

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Fakulta přírodovědecká

Katedra analytické chemie

**OPTIMALIZACE POSTUPU PRO STANOVENÍ STŘÍBRA
V OBVAZOVÝCH MATERIÁLECH POMOCÍ ICP-MS**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor práce:

Bc. Radka Pechancová

Studijní obor:

Analytická chemie

Vedoucí práce:

Ing. David Milde, Ph.D.

Olomouc 2016

SOUHRN

Tato diplomová práce pojednává o vývoji metody pro stanovení stříbra v obvazových materiálech pomocí hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem. Jsou zde zmíněny základní poznatky o instrumentaci a principu fungování hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem a současné poznatky jeho využití při analýze vzorků se stříbrem, zejména různých druhů textilií a obvazových materiálů. Dále je práce zaměřena na rozklady vzorků a použití stříbra v medicíně. Experimentální část obsahuje vývoj metody pro stanovení iontového stříbra a stříbra ve formě nanočástic v různých obvazových materiálech. Jedná se zejména o optimalizaci rozkladů vzorků, stanovení linearitu, pravdivosti, preciznosti, meze detekce a meze stanovitelnosti metody. Následně bylo provedeno několik experimentů s obvazovými materiály, kde bylo zjištěno množství stříbra, které se z těchto materiálů uvolňuje, což je významný ukazatel při použití v medicíně.

SUMMARY

This thesis deals with the development of methods for the determination of silver in wound dressing by inductively coupled plasma mass spectrometry. Basic knowledge about instrumentation and operating principle of mass spectrometry with inductively coupled plasma and current knowledge of its applications in the analysis of samples with silver, especially various kinds of textiles and even wound dressing materials are mentioned. Further work is focused on the decomposition of the samples and the use of silver in medicine. Experimental part of this work includes mainly the development of methods for the determination of ionic silver and silver nanoparticles in various dressing materials. It means optimizing of the decomposition of the samples, determining the linearity of calibration, accuracy, precision, limit of detection and limit of quantification. Subsequently several experiments were performed on dressing materials in order to find the amount of released silver, which is an important indicator for applications in medicine.

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

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

V Olomouci dne

.....

Tímto bych chtěla poděkovat vedoucímu mé diplomové práce Ing. Davidu Mildemu, Ph.D. za odborné vedení, čas a pomoc při řešení dané problematiky.

Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Šárce Hradilové, Ph.D. za spolupráci a odbornou pomoc při experimentech s obvazy. V neposlední řadě bych ráda poděkovala Katedře analytické chemie a Regionálnímu centru pokročilých technologií a materiálů, Přírodovědecké fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci za zprostředkování přístrojů, chemikálií a vzorků pro mou diplomovou práci.

OBSAH

1. ÚVOD.....	1
2. TEORETICKÁ ČÁST.....	2
2.1. Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem	2
2.1.1. Instrumentace ICP-MS	3
2.1.1.1. Zavádění vzorku do plazmatu.....	4
2.1.1.2. Plazma jako zdroj iontů	8
2.1.1.2.1. Stejnoseměrně vázané plazma.....	9
2.1.1.2.2. Mikrovlnné indukované plazma	9
2.1.1.2.3. Indukčně vázané plazma.....	10
2.1.1.3. Interface	13
2.1.1.4. Iontová optika	14
2.1.1.5. Hmotnostní analyzátory.....	15
2.1.1.6. Detektory	18
2.1.2. Interference v ICP-MS.....	21
2.1.2.1. Spektrální interference.....	21
2.1.2.2. Eliminace spektrálních interferencí	23
2.1.2.3. Nespektrální interference.....	28
2.2. Rozklady vzorku.....	29
2.2.1. Otevřené rozklady.....	29
2.2.2. Uzavřené rozklady.....	30
2.2.2.1. Interakce mikrovlnného záření s látkou.....	30
2.2.2.2. Materiály rozkladných nádob a ochranných plášťů.....	32
2.3. Stříbro	32
2.3.1. Výskyt.....	32
2.3.2. Výroba	33
2.3.3. Toxicita stříbra.....	33
2.3.4. Nanočástice.....	34
2.3.4.1. Syntéza nanočástic.....	34

2.3.5. Iontové stříbro.....	36
2.3.6. Antimikrobiální aktivita.....	36
2.3.7. Bakteriální rezistence.....	37
2.4. Lékařské využití stříbra	37
2.4.1. Léčba ran pomocí stříbra	38
2.4.1.1. Mepilex Ag	40
2.4.1.2. Aquacel Ag	41
2.4.1.3. Atrauman Ag.....	41
2.4.1.4. Náplasti se stříbrem	42
2.5. Využití ICP-MS při stanovení stříbra	42
2.5.1. Stanovení stříbra uvolněného z různých typů textilií (oblečení)	42
2.5.2. Stanovení uvolněného stříbra ze 4 různých druhů obvazů	44
2.5.3. Aplikace metod pro stanovení stříbra v polymerních obvazech.....	46
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	48
3.1. Chemikálie, pomůcky a přístroje	48
3.1.1. Chemikálie	48
3.1.2. Pomůcky	49
3.1.3. Přístroje.....	49
3.1.4. Analyzované vzorky	51
3.2. Rozklady vzorků.....	52
3.3. Příprava kalibračních roztoků.....	54
3.4. Příprava roztoku interního standardu.....	54
3.5. Optimalizace složení roztoků po rozkladu.....	55
3.6. Měření pomocí ICP-MS.....	56
3.7. Inkubace obvazových materiálů	57
3.8. Analýza obvazových materiálů pomocí SEM-EDS	58
4. VÝSLEDKY A DISKUSE	59
4.1. Validace metody	59
4.2. Vyhodnocení výsledků	63
4.2.1. Stanovení stříbra v komerčně dostupných obvazových materiálech.....	63

4.2.2. Studium rovnováhy NH_4OH	64
4.2.3. Inkubace obvazových materiálů	69
4.3. Diskuse	74
5. ZÁVĚR	76
6. LITERATURA	78
7. SEZNAM ZKRATEK	81
8. PŘÍLOHY	82

1. ÚVOD

Tato diplomová práce se zabývá uplatněním hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem v prvkové analýze obvazových materiálů, zejména v analýze stříbra. Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS) je jedna z nejuniverzálnějších elementárních metod, která umožňuje stanovení asi 70 prvků v širokém koncentračním rozsahu a vyznačuje se především velmi nízkými mezemi detekce. Většinu vzorků však nelze analyzovat přímo, ale musí dojít k jejich úpravě či rozkladu. V případě pevných vzorků jako jsou i obvazy jde zejména o mikrovlnný rozklad. Tento typ rozkladu je efektivnější, probíhá mnohem rychleji a dokonce dochází k rozkladu organických matric. Další výhodou je uchování těkavých látek v systému, což nezpůsobí jejich ztráty.

Stříbro bylo a je díky své antimikrobiální aktivitě hojně využíváno v různých lékařských výrobcích, jako jsou masti nebo roztoky, z nichž každý může obsahovat jiný typ stříbrné sloučeniny a dle toho také vykazovat odlišné vlastnosti. Obvykle obsahují nanočástice stříbra (koloidní roztoky stříbra), stříbrné proteiny nebo soli stříbra (AgCl , AgNO_3 , Ag_2SO_4). Hlavním problémem ale bývá malé množství stříbra, které se z takových látek uvolňuje, nedostatečné pronikání, rychlá spotřeba a přítomnost dusičnanů, které zpomalují hojení. Často dochází k barvení pokožky, nerovnováze elektrolytů a v neposlední řadě jsou takovéto komplikace nepohodlné pro pacienta. Inovací ve výrobě léčiv se stříbrem je systém, kde je stříbro začleněno (obvaz). Dnes je už známo množství systémů, hlavně obvazů či náplastí, které se velmi často používají ve zdravotnictví k léčbě popálenin či mokvajících ran. Význam stříbra tedy spočívá v antibakteriální aktivitě, na kterou na rozdíl od antibiotik nevzniká rezistence. Na druhou stranu ale na léčbu může být použito jen omezené množství, protože při použití vysoké koncentrace dochází k modrání zasažené tkáně a dalším komplikacím. Z těchto důvodů je žádoucí vyvíjet metody pro stanovení stříbra, a tak kontrolovat jejich množství ve zdravotnických prostředcích.

Cílem této práce je tedy vyvinout metodu pro stanovení stříbra v obvazových materiálech a potvrdit obsah stříbra ve 4 vybraných materiálech. Protože důležitým kritériem obvazu je uvolňování stříbra do rány, dalším cílem je inkubace obvazů ve vodě a fyziologickém roztoku. Nakonec byla detailně studována rovnováha v roztoku stříbra po rozkladu materiálů.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem

Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS) je jedna z nejuniverzálnějších elementárních metod, které jsou dnes dostupné. Typy vzorků, které lze měřit, sahají od mořské vody či skalních útvarů až po ultračisté chemikálie, ve kterých lze stanovit téměř všechny kovové prvky periodické tabulky. Také měřitelné koncentrace sahají od nízkých (ng l^{-1}) až po vysoké (mg l^{-1}). Tato univerzálnost tedy přispěla k nárůstu popularity této techniky a zejména v analytické chemii je dnes hojně využívána.

Od spuštění prvního komerčně dostupného přístroje s kvadrupólovým analyzátozem v roce 1983 byla metoda podrobena mnoha automatizacím, a tak dnes máme k dispozici velmi citlivé, kompaktní analytické přístroje. V praxi lze měřit jak kapalné, tak i pevné vzorky, které pocházejí z životního prostředí, potravinářství, kde se jedná zejména o detekci cizorodých látek či určování místa původu. Dále se ICP-MS využívá v polovodičovém průmyslu ke kontrole kvality výrobků či čistoty, pro klinické a farmaceutické analýzy, v geologii, ve forenzních vědách atd. Neméně důležité je i využití ICP-MS pro prvkovou speciální analýzu, kde je tato metoda spojena s chromatografickými aplikacemi jakou jsou CE, HPLC nebo GC s on-line detekcí.^{1,2}

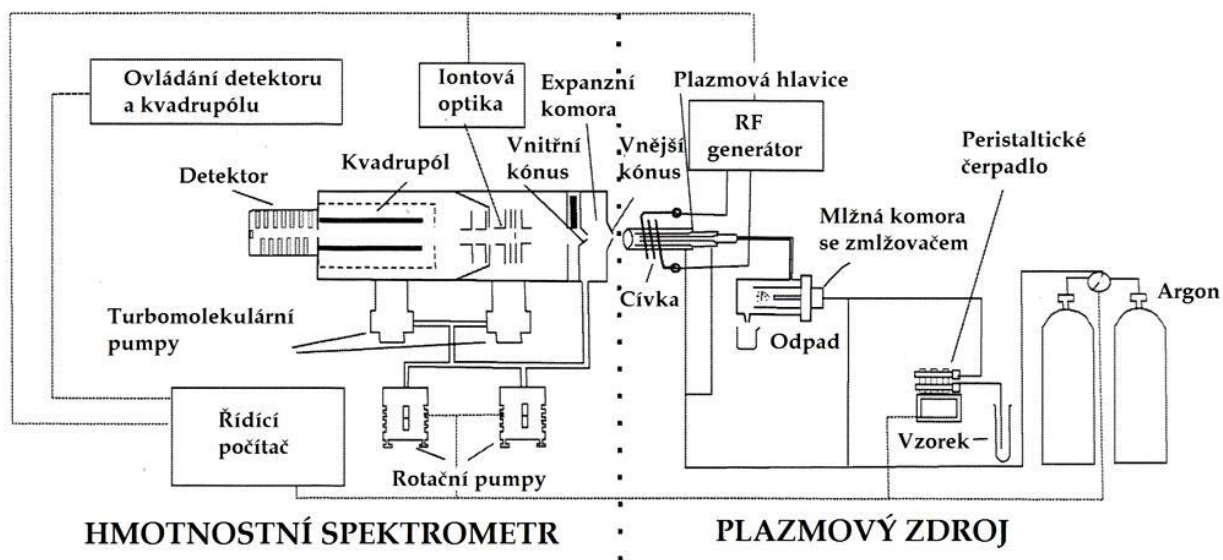
ICP – MS má mnoho výhod, díky kterým je dnes tato metoda hojně využívána:^{1,2}

- nejlepší LOD ze všech metod atomová spektrometrie, a tak lze stanovovat velmi nízké koncentrace (ng l^{-1})
- snadná speciální analýza
- lze měřit izotopická zastoupení
- multielementární analýza
- téměř žádné nespektrální interference
- měření kapalných i pevných vzorků
- rychlé analýzy, možnost automatizace

ICP–MS nemá ale jen samé výhody. Mezi největší nevýhody patří vysoké pořizovací náklady a pak také provozní náklady. Dále pak nemožnost detekce neutrálních částic.^{1,2}

2.1.1. Instrumentace ICP – MS

Mezi základní části patří část ICP a část MS. Do části ICP lze zahrnout přívod vzorku, plazmovou hlavici, peristaltické čerpadlo, zmlžovač a mlžnou komoru. Všechny části pracují za atmosférického tlaku. Do části MS spadá hmotnostní analyzátor, iontová optika a detektor. Tyto části se ale nacházejí ve vysokém vakuu. Přechod z atmosférického tlaku do vakua tak vyžaduje další důležitou část, která se nazývá interface. Obrázek č. 1 popisuje celkové schéma přístroje.^{1,2,3}



Obr.1 Schéma ICP – MS⁶

Interface se skládá z kovových kuželů (konusů), které zajišťují rychlý přechod iontů z atmosférické části do evakuované. Tyto konusy jsou vyrobeny z kovu s tepelnou vodivostí a odolností proti kyselinám, nejčastěji z Pt nebo Ni. Jsou chlazeny vodou a ve středu se nacházejí malé otvory. Problémem bývají vzorky, které obsahují velké množství solí, neboť dochází k ucpávání otvorů. Snížení tlaku pak zajišťují pumpy, nejčastěji rotační a turbomolekulární.

Principem metody je nejčastěji zavádění kapalného vzorku, ze kterého díky inertnímu plynu a zmlžovači vzniká v mlžné komoře aerosol, který se dostává do plazmové hlavice. Zde je vzorek ionizován a veden přes interface do hmotnostního analyzátoru, kde je separován podle m/z. Dopadem elektronů na detektor vzniká elektrický proud, který je převáděn na signál.^{1,2,3,4}

2.1.1.1. Zavádění vzorku do plazmatu

Technika ICP–MS v současné době umožňuje analýzu všech typů vzorků, tedy jak pevných a kapalných, tak i plyných. Nejčastěji se využívají kapalné vzorky, které se převádějí na aerosol v mlžné komoře. Pevné vzorky lze analyzovat za využití laserové ablace, výbojové abraze nebo elektrotermického vypařování. Speciální technikou pro analýzu plyných vzorků je pak generování těkavých hydridů HG–ICP–MS. Zavádění vzorku je ale problematickým krokem, neboť může docházet k problémům se stabilitou, dostatečným vypařením, či vznikem aerosolu a ovlivňuje tak celkovou kvalitu měření a konečné výsledky.^{1,2,3}

A. Kapalné vzorky

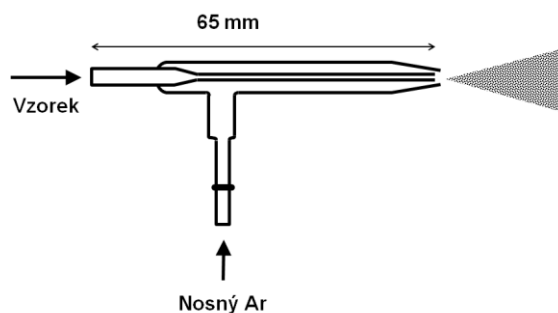
Jedním z nejvíce využívaných způsobem přímého zavádění kapalného vzorku do přístroje je generování aerosolu a následná filtrace pro zbavení hrubších částí, které by se mohly dostat do plazmatu. Zavedení vzorku udává kvalitu konečných výsledků, a tak je na jeho provedení kladen velký důraz. Obecně se systém pro zavedení vzorku skládá ze dvou částí: ze zmlžovače, který mění kapalinu na aerosol a z mlžné komory, která udává maximální velikost kapek, které projdou do plazmatu (obvykle 10 μm).^{1,2}

Koncentrický zmlžovač (guide)

Zmlžování probíhá zavedením roztoku kapilárou k plynu (Ar), který proudí velkou rychlostí pod tlakem 0,13 - 0,22 bar. Vzorek je tak nasáván až na konec kapiláry a pak rozprášen. Tento typ zmlžovače popisuje obrázek č. 2. Většina těchto zmlžovačů je vyrobena z borosilikátového skla nebo křemene. Nejčastější průtoky jsou 1 – 3 ml min⁻¹. Nižší průtoky se používají pro těkavější vzorky jako například organická rozpouštědla. Vysokou citlivost vykazují pro čisté vzorky, u složitějších matic může docházet k ucpání kapiláry.^{1,2}

Mikrokoncentrický zmlžovač

Nový typ zmlžovače, který byl vyvinut zejména pro nižší průtoky, se nazývá mikrokoncentrický. Obvykle se pracuje s průtoky nižšími než 0,1 ml min⁻¹. Funguje podobně jako koncentrický zmlžovač, ale s mnohem vyšším tlakem plynu. Výhodou je, že vytváří mnohem menší kapičky, a tak je i účinnější. Tyto zmlžovače jsou vyrobeny z polymerních materiálů jako je PTFE, PFA a PVF. Jsou tedy velmi odolné vůči korozi. Nevýhodou je ale použití jemných kapilár, které neodolají vysokým koncentracím. Lze je tedy použít u malých množství vzorku nebo ve spojení s HPLC.^{1,2}



Obr. 2 Mikrokoncentrický zmlžovač²⁹

Ultrazvukový zmlžovač

Tento typ obsahuje mnohem složitější konstrukci, tudíž má i vyšší pořizovací náklady. Naopak účinnost dosahuje 70 – 80 %. Aerosol je generován vibracemi piezoelektrického krystalu a proudem inertního plynu je veden dále do zmlžovače. Vyhřátou trubicí, kterou proudí, je pak

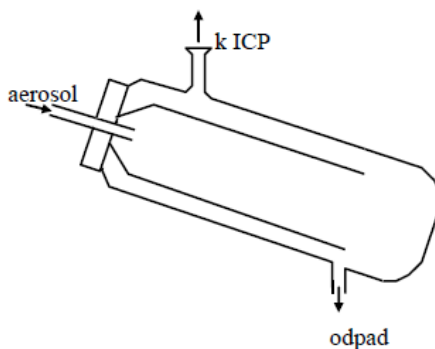
odpařeno přebytečné rozpouštědlo. Výhodou je převedení veškerého vzorku na aerosol. Nevýhodou jsou ale velké paměťové efekty.^{1,2}

MLŽNÉ KOMORY

Druhou neméně důležitou součástí systému pro zavádění kapalných vzorků je mlžná komora. V současné době se nejčastěji používají dva typy: s dvojitým průchodem vzorku (Scottova) a cyklónická. Jak už bylo řečeno, jejich funkcí je odstranění velkých kapek a dále ještě vyhlazení pulzů, pocházejících z peristaltického čerpadla zmlžovače. Některé mlžné komory obsahují navíc vnější chlazení kvůli tepelné stabilitě vzorků. Díky tomu dochází k nasávání menšího množství rozpouštědla, což minimalizuje časovou nestabilitu signálu a přítomnost oxidů.^{1,2,4}

- Mlžná komora s dvojitým průchodem vzorku

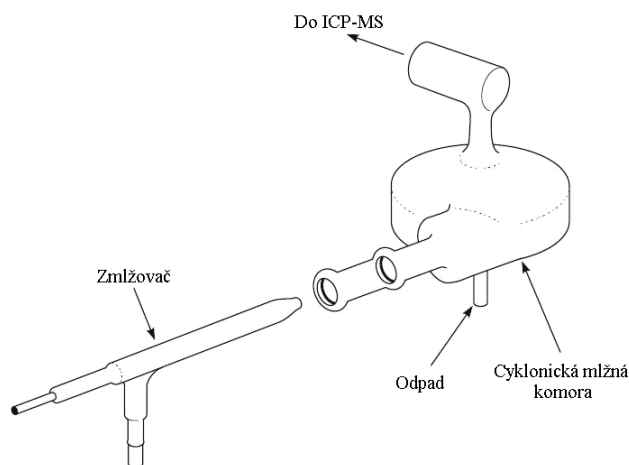
Nejběžnější mlžnou komoru tohoto typu je Scottova mlžná komora. Dochází zde k výběru malých kapiček nasměrováním aerosolu do hlavní trubice, větší kapky jsou vytěsněny z trubice a gravitací vypouštěcí trubicí odchází pryč. Mlžná komora se tedy skládá ze dvou trubic, které jsou k sobě orientovány o 180 °, jak je vidět na obrázku č. 3.



Obr. 3 Scottova mlžná komora³⁰

- **Cyklónická mlžná komora**

Tento typ mlžné komory používá odstředivou sílu. Kapky jsou separovány díky víru, který vytváří tangenciální tok aerosolu a argonu uvnitř komory. Menší kapičky jdou spolu s plynem dále a větší dopadají na stěny a odcházejí odtokem. Tento typ se vyznačuje vyšší účinností, citlivostí a nižší mezí detekce. Konstrukčním materiálem je nejčastěji sklo, křemen nebo různé polymery.^{1,2,4}



Obr. 4 Cyklónická mlžná komora a koncentrický zmlžovač¹

B. Zavádění pevných vzorků

Použití klasické ICP–MS instrumentace se systémem zmlžovač a mlžná komora má určitá omezení, zejména pokud se jedná o analýzu komplexních vzorků. Analýza pevných vzorků tímto systémem není možná, suspenze už analyzovat lze, ale proces je velmi obtížný. Dalším problémem je možná kontaminace vzorků při jejich přípravě nebo výrazné spektrální interference díky rozpouštědlům. Navíc při použití organických rozpouštědel je situace ještě více obtížná. Matrice musí být odstraněna offline a použití vnitřních standardů je rovněž velmi problematické a časově náročné.

Díky těmto problémům byly zavedeny metody pro analýzu pevných vzorků, které nelze převést do roztoku či nějakým způsobem rozložit. Mezi nejběžněji využívané patří laserová ablace a elektrotermické vypařování.^{1,2}

Laserová ablace

Pro generování suchého aerosolu se používá laser. U této metody je možná jak povrchová, tak i hloubková analýza. Po ablaci (leptání) se aerosol odvádí proudem argonu dále. Jako laser se používá neodymový (Nd:YAG) – syntetický polykrystal yttrium-aluminiového granátu, kde jsou některé yttriové ionty nahrazeny neodymovými. Základní vlnová délka je 1064 nm, umožňuje pracovat při frekvencích 532, 355, 266 a 213 nm. Dalším typem laseru je excimerový (plynový) laser, jehož vlnová délka závisí na použitém plynu (ArF, XeCl, KrF). Často se používá 193 nm. Tuto metodu lze použít pro jakýkoliv pevný vzorek z oblasti geologie, paleontologie, biologie (tkáň, kosti, zuby, porcelán, umělecká díla, ...). Problémy se ale objevují s nedostatkem kalibračních materiálů. ^{1,2}

Elektrotermické vypařování

Tato metoda využívá použití uhlíkové pece nebo grafitového vlákna k tepelnému oddělení analytu od složek matrice. Toho se dosahuje vstříkáním malého množství vzorku (20 - 50 µl z autosampleru) do grafitové kyvety nebo kovového vlákna, kde dochází k sušení, pyrolýze a pak vypařování pomocí teplotního programu. Výhodou je, že ionizace a vypařování se provádí odděleně, což umožňuje snadnou optimalizaci. Dále lze eliminovat složky matrice, což sníží spektrální i nespektrální interference. Nevýhodou je vznik přechodových signálů během jednotlivých stupňů procesu. ^{1,2}

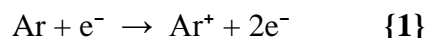
2.1.1.2. Plazma jako zdroj iontů

PLAZMA je ionizovaný plyn obsahující dostatečný počet kladně nabitých (iontů) a záporně nabitých částic (elektronů), který je navenek elektroneutrální. Celá soustava je elektricky vodivá. Plazma se vyznačuje kolektivním chováním: změny v jednom místě vyvolávají změny i na vzdálených místech. U plynů je ovlivňováno jen blízké okolí, proto se plazma také označuje jako 4. typ skupenství. Od plynu se kvůli přítomnosti nabitých částic významně liší svou viskozitou a tepelnou vodivostí. ^{1,2}

Přechod plynu na plazma se uskutečňuje dodáním energie, která převyšuje ionizační energii přítomných atomů plazmatu. Na rozdíl od plamene, který se jednou zapálí a hoří neustále, dokud je přiváděn plyn, u plazmatu je nutné dodávat vnější energii ve formě elektrického pole, aby docházelo k ionizaci plynu a udržení plazmatu. Následně je část energie z plazmatu přenášena na vzorek a dochází k excitaci a ionizaci. Plazma lze podle typu elektrického pole dělit na stejnosměrně vázané plazma, mikrovlnně indukované plazma a indukčně vázané plazma.^{1,2}

Plazma můžeme vytvořit z libovolného plynu, používají se ale hlavně inertní, monoatomické plyny jako je He nebo Ar. Ionizační energie He je 24,6 eV, jeho iniciace je obtížná, navíc je velmi drahé. Avšak za jeho použití lze měřit téměř všechny prvky. Ionizační energie Ar je 15,8 eV. Má nižší tepelnou vodivost než He a neionizuje He, Ne a F. Používá se ale nejčastěji. Poskytuje jednoduché spektrum ve srovnání s plameny, kde vznikají molekulární spektra. Nedochozí ke vzniku stabilních sloučenin mezi Ar a analytem.^{1,2}

Princip ionizace: elektrické pole urychluje elektrony v plazmatu, které následně ionizují plazmový plyn.^{1,2}



2.1.1.2.1. Stejnosměrně vázané plazma (Direct Current Plasma - DCP)

DCP se tvoří, když je plyn (obvykle Ar) zaváděn do proudu mezi 2 nebo 3 elektrody. Ionizace plynu tvoří tvar písmene Y, který má i výsledné plazma. Anoda je obvykle konstruována z uhlíku a katoda z wolframu. Výhodou je možnost analýzy pevných vzorků či suspenzí, avšak převažují nevýhody, například častá výměna uhlíkových elektrod, které se spotřebovávají, tvorba interferencí a nestabilita. Proto se tento typ v praxi moc nevyužívá.^{1,2}

2.1.1.2.2. Mikrovlnně indukované plazma (Microwave Induced Plasma - MIP)

Mikrovlnná plazmata jsou generována v magnetronech s pracovní frekvencí 1–5 GHz, obvykle 2,45 GHz. MIP pracuje za atmosférického tlaku s Ar nebo He o průtoku 1 l min⁻¹. Z magnetronu je MW záření vedeno rezonanční dutinou do výbojové trubice (z křemene nebo skla) a udržuje plazma. Dosahuje se zde velmi vysokých excitačních teplot (až 9000 K), ale

teplota plazmového plynu je nízká (1000 K), při měření kapalných vzorků tak může docházet ke zhášení nebo se mohou objevovat významné efekty matrice. He MIP se používá jako detektor pro GC, a to jak u emisních spekter, tak i pro nekovové prvky – O, S, P, Cl, ...^{1,2}

2.1.1.2.3. Indukčně vázané plazma (Inductively Coupled Plasma ICP)

Dominantní oblastí výzkumu jak pro optickou emisní spektrometrii tak i hmotnostní spektrometrii je ICP. Poprvé bylo použito roku 1964 a ukázalo na velký význam ICP jako budícího zdroje. V 80. letech pak bylo poprvé použito se spojením s hmotnostní spektrometrií jako zdroj pro generování iontů. ICP vzniká díky 3 částím přístroje: plazmová hlavice, indukční cívka a RF generátor.^{1,2}

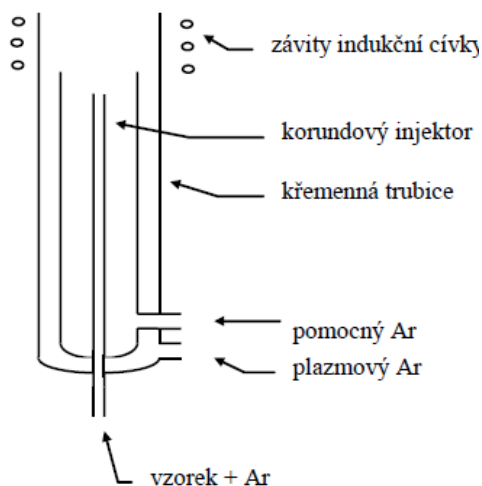
ICP výboj

Plyn je přiváděn tangenciálním směrem do hlavice, směřuje mezi vnější trubice křemenné hlavice. Indukční cívka (obvykle měděná) obklopuje horní konec hlavice a je spojena s RF generátorem. Když plyn projde plazmovou hlavicí uprostřed indukční cívky, na cívku je vloženo radiofrekvenční energie (750 – 1500 W) a vzniká střídavý proud, který osciluje uvnitř cívky a má stejnou frekvenci jako radiofrekvenční generátor (27 nebo 40 MHz). Tato oscilace vytvoří elektromagnetické pole, plyn v tomto poli je pulzem z Teslova generátoru (ionizační impulz) ionizován a některé elektrony jsou odtrženy od atomů plynu. Ty se potom srážejí s dalšími atomy a tzv. kolizí indukovanou disociací vzniká plazma. Po zažehnutí je plazma udržováno indukční vazbou: radiofrekvenční proud prochází cívkou a vytváří magnetické pole s vektorem intenzity rovnoběžným s hlavicí. Elektrony uvnitř jsou urychleny magnetickým polem a svou energii předávají atomům plynu, který se zahřívá a ionizuje, tak vznikají další elektrony. Tímto procesem se po celou dobu udržuje plazma, pokud je dodáván radiofrekvenční proud.^{1,2,3}

Plazmová hlavice

Plazmová hlavice se obvykle skládá ze tří soustředných trubic, které jsou vyráběny z křemene (Obr. 5). Hlavice mohou být vyráběny v jednom celku, kde jsou všechny tři trubice

spojeny, nebo jsou kombinované, kdy je injektor odnímatelný. Plazmová hlavice obsahuje tedy 3 křemenné trubice a indukční cívku, můžeme zde rozpoznat tři toky plynu třemi trubicemi (nejčastěji je to Ar). První tok se používá pro tvorbu plazmatu a je umístěn mezi vnější a střední trubicí. Jeho průtok je $12 - 17 \text{ l min}^{-1}$. Druhý proud plynu slouží jako pomocný plyn, prochází mezi střední trubicí a injektorem. Slouží ke stabilizaci výboje a chlazení (odděluje plazma od trubice). Jeho průtok je asi 1 ml min^{-1} . Třetí proud má průtok 1 l min^{-1} a používá se k zavedení vzorku ve formě aerosolu, vytváří tak analytický kanál. Injektor je často vyroben z jiných materiálů než ostatní trubice. Kromě křemenu se používá i oxid hlinitý, platina a safír (v případě vysoce korozivních materiálů). Plazmová hlavice je umístěna horizontálně 10 – 20 mm od interface a má 3 hlavní úkoly: izoluje plazma od cívky, usměrňuje tok plynů a umožňuje zavedení vzorku do výboje.^{1,2,3}



Obr.5 Schéma plazmové hlavice³⁰

Indukční cívka

Cívka používaná v ICP–MS se mírně liší od té, která se používá v ICP–OES. Důvodem je plazmový výboj, kde vzniká potenciálový rozdíl několika set voltů díky vazbě RF cívky a plazmatu. V ICP–MS by to mělo za následek sekundární výboje mezi plazmatem a interface, což

může negativně ovlivnit výkon přístroje. Indukční cívka tak musí být uzemněna, aby byl rozdíl potenciálů co nejnižší. Cívka je přímo napojena na vysokofrekvenční generátor.^{1,2}

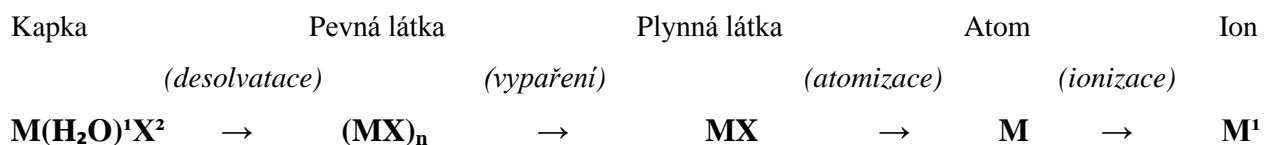
RF generátor

První RF generátory využívaly dusík nebo vzduch o výkonu 5 – 10 kW k udržení plazmového výboje a občas zabíraly i polovinu místnosti. Dnešní generátory jsou tvořeny pomocí solid-state součástek, což znamená, že pro výkon není vyžadováno vakuum. To činí tyto zařízení mnohem menší a také spolehlivější. Hodně důležitá je účinnost vazby RF generátoru k cívce. Většina RF generátorů pracuje s účinností 70 – 75 %, tedy 70 – 75 % dodané energie produkuje plazma.^{1,2}

Ionizace vzorku

Hlavním centrem ionizace vzorku je plazmový výboj. Aerosol vzorku přichází do injektoru z mlžné komory. Při výstupu z injektoru se pak pohybuje takovou rychlostí, že praktický udeří do plazmového výboje. Vzorek pak prochází několika změnami, které začínají v přehřívací zóně a pokračují v zóně zářivé. Například pokud se jedná o kovovou sůl v roztoku, prvním krokem je desolvatace na kapičky. Pak vznikají malé pevné částice, které putují dále do plazmatu, kde se nejprve mění na plynnou formu a poté na základní atom. Finální přeměna na ionty se děje srážkami elektronů argonu se základními atomy. Ionty jsou pak směřovány do hmotnostního spektrometru.^{1,2}

Schéma I Ionizace vzorku¹



Ionizační mechanismy: ²⁹

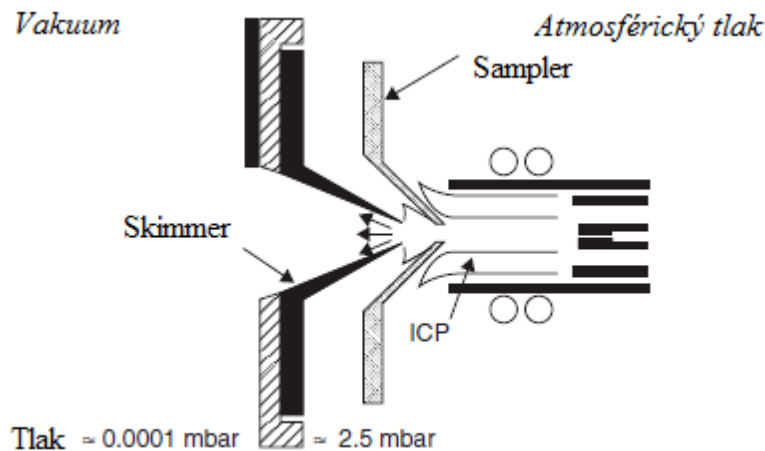
1. Přenos náboje: $\text{Ar}^+ + \text{M} \rightarrow \text{M}^{+*} + \text{Ar} + \Delta\text{E}$ {2}
2. Penningova reakce: $\text{Ar}^m + \text{M} \rightarrow \text{M}^{+*} + \text{Ar} + \text{e}^- + \Delta\text{E}$ {3}
3. Srážka s elektronem: $\text{M} + \text{e}^- \rightarrow \text{M}^+ + 2\text{e}^-$ {4}

2.1.1.3. Interface

Úloha oblasti interface je přepravovat ionty efektivně a trvale z plazmatu, který je při atmosférickém tlaku (1 bar), k oblasti analyzátoru hmotnostního spektrometru na přibližně 13 – 8 mbar.

Interface se skládá z 2 – 3 kovových kuželů (konusů) s velmi malými otvory, které jsou udržovány pod vakuem 1,3 – 2,6 mbar hrubou mechanickou pumpou. Poté, co jsou ionty generovány v plazmatu, procházejí prvním konusem, který je také známý jako vzorkovací (sampler). Jeho otvor má asi 0,8 – 1,2 mm. Expanzní komorou je nazýván prostor mezi oběma konusy, kde je udržován tlak 2 – 5 mbar pomocí rotačních pump. Díky nižšímu tlaku jsou ionty urychleny a putují dále ke sběrnému konusu (skimmer), který je menší, ale ostřejší. Má také menší otvor (0,4 – 0,8 mm). Oba konusy jsou obvykle vyrobeny z niklu, lze ale použít i jiné materiály jako je platina, která je odolnější ke korozivním kapalinám. Ke snížení tepelných účinků plazmatu se jako chladicí medium používá voda, která je v chladicím bloku. Ten je také tvořen z materiálu, který dobře odvádí teplo, například měď nebo hliník. Z druhého konusu jsou ionty řízeny iontovou optikou přímo do hmotnostního analyzátoru.

Interface je velice důležitá součást ICP–MS, navíc je hodně náchylná k různým destrukcím, například k zanášení otvorů konusů solí ze vzorku. Schéma interface popisuje obrázek č. 6.^{1,2}



Obr. 6 Interface¹

2.1.1.4. Iontová optika

Další důležitou součástí ICP–MS je iontová optika. Je obvykle umístěna mezi skimmerem a hmotnostním analyzátozem a tvořena minimálně jednou elektrostaticky řízenou čočkou. Umístěna je pod vakuem 12 – 4 mbar, které je udržováno turbomolekulární pumpou. Tato optika není stejná jako u zařízení optické emise či atomové absorpce, ale skládá se ze systému desek, sudů nebo válců, na které je vloženo napětí.

Funkce iontové optiky je odvádět ionty z plazmatu za atmosférického tlaku přes interface a nasměrovat je do hmotnostního analyzátozu, který je pod vysokým vakuem. Částice neiontové povahy jako jsou neutrální částice a fotony jsou určitou bariérou odstraněny, a tak jim je zamezen přístup do detektoru. Tyto částice nejsou ovlivňovány elektromagnetickým polem, na čemž je zaleženo jejich odstranění. Existují dva typy eliminace. Prvním typem je umístění zarážky přímo do dráhy iontů – in-line. Neutrální částice se zde zastaví a ionty jsou vychýleny elektrickým polem, aby se vyhnuly bariéře. Druhým typem je eliminace off-axis, kde osa hmotnostního analyzátozu je vychýlena o 45° vůči interface. Ionty jsou opět vychýleny pomocí elektromagnetického pole a ostatní částice jsou zachyceny na bariéře v ose proudu vstupujících

iontů. Neutrální částice je nutné odstranit, protože způsobují nestabilitu signálu a přispívají k signálu pozadí. Některé iontové optiky obsahují ještě extrakční čočky za posledním konusem, které zlepšují extrakci lehčích prvků.^{1,2}

2.1.1.5. Hmotnostní analyzátory

K separaci iontů podle jejich molární hmotnosti se využívají hmotnostní analyzátory. V ICP–MS se nejčastěji využívají sektorové analyzátory, kvadrupólový analyzátor a průletový analyzátor. Po separaci se měří relativní zastoupení iontů pro každou hmotnost a je nutný průchod iontů bez kolizí. Celý hmotnostní spektrometr, tedy i analyzátor, je uchováván při nízkém tlaku $10^{-8} - 10^{-6}$ torr pomocí turbomolekulárních pump. Tento nízký tlak je nezbytný, aby se zabránilo nežádoucím srážkám mezi ionty a neutrálními částicemi mezi ionizací a detekcí a také z instrumentálních důvodů: nízký tlak zabraňuje přepálení odporového drátku, který vytváří ionizující elektrony v iontovém zdroji. Významným parametrem pro výběr hmotnostního analyzátoru je rozlišovací schopnost, která je definována:

$$R = \frac{m}{\Delta m} \quad \{5\}$$

m je hmotnost analyzovaného signálu, Δm je šířka signálu v 10% výšky^{1,2,5,8}

- **Sektorový analyzátor (Sector Field – SF)**

Před objevením kvadrupólového analyzátoru byla technologie magnetického sektoru nejvíce využívána pro dělení na základě hmotnosti a to hlavně pro anorganické ionty. Analyzátor s jednoduchou magnetickou fokusací se tak hojně používal až do počátku 80. let. Jelikož se ale objevil problém u polyatomických spektrálních interferencí, pomalu se začalo přecházet na analyzátor s dvojitou fokusací.^{1,2}

Sektorový analyzátor s dvojitou fokusací

Tento typ analyzátoru se skládá ze dvou sektorů a to z magnetického a elektrického. Při vstupu z iontového zdroje do elektrického sektoru mají ionty kinetickou energii $z \cdot V = m \cdot v^2/2$.

V elektrickém poli na ně působí dostředivá síla $F = z \cdot E$ (E je intenzita elektrického pole). Stejně jako u jednoduchého sektoru zde dochází k rovnováze se silou odstředivou:

$$E \cdot z \cdot v = m \cdot v^2/r. \quad \{6\}$$

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

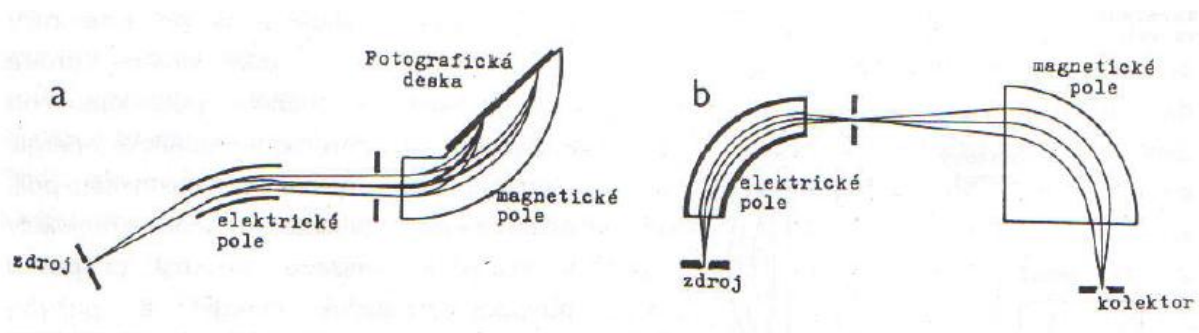
K samotné separaci iontů podle jejich poměru m/z dochází v magnetickém sektoru. Na ionty působí magnetické pole, které ovlivňuje jejich trajektorii v závislosti na hmotnosti a energii iontů. Dochází k zakřivení jejich dráhy letu o daný poloměr r . Z rovnice {7} je patrné, že při konstantní magnetické indukci B a urychlovacím napětím V je poloměr dráhy letu r daný poměrem m/z .

$$m/z = B^2 \cdot r^2/2V \quad \{7\}$$

Poloměr zakřivení dráhy v elektrickém sektoru lze tedy vyjádřit: $r = 2V/E$. Ionty urychlené potenciálem V v elektrickém poli o konstantní E mají také stejné poloměry zakřivení drah. Na výstupní štěrbinu tedy dopadají ionty s různou efektivní hmotností ale se stejnou kinetickou energií. Do magnetického sektoru pak vstupuje iontový svazek se stejnou energií, což zvyšuje rozlišovací schopnost analyzátoru.

Tyto analyzátoru lze podle geometrického uspořádání magnetického a elektrického sektoru dělit na uspořádání podle Mattaucha a Herzoga a podle Niera a Johnsona (Obr. 7). U prvního typu se v elektrickém sektoru ohýbá svazek iontů o 30° a v magnetickém sektoru pak o 90° na druhou stranu. U uspořádání dle Niera a Johnsona se svazek v magnetickém sektoru ohýbá o 60° , v elektrickém pak o 90° . Ionty vstupují nejprve do elektrického a pak do magnetického sektoru. Existují ale i přístroje s inverzním uspořádáním, kdy vstupují nejprve do magnetického a pak do elektrického sektoru., což umožňuje studovat i fragmentační cesty.

Analyzátoru s dvojitou fokusací mají nejvyšší rozlišovací schopnost, $R = 10\,000$.^{1,2,5,8}



Obr. 7 Příklady geometrického uspořádání sektorových analyzátorů s dvojitou fokusací:

a) podle Mattaucha Herzoga, b) podle Niera a Johnsona ⁸

- **Kvadrupólové analyzátoary**

Kvadrupólové analyzátoary byly vyvinuty na počátku 80. let a v dnešní době zaujímají 85 % analyzátoarů ve spojení s ICP–MS. Tento analyzátoar nevyužívá magnetické pole, ale elektrické pole vložené na čtyři rovnoběžné, pravidelně uspořádané, precizně opracované kovové tyče kruhového průřezu o délce asi 15 - 25 cm a průměru 1 cm. Vyrobeny jsou typicky z nerezové oceli nebo molybdenu a někdy jsou pokryty keramickou vrstvou kvůli ochraně proti korozi. Pracuje se při frekvenci 2 – 3 MHz.

Na jednu dvojici protilehlých tyčí (elektrod) je vloženo kladné stejnosměrné napětí, na druhou stejná hodnota záporného stejnosměrného napětí. Současně je na tyče vkládáno i střídavé vysokofrekvenční napětí. Volbou optimálního poměru stejnosměrného a střídavého napětí ionty určité hmotnosti projdou přes tyče do detektoru, ostatní ionty budou v kvadrupólu oscilovat a po srážce s tyčí se vybijí. Tento proces se pak opakuje, až se zanalyzuje celý vzorek.

Rozlišovací schopnost kvadrupólového analyzátoaru je nízká ($R = 400$), tudíž je nutné řešit spektrální interference, například pomocí kolizní cely. Dále celkové rozlišení ovlivňuje tvar, délka a průměr tyčí, použitá frekvence, aplikované střídavé i stejnosměrné napětí. Výhodou tohoto analyzátoaru je ale nižší cena a nízké nároky na vakuum, stáčí pouze 10^{-3} Pa. ^{1,2,5,8}

- **Průletový analyzátor (Time of Flight – TOF)**

Průletový analyzátor byl poprvé publikován v literatuře v roce 1940, komerčně byl ale využit až za 50 let. Tento typ využívá krátkých pulzů svazku iontů, které jsou urychleny potenciálem V a získávají stejnou kinetickou energii $z \cdot V = m \cdot v^2/2$. Vstupují pak do evakuované trubice o délce 100 – 170 cm, kde na ně nepůsobí žádné silové pole, a tak se pohybují různou rychlostí v podle svých hmotností. Pak dopadají na násobič elektronů a detekuje se jejich signál. Doba pulzů je asi 10^{-9} s a celý pracovní cyklus trvá jen 100 μ s, což je velmi rychlé. Například při použití trubice délky 1 m trvá záznam celého spektra pouze 50 μ s, což znamená asi 20 000 skenů za minutu. Čím je ion lehčí, tím dříve dopadne na kolektor, což také vyplývá z rovnice pro tento analyzátor.

$$m/z = 2V/v^2 = 2V \cdot t^2/l^2 \quad \{8\}$$

Co se týká konstrukce, existují dva typy akcelerace. Prvním typem je ortogonální akcelerace, kde je letová trubice umístěna v pravém úhlu od iontového paprsku, na druhou stranu u axiální akcelerace je letová trubice s iontovým paprskem v jedné rovině. Avšak komerčně dostupná je pouze ortogonální akcelerace.

Rozlišení se pohybuje kolem 2000 a není zcela jasné řešení spektrálních interferencí. Rozlišovací schopnost lze zlepšit pomocí reflektoru, což je soubor elektrod, na který dopadají ionty. Ty se pak vrací zpět do letové trubice a v různém čase dopadají na detektor. Slouží vlastně ke korekci kinetické energie iontů .^{1,2,5,8}

2.1.1.6. Detektory

Poslední částí systému ICP–MS je detektor, který slouží k převodu proudu iontů na elektrický signál. Od 80. let 20. století se používaly různé detektory, v současné době to je nejčastěji Faradayova klec a elektronový násobič s oddělenými dynodami, a to hlavně kvůli nízkým koncentracím iontů.

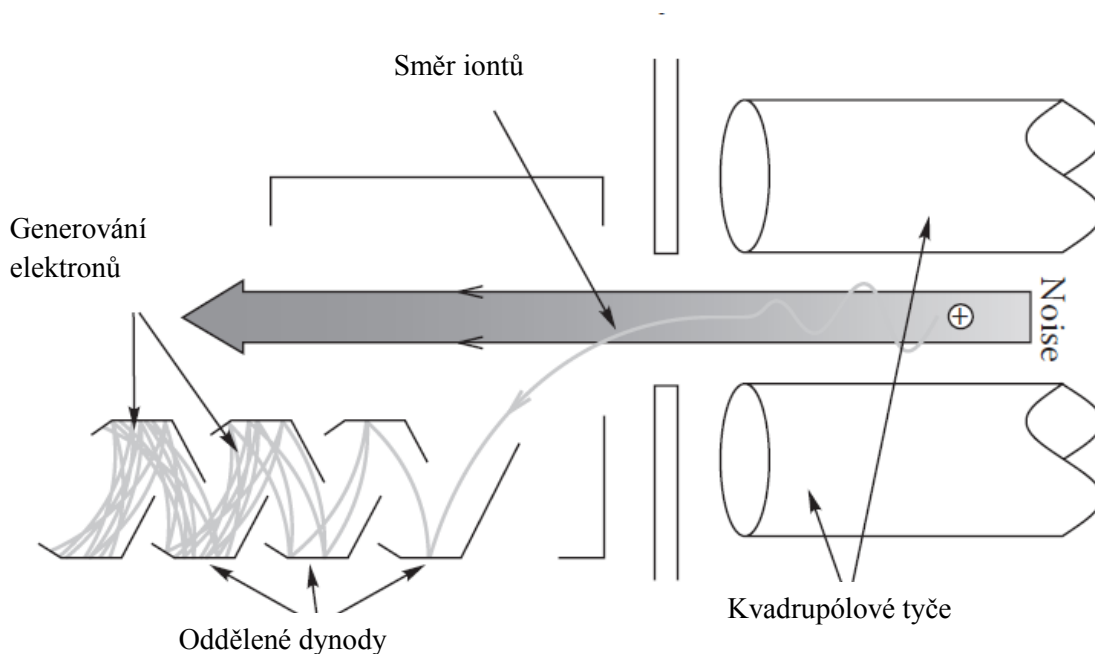
Elektronový násobič (channeltron)

Princip funkce elektronového násobiče je velmi podobný jako u fotonásobiče, avšak namísto použití jednotlivých dynod pro přeměnu fotonů na elektrony, elektronový násobič tvoří otevřený skleněný kužel (potažený polovodičovým materiálem). Elektrony jsou generovány z iontů, které narušují jeho povrch. Na přední část kužele je aplikován negativní potenciál, což slouží k detekci kladných iontů, a zadní část je uzemněna. Když tedy ion opustí hmotnostní analyzátor, je přitahován negativním potenciálem kužele. Narazí na jeho povrch, ze kterého se pak uvolní jeden nebo více sekundárních elektronů. Tento proces se opakuje a výsledkem je pulz, který obsahuje několik miliónů elektronů.

Elektronový násobič může pracovat v pulzním módu, kde pracuje s větším počtem dynod a zesílení je větší. Požívá se ke stanovení nízkých koncentrací. Naopak u analogového módu je zesílení menší a hodí se pro vysoké koncentrace. V přístrojích se k simultánnímu stanovení širokého rozsahu koncentrací využívá dvoustupňového elektronového násobiče, jehož princip je založen na měření signálu iontu v analogovém módu na určité dynodě. Pokud je signál vyšší než prahová hodnota, tak je signál zpracován přes analogový obvod. Jestliže je signál nižší než prahová hodnota, pak je signál zesílen na zbývajících dynodách.

Elektronový násobič s oddělenými dynodami

Tento typ detektoru pracuje na podobném principu jako channeltron, ale obsahuje oddělené dynody, které slouží k násobení elektronů. Detektor je umístěn off-axis k minimalizaci šumu z rozptýleného záření a neutrálních částic, pocházejících z ICP. Když ion vychází z hmotnostního analyzátoru, dostává se na první dynodu, ze které vyrazí sekundární elektrony. Tyto sekundární elektrony jsou pak urychleny k další dynodě. Tento proces se opakuje na dalších dynodách, nakonec se generuje zesílený elektronový pulz, který je zachycen na anodě. Obvykle je složen z 15 – 19 dynod, které jsou pokryty oxidy kovů. Díky použitému materiálu a rozdílu ve tvorbě elektronů je asi o 50 – 100 % účinnější než channeltron.



Obr. 8 Princip funkce elektronového násobiče s oddělenými dynodami ¹

Faradayova klec

Pro aplikace, kde nejsou vyžadovány ultrastopové detekční limity, se používá k detekci iontů jednoduchá kovová elektroda nebo Faradayova klec. Principem fungování je dopad iontů na sběrnou elektrodu a konvertované elektrony jsou zachyceny na „kleci“, která je okolo sběrné elektrody. Pracovní rozsah tohoto detektoru je 10^4 cps, což znamená, že jeho citlivost je nízká, pokud je použit jako jediný detektor. Obvykle tedy bývá spojen s elektronovým násobičem nebo elektronovým násobičem s oddělenými dynodami. Dnes je Faradayova klec hojně využívána s magnetickým sektorovým analyzátořem, kde jsou vysoké iontové signály. Slouží hlavně k určení izotopových poměrů.

2.1.2. Interference v ICP – MS

Doteď byla popsána základní instrumentace a principy, se kterými se můžeme setkat u ICP–MS. Důležitou roli ale hrají i interference, se kterými se setkáváme během měření. V ICP-MS jsou dobře kompenzovány, avšak jejich řešení bývá někdy časově náročné a obtížné, zejména pokud se jedná o složité matrice. Znalost interferencí pro určitý typ vzorku je určující pro jeho přípravu a také výběr instrumentace. Interference v ICP–MS se obvykle dělí do dvou skupin, a to mezi spektrální a nespektrální interference. Oba dva typy jsou problematické, avšak použití moderních instrumentací a kvalitních softwarů ve spojení s optimalizovanými analytickými metodikami snižují jejich dopad na stopové stanovení prvků.^{1,2}

2.1.2.1. Spektrální interference

Spektrální interference jsou nejzávažnějším typem interferencí, který se projevuje v ICP–MS, zejména u hmotnostních spektrometrů s nízkým rozlišením jako je například hmotnostní spektrometr s kvadrupólovým analyzátozem. Lze je dále dělit na izobarické interference a molekulární či polynomické interference. Nejčastěji se projevují u $m/z = 40 - 80$.^{1,2}

- **Molekulární interference**

Tyto interference vznikají v důsledku sloučení dvou nebo i více různých atomických iontů, jejichž výsledná hodnota m/z je totožná s hodnotou m/z analyzovaného prvku. Jsou tvořeny různými způsoby, ale obvykle vznikají spojením s plazmovým plynem, matricovými součástmi v rozpouštědle, dalšími prvky ve vzorku nebo s kyslíkem a dusíkem v okolním vzduchu. Například v plazmatu z Ar vznikají molekulární interference způsobené ionty argonu a kombinací iontů argonu s dalšími částicemi. Nejhojnější izotop Ar má hmotu 40, což ovlivňuje izotop Ca, jehož m/z je také 40. Naopak kombinace argonu a kyslíku ve vodném roztoku $^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}^+$ ovlivňuje hlavní izotop Fe s $m/z = 56$. Argon dále může tvořit molekulární interference s prvky, nacházejícími se v kyselinách, které se používají na rozpuštění vzorku. Například

v prostředí kyseliny chlorovodíkové $^{40}\text{Ar}^+$ se spojuje s izotopem chloru s hmotou 35, a tak vzniká $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$, který ovlivňuje izotop arsenu s $m/z = 75$.

Další typ interferencí tvoří prvky ve vzorku jako H^+ , $^{16}\text{O}^+$ nebo $^{16}\text{OH}^+$ (z vody nebo ze vzduchu), které se spojují v molekulární hydridy, oxidy nebo hydroxidy. Tyto interference se typicky objevují v chladnější oblasti plazmatu před oblastí interface. Tento typ interferencí se vyskytuje u vzorků obsahující kovy vzácných zemin a refraktorní prvky, které snadno tvoří molekulární spojení (nejčastěji oxidy) vytvářející spektrální překryv s prvky ve stejné skupině. Společně s těmito interferencemi mohou vznikat v plazmovém výboji i dvojnásobně nabitě ionty. Jsou to ionty, které nesou dvojnásobný náboj oproti klasickým iontům, a tak tvoří izotopický pík v oblasti jejich poloviční hmotnosti. Množství vznikajících oxidických a dvojnásobně nabitých iontů lze minimalizovat optimalizací podmínek plazmového výboje, hlavně průtokem zmlžovacího plynu, RF výkonem a pozicí plazmové hlavice. ^{1,2}

Tab. I Nejběžnější molekulární interference v ICP-MS ¹

Prvek/izotop	Matrice/rozpuštědlo	Interference
$^{39}\text{K}^+$	H_2O	$^{38}\text{ArH}^+$
$^{40}\text{Ca}^+$	H_2O	$^{40}\text{Ar}^+$
$^{56}\text{Fe}^+$	H_2O	$^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}^+$
$^{80}\text{Se}^+$	H_2O	$^{40}\text{Ar}^{40}\text{Ar}^+$
$^{51}\text{V}^+$	HCl	$^{35}\text{Cl}^{16}\text{O}^+$
$^{75}\text{As}^+$	HCl	$^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$
$^{28}\text{Si}^+$	HNO_3	$^{14}\text{N}^{14}\text{N}^+$
$^{44}\text{Ca}^+$	HNO_3	$^{14}\text{N}^{14}\text{N}^{16}\text{O}^+$
$^{55}\text{Mn}^+$	HNO_3	$^{40}\text{Ar}^{15}\text{N}^+$
$^{48}\text{Ti}^+$	H_2SO_4	$^{32}\text{S}^{16}\text{O}^+$
$^{52}\text{Cr}^+$	H_2SO_4	$^{34}\text{S}^{16}\text{O}^+$
$^{64}\text{Zn}^+$	H_2SO_4	$^{32}\text{S}^{16}\text{O}^{16}\text{O}^+$
$^{63}\text{Cu}^+$	H_3PO_4	$^{31}\text{P}^{16}\text{O}^{16}\text{O}^+$

$^{24}\text{Mg}^+$	organická rozpouštědla	$^{12}\text{C}^{12}\text{C}^+$
$^{52}\text{Cr}^+$	organická rozpouštědla	$^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}^+$
$^{65}\text{Cu}^+$	horniny	$^{48}\text{Ca}^{16}\text{OH}^+$
$^{64}\text{Zn}^+$	horniny	$^{48}\text{Ca}^{16}\text{O}^+$
$^{63}\text{Cu}^+$	mořská voda	$^{40}\text{Ar}^{23}\text{Na}^+$

- **Izobarické interference**

Druhým typem spektrálních interferencí jsou izobarické interference. Vznikají díky přítomnosti jiných izotopů dalších prvků ve vzorku, které mají stejnou hmotnost jako analyt, a tak dochází k hmotnostním překryvům. Například vanad má dva izotopy 50 a 51. Izotop 50 (výskyt 2,5 %) lze jako jediný stanovit ve spojení s maticí HCl, protože $^{16}\text{O}^{35}\text{Cl}^+$ má také hmotu 51 stejně jako druhý izotop. Naopak ho ale nelze stanovit ve spojení s Ti (5,4 %) nebo Cr (4,3 %), neboť opět vykazují stejné hmoty. Tyto interference jsou ale dobře popsány, a tak je výhodou, že 70 % prvků má více než 1 vhodný izotop. Řešením tedy bývá sledování jiného izotopu, jehož hmota se liší. Molekulární interference takto řešit nelze, a proto se museli najít jiné metody, jak spektrální interference vyřešit. ^{1,2}

2.1.2.2. Eliminace spektrálních interferencí

U spektrálních interferencí existuje hned několik způsobů, jak je odstranit. Jak už bylo řečeno, nejjednodušší možnost je sledování vhodnějšího izotopu, který neposkytuje interference. Další možností je odstranění všech rušivých elementů, které se nacházejí ve vzorku. Toto se děje hlavně pomocí prekoncentračních nebo chromatografických technik nebo pouhou desolvací rozpouštědla. Dalšími náročnějšími metodami je použití matematických korekčních rovnic a

úprava instrumentace jako je využití studeného plazmatu, kolizních nebo reakčních cel, diskriminace pomocí kinetické energie a použití přístrojů s vysokým rozlišením.

Matematické korekční rovnice

Tento typ eliminace spektrálních interferencí se hojně využívá pro izobarické interference a pro některé jednoduché molekulární interference (pokud nejsou k dispozici ke kvantifikaci jiné izotopy). Metoda funguje na principu měření intenzity interferujícího izotopu nebo seskupení na jiné hmotě, kde se nevyskytují interference. Korekce je pak provedena ze známého poměru zastoupení interferujícího iontu na analytické a alternativní hmotě. Například u kadmia má jeho izotop hmotu 114, avšak hmotu 114 má také méně se vyskytující izotop cínu (0,65 %). Měří se tedy intenzita hmotnosti 114. Cín má ale celkem 10 izotopů, z toho nejhojněji se vyskytuje ^{118}Sn (24,23 %). Poměrem výskytu těchto dvou izotopů se tedy provede korekce:

$$114 = {}^{114}\text{Cd}^+ + {}^{114}\text{Sn}^+ \quad \{\mathbf{9}\}$$

$${}^{114}\text{Cd}^+ = 114 - {}^{114}\text{Sn}^+ \quad \{\mathbf{10}\}$$

Příspěvek ${}^{114}\text{Sn}^+$ se zjistí pomocí poměru výskytu zmíněných izotopů cínu a hodnoty neinterferujícího ${}^{118}\text{Sn}$.

$${}^{114}\text{Cd}^+ = 114 - (0,65/24,23) \cdot {}^{118}\text{Sn}^+ \quad \{\mathbf{11}\}$$

$${}^{114}\text{Cd}^+ = 114 - (0,0268) \cdot {}^{118}\text{Sn}^+ \quad \{\mathbf{12}\}$$

Výsledkem korekce interference ${}^{114}\text{Sn}^+$ je tedy $-0,0268 \cdot {}^{118}\text{Sn}^+$.

V praxi se používají mnohem složitější rovnice pro určení příspěvku více interferujících iontů ve vzorku.^{1,2}

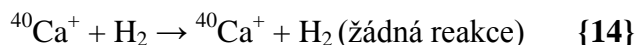
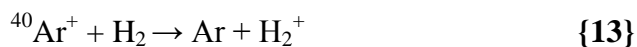
Cool/cold plazma

V případě že intenzita interferencí je vysoká a intenzita analytu naopak nízká, matematických korekcí nelze využít. Z tohoto důvodu je nutné tyto případy řešit úpravou instrumentace. Jednou takovou možností je použití tzv. studeného plazmatu, které pomáhá

snížovat některé molekulární interference. Tato metoda byla vyvinuta v 80. letech a využívá nízké teploty k zamezení molekulárních interferencí s argonem. Za normálních podmínek (RF výkon 1000 – 1400 W, průtok nosného plynu 0,8 – 1,0 ml min⁻¹) se Ar spojuje s maticí, částicemi rozpouštědla a tvoří se interference jako ³⁸ArH⁺, ⁴⁰Ar⁺ a ⁴⁰Ar¹⁶O⁺. Ty pak ovlivňují detekční limity některých prvků, hlavně K, Ca a Fe. Použitím podmínek pro studené plazma se tyto interference sníží (RF výkon 500 – 800 W, průtok nosného plynu 1,5 – 1,8 ml min⁻¹). Detekční limity těchto prvků se tedy značně zvýší. Avšak tato metoda má i značná omezení. Například prvky s vysokou ionizační energií nemohou být dostatečně ionizovány, protože ve studeném plazmatu není dostatečné množství energie. Citlivost je často ovlivněna maticí vzorku, a tak studené plazma často vyžaduje použití standardního přídatku. Dále tato metoda není vhodná ani pro multielementární analýzu.^{1,2}

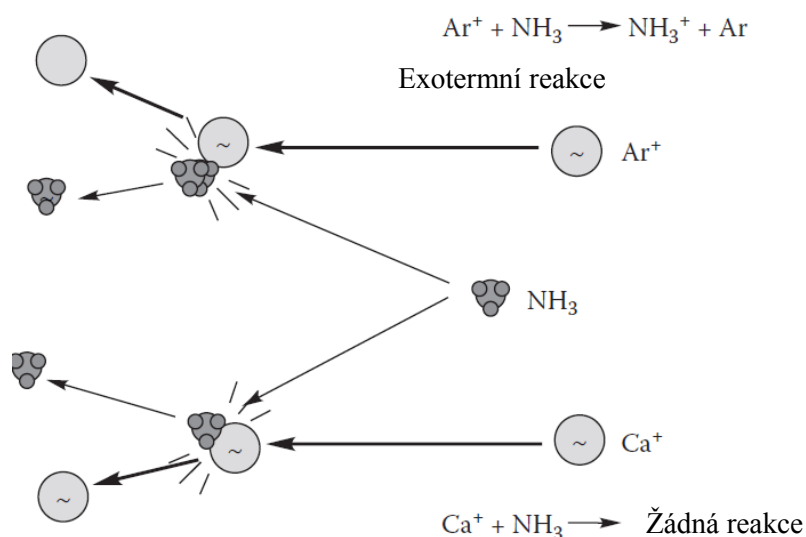
Kolizní/reakční cely

Omezení studeného plazmatu vedlo k sestrojení kolizních/reakčních cel, které využívají ion – molekulových srážek a reakcí k odstranění molekulárních interferencí ještě před vstupem do hmotnostního analyzátoru. Tato zařízení se obvykle spojují s kvadrupólovými hmotnostními analyzátory a poskytují tak nejcitlivější izotopové stanovení. Jejich funkce spočívá v přechodu přes interface, odkud normálním způsobem vstupují do kolizní/reakční cely umístěné před kvadrupólovým analyzátorem. Jako kolizní/reakční plyn se používá He, H₂, NH₃, O₂ nebo methan, ten prochází prostřednictvím vstupu do cely, která je multipól (kvadrupól či oktapól). Obvykle pracuje v RF módu. Radiofrekvenční pole pak slouží k transportu iontů, které se pak srážejí a reagují s molekulami kolizního/reakčního plynu. Rušivé ionty jako ³⁸ArH⁺, ⁴⁰Ar⁺ a ⁴⁰Ar¹⁶O⁺ se buď převedou na neinterferující ionty, nebo se analyt převede na jiný ion, který interference nezpůsobuje. Příkladem je využití vodíku k rozlišení ⁴⁰Ar⁺ a ⁴⁰Ca⁺. Reakcí s ⁴⁰Ar⁺ vzniká atomární argon a neškodný H₂⁺. S ⁴⁰Ca⁺ vodík nereaguje.



Tato reakce je příkladem ion – molekulové reakce s využitím přenosu náboje. Existuje ale i řada dalších reakcí, které probíhají v reakčních/kolizních celách v závislosti na povaze analytu, reakčním/kolizním plynu, iontu či interferujících částicích:

- přenos protonu
- přenos atomu vodíku
- molekulární reakce – spojení interferujícího iontu s neutrálními částicemi
- kolizní fragmentace
- kolizní retardace – molekuly prochází několika kolizemi, díky kterým snižují svou kinetickou energii
- kolizní zaměrování – molekuly kolizí s plynem ztrácí kinetickou energii a na základě hmoty plynu se bude zvyšovat nebo snižovat přenos iontů

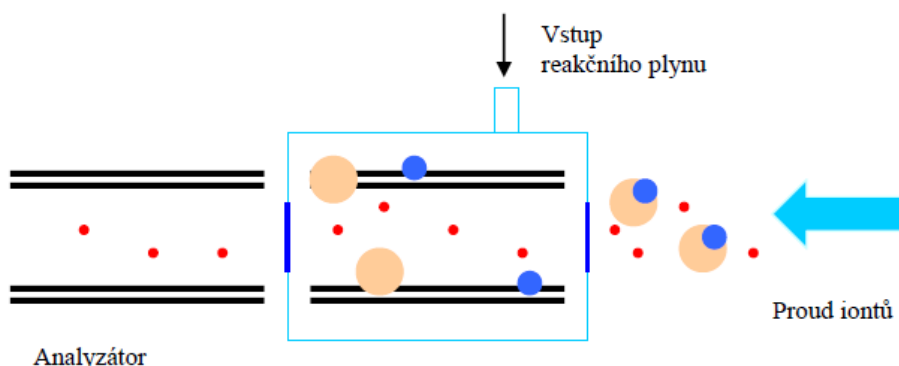


Obr. 9 Příklad reakce NH_3 s Ar^+ a Ca^+ , s Ca^+ amoniak nereaguje, a tak ruší interference ¹

Jak už z úvodu vyplývá, tyto cely lze dělit na kolizní a reakční. Kolizní cely používají nereaktivní plyny a rozlišení podle kinetické energie. Naopak reakční cely používají vysoce reaktivní plyny a rozlišení podle hmotností. Hlavním rozdílem je tedy jak plynné molekuly interagují s interferujícími částicemi a jaký typ multipólu je použit v cele.

Základním principem kolizní cely je použití nereaktivního plynu (He, Xe, Ne, Ar) nejčastěji v hexapólové nebo oktapólové kolizní cele, který stimuluje ion – molekulové srážky. K eliminaci interferencí je využit mechanismus diskriminace kinetické energie (KED – Kinetic Energy Discrimination), který je založen na srážkách analytu a interferujícího iontu s nereaktivním plynem, kdy při každé srážce ion předá část své kinetické energie koliznímu plynem. Dochází tak k oddělování iontů na základě jejich iontové energie. Energie iontů se snižuje oproti energii analytu, tudíž neprojdou bariérou, která je na konci cely. Je totiž nastavena na určitý potenciál, který interferující ionty nepřekonají.

Další možností, jak se zbavit molekulárních interferencí je jejich diskriminace podle hmot. Tento princip využívají reakční cely (Dynamic Reaction Cell – DRC), které obsahují kvadrupól. Je naplněn vysoce reaktivním plynem, jako je methan, amoniak nebo kyslík, který plní funkci katalyzátoru pro ion – molekulové reakce. Kvadrupólový analyzátor tedy pracuje jako hmotnostní filtr a je charakterizován pásmem propustnosti, které měníme v závislosti na měřené hodnotě m/z . Eliminace molekulárních interferencí probíhá na základě reakce plynu s interferujícími částicemi o rozdílném poměru m/z a nebo neutrálních částic. Ionty analyzovaných prvků poté vstupují do hmotnostního analyzátoru bez interferujících částic. Reakční celou pak procházejí jen ionty analytu, jak je vidět na obrázku 10.^{1,2}



Obr. 10 Schéma reakční cely³⁰

Hmotnostní spektrometry s vysokým rozlišením

Nejefektivnější způsob, jak odstranit spektrální interference, je použití hmotnostních spektrometrů s vysokým rozlišením. Nejvyšší rozlišení poskytuje magnetický sektorový analyzátor s dvojitou fokusací.¹

2.1.2.3. Nespektrální interference

Druhou velkou skupinou interferencí v ICP–MS jsou nespektrální interference, kde dochází k výraznému vlivu signálu samotné matrice. V podstatě existují tři typy „matricových“ interferencí. Prvním nejjednodušším typem je efekt transportu a zmlžování vzorku, kde se projevuje viskozita vzorku, hustota, velikost kapiček, typ matrice. Druhým typem je vliv ionizace v plazmatu, která hodně závisí na ionizačních podmínkách a koncentraci analytu ve vzorku. Posledním typem interferencí je blokování interface usazenými solemi. Pokud se v analyzovaném vzorku nachází velké množství pevných látek či kyselin dochází k ovlivnění transportu, ionizace i celého měřicího procesu, neboť může dojít k ucpání konusů.

Jako řešení nespektrálních interferencí se používá metoda vnitřního standardu. Malé množství vnitřního standardu ($\mu\text{g l}^{-1}$) se před měření přidá ke kalibračním standardům, blanku a vzorkům, aby se vyrovnaly problémy způsobené matricí. Výběr vnitřního standardu má hned několik kritérií:

- Nesmí být přítomen ve vzorku.
- Neměl by to být kontaminant životního prostředí.
- Neměl by spektrálně interferovat s hmotou analytu.
- Měl by mít podobný ionizační potenciál, hmotu a chování v plazmatu jako analyt.

Nejběžněji používanými vnitřními standardy jsou ^9Be , ^{45}Sc , ^{74}Ge , ^{103}Rh , ^{115}In , ^{232}Th . Vnitřní standardy lze také využít pro kompenzaci dlouhodobého signálu driftu.^{1,2}

2.2. Rozklad vzorku

Rozklad vzorku znamená převedení analytu do roztoku. Během rozkladu dochází k změnám struktury, které jsou většinou nevratné. Rozklady můžeme dělit do dvou základních skupin, a to na rozklad na mokré, nebo suché cestě.

Rozklad na suché cestě je jeden z nejstarších způsobů. Skládá se z několika kroků, a to ze sušení, spalování, zpopelnění a nakonec převedení minerální kyselinou. Jde o rozklad v otevřených kelímcích z porcelánu či platiny za atmosférického tlaku a vysoké teploty (450 – 550 °C). Hodí se pro velké navážky vzorku a jde o velmi účinný rozklad. Používá se zejména pro stanovení kovů, ale je nevhodný pro stanovení těkavých prvků.

Rozklad na mokré cestě využívá činidel, jako jsou kyseliny a zásady. Kyseliny napomáhají oxidaci vzorku, kterou může urychlit další oxidační činidlo (H_2O_2). Nejčastěji se používá HCl , HNO_3 , HClO_4 či H_2SO_4 , kdy se kovy převedou na rozpustné soli těchto kyselin. Pokud kyseliny nemají dostatečnou teplotu varu na rozklad, je nutné pracovat za vyšších tlaků. Ze zásad se nejvíce používá NaOH a Na_2CO_3 , které se hodí na rozklad slitin.

Rozklad na mokré cestě lze dále dělit na otevřený a uzavřený rozklad podle způsobu provedení.³¹

2.2.1. Otevřené rozklady

Probíhají při teplotě varu rozkladného činidla. Pracuje se při normálním tlaku. Proces lze jednoduše optimalizovat, například množstvím činidel. Lze je s výhodou používat při rozkladu látek s explozivním charakterem. Pro rozklad je možné využívat skleněné, teflonové nebo křemenné nádoby. Jelikož nelze používat vyšší teploty varu než teploty varu činidel, organické vzorky za použití HNO_3 a H_2O_2 nebývají úplně rozloženy. Za použití kyseliny sírové je tento problém odstraněn, ale hrozí interference s analyty.

Otevřené rozklady umožňují rozklady farmaceutických, potravinářských, kosmetických vzorků kolem 10 g. Jsou také vhodné pro louhování vzorků s kyselinami, kdy se stanovují prvky extrahovatelné kyselinami.

Mezi základní výhody patří snadná automatizace, libovolná navážka, možnost přidávání činidel během procesu, rozklad explozivních vzorků, automatická manipulace s roztokem – úpravy objemu, atd.

Bohužel se ale setkáváme s problémy s neúplným rozkladem vzorku, vyšší spotřebou činidel, kontaminací a ztrátou těkavých vzorků.⁷

2.2.2. Uzavřené rozklady

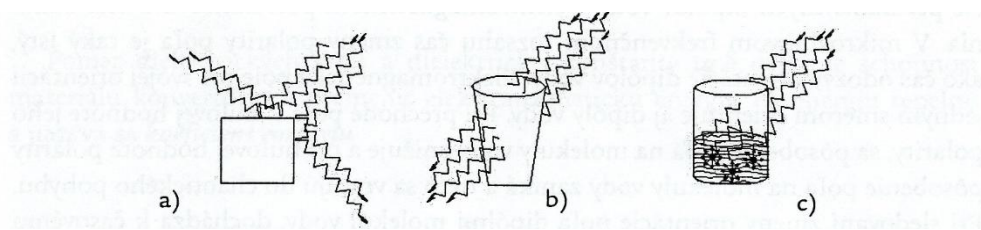
Tento typ rozkladů je efektivnější, probíhá mnohem rychleji a dokonce dochází k rozkladu organických matic. Jsou vhodné pro rozklad všech typů vzorků. Další výhodou je uchování těkavých látek v systému, což nezpůsobí jejich ztráty, malá množství kyselin či jiných činidel, které usnadňují rozklad a v neposlední řadě dochází i ke zlepšení a zjednodušení hygieny práce.

Princip rozkladu spočívá v přeměně mikrovlnného záření v teplo, které se dostává přímo do vzorku. Vzorek je uložen v nádobě, která je vyrobena z materiálu, který dobře izoluje, a tak napomáhá rychlejšímu rozkladu. Nádoby pro tento typ rozkladu jsou vyrobeny z PTFE, PFA, křemenu.⁷

2.2.2.1. Interakce mikrovlnného záření s látkou

Látky se na základě svých dielektrických vlastností dělí na vodiče, dielektrika a izolanty. Tyto skupiny látek reagují s mikrovlnným zářením různým způsobem. Vodiče mikrovlnné záření odrážejí a izolanty ho propouští, a tak tyto dvě skupiny látek nijak s mikrovlnným zářením neinteragují. Dielektrika s tímto zářením interagují, pohlcují ho. Dochází k tzv. dielektrickému zahřívání, kdy ohřev kapalin závisí na jejich fyzikálních vlastnostech (viskozita, teplota, koncentrace) a iontových vlastnostech (koncentrace, náboj iontů, iontová mobilita).

Efektivita mikrovlnného zahřívání pak tedy záleží na typu látky, frekvenci a výkonu mikrovlnného záření a hmotnosti vzorku. Většinou se rozkládá vzorek o hmotnosti v mg. Velká navážka může způsobit explozi, naopak u malé navážky nemusí dojít k reakci s mikrovlnným zářením.⁷



Obr. 11 Interakce látek s mikrovlnným zářením

a) vodiče, b) izolátory, c) dielektrika

Typy mikrovlnných pecí⁷

Známy jsou tři základní typy:

- S rozptýleným mikrovlnným zářením (multi mode systém) – záření proniká do celé rozkladné nádoby.
- S usměrněným mikrovlnným zářením (single mode systém) – vlnovodem je záření usměrněno přímo na vzorek.
- UltraWAVE mikrovlnný rozkladný systém – reakční komora je předtlakována inertním plynem a ohřívána mikrovlnnou energií.

Mezi základní nevýhody tohoto rozkladu patří nemožnost automatizace, nižší hmotnost navážky a nemožnost přidávání činidel během rozkladu.⁷

2.2.2.2. Materiály rozkladných nádob a ochranných plášťů (kontejnerů)

Materiál zařízení musí splňovat požadavky na základě typu vzorku, aplikovaných činidel, tlaku a typu rozkladného přístroje. Nejčastěji se používá PTFE, borosilikátové sklo či porcelán. Rozklad látek nelze provádět pomocí kyseliny sírové nebo fosforečné při použití plastových nádob (mají vyšší teplotu varu než je nejvyšší možná teplota zahřátí). Křemenné nebo skleněné nádoby zase nelze použít společně s kyselinou fluorovodíkovou.

Pro konstrukci kontejnerů a držáků nádob při rozptýleném záření se opět používají různé plasty, a to do teploty 200 °C, jinak se používá keramika. Při usměrněném záření se naopak používají ocelové nádoby, které jsou hodně mechanicky odolné.⁷

2.3. Stříbro

Stříbro je bílý, měkký a velmi tažný lesklý kov. Krystaluje v tetragonální soustavě. Spolu se zlatem bylo jedním z prvních kovů, které člověk poznal, protože se vyskytuje v přírodě v kovovém stavu většinou v horninách. Protože stříbro bylo vždy poměrně vzácné a je velmi měkké, dobře tvárné a na vzduchu stálé, sloužilo hlavně na různé tepané ozdoby. Teprve později se stříbro začalo používat i v mincovnictví. Dnes se většina stříbra získává jako vedlejší produkt při výrobě mědi, olova a zinku.⁹

2.3.1. Výskyt

Průměrný obsah stříbra v zemské kůře je 0,075 mg l⁻¹. V mořské vodě činí jeho koncentrace přibližně 3 mikrogramy v jednom litru. Přírodní stříbro je směsí dvou stabilních izotopů, 51,84 % připadá na izotop ¹⁰⁷Ag, 48,16 % na izotop ¹⁰⁹Ag. Uměle bylo připraveno dalších 31 radioaktivních nuklidů stříbra.

V přírodě se stříbro nalézá ryzí v krystalické podobě v řadě minerálů, obvykle se jedná o minerály 2. třídy, např. argentit (*akantit*) Ag_2S , pyrargyrit $\text{Ag}_3[\text{SbS}_3]$, freibergit $\text{Ag}_{12}\text{Sb}_4\text{S}_{13}$, andorit $\text{PbAgSb}_3\text{S}_6$, proustit $\text{Ag}_3[\text{AsS}_3]$.⁹

2.3.2. Výroba

Nejvíce používanou metodou pro získávání i čištění ryzího stříbra je elektrolýza, z halogenidů je však možno jej jako ryzí získat i pyrometalurgicky přímým tavením.

Výroba stříbra se nejčastěji provádí kyanidovým loužením stříbrných rud, v minulosti se používal i amalgamový postup nebo se stříbro z rudy vyluhovalo roztoky thiosíranů. Výroba stříbra se také provádí různými chemickými postupy z odpadních produktů po rafinaci niklu, mědi, zinku a olova.

Největšími světovými producenty stříbra jsou Mexiko, Kanada, Peru, Austrálie a USA. V Čechách se ve středověku dobývalo značné množství stříbrných rud. Nejznámější lokalitou je patrně Kutná Hora – kromě dobývání a rafinace stříbra zde vznikla i královská mincovna, kde byly raženy známé stříbrné groše. Další lokality s výskytem stříbrných rud nalezneme i v Krušných horách a na Českomoravské vrchovině.⁹

2.3.3. Toxicita stříbra

Po vniknutí stříbra do těla se zde stříbro ukládá a uvolňuje se vlasy nebo vylučovací soustavu. Avšak větší množství stříbra může výrazně ovlivnit lidské zdraví i životní prostředí:

- Velké množství stříbra způsobuje namodralé zbarvení kůže a očí – argyrosa, argyria.
- Rozpustné formy stříbra mohou mít vliv na játra a ledviny, dýchací a trávicí systém, mužský pohlavní systém, ovlivňují i krevní buňky.
- Studium toxicity bylo prováděno na myších, kde byly potvrzeny negativní účinky na mitochondrie.

- Nanočástice stříbra jsou dokonce více toxické než azbest – ovlivňují výměnu draslíku a sodíku přes membránu, což snižuje mitochondriální aktivitu.
- Ve vodách zabraňuje denitrifikaci, při které se tvoří dusík, který je důležitý pro mnoho rostlin.
- Nanostříbro je také toxické pro vodní živočichy, reaguje se žábami, zabraňuje osmoregulaci.¹¹

2.3.4. Nanočástice

Kovové stříbro může mít hned několik podob. Co se týká velikosti, v současné době vzrostl zájem o tzv. nanostříbro. Stříbrné nanočástice jsou nanočástice stříbra, které mají velikost 1 – 100 nm. Mají zajímavé vlastnosti, které pomáhají molekulární diagnostice, terapiím, stejně jako různým přístrojům využívaným v medicíně. Díky své antimikrobiální aktivitě jsou využívány například i v metru nebo výtazích v Číně, ve vodních filtrech, v respirátorech, ponožkách, polštářích, detergentech, mýdlech, šampónech, zubních pastách, pračkách a v neposlední řadě v obvazových materiálech

Nanočástice vynikají díky svému vnějšímu i vnitřnímu uspořádání unikátními vlastnostmi adsorpčními, katalytickými, optickými i biologickými. Prakticky jedna z prvních nanotechnologií nového věku vědecko-technické revoluce byla fotografie založená na fotocitlivosti halogenidů stříbra, kdy po částečné fotolýze těchto halogenidů při expozici (za vzniku nanočástic stříbra) vznikal fotografický obraz díky chemickému zesílení - redukci stříbrných iontů za vzniku viditelných částic stříbra.^{10, 11, 24}

2.3.4.1. Syntéza nanočástic

Výrobu nanočástic lze dělit do dvou skupin, na chemickou a biologickou. Tyto metody jsou většinou založeny na redukci kovů a následné stabilizaci vzniklých nanočástic přídavkem koloidního ochranného činidla nebo na redukci kovů a elektrochemických metodách.

Chemické metody bývají obvykle jednodušší, ale také velmi drahé a používají toxické látky. Mezi nejznámější metody tohoto druhu patří:

- Redukce kovové soli (AgBF_4) pomocí NaBH_4 ve vodě, vznikají nanočástice o velikosti 3-40 nm.
- Elektroredukce AgNO_3 ve vodném prostředí za přítomnosti polyethylenglykolu, vznikají nanočástice o velikosti 10 nm.
- Sonochemická redukce ve vodném roztoku AgNO_3 v atmosféře argonu a vodíku, velikost asi 20 nm.
- Elektrostatická komplexace iontů stříbra s aniontovým aerosolem v kapalně pěně, pěna je následně odčerpána a redukována NaBH_4 , nanočástice jsou stabilní, velikost 5-40 nm.
- Mikrovlnná syntéza pomocí redukce nanočástic využívající mikrovlnné záření.
- Další metody: tepelná syntéza v organických rozpouštědlech, kryochemická syntéza, jiskrová výměna, velikost 5-80 nm.

Za použití toxických látek hrozí možnost zamoření životního prostředí. Tyto metody bývají také velmi drahé, což má neblahý vliv na další využívání takto vyrobených nanočástic. Proto se začalo přecházet k biologickým metodám, které jsou ekonomičtější a ekologičtější cestou. Existují tři hlavní zdroje pro biologickou syntézu: bakterie, houby a extrakty z rostlin. Tyto metody obvykle využívají oxidace nebo redukce. Takové reakce zajišťují mikrobiální enzymy nebo rostlinné chemikálie s antioxidačními nebo redukčními účinky, které působí na příslušnou sloučeninu, a tak se získávají nanočástice. Při přípravě jsou nutné 3 hlavní reagenty: rozpouštědlo pro syntézu, redukční činidlo šetrné k životnímu prostředí a netoxické stabilizující činidlo.

Syntéza v bakteriích využívá bakterii *Pseudomonas Stutzeri* AG259, která byla izolovaná ze stříbrných dolů, a tak je odolná vůči stříbru. Syntéza v houbách využívá houby, protože produkují větší množství nanočástic, vytváří více proteinů, které tvoří nanočástice. Dochází zde k zachycení stříbrných iontů na povrchu buněk hub a následné redukci iontů enzymy v houbách. Nejvíce využívanou je ale syntéza v rostlinách, a to hlavně ve skořici, papaye a aleo vera. Hlavní výhodou je dostupnost, bezpečnost a široká škála metabolitů, které redukují ionty stříbra a jsou rychlejší než bakterie. Proces zahrnuje redukci díky látkám v rostlinách (terpenoidy, flavony, ketony, aldehydy, amidy, karboxylové kyseliny).¹¹

2.3.5. Iontové stříbro

Další formou stříbra, která také vykazuje vysokou antimikrobiální aktivitu, je iontové stříbro, tedy stříbro nesoucí většinou kladný náboj. Dříve se spekulovalo o tom, že je toxicitější než nanostříbro, avšak v dnešní době už se jim připisují stejné toxické vlastnosti. Jeho účinnost se projevuje proti široké škále organismů, kdy je zapotřebí jen velmi nízká koncentrace. Je tedy jasné, že se vyskytuje v mnoha zdravotnických potřebách, jako jsou obvazy, náplasti, katetry či přímo v léčivech.¹³

2.3.6. Antimikrobiální aktivita

Stříbro vykazuje vysoké toxické účinky proti 16 druhům bakterií. Tato toxicita se projevuje lýzou buněk, inhibicí růstu, strukturními změnami v membráně jako je permeabilita, ovlivnění aktivity enzymů atd.

Stříbro se považuje za slabou kyselinu, jež reaguje se slabými bázemi, jako je síra a fosfor, které tvoří buněčnou membránu bakterií nebo nukleové kyseliny, a tak může stříbro ničit i samotné DNA. Dále může přeměňovat signál pro přenos genetického materiálu a tím zabraňovat fosforylaci.^{11,24}

Dalším místem působení jsou enzymy či proteiny. Působí na nukleofilní zbytky aminokyselin v proteinech a útočí na sulfohydroxylové, amino, imidazolové, fosfátové a karboxylové skupiny membrán nebo enzymových proteinů, což vede k proteinové denaturaci. Jinou jeho funkcí je inhibice enzymů s thiolovými skupinami či mnoha oxidujících enzymů jako je alkoholdehydrogenaza. Ta je důležitá pro dýchací řetězec *Escheria coli*, dochází tak k rozpadu metabolismu a ovlivnění DNA replikace. Už i nízké koncentrace Ag^+ urychlují únik proteinů z bakteriální membrány, což končí buněčnou smrtí.

Maximální koncentrace volného Ag^+ je $1 \mu\text{g ml}^{-1}$. Při vyšší koncentraci Ag^+ ve sloučeninách s anionty jako Cl^- se tvoří méně rozpustná neaktivní sůl.¹³

2.3.7. Bakteriální rezistence

Rezistence proti antimikrobiálním látkám může být způsobena buď „vrozenými“ nebo „získanými“ mechanismy. Získaná rezistence může vznikat buď mutacemi nebo získáním různých typů genetického materiálu v podobě plastidů nebo extra-chromosomální DNA. Získaná rezistence proti široce rozšířeným antibiotikům se objevuje u mnoha organismů.

Vrozená rezistence je rezistence vzniklá před užitím antimikrobiálních látek, tedy přirozená vlastnost organismu. Je způsobena různými mechanismy jako je povaha a složení buněčné stěny, která může fungovat jako bariéra, nebo syntetizovanými enzymy, které mohou zničit sloučeninu se stříbrem.

Stříbro a antibiotika mají různý princip fungování. Stříbro má za cíl více míst na nebo uvnitř buněčné stěny, a proto má široké spektrum aktivity. Antibiotika ovlivňují specifické místo na nebo uvnitř buňky, a tak mají užší spektrum aktivity.

Je možné, že široké a nekontrolované používání stříbra může vyústit ve vyšší odolnost vůči bakteriím, ale pravděpodobnost přenosu genů, způsobujících odolnost vůči stříbru, je nízká. Příklad bakterií odolných vůči stříbru je *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Salmonella typhimurium* a *Pseudomonas stutzeri*. Rezistence se hlavně objevuje v místech vysokého používání stříbra – dentální ordinace, popáleninová centra, stříbrné doly.

Rezistence je tedy méně významná, neboť není tak rozšířená jako rezistence proti obecně užívaným antibiotikům, avšak je důležité se jí zabývat.¹³

2.4. Lékařské využití stříbra

Antibakteriální vlastnosti stříbra zaznamenala již staroindická i arabská medicína. K využití stříbra jako antimikrobiálního prostředku však ve větší míře došlo teprve v antickém Římě. Všechny patricijské domy uchovávaly poživatiny ve stříbrných nádobách a do mléka a tekutin ukládaly stříbrné mince, aby je sterilizovaly i prodloužily jejich životnost. Od 15. století se stalo zvykem, že byla stolovníkům vedle slánky k dispozici také dóza s mletým stříbrem,

kterým se zasypávaly jednotlivé chody. Čisté stříbro však není biologicky dobře využitelné a po určité době jeho vnitřního užívání se objevovaly příznaky otravy stříbrem (argyrie), které se projevují šedým zabarvením pokožky a očního bělma a poškozením jater. Proto se postupně od užívání stříbra touto formou začalo upouštět.

Pro léčebné účely se stříbro začalo využívat už v 17. století. AgNO_3 byl použit k léčbě chronických ran a vředů, ale tato sůl ve vyšší koncentraci ničí tkáň (1 % roztoky) a v kontaktu se světlem černá. Po první světové válce se začalo využívání koloidního stříbra ve zdravotnictví rychle šířit. Stříbro se již užívalo jako prvotní medikace k léčbě všech přenosných chorob a aplikovalo se ústně, nitrožilně i nitrosvalově. V průběhu druhé světové války se na trhu objevily sulfonamidy (sulpha-P) a antibiotika (penicilin a streptomycin), tedy léčiva se stejnou indikací, avšak s mnohem nižšími náklady na výrobu. Přejít od stříbra k antibiotikům se tak stal symbolicky přechodem od léčení k velkému byznysu.

V roce 1965 došlo k využití dalších forem stříbra: AgCl , roztoky síranů, sulfadiazinů, ze kterých se dělaly hlavně krémy. Dr. Rober Burell r. 1995 vytvořil první obvaz na bázi nanostříbra – Acticoat. Tento obvaz urychloval hojení a odstraňoval zjizvenou tkáň, stříbro zde působilo proti bakteriím, které mohly infikovat rány.^{11, 18}

2.4.1. Léčba ran pomocí stříbra

V současné době existuje několik typů léčiv, z nichž každý může obsahovat jiný typ stříbrné sloučeniny, a dle toho také vykazovat odlišné vlastnosti. Obvykle obsahují nanočástice stříbra (koloidní roztoky stříbra), stříbrné proteiny, soli stříbra (AgCl , AgNO_3 , Ag_2SO_4), sloučeniny stříbra jako sulfodiazin (stříbro v komplexu s propylenglykolem, stearylalkoholem, isopropylmirystátem a ve směsi a antibiotikem Sulfodiazin, který vzniká z sulfodiazinu sodného a AgNO_3 nahrazením vodíkového atomu stříbrem, kombinuje se zde inhibiční účinek stříbra s antimikrobiální aktivitou antibiotika) a systémy uvolňující stříbro. Hlavním problémem bývá malé množství stříbra, které se z takových látek uvolňuje, nedostatečné pronikání, rychlá spotřeba a přítomnost dusičnanů, které zpomalují hojení. Dále dochází k barvení pokožky, nerovnováze elektrolytů a v neposlední řadě jsou takovéto komplikace nepohodlné pro pacienta. Proto

v poslední době vzrostla produkce obvazů se stříbrem, které jsou snadno dostupné a tyto problémy řeší. Avšak bez ohledu na to, zda se stříbro uvolňuje z roztoku, krému, či obvazu, stříbro projevuje cytotoxickou aktivitu na keranocyty a fibroblasty. Fibroblasty jsou na stříbro dokonce ještě citlivější. Posouzení cytotoxických účinků by proto také mělo být rozhodující při volbě terapie.¹⁴

U obvazu tedy nejde o obvyklé uvolňování stříbra z roztoku, soli, či sloučeniny. Obvazy jsou více kontrolovány a stříbro se uvolňuje do specifické oblasti děle a pravidelně. Mezi základní aspekty výběru takového systému patří charakteristika systému a dodání stříbra ze systému k ráně. Dnes je už známo velké množství systémů, hlavně obvazů či náplastí, která se velmi často používají v běžném zdravotnictví.^{16, 17, 19,20}

- *Acticoat-7* (Smith & Nephew, Hull, Velká Británie) - obvaz se skládá ze tří vrstev polyethylenu potažených nanokrystaly (< 20 nm v průměru) stříbra a dvou vrstev hedvábného polyesteru. Nanokrystalické stříbro poskytuje velké počáteční uvolnění stříbra do rány a následně prodloužené uvolňování.
- *ActicoatTM Flex 3* (Smith & Nephew, Milano, Itálie) je flexibilní polyethylenové krytí s částicemi nanokrystalického stříbra v koncentraci 0,69 – 1,64 mg cm⁻², což je nejvíce ze všech obvazů. Poskytuje asi třídenní ochranu.
- *Mepilex Ag* (Molnlycke health Care, Gallarate, Itálie) se skládá z polyuretanové pěny obsahující soli stříbra ze skupiny síranů, citrátů, acetátů, uhličitanů, laktátů a fosforečnanů nebo jejich směsi. Koncentrace je asi 1,2 mg cm⁻². Silikonová vrstva pokrývá kontakt rány s povrchem, což zamezí většímu poškození. Antimikrobiální aktivita trvá 7 dní.
- *Actisorb Silver 220* (Johnson & Johnson, New Brunswick, NJ) je obvaz z aktivního uhlí, na který je vázáno stříbro. Principem je adsorpce bakterií na aktivní uhlí, kde jsou usmrceny stříbrem. Koncentrace stříbra je 33 μg cm⁻². Výrobci v případě čisté rány garantují účinnost asi 7 dnů. Během prvních 6 hodin dochází k uvolnění stříbra z povrchu díky přítomnosti proteinů, pomalejší uvolňování pak nastává díky pomalejší difúzi stříbra z vláken na povrch. Tento typ obvazu je tedy více kontrolovatelný než ostatní.
- *Aquacel Ag hydrofiber* (ConvaTec, Skillman, Německo, 70:30 sodík: stříbrná karboxymethylcelulóza hydrofiber) je absorpční obvaz, má strukturu želatiny. Ionty

stříbra jsou nahrazeny nosiči karboxymethylcelulózy při hydrataci vláken a bakterie se uzavírají do gelu. Tím se dosáhne postupného, trvalého a pomalého uvolňování. Koncentrace stříbra je 0,122 mg cm⁻². Maximální doba aplikace je jeden týden.

- *Arglaes* (Medline, Mundelein, Illinois) je stříbro impregnované polymerním filmem. Zdrojem stříbra je stříbrem dopovaný Ca₃(PO₄)₂ v polymerní matrici.
- *Contreet-H* (Coloplast, Marietta, Ga), je hustý hydrokoloidní obvaz, který má stříbro navázané na hydrokoloidu.
- *SilvaSorb* (Medline) je polyakrylát matrice se stříbrem ve formě halogenidu.
- *Silverlon* (Argentum LLC, Willowbrook, Illinois) je polymerní tkanina potažená kovovým stříbrem autokatalytickým chemickým pokovováním. Výhodou je trojrozměrný vzhled, velký povrch a flexibilita.

Dalšími známými jsou například Acticoat Moisture Control, Acticoat Absorbent, Silvercel, Aquacel Ag, Contree F, Urgotol SSD.

V této práci byl použit Mepilex Ag, Aquacel Ag, Atrauman Ag a náplast Cosmopor Antibacterial.^{19, 20, 21, 22, 23, 25, 26, 27}

2.4.1.1.1. Mepilex Ag

Antimikrobiální absorpční měkké silikonové pokrytí, které netraumatizuje ránu a okolní kůži. Má vynikající schopnost zvládat tekutiny. Antimikrobiální aktivita začíná během 30 minut, trvá až 7 dní, působí nejrychleji ze všech dostupných obvazů. Používá se pro slabě a středně exudující rány – bércové vředy, traumatické rány. Nepoužívá se u pacientů citlivých na stříbro, během ozařování nebo při rentgenovém či ultrazvukovém ošetření. Nesmí se používat s oxidačními činidly – roztoky chlornanů, peroxid vodíku. Je účinný na gram-negativní i gram-pozitivní bakterie. Nepřishne k ráně a minimalizuje bolest. Dá se stříhat a přizpůsobí se i problematickým místům.³²

2.4.1.1.2. Aquacel Ag

Základem tohoto produktu je krycí materiál Hydrofiber® – měkký, netkaný krycí materiál, který se při styku s výpotkem z rány mění v gel a tím se rána udržuje vlhká. Hydrofiber® je vysoce absorpční a díky vytvořenému gelu umí udržet odpad z hojící se rány včetně bakterií uvnitř krytí. Unikátní vlastnosti vláken Hydrofiber® a iontového stříbra vytvářejí ideální podmínky pro hojení infikovaných, exsudujících ran. Iontové stříbro má antimikrobiální účinky a je schopno ničit široké spektrum bakterií i rezistentních kmenů a kvasinek. Je určen pro léčbu diabetických vředů, popálenin, bércových vředů a proleženin.

Jsou známy další podoby tohoto obvazu a to Aquacel Ag FOAM (pěnové krytí hlavně na vředy a proleženiny), Aquacel Ag BURN (aplikace až 21 dnů, popáleniny), Aquacel Ag SURGICAL (pooperační rány, voděodolná) a Aquacel Ag+Extra (ničí strukturu tvořenou bakteriemi – biofilm).³⁴

2.4.1.1.3. Atrauman Ag

Atrauman Ag je antiseptické krytí, které obsahuje nanočástice stříbra. Stříbro je do rány uvolňováno postupně po dobu 7 dní, má tak delší a spolehlivější antimikrobiální účinek. Díky impregnaci mastí se Atrauman Ag nepřilepí k ráně. Mastný tyl s obsahem stříbra je zvláště vhodný pro infikované rány, hluboké rány (v kombinaci s vhodným sekundárním krytím), všechny typy povrchových ran a jako ochrana před infekcí a průnikem choroboplodných zárodků do rány.

Ionty stříbra se uvolňují z Atraumanu Ag postupně (ve stálé hladině 0,06 ppm za 24 hodin) a zajišťují udržení permanentní koncentrace stříbra v ráně. Bakterie jsou tak pod stálým působením stříbra nejen v počáteční fázi, ale po celou dobu krytí. Je tím zajištěn stálý, prokazatelně baktericidní účinek stříbra na mikroby v různých fázích buněčného cyklu. Lipidová vrstva plní funkci bariéry kůže – snižuje prostupnost epidermis pro škodlivé látky zvnějšku a stabilizuje v ráně fyziologické, lehce kyselé pH. Mastné kyseliny obsažené v impregnaci jsou

také využitelné jako energetický zdroj či stavební materiál pro keratinocyty během reparačního procesu tkáně.³⁶

2.4.1.1.4. Náplasti se stříbrem

Existuje několik typů náplastí se stříbrem, které se vyskytují na našem trhu. Obvykle obsahují centrálně umístěný polštářek s vrstvou stříbra, který vytváří ochranu proti bakteriím a tím významně snižuje riziko infekce rány a urychluje proces hojení. Jsou hypoalergenní - neobsahují latex. Tenká vrstva lepidla okolo středové vložky zaručuje přilnavost k pokožce ze všech stran.³⁵

Od těchto běžných typů se liší náplast Cosmopor Antibacterial od společnosti Hartmann. Cosmopor Antibacterial je samolepicí krytí vhodné pro rány ohrožené infekcí – například při pooperačním hojení. Krytí obsahuje speciální vrstvu, ze které se po zvlhčení uvolňují ionty stříbra. Technologie DryBarrier umožňuje rychlý odvod exsudátu z rány a zároveň zabraňuje zpětnému úniku absorbovaného exsudátu – rána tak zůstává suchá. Nosný materiál se skládá z netkaného textilu s vrstvou syntetického lepidla. Uvnitř polštářku jsou viskózní vlákna, superabsorpční vlákna a polyethylenová fólie s vrstvou metalického stříbra. Cosmopor Antibacterial tímto způsobem omezuje kultivační médium, které umožňuje růst bakterií.³⁷

2.5. Využití ICP–MS při stanovení stříbra

2.5.1. Stanovení stříbra uvolněného z různých typů textilií (oblečení)

Jak už bylo řečeno, stříbro je v jakékoliv formě využíváno v různých aplikacích zahrnujících i antimikrobiální textilie. Praní těchto textilií je důležitý proces, který vede k uvolňování stříbra do odpadní vody. Tato studie se zabývala osmi různými komerčně dostupnými textiliemi během pracovního cyklu. Antimikrobiální aktivita pak byla testována před a po praní. Dále byla určena velikost částic a chemická forma pomocí elektronového mikroskopu.

Ve studii bylo použito 8 různých textilií (ponožky, trička, kalhoty), které se lišily typem použití, obsahem stříbra, složením vláken a hustotou tkaniny. Pět druhů bylo vyrobeno z umělých vláken, tři druhy z bavlny. Jeden produkt obsahoval pouze čisté nanostříbro, u dalších čtyř druhů byla forma neznámá, u jednoho typu byla viditelná forma kovového stříbra a u posledního druhu byla známá forma až po konzultaci s výrobcem.

Experimenty, které se týkaly praní, byly provedeny na základě ISO normy 105-C06: 1994 „pro barevnou stálost domácího a komerčního praní“. Test byl proveden s laboratorní pračkou Washtex-P Roaches, byl použit prací roztok o koncentraci $4 \pm 0,01 \text{ g l}^{-1}$ ECE detergentu 77 pro barevnou stálost v destilované vodě (pH = 10,6). Hlavní složky tohoto detergentu jsou LAS (8 %) (lineární alkylbenzensulfonát), trifosfát sodný (43,8 %), křemičitan sodný a hořčičnatý (9,4 %) a síran sodný (21 %). Místo 10 ocelových kuliček, které se používají ke zvýšení tření během praní, se použilo 10 polyethylenových kuliček z důvodu uvolnění stříbra z oceli. Také buben u pračky byl z oceli, experimenty byly provedeny v polyethylenových lahvích o objemu 300 ml. Po každém pracím cyklu byly zahájeny dva cykly máchání s $20 \pm 0,03 \text{ ml}$ vodovodní vody, aby se ještě více experiment podobal běžnému praní. Prací roztok byl před zahájením experimentu přehříván na $40 \text{ }^\circ\text{C}$.

Aby se určila velikost částic, odebralo se 10 ml jak z pracího, tak i z máchacího roztoku. Každý vzorek se přefiltroval přes $0,45 \text{ }\mu\text{m}$ celulozo-nitrátový filtr. Použité filtry se zachycenými částicemi se rozložily pomocí mikrovlnného rozkladu. Asi 2,5 ml roztoku se přemístilo do plastové zkumavky a přidalo se 1,5 ml destilované vody a 1 ml 65 % HNO_3 . Roztok se pak analyzoval pomocí TSEM (Transmission Scanning Electron Microscopy, nejsou přítomny čočky k detekci) a STEM (Scanning transmission Electron Microscopy, elektronová difrakce je detekována pomocí čoček), prvkové složení se měřilo pomocí EDX (Energy Dispersive X-ray Spectroscopy).

K analýze pomocí ICP–OES se využil opět rozklad pomocí mikrovlnného záření. Bylo použito asi 0,2 g z každé textilie. Ke vzorkům se přidalo 3,5 ml 65 % HNO_3 a 1 ml 30 % H_2O_2 . Poté byly vzorky doplněny do 10 ml ultračistou vodou. Pro kalibraci byl použit standard AgNO_3 v 5 mol l^{-1} HNO_3 o koncentraci 1000 mg l^{-1} (Merck).

Antimikrobiální aktivita pak byla testována na základě ISO 20743:2007 za použití gram-negativní bakterie *Klebsiella pneumoniae*. Vzorky byly naočkovány 50 μl na každých 100 mg tkaniny. Inkubace byla provedena při 37 °C asi 18 h.

Počáteční obsah stříbra ve vzorcích se pohyboval mezi 1,5 a 2923 mg kg^{-1} . Čtyři ze sedmi testovaných vzorků uvolňovaly množství stříbra. Textilie uvolňovaly 0,32 – 38,5 mg/l v pracím roztoku a 0,36 – 22,7 mg l^{-1} v máchacím roztoku.

Co se týče antimikrobiální aktivity, tři vzorky nevykazovaly žádnou aktivitu. ^{15,28}

2.5.2. Stanovení uvolněného stříbra ze 4 různých obvazů používaných v léčbě popálenin

Tento výzkum se zabýval studiem 4 různých obvazů; ActicoatTM Flex 3, Actisorb Silver 220, Aquacel Ag a Mepilex Ag. Uvolňování bylo měřeno ve 3 typech matric, a to v ultračisté vodě (ELGA pure systém), fyziologickém roztoku (0,9 % roztok NaCl v ultračisté vodě) a v náhradním lidském séru (HIT Serum Substitute, STEMCELL Technologies, Kanada). Tyto matrice jsou podobné podmínkám, ve kterých stříbro reaguje při běžných aplikacích. Ultračistá voda je nejjednodušší matricí, fyziologický roztok simuluje prostředí bohaté na chloridy, ve kterém stříbro komplexuje a tvoří nerozpustný AgCl. Náhradní sérum obsahuje lidský rekombinační albumin, transferin a insulin v koncentracích, které jsou podobné koncentracím ve skutečném lidském séru. Roztok byl použit, aby se zjistilo, zda přítomnost proteinů může zvýšit uvolňování Ag^+ .

Obvazy o hmotnosti 0,3 g byly nastříhány na stejné kousky; to znamená asi 25 cm^2 ActicoatTM Flex 3, 4 cm^2 Mepilex Ag, 19 cm^2 Actisorb Silver 220 a 28 cm^2 Aquacel Ag. Vzorky byly přemístěny do 50 ml kelímků, do kterých byly přidány roztoky (asi 30 g, poměr 1:100). Tyto kelímky byly inkubovány při teplotě 37 °C po maximální aplikační dobu každého obvazu. Pravidelně byly roztoky míchány pipetováním. Poté byl z každého vzorku odebrán 1 ml a uchován při - 20 °C. Vzorky byly centrifugovány 10 minut při 14000 rpm (mikrocentrifuga 5424, Eppendorf) kvůli odstranění sraženin. Pokud byly vzorky rozpuštěny v ultračisté vodě, přidala se

k nim 2 % HNO_3 , pokud v lidském séru, pak se přidal 2,8 % roztok NH_4OH . Ke vzorkům ve fyziologickém roztoku se nic nepřidalo, neboť koncentrace stříbra už tak byla velmi nízká.

Ještě před měřením se ke všem vzorkům přidal opět 2,8 % roztok NH_4OH , který zajišťuje rozpuštění nerozpustných forem Ag^+ (AgCl nebo Ag navázané na nerozpustné proteiny). Vzorky se zvortexovaly a několik ml se analyzovalo pomocí ICP-MS.

Koncentrace Ag byly měřeny jako mg g^{-1} a pak převedeny na mg cm^{-2} . U obvazu ActicoatTM Flex 3 byla zjištěna velikost částic 200 až 450 nm. Do vody a lidského séra se po 3 dnech uvolnilo 4 až 7 % celkového množství stříbra v obvazu. Do fyziologického roztoku se uvolnilo pouze 0,3 %. Většina stříbra se po 3 dnech tedy nachází ještě v obvazu. Nižší obsah stříbra ve fyziologickém roztoku je způsoben tvorbou AgCl .

Mepilex Ag obsahuje hlavně Ag , S a O , což bylo objeveno pomocí elektronového mikroskopu, vyskytují se tam tedy velké krystaly Ag_2SO_4 . Uvolňování Ag bylo měřeno po 1 týdnu, což je maximální aplikační doba. Do vody se uvolnilo celé množství Ag . Už po prvních 5 minutách to bylo 50 % a 90 minutách až 96 %. Do fyziologického roztoku se opět uvolnilo méně Ag , pouze 0,15 %. Do lidského séra se pak uvolnilo 67 %. Stříbro se z tohoto typu obvazu ve všech 3 maticích uvolňovalo nejrychleji.

Největší množství Ag z obvazu Actisorb Silver 220 se uvolnilo do lidského séra, nejmenší do fyziologického roztoku. Do vody se uvolnilo celkové stříbro po 1 dni, avšak maximální aplikační doba jsou 4 dny. Tento typ obsahuje nejméně stříbra, a tak se doporučuje pro infekční rány.

Obvaz Aquacel Ag má nejdelší aplikační dobu, 14 dní. Hlavním rozdílem od ostatních obvazů bylo vyšší množství uvolněného stříbra ve fyziologickém roztoku. Studie tedy ukazuje, že po 1 dni v lidském séru ActicoatTM, Mepilex Ag a Aquacel Ag uvolňují nejméně inhibitorů rozpouštění Ag , avšak Actisorb Silver 220 neuvolňuje dostatečné množství Ag . Do fyziologického roztoku se naopak se všech obvazů uvolnilo minimální množství stříbra.¹⁶

2.5.3. Aplikace metod pro stanovení stříbra v polymerních obvazech

Roman a kolektiv v roce 2013 publikoval studii o měření koncentrace stříbra v 6 komerčních produktech. Tento proces zahrnoval několik kroků: suché zpopelnění, rozpuštění v rozpouštědle, otevřenou a mikrovlnnou mineralizaci.

Vzorky obvazů byly sbírány v Univerzitní nemocnici v Padově, Itálie. Bylo vybráno 6 typů, které se nejvíce využívají v popáleninovém centru: ActicoatTM Flex 3 (Smith & Nephew, milano, Itálie), Actisorb Silver 220 (Johnson & Johnson, Řím, Itálie), Aquacel Ag (Convatec, Řím, Itálie), Urgosorb Ag (Fidia, Abano Terme, Itálie), Mepilex Ag (Mölnlycke Health Care, Gallarate, Itálie), Cellosorb Ag (Fidia, Abano Terme, Itálie). Vzorky byly odebírány po 3 dnech od aplikace. Terapie nezahrnovala použití fyziologického roztoku či sulfodiazinové masti k udržení vlhkosti rány.

Všechny obvazy byly nejprve analyzovány pomocí elektronového mikroskopu (SEM, Philips XL-40) přímo na uhlíkovém pásku.

Pro analýzu na ICP–MS byly obvazy nastříhány na kousky asi 1 mm², a pak promíchány, aby byl vzorek homogenní. Každý vzorek byl podroben dvěma typům rozkladu; „otevřenému“ a mikrovlnnému rozkladu. Otevřený rozklad zahrnuje jednoduché metody, které jsou založeny na rozpouštění v rozpouštědlech či rozpuštění pomocí kyselin na hořáku. ActicoatTM Flex 3 byl rozložen v peci, kde vznikl popel a ten byl poté rozpuštěn ve 4 ml HNO₃ na hořáku při teplotě 200 °C. Actisorb Silver 220 byl rozložen stejným způsobem. Aquacel Ag byl rozpuštěn v 5 ml 0,2 M NaOH vortexováním při pokojové teplotě. Urgosorb Ag byl rozpuštěn ve 4 ml HNO₃ na hořáku při teplotě 200 °C. Mepilex Ag byl rozpuštěn v 0,5 ml DMSO, pak následovalo rozpuštění ve 4 ml HNO₃ a 2 ml H₂O₂ na hořáku při teplotě 200 °C. Cellosorb Ag byl rozložen ve 4 ml HNO₃ a 2 ml H₂O₂ na hořáku při teplotě 200 °C. Vzorek obvykle vážil 25 – 50 mg. V obvazech Aquacel Ag, Urgosorb Ag a Cellosorb Ag se v matrix nachází Cl⁻, který vede ke tvorbě AgCl během mineralizace. Proto byly tyto vzorky podrobeny centrifugací a sraženina byla rozpuštěna v koncentrovaném NH₄OH.

Mikrovlnný rozklad probíhal v křemenných kelímcích pomocí 65 % HNO₃ a 30 % H₂O₂, které byly umístěny do mikrovlnné pece. Každý obvaz je jiný, co se týče materiálu, a tak musel

být mikrovlnný rozklad pro každý typ obvazu optimalizován. Vzorčky pak byly rozpuštěny v 2 % HNO_3 , ihned před měřením v 2,8 % NH_4OH .

Stříbro bylo detekováno ve všech 6 obvazech po rozkladu. Před vlastní analýzou byly vzorky uchovávány při $-20\text{ }^\circ\text{C}$, před měřením se přidal 2,8 % NH_4OH . Všechny produkty poskytovaly výsledky odpovídající údajům od výrobce. Kvantifikace probíhala pomocí kalibrační křivky (ze standardního roztoku Ag 1000 ng g^{-1} se připravila řada standardů, korekce nespektrálních interferencí) a izotopového zředování (přídavek izotopového standardu kovového ^{109}Ag).¹⁷

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1. Chemikálie, pomůcky a přístroje

3.1.1. Chemikálie

- deionizovaná voda ($\geq 18,2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$)
- CRM vodného kalibračního roztoku Ag o hmotnostní koncentraci $1,000 \pm 0,002 \text{ g l}^{-1}$
- roztok nanočástic stříbra o hmotnostní koncentraci 1 g l^{-1} a velikosti nanočástic 26 nm; příprava Tollensovou metodou (redukce $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ maltózou)
- kyselina dusičná 67 % (Analpure) Analytika spol. s.r.o., ČR
- peroxid vodíku 30 % (pro stopovou analýzu) Analytika spol. s.r.o., ČR
- roztok pro ICP-MS 7500cs $10 \mu\text{g l}^{-1}$ (Ce, Co, Li, Mg, Tl, Y v 2 % HNO_3 (V/V)), Agilent Technologies, USA
- kalibrační roztok interního standardu INT MIX1 $10 \pm 0,1 \text{ mg l}^{-1}$ (Y, In, Bi, Tb v 5 % HNO_3 (V/V)) Analytika spol. s.r.o., ČR
- hydroxid amonný 28 – 30 %, ACS chemikálie, Sigma Aldrich USA
- hydroxid sodný p.a., Penta, ČR
- chlorid sodný p. a., Penta, ČR
- Aquacel Ag, 10x10 cm, čísla použitých šarží: 2G01606, 4L02219, SE00362
- Mepilex Ag, 10x10 cm, číslo použité šarže: 13409770
- Atrauman Ag, 5x5 cm, čísla použitých šarží: 400103110, 500231119
- Cosmopor Antibacterial, 7,2x5 cm, číslo použité šarže: 400640127

3.1.2. Pomůcky

- teflonové kelímky pro mikrovlnný rozklad
- skleněné laboratorní nádobí – odměrné baňky 10 a 25 ml
- plastové laboratorní nádobí – kelímky, zkumavky s víčky, špičky na pipety, nálevky
- nerezové nůžky
- automatické pipety Finnpiquette® F2 (10 – 100 µl, 100 – 1000 µl, 1 – 5 ml), Thermo SCIENTIFIC

Laboratorní nádobí z obou materiálů bylo před každým použitím namočeno v 5 – 10 % kyselině dusičné po dobu 24 h. Poté bylo několikrát opláchnuto deionizovanou vodou a vysušeno v sušárně. Tímto způsobem bylo čištěno nejen nádobí po použití, ale i úplně nové nádobí, neboť se jedná o stopovou analýzu. Nádobí pak bylo uchováváno v plastových sáčkách s uzávěrem.

Teflonové kelímky byly po každém použití vyčištěny koncentrovanou kyselinou dusičnou, která do nich byla přidána a poté byly kelímky vloženy do mineralizátoru a podrobeny rozkladnému kroku. Po delší době používání byly kelímky čištěny od oxidů dusíku v sušárně při teplotě 150 °C. Během používání kyseliny dusičné může docházet k sorpci oxidů dusíku na stěny kelímku a v sušárně působením tepla dochází k jejich uvolnění. Bez tohoto kroku by docházelo k nedokonalým mikrovlnným rozkladům.

3.1.3. Přístroje

- ORS-ICP-MS 7700x (ICP-MS s oktapólovou reakčně-kolizní celou), Agilent Technologies, Japonsko
- mikrovlnný rozkladný systém MLS1200 mega, Milestone, Itálie
- analytické váhy ABJ 220-4M, KERN & Sohn GmbH, Německo
- zařízení k přípravě deionizované vody Direct – Q UV Millipore, Francie
- skenovací elektronový mikroskop Hitachi SU6600 s urychlovacím napětím 5 kV, Japonsko

- disperzní spektrometr Thermo Noran System 7 s Si (Li) detektorem a urychlovacím napětím 15 kV, USA
- vortex NEOTEK IKA MS 3 basic, Merci, Česká republika
- CO₂ inkubátor NB-203XL firmy N-Biotek, 37 °C, 5 % CO₂, Jižní Korea

Ke spektrometru ORS-ICP-MS 7700x byl připojen autosampler ASX-520 (Cetac, USA). Dalšími částmi byly peristaltická pumpa, mikrokonzentrický zmlžovač GE Micromist 400 μl min⁻¹, chlazená Scottova mlžná komora, dvojice niklových kónusů, oktapólová reakčně-kolizní cela, kvadrupólový analyzátor a jako detektor elektronový násobič s oddělenými dynodami. K analýzám byl použit argon o čistotě nejméně 4.6 (Siad, ČR) a pro potlačení spektrálních interferencí byla využita oktapólová reakčně-kolizní cela s heliem jako kolizním plynem o čistotě 5.5 (Siad, ČR).

Mikrovlnný rozkladný systém MLS1200 mega slouží k rozkladu 6 vzorků umístěných v 6 teflonových kelímcích s víčkem. Tyto kelímky jsou upevněny v rotoru, který se pohybuje konstantní rychlostí, což zajišťuje rovnoměrný rozklad všech vzorků. Tento typ mikrovlnného rozkladného systému je zástupcem systému s rozptýleným mikrovlnným zářením, a tak mikrovlnné záření není nasměrováno pouze na vzorky, ale je rozptýleno po celém systému. Princip rozkladu spočívá v pohlcení mikrovlnného záření vzorkem s rozkladnou směsí (nejčastěji se používá směs kyseliny a oxidovadla), díky čemuž dochází ke zvyšování teploty a tlaku a tím také k dokonalejšímu rozkladu. Volbou rozkladné směsi a rozkladného programu pak lze optimalizovat dobu rozkladu, teplotu a tlak.

Skenovací elektronový mikroskop Hitachi SU6600 je typem elektronového mikroskopu, který k zobrazování vzorků využívá zaostřeného svazku vysoce energetických elektronů, kterým se skenuje po povrchu. SEM poskytuje informace o topografii povrchu vzorku, jeho složení a dalších vlastnostech. Techniku lze použít pro analýzy v biologickém i materiálovém výzkumu. Pomocí EDS (energieově disperzní spektrometrie, disperzní spektrometr Thermo Noran System 7 s Si (Li) detektorem) lze zjistit i prvkové složení vzorků. Vzorky pro analýzu nesmí obsahovat vodu a cizorodé částice, musí být stabilní ve vakuu. Mohou být analyzovány ve formě prachu, suspenze, ale biologické vzorky musí být ještě upraveny. U těchto typů vzorku je nutná fixace

(například pomocí formaldehydu, který zabrání degradaci), promytí preparátu (pufr s přídavkem sacharózy nebo glukózy), dehydratace (pomocí organických rozpouštědel) a nakonec sušení a vypínání.

CO₂ inkubátor NB-203XL firmy N-Biotek byl použit pro inkubaci vzorků při teplotě 37 °C. Objem inkubátoru je 172 l, teplotní rozsah +5 °C / +60 °C, UV sterilizace, vnější rozměry š x h x v: 63 x 68 x 92 cm. Oxid uhličitý zde slouží na zajištění ochranné atmosféry. Před vložením vzorků ve zkumavkách do inkubátoru byly přestříkány roztokem ethanolu kvůli zabránění kontaminace.

3.1.4. Analyzované vzorky

K experimentům byly použity 4 druhy obvazových materiálů se stříbrem, konkrétně Mepilex Ag, Aquacel Ag, Atrauman Ag a Cosmopor Antibacterial. Všechny materiály jsou běžně dostupné. Mepilex Ag byl získán z Fakultní nemocnice v Ostravě, ostatní materiály byly zakoupeny v lékárnách a prodejnách zdravotnických potřeb. K analýzám byly použity bez žádné předchozí úpravy, pouze byly rozstříhány na menší kousky pro dokonalejší rozklad.

Tab. II Použité materiály a jejich vlastnosti

Obvaz	Výrobce	Forma stříbra	Maximální doba aplikace	Materiál
Aquacel Ag	ConvaTec, ČR	iontové	7 dní	Na-karboxy-methylcelulosa
Mepilex Ag	Mölnlycke Health Care, ČR	solí – sírany, acetáty, iontové	7 dní	polyuretanová pěna se silikonovou vrstvou
Atrauman Ag	HARTMANN- RICO a.s., ČR	nanočástice	7 dní	polyamid, impregnace mastí s triacylglyceridy
Cosmopor Antibacterial	HARTMANN- RICO a.s., ČR	iontové	2 – 3 dny	polštářek z viskózných superabsorpčních vláken a polyethylenové folie

3.2. Rozklady vzorků

Vzorky obvazových materiálů byly přednostně rozkládány v rozkladném mikrovlnném systému. K rozkladu byla ke vzorkům přidána rozkladná směs kyseliny a oxidovadla. Při pohlčení mikrovlnného záření se dosáhlo bodu varu této směsi, došlo ke zvýšení teploty i tlaku, a tím byl vzorek dokonale rozložen. Rozklad byl řízen softwarovým programem číslo 1. Tento program měl 7 kroků, byly charakterizovány pouze časem a příkonem, teplota se neměnila (Tab. III).

Na rozklady byla použita vždy směs koncentrované kyseliny dusičné a peroxidu vodíku (na navážku 0,03 g vzorku směs 3 ml HNO₃ a 0,5 ml H₂O₂). Tato směs byla přidána k obvazovému materiálu, který byl rozstříhán na kousky o velikosti kolem 0,5 cm² z důvodu dokonalejšího rozkladu. Poté byly vzorky umístěny do rotoru, vloženy do mikrovlnného systému a podrobeny rozkladu. Po rozkladu byl rotor vytažen a nechal se ochlazovat při laboratorní

teplotě. Poté byly vzorky převedeny do 25 ml skleněných odměrných baněk, které se pak doplnily po rysku deionizovanou vodou. Nakonec byly po každém rozkladu teflonové kelímky vyčištěny deionizovanou vodou, dovnitř se napipetovaly 3 ml koncentrované kyseliny dusičné a celý cyklus rozkladu v mikrovlnném systému se zopakoval jako čistící krok. Tímto způsobem byly rozloženy obvazové materiály Mepilex Ag, Atrauman Ag a Cosmopor Antibacterial.

Tab. III Program pro mikrovlnný rozklad

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

Mikrovlnný rozklad bohužel nemohl být využit k rozkladu obvazu Aquacel Ag. V tomto případě docházelo k nedokonalému rozkladu vzorku, navíc díky tomu nebylo ve vzorku po rozkladu prokázáno téměř žádné množství stříbra. Proto byl místo uzavřeného rozkladu zvolen otevřený rozklad. Obvaz Aquacel Ag byl rozložen v 0,2 mol l⁻¹ roztoku hydroxidu sodného za laboratorní teploty. Vzorek byl opět nastříhán na kousky o velikosti asi 0,5 cm² a vložen do plastové konické eppendorfky o objemu 10 ml. Ke vzorku byl nepipetován roztok 0,2 mol l⁻¹ NaOH (na 0,03 g vzorku 3 ml 0,2 mol l⁻¹ roztoku NaOH). Materiál byl pak rozložen za laboratorní teploty mícháním na vortexu. K takto rozloženému vzorku byl přidán 1 ml koncentrované kyseliny dusičné kvůli stabilizaci uvolněného stříbra a roztok byl pak opět převeden do 25 ml skleněné odměrné baňky a doplněn po rysku deionizovanou vodou.

Pokud roztoky po rozkladu obsahovaly zbytky nerozloženého materiálu, byly před analýzou přefiltrovány pomocí polypropylenové stříkačky a mikrofiltru s velikostí pórů 0,45 μm . Nakonec byly roztoky převedeny do plastových zkumavek s víčky, které jsou vhodné k analýze pomocí ICP–MS a zejména pro použitý autosampler.

3.3. Příprava kalibračních roztoků

Kalibrační roztoky se připravovaly ředěním CRM vodného kalibračního roztoku stříbra o hmotnostní koncentraci $1,000 \pm 0,002 \text{ g l}^{-1}$. Kalibrační řada se skládala ze sedmi kalibračních roztoků o koncentraci 0, 10, 50, 100, 500, 1000 a 5000 $\mu\text{g l}^{-1}$. Pro přípravu kalibračních roztoků se používaly 10 ml skleněné baňky, plastové kelímky a daný objem se odměřoval pomocí pipet s plastovými špičkami. Z vodného kalibračního roztoku se připravil roztok o koncentraci stříbra 10 mg l^{-1} , jelikož je nejlepší používat maximálně 100 násobné ředění v jednom zředovacím kroku. Z tohoto roztoku byl dále vytvořen kalibrační roztok o koncentraci 1 mg l^{-1} . Oba tyto vytvořené roztoky byly využity na přípravu kalibračních roztoků. Navíc ke kalibračním roztokům bylo přidáno určité množství koncentrované kyseliny dusičné, jejíž koncentrace po doplnění po rysku deionizovanou vodou odpovídá koncentraci v reálných vzorcích (1 ml HNO_3 do 10 ml baňky). Ředění kalibračních roztoků bylo tedy opět provedeno pomocí deionizované vody.

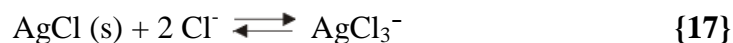
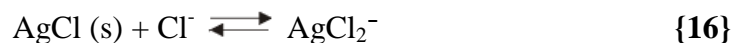
3.4. Příprava roztoku interního standardu

Roztok interního standardu byl připraven z kalibračního roztoku interního standardu INT MIX1 $10 \pm 0,1 \text{ mg l}^{-1}$ (Y, In, Bi, Tb v 5 % HNO_3). Výsledný roztok měl koncentraci 100 $\mu\text{g l}^{-1}$ a byl připraven ředěním kalibračního roztoku interního standardu deionizovanou vodou. Nakonec byl převeden do plastové zásobní lahve a připraven k měření.

3.5. Optimalizace složení roztoků po rozkladu

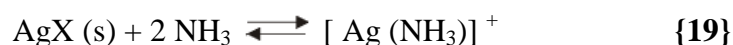
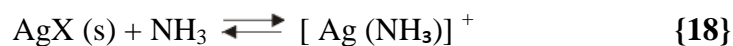
Po rozkladu obvazových materiálů ať už mikrovlnným rozkladem či otevřeným rozkladem bohužel nikdy nebylo naměřeno takové množství stříbra, které by odpovídalo skutečnému množství v obvazu (informacím, které udává výrobce nebo přídavku stříbra před rozkladem). Z tohoto důvodu muselo dojít k řadě optimalizacím, které vedly k lepším výsledkům. Stříbro v obvazových materiálech po rozkladu pomocí koncentrované kyseliny dusičné přechází do formy dusičnanů, které jsou rozpustné a měřitelné. Stejně tak v případě Aquacelu Ag dochází ke tvorbě hydroxokomplexů stříbra v roztoku hydroxidu sodného. Kromě těchto rozpustných forem ale může docházet v roztoku ke tvorbě komplexů a sraženin, které jsou nerozpustné. Určité množství stříbra tak tvoří tyto sloučeniny, nemůže být změřeno na ICP–MS, a tak dochází k měření mnohem nižších koncentrací stříbra.

Řešením tohoto problému by mohla být koncentrovaná kyselina chlorovodíková, která by případné sraženiny (hlavně AgCl) mohla převádět na rozpustné sloučeniny. Chlorid stříbrný je rozpustný v prostředí s nadbytkem chloridových aniontů:



Bohužel tato reakce funguje pouze, pokud jsou v roztoku přítomny hlavně chloridy stříbra, což nelze potvrdit, protože formy stříbra udává pouze jeden výrobce (Mepilex Ag).

Další možností je hydroxid amonný. Ten převádí stříbro z komplexů či sraženin na diaminstříbrné komplexy, které jsou rozpustné, a tak je lze měřit pomocí ICP–MS. Rovnováha má v tomto případě tuto podobu:



Na základě těchto rovnováh byl proveden experiment, který se zabýval závislostí přidaného NH_4OH do roztoku na naměřené koncentraci stříbra. Dále bylo pomocí ICP-MS zjištěno semikvantitativní složení obvazu Aquacel Ag a náplasti Cosmopor Antibacterial, které potvrdilo přítomnost dalších prvků v materiálech. Pravděpodobnost vzniku sraženin a komplexů byla dále ověřena zjištěním jejich součinů rozpustnosti či konstant stability.

3.6. Měření pomocí ICP–MS

K měření stříbra v obvazových materiálech byl využit přístroj ORS–ICP–MS vybaven oktapólovou kolizní celou a kvadrupólovým hmotnostním analyzátozem. Stříbro bylo měřeno ve dvou módech: s použitím kolizní cely s heliem jako kolizním plynem a bez kolizní cely. Použití oktapólové kolizní cely zajišťuje odstranění spektrálních interferencí. Oba dva postupy ale poskytovaly velmi podobné výsledky, a tak by se dalo říci, že při měření nedocházelo k žádným interferencím. V tabulce IV jsou shrnuty parametry měření hmotnostního spektrometru s indukčně vázaným plazmatem

Tab. IV Parametry měření ICP-MS

Plazma		Iontová optika	
Příkon generátoru	1550 W	X-Lens	
Průtok plynu (Ar)		Extract 1	0 V
Vnější plazmový kanál	14,95 l min ⁻¹	Extract 2	-195 V
Sřední plazmový kanál	0,9 l min ⁻¹	Kolizní cela	
Vnitřní(nosný) plazmový kanál	1,07 l min ⁻¹	<i>Mód 1 (bez plynu)</i>	
Rychlost čerpání vzorku	0,1 rps	Cela vstup	-30 V
Sběr dat		Cela výstup	-50 V
Akviziční mód	Spectrum	<i>Mód 2 (He)</i>	
Peak Pattern	1 bod	Cela vstup	-40 V
Repliky měření	3	Cela výstup	-60 V
		Průtok plynu	4,3 ml min ⁻¹
		Energetická diskriminace	5 V

Množství stříbra bylo měřeno na izotopu 107 a 109. V případě ¹⁰⁹Ag byl použit ke kvantifikaci interní standard; roztok ¹¹⁵In. Hodnota integračního času/hmotě při měření byla 0,2 s.

3.7. Inkubace obvazových materiálů

Další částí experimentu byla inkubace všech obvazových materiálů v deionizované vodě a fyziologickém roztoku. Jako fyziologický roztok byl použit 0,9 % roztok NaCl v deionizované vodě. Inkubováno bylo vždy 0,1 g vzorku v 10 ml roztoku. Inkubace probíhala v 50 ml plastových zkuševkách s víčkem, která se umístily do CO₂ inkubátoru nastaveného na teplotu

37 °C. Délka inkubační doby byla pro všechny obvazové materiály 24 h a pak dle maximální aplikační doby (většinou to bylo 7 dní, ale u náplasti Cosmopor Antibacterial pouze 3 dny). Po inkubaci byly obvazy z roztoků vyndány a vysušeny při laboratorní teplotě. Roztoky byly změřeny pomocí ICP–MS a po rozkladu bylo změřeno i zbytkové množství ve vzorcích. Následně byla množství porovnána, jejich součet byl porovnán s původním množstvím v materiálu. Tento experiment je významný zejména při aplikaci těchto obvazových materiálů v medicíně, kdy dochází k uvolňování stříbra z materiálu do rány. Pokud je toto množství příliš vysoké, může docházet k odumírání tkáně a otravě stříbrem.

3.8. Analýza obvazových materiálů pomocí SEM–EDS

Obvazové materiály byly dále zanalyzovány i pomocí skenovacího elektronového mikroskopu ve spojení s energiově disperzním spektrometrem (SEM – EDS). Skenovací elektronový mikroskop umožňuje zobrazení povrchu vzorku ve vysokém rozlišení, které převyšuje možnosti optické mikroskopie. Výsledný černobílý obraz vypovídá nejen o textuře povrchu, ale i o jeho prvkovém složení díky energiově disperznímu spektrometru – atomy s vyšším prvkovým číslem se na fotografii zobrazí jako světlejší. Tato analýza tedy sloužila k potvrzení stříbra v materiálech, identifikaci dalších prvků a v neposlední řadě poukázala i na rozložení stříbra ve struktuře vzorků.

K analýzám byl vždy odebrán vzorek o velikosti asi 4 cm², který byl následně fixován a namáčen do různých rozpouštědel. V tomto případě byly vzorky namáčeny do 2,5 % glytaraldehydu v PBS (pufrovaný fyziologický roztok, fosfátový pufr s 0,15 mol l⁻¹ NaCl) a inkubovány při laboratorní teplotě 2 h nebo při teplotě 4 °C přes noc. Dále byly třikrát promyty PBS a dehydratovány v sérii roztoků ethanolu s objemovým zlomkem 30, 50, 80, 90 %, v každém roztoku byl vzorek 15 minut opět při laboratorní teplotě. Nakonec byly vzorky ponechány ve 100 µl absolutního ethanolu. Poté mohl být zanalyzován pomocí SEM–EDS.

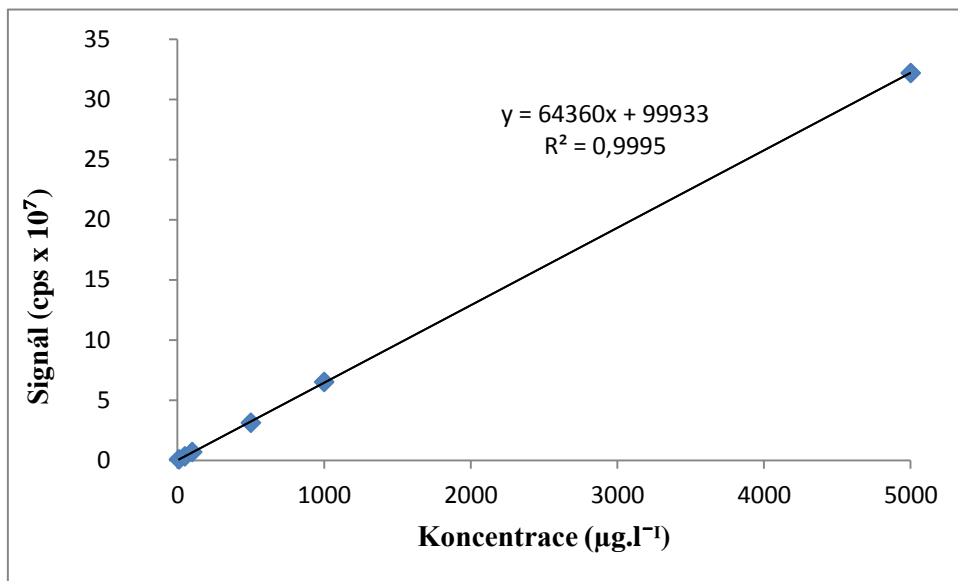
4. VÝSLEDKY A DISKUSE

Obvazové materiály s iontovým stříbrem či s nanočásticemi stříbra byly měřeny pomocí ICP-MS dle parametrů v tabulce VI. Oktapólová rekčně kolizní cela byla použita u každého měření z důvodu odstranění spektrálních interferencí, výsledky ale byly velmi podobné jako bez použití této cely, a tak nebylo nutné tuto metodu používat. Naopak pro odstranění nespektrálních interferencí byl použit interní standard ^{115}In , který byl přiváděn po celou dobu měření pomocí peristaltického čerpadla.

Správná funkce celého přístroje ICP-MS byla kontrolována před každým měřením pomocí tzv. ladícího roztoku (tuning solution). Tento roztok se analyzuje po každém zapnutí přístroje a musí splňovat určité parametry jako je například intenzita prvků. Pokud jsou zjištěny nějaké odchylky, musí být příčiny těchto problémů odstraněny, protože přístroj je připraven k použití jedině tehdy, pokud všechny parametry splňuje. Dalším ukazatelem správné kalibrace přístroje je analýza certifikovaného referenčního materiálu TM 15.2. Tento vzorek vody z Ontarijského jezera se analyzuje po kalibračních standardech pro zjištění správné přípravy standardů, ale i po posledním vzorku, což potvrzuje nebo vyvrací správný průběh celé analýzy.

4.1. Validace metody

Všechny vzorky obvazových materiálů byly kvantifikovány pomocí metody kalibrační křivky, která obsahovala 7 kalibračních bodů v rozmezí 0 – 5000 $\mu\text{g l}^{-1}$. Linearita kalibrační závislosti byla potvrzena v oblasti 14 – 5000 $\mu\text{g l}^{-1}$ pomocí statistického softwaru QC Expert.



Obr. 12 Křivka kalibrační závislosti pro stříbro

Mez detekce, mez stanovitelnosti

Mez detekce (LOD – Limit of Detection) odpovídá koncentraci, pro kterou je analytický signál významně odlišný od šumu. Je stanovována opakovanou analýzou alikvotního podílu slepého pokusu a je to taková koncentrace analytu, jehož odezva je ekvivalentní průměrné odezvě slepého pokusu plus trojnásobek odhadu směrodatné odchylky.³⁸ Mez detekce byla vypočtena z 15 slepých vzorků změřených během měření obvazových materiálů v období od 2. 6. 2015 do 3. 12. 2015. Mez detekce byla dále určena i pomocí statistického softwaru QC Expert z kalibrační křivky složené ze 7 bodů v rozmezí 0,1 – 100 µg l⁻¹.

Mez stanovitelnosti (LOQ – Limit of Quantification) určité metody je nejmenší množství analytu ve vzorku, které může být stanoveno jako exaktní hodnota s předem zadanou nejistotou. Měla by být zjištěna za použití vhodného etalonu či vzorku, tj. obvykle je to nejmenší bod kalibrační křivky (při vyloučení slepého pokusu). Vypočte se jako desetinásobek směrodatné odchylky pro průměr nulového signálu slepého pokusu.³⁸ Mez stanovitelnosti byla opět určena pomocí 15 slepých vzorků i pomocí QC Expertu jako mez detekce.

Mez detekce i mez stanovitelnosti byly přepočítány na navážku 0,03 g a ředění do 25 ml odměrných baněk.

Tab. V Vypočítané statistické parametry pro danou metodu

Parametr	Výpočtem	QC Expert	Koncentrace
LOD	4,3 $\mu\text{g l}^{-1}$	1,5 $\mu\text{g l}^{-1}$	3,5 $\mu\text{g g}^{-1}$
LOQ	14 $\mu\text{g l}^{-1}$	2,3 $\mu\text{g l}^{-1}$	8,7 $\mu\text{g g}^{-1}$

Pravdivost

Pravdivost je definována jako těsnost shody mezi aritmetickým průměrem nekonečného počtu opakovaných naměřených hodnot veličiny a referenční hodnotou veličiny. Pravdivý výsledek je zatížen malou systematickou chybou.³⁸

Správnost metody byla ověřena mikrovlnnými rozklady běžného obvazu s přísávkou 25 $\mu\text{g l}^{-1}$ iontového stříbra i stříbra ve formě nanočástic. Touto metodou bohužel bylo naměřeno mnohem nižší množství stříbra. Proto došlo k několika optimalizacím. Po rozkladu se k roztoku přidaly 3 ml koncentrované kyseliny chlorovodíkové, která rozpouští sraženinu AgCl, jež by mohla v roztoku vznikat. Tato informace byla získána z práce, která se zabývala stříbrem v orgánech.³⁹ Bohužel ani tímto způsobem nebylo dosaženo lepších výsledků. Řešením byl přísávek 28 % roztoku hydroxidu amonného v takovém množství, aby výsledný roztok analytu měl objemový zlomek 2, 8 % hydroxidu amonného. Amoniak je Lewisova báze, která stabilizuje Ag^+ (slabá Lewisova kyselina) v roztoku tvorbou komplexu $\text{Ag}(\text{NH}_3)_2^+$. Tato komplexace také zajistí rozpuštění halogenidů stříbra na povrchu instrumentace. Výsledky těchto měření shrnuje tabulka VI.

Tab. VI Ověřování správnosti metody (přidavky $25 \mu\text{g l}^{-1}$ iontového stříbra nebo nanočástic před rozkladem, výsledky udávají průměr z 6 opakování)

Forma Ag	Naměřené množství	Přídavek HCl	Přídavek NH_4OH
iontové	$68 \pm 3 \%$	$57 \pm 4 \%$	$93 \pm 4 \%$
nanočástice	$70 \pm 17 \%$	$50 \pm 7 \%$	$91 \pm 4 \%$

Preciznost

Preciznost je definována jako těsnost shody mezi vzájemně nezávislými výsledky zkoušek za specifikovaných podmínek. Charakterizuje opakovatelnost či reprodukovatelnost metody a lze ji vyjádřit směrodatnou odchylkou či relativní směrodatnou odchylkou.³⁸

Preciznost byla vypočtena jako směrodatná odchylka a relativní směrodatná odchylka změřením 10 shodných vzorků z obvazu Mepilex Ag a 10 shodných vzorků z náplasti Cosmopor Antibacterial, výsledky obsahuje tabulka VII.

Tab. VII Preciznost metody

Obvazový materiál	Směrodatná odchylka (mg g^{-1})	RSD (%)
Mepilex Ag	4,4	20
Cosmopor Antibacterial	0,07	18,9

Tímto experimentem byla potvrzena nehomogenita rozložení stříbra v obvazových materiálech (u obvazů Aquacel Ag a Atrauman Ag rovněž). Tato skutečnost byla podpořena i analýzou na skenovacím elektronovém mikroskopu s rentgenově fluorescenční spektrometrií, kde byla vidět vlákna s nerovnoměrným rozložením stříbra. Navíc pomocí rentgenově fluorescenčního spektrometru byla potvrzena přítomnost dalších prvků a tedy přítomnost sraženin v roztocích - uhlík, kyslík, síra, křemík, chlór (příloha č. 1 a 2).

4.2. Vyhodnocení výsledků

4.2.1. Stanovení stříbra v komerčně dostupných obvazových materiálech

Cílem této práce bylo vyvinout metodu pro stanovení stříbra v obvazových materiálech. Jako nejvhodnější metoda byl zvolen mikrovlnný rozklad obvazového materiálu pomocí kyseliny dusičné a peroxidu vodíku s následným přidavkem hydroxidu amonného po rozkladu těsně před měřením pomocí ICP-MS. Tento způsob byl vhodný pro obvaz Atrauman Ag a náplast Cosmopor Antibacterial. Obvaz Aquacel Ag byl rozložen pomocí 0,2 mol l⁻¹ roztoku NaOH za laboratorní teploty, následně byla přidána koncentrovaná kyselina dusičná (1 – 2 % HNO₃ se používá k udržení nízkého pH, které udržuje prvky stabilní) a těsně před měřením opět hydroxid amonný. Naopak obvaz Mepilex Ag byl rozložen mikrovlnným rozkladem jako předchozí dva materiály, avšak po přidavku hydroxidu amonného v takovém množství, aby jeho objemový zlomek v roztoku byl 2,8 %, poskytoval mnohem horší výsledky. Tudíž se k tomuto obvazu před měřením nepřidával. Následující tabulka VIII shrnuje výsledky měření stříbra v obvazových materiálech a srovnání těchto údajů s hodnotami, které deklaruje výrobce.

Tab. VIII Deklarovaná a naměřená množství stříbra v obvazech

Obvaz	Deklarovaný obsah (mg g ⁻¹)	Naměřený obsah (mg g ⁻¹)
Aquacel Ag	12 (0,12mg cm ⁻²)	5 – 9
Mepilex Ag	18 (1,2 mg cm ⁻²)	13 – 19
Atrauman Ag	22,5 – 37,5 (0,3 – 0,5 mg cm ⁻²)	22,1 – 25,1
Cosmopor Antibacterial	neuveдено	0,3 – 0,5

Rozdíly ve výsledcích byly dány nehomogenitou stříbra, která byla ověřena změřením 10 vzorků z jednoho kusu obvazu (Mepilex Ag a Comopor Antibacterial), poskytovaly RSD kolem 20 %. Stříbro bylo potvrzeno ve všech obvazech a jeho rozložení bylo tedy nerovnoměrné.

Analýzou pomocí SEM-EDS byla zjištěna povrchová struktura jednotlivých obvazových materiálů a také potvrzena přítomnost stříbra a jeho nehomogenní rozložení. U obvazu Mepilex Ag a Aquacel Ag bylo potvrzeno i několik dalších prvků ve vzorcích, u obvazu Atrauman Ag a náplasti Cosmopor Antibacterial bylo bohužel stříbro během fixace pravděpodobně vymyto, a tak vzorek nemohl být pomocí EDS analyzován. Jednotlivé skeny obsahuje příloha 1, 2, 3 a 4.

4.2.2. Studium rovnováhy NH_4OH

Na základě přítomnosti dalších prvků v roztocích vzorků, které mohou tvořit sraženiny a komplexy stříbra po rozkladu, bylo dalším cílem práce studium rovnováhy NH_4OH v těchto roztocích. Přítomnost komplexů a sraženin potvrzují konstanty stability a součiny rozpustnosti daných látek (Tab. XIII a XIV). Informace o formách stříbra udává pouze výrobce obvazu Mepilex Ag (obsahuje uhličitany, sírany, chloridy, citráty a acetáty stříbra). Ostatní obvazy musely být podrobeny dalším analýzám, kde byly zjištěny formy stříbra. Konstanty stability komplexů jsou velmi nízké, a tak je jejich tvorba nepravděpodobná. Naopak přítomnost sraženin je možná díky jejich vysokým součinům rozpustnosti.⁴⁰

Tab. XIII Komplexy stříbra a jejich konstanty stability⁴⁰

Aniont	Komplex	Konstanta stability log β
$(\text{SO}_4)^{2-}$	$[\text{Ag}(\text{SO}_4)]^-$	0,23
	$[\text{Ag}(\text{SO}_4)_2]^{3-}$	0
	$[\text{Ag}(\text{SO}_4)_3]^{5-}$	0,4
$(\text{CH}_3\text{COO})^-$	$[\text{Ag}(\text{CH}_3\text{COO})]^-$	0,37
	$[\text{Ag}(\text{CH}_3\text{COO})_2]^-$	0,14
	$[\text{Ag}(\text{CH}_3\text{COO})_3]^{2-}$	-0,3

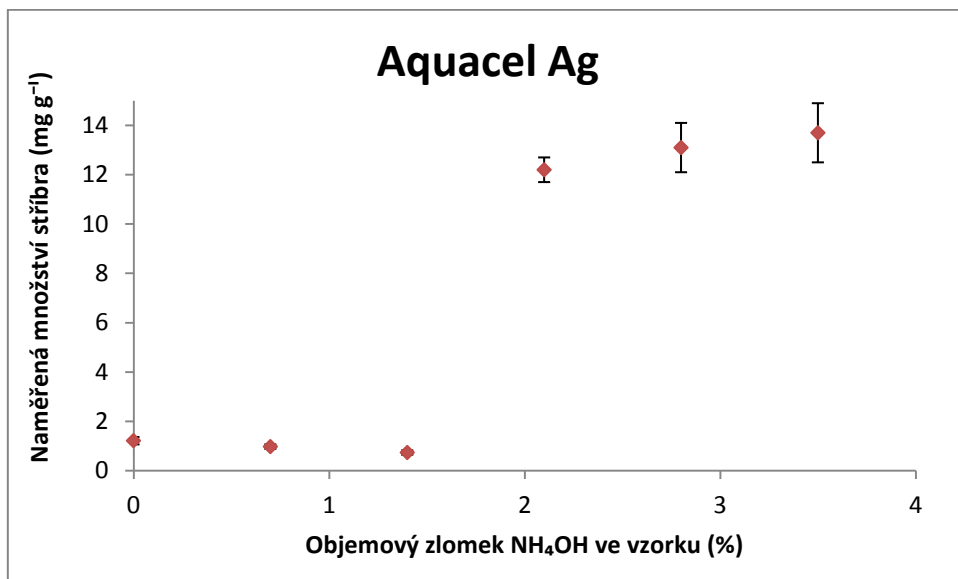
Tab. XIV Sraženiny stříbra a jejich součiny rozpustnosti⁴⁰

Sraženina	pKs
AgCl	10,4
Ag ₂ CO ₃	11,19
Ag ₃ PO ₄	17,55
Ag ₂ SO ₄	4,83

Na základě těchto zjištěných údajů byl proveden experiment, který se týkal studia rovnováhy NH₄OH v roztoku stříbra po rozkladu. Během stanovení množství stříbra se právě jako nejlepší metoda jevila volba rozkladu s přidavkem takového množství NH₄OH, aby jeho objemový zlomek byl roven 2,8 %, což bylo množství dostatečné k rozpuštění daných sraženin a komplexů. Tato informace byla získána z literatury, ale jelikož nevyhovovala pro obvaz Mepilex Ag, bylo žádoucí se tímto problémem dále zabývat. Byl vybrán obvaz Aquacel Ag a náplast Cosmopor Antibacterial, které byly rozloženy a následně byl přidáván různý objem NH₄OH a sledována závislost naměřeného množství stříbra (Tab. XV, Obr. 13 a 14).

Tab. XV Závislost naměřeného množství stříbra na přidaném objemu NH₄OH (objemovém zlomku φ v roztoku) pro obvaz Aquacel Ag

$\varphi_{\text{NH}_4\text{OH}}$ (%)	Naměřená koncentrace Ag (mg g ⁻¹)
0	1 – 1,4
0,7	0,9 – 1,1
1,4	0,6 – 0,8
2,1	11,5 – 12,7
2,8	11,6 – 13,8
3,5	12,1 – 15,1

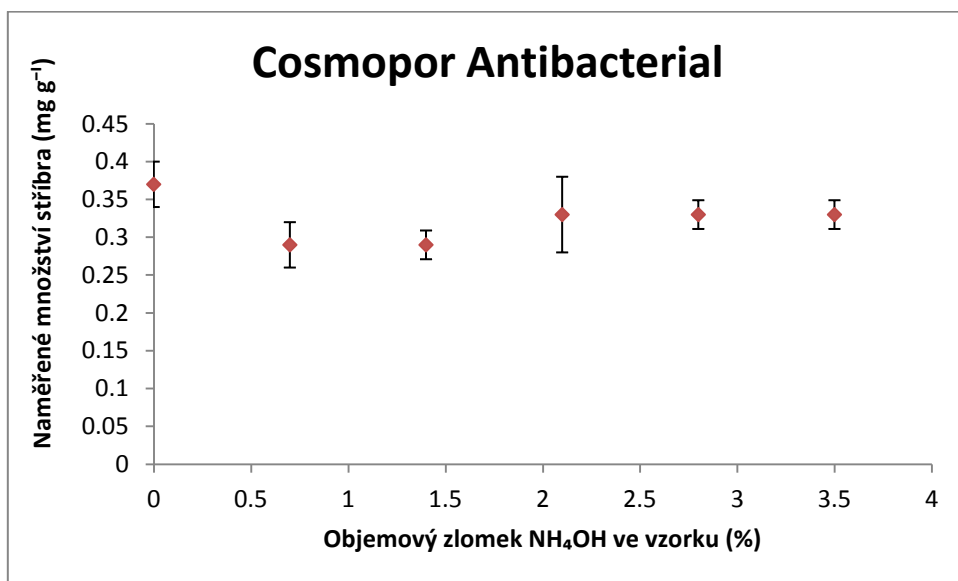


Obr. 13 Graf závislosti měřitelné formy stříbra na množství přidaného NH₄OH, chybové úsečky představují směrodatnou odchylku, n=3

V případě obvazu Aquacel Ag je množství naměřeného stříbra velmi ovlivněno přítomností sraženin či komplexů, což vyplývá i z tabulky XV nebo obrázku 13. Po rozkladu obvazu v hydroxidu sodném bez přídavku NH₄OH bylo naměřeno pouze 10 % z celkového množství v obvazu. Po přidavcích velmi malého množství NH₄OH ($\varphi = 0,7$ a $1,4$ %) se dokonce ještě snížilo na 7 - 9 %. Toto množství je tedy velmi nízké, aby došlo k rozpuštění všech nežádoucích sloučenin. Avšak vyšší přídavky NH₄OH byly vhodné k měření stříbra v tomto materiálu, protože bylo změřeno celkové množství stříbra. Dokonce v případě 3,5 % NH₄OH v roztoku bylo dosaženo ještě vyšší koncentrace než u běžně používaného roztoku 2,8 %.

Tab. XVI Závislost naměřeného množství stříbra na přidaném objemu NH_4OH (objemovém zlomku φ v roztoku) pro náplast Cosmopor Antibacterial

$\varphi_{\text{NH}_4\text{OH}}$ (%)	Naměřená koncentrace Ag (mg g^{-1})
0	0,33-0,43
0,7	0,26-0,33
1,4	0,26-0,31
2,1	0,32-0,35
2,8	0,31-0,36
3,5	0,3-0,36



Obr. 14 Graf závislosti měřitelné formy stříbra na množství přidaného NH_4OH v náplasti Cosmopor Antibacterial, chybové úsečky představují směrodatnou odchylku, $n=3$

Dalším materiálem, který byl podroben tomuto experimentu, byla náplast Cosmopor Antibacterial. Závislost naměřeného množství stříbra na přidávaném objemu NH_4OH není

významná, neboť za nulové či jakékoliv vyšší koncentrace bylo naměřeno velmi podobné množství stříbra. Opět zde lze vidět snížení naměřeného množství po minimálním přidavku NH_4OH , naopak od 2,1 % roztoku také dochází k nárůstu koncentrace. Změny jsou zde ale oproti obvazu Aquacel Ag velmi malé, a tak je lze přisuzovat i potvrzené nehomogenitě v rozložení stříbra.

Rozložené materiály bez přidavku NH_4OH byly také podrobeny semikvantitativní analýze pomocí ICP-MS, čímž byl zjištěn poměr dalších prvků ve vzorcích a potvrzena přítomnost nerozpustných sloučenin stříbra (Tab. XVI). Tento experiment potvrzuje výsledky získané pomocí energiově disperzního spektrometru a více upřesňuje obsah sloučenin v roztoku po rozkladu.

Tab. XVI Semikvantitativní stanovení prvků ve vzorcích po rozkladu

Prvek	Koncentrace	Aquacel Ag	Cosmopor Antibacterial
^{12}C	mg l^{-1}	$\sim 4 \cdot 10^3$	$\sim 1 \cdot 10^3$
^{14}N	mg l^{-1}	$\sim 7 \cdot 10^5$	$\sim 64 \cdot 10^3$
^{28}Si	mg l^{-1}	~ 8	$\sim 0,5$
^{31}P	mg l^{-1}	$\sim 0,3$	$\sim 0,4$
^{34}S	mg l^{-1}	~ 6	~ 5
^{35}Cl	mg l^{-1}	~ 70	~ 4
^{107}Ag	mg l^{-1}	~ 4	$\sim 0,3$

Z tabulky XVI je zřejmé, že v obvazu Aquacel Ag se budou vyskytovat hlavně uhličitany, křemičitany, sírany a chloridy. V náplastí Cosmopor Antibacterial pak budou přítomny také uhličitany, sírany a chloridy, křemičitany a fosforečnany pak v menší míře. Oba vzorky obsahovaly i velké množství dusíku, a to hlavně díky použití kyseliny dusičné na mikrovlnný rozklad a stabilizaci stříbra. Dané koncentrace neudávají přesné množství, jelikož se jedná o semikvantitativní analýzu, která umožňuje řádové určení koncentrace. Poskytuje informace o poměru zastoupení prvků a srovnání složení obou obvazů.

4.2.3. Inkubace obvazových materiálů

Záměrem tohoto experimentu bylo stanovit uvolněné množství stříbra, které se může dostávat při použití těchto obvazů do lidského těla a v krajních případech může být i toxické pro lidský organismus, zejména ve vyšších koncentracích. Obvazové materiály byly inkubovány v deionizované vodě a fyziologickém roztoku vždy 24 h a poté dle jejich maximální aplikační doby: obvazy Mepilex Ag, Atrauman Ag a Aquacel Ag 7 dní a náplast Cosmopor Antibacterial pouze 3 dny. Experiment probíhal v CO₂ inkubátoru nastaveném na teplotu 37 °C.

K inkubaci bylo použito 0,1 g vzorku na rozdíl od ostatních experimentů, kde bylo použito vždy 0,03 g vzorku obvazového materiálu. Před měřením byla k roztokům přidána opět koncentrovaná kyselina dusičná a hydroxid amonný, obvazy byly rozloženy dle postupů uvedených v experimentální části poté, co byly vysušeny při laboratorní teplotě.

Následující tabulky IX, X, XI a XII shrnují výsledky, které byly naměřeny v roztocích a poté po rozložení inkubovaných vzorků.

Tab. IX Výsledky stanovení Ag vzorků po inkubaci v deionizované vodě

Obvaz	Inkubace 1 den		Inkubace 7 dnů	
	Roztok (mg l ⁻¹)	Obvaz (mg g ⁻¹)	Roztok (mg l ⁻¹)	Obvaz (mg g ⁻¹)
Aquacel Ag	0,2 – 0,6	5 – 8	0,8 – 1	6 – 9
Mepilex Ag	171 – 224	0,01 – 0,03	169 – 227	0,01-0,04
Atrauman Ag	0,5 – 0,7	25,7 – 26,9	1,1 – 1,5	22,3 – 27,2

Tab. X Výsledky stanovení Ag vzorků po inkubaci ve fyziologickém roztoku

Obvaz	Inkubace 1 den		Inkubace 7 dnů	
	Roztok (mg l^{-1})	Obvaz (mg g^{-1})	Roztok (mg l^{-1})	Obvaz (mg g^{-1})
Aquacel Ag	0,4 – 0,6	5 – 8	0,5 – 0,8	6 – 8
Mepilex Ag	0,2 – 0,4	19 – 21,3	0,2 – 0,4	13 – 20,5
Atrauman Ag	0,5 – 0,6	21 – 22,5	0,5 – 0,6	22,8 – 27,2

Tab. XI Výsledky stanovení Ag v náplasti Cosmopor Antibacterial po inkubaci v deionizované vodě

Obvaz	Inkubace 1 den		Inkubace 3 dny	
	Roztok (mg l^{-1})	Obvaz (mg g^{-1})	Roztok (mg l^{-1})	Obvaz (mg g^{-1})
Cosmopor Antibacterial	0,003 – 0,004	0,5 – 0,6	0,006 – 0,008	0,3 – 0,5

Tab. XII Výsledky stanovení Ag v náplasti Cosmopor Antibacterial po inkubaci ve fyziologickém roztoku

Obvaz	Inkubace 1 den		Inkubace 3 dny	
	Roztok (mg l^{-1})	Obvaz (mg g^{-1})	Roztok (mg l^{-1})	Obvaz (mg g^{-1})
Cosmopor Antibacterial	0,016 – 0,02	0,3 – 0,4	0,007 – 0,009	0,3 – 0,4

Aquacel Ag

Z analýzy pomocí skenovacího elektronového mikroskopu je jasně vidět struktura tohoto obvazu, kterou tvoří síť vláken Na – karboxymethylcelulosity. Během inkubačních experimentů se struktura tohoto obvazu ihned měnila v želatinu po přidání buď deionizované vody či fyziologického roztoku. Tato forma lépe váže bakterie a absorbuje exudáty z ran, a tak se do této formy dostává i po přiložení na jakoukoliv ránu. Problémy ale způsobuje ve chvíli, kdy je nutné s obvazem jakkoliv manipulovat, neboť s touto formou se velice těžko zachází. K této změně dochází díky přenosu iontů do kapaliny, obvaz inkubován pouze 24 h byl o trochu pevnější než obvaz inkubován 7 dní, a tak tato změna závisí i na době, po kterou je tento materiál ve styku s kapalinou. Dále byla změna rozsáhlejší při inkubaci v deionizované vodě než ve fyziologickém roztoku. Příčinou je roztok NaCl, který snižuje rozpouštění iontů, a tak omezuje změnu struktury.

Obvaz byl inkubován v roztocích 24 h a dle maximální aplikační doby, kterou uvádí výrobce, tedy 7 dní. Do deionizované vody se uvolnilo velmi malé množství stříbra, po 24 h pouze $0,6 \text{ mg l}^{-1}$, po 7 dnech pouze 1 mg l^{-1} . Množství se sice zvýšilo, ale koncentrace byla velmi nízká (0,6 – 1 % z celkového množství stříbra v obvazu). Do fyziologického roztoku se uvolnilo podobné množství, což byl hlavní rozdíl od ostatních obvazových materiálů, kde se do fyziologického roztoku uvolnilo vždy méně stříbra. Výrobce uvádí, že hlavní formou iontového stříbra v tomto obvazu je AgCl, a tak při zvýšené koncentraci chloridových iontů v roztoku dochází k jejich významnému uvolňování. Tento fakt byl potvrzen analýzou SEM a semikvantitativní analýzou na ICP-MS. Po 1 dni se uvolnilo opět $0,6 \text{ mg l}^{-1}$, po 7 dnech bylo opět množství vyšší a to $0,8 \text{ mg l}^{-1}$. Rozkladem obvazů bylo stanoveno zbytkové množství stříbra, které se neuvolnilo, toto množství odpovídalo 90 – 100 %. Opět se musí brát v úvahu nehomogenita rozložení stříbra v tomto materiálu.

V případě tohoto obvazu se nepodařilo stanovit množství stříbra, které deklaruje výrobce, ale pouze 75 % z tohoto množství. Tato hodnota byla ověřena několika měřeními shodných vzorků tohoto materiálu, a tak bude deklarovaná hodnota pravděpodobně nepřesná.

Mepilex Ag

Skenovacím elektronovým mikroskopem byla potvrzena porézní struktura tohoto obvazu, připomíná spíše pěnu a je velmi lehký. Dále jsou zde vidět velké krystaly stříbra, které jsou opět nerovnoměrně rozloženy, což bylo potvrzeno experimentem k určení preciznosti. Rentgenově fluorescenční spektrometrií byla potvrzena přítomnost další prvků jako je například síra a kyslík, což poukazuje na přítomnost Ag_2SO_4 . Navíc i výrobce udává přítomnost síranů, chloridů, acetátů, citrátů, fosforečnanů a uhličitánů stříbra.

Rychlost sledování uvolňování stříbra byla po dobu 1 týdne a opět po 24 h. Už po 24 h se do deionizované vody uvolnilo téměř všechno stříbro (84 – 100 %). Po 7 dnech bylo množství stejné. Zůstatek v obvazu je tedy minimální. Naopak do fyziologického roztoku se uvolnilo minimální množství stříbra, a to 0,2 – 0,4 mg l^{-1} (0,1 – 0,2 % z celkového množství v obvazu). Velké množství iontů se uvolňuje do deionizované vody zejména díky porézní struktuře, která tento děj usnadňuje. Tento obvaz ze všech analyzovaných vykazuje nejrychlejší uvolňování stříbra do okolí, a tak by neměl být používán v případech, kde je požadováno pomalé a nízké uvolňování stříbra či jeho postupné uvolňování. Do fyziologického roztoku se ho uvolnilo nepatrné množství, neboť se většina stříbra vysrážela jako AgCl a tato sraženina zůstala v matrici obvazu, nikoliv v roztoku. Srážení AgCl je pravděpodobně tak rychlé, že ionty nestihnou opustit obvaz.

Při následném rozkladu inkubovaných vzorků bylo nutné přidat před měřením hydroxid amonný, i když při zjišťování koncentrace stříbra v tomto obvazu se nepoužíval. Je to zejména z důvodu přítomnosti AgCl v obvazu po inkubaci ve fyziologickém roztoku, ke vzorkům po inkubaci v deionizované vodě se opět vynechal.

Atrauman Ag

Toto krytí jako jediné z analyzovaných obvazových materiálů obsahovalo nanočástice stříbra, což také bylo potvrzeno skenovacím elektronovým mikroskopem. Struktura obvazu odpovídá síťce z polyamidu pokryté stříbrem, která je impregnována mastí s triglyceridy. Díky ní

nehrozí přilepení k ráně. Jelikož se opravdu jedná jen o síťku, je doporučováno ještě další krytí ze svého materiálu.

Po přidavku kyseliny dusičné a peroxidu vodíku se materiál okamžitě rozložil ještě před samotným mikrovlnným rozkladem, a tak rozklad nemusel být nijak významně optimalizován. Maximální aplikační doba pro tento materiál je opět 7 dní, a tak inkubace v roztocích trvala 1 týden a 24 h. Tento materiál je velice lehký a obsahuje i mast z triglyceridů, tudíž v roztocích spíše přilnul ke stěně zkumavky a neplaval na hladně jako to bylo v ostatních případech. Po 24 h hodinách bylo zjištěno, že do deionizované vody i fyziologického roztoku se uvolní srovnatelné množství, a to $0,5 - 0,6 \text{ mg l}^{-1}$, tedy $0,2 - 0,3 \%$. Po rozkladu obvazu bylo zjištěno odpovídající množství stříbra, které bylo $21 - 26,9 \text{ mg g}^{-1}$. Tato hodnota odpovídá údajům od výrobce a také množství, které mělo zůstat v obvazu. Po 7 dnech inkubace ve fyziologickém roztoku se množství uvolněného stříbra nezměnilo, naopak do vody se uvolnilo více stříbra, asi $1,1 - 1,5 \text{ mg l}^{-1}$ ($0,5 - 0,8 \%$). Jelikož je obvaz opatřen triglyceridovou mastí, je možné, že brání uvolňování stříbra do deionizované vody i fyziologického roztoku. Proto se z obvazu uvolnilo velmi nízké množství stříbra. Po 7 dnech se množství v deionizované vodě zvýšilo, avšak ve fyziologickém roztoku zůstalo konstantní právě díky masti, která udržela sraženinu AgCl ve struktuře obvazu, a dále už se stříbro neuvolňovalo.

Cosmopor Antibacterial

Tento obvazový materiál je jediná náplast použitá v experimentu. Používá se zejména jako pooperační krytí. Obsahuje speciální vrstvu, ze které se uvolňují ionty stříbra přímo do rány. K analýzám byl použit pouze polštářek, který je součástí náplasti. Okolní materiál neobsahuje stříbro, slouží pouze k uchycení náplasti. Pomocí skenovacího elektronového materiálu byla opět potvrzena nehomogenita v rozložení stříbra v náplasti, byly zde vidět menší krystaly stříbra. Struktura odpovídá síti z viskózních superabsorpčních vláken. Po namočení do roztoků vzorky nasály tekutinu a jejich struktura se změnila díky absorpčním schopnostem, několikrát tak zvětšil v roztoku svou velikost.

Jelikož tento materiál není obvaz ale náplast, maximální aplikační doba je pouze 3 dny, a tak byla i doba inkubace zkrácena. Druhá délka inkubace byla opět 24 h. Cosmopor Antibacterial

navíc obsahuje mnohem nižší množství stříbra než ostatní obvazy, a tak i uvolněné množství bylo nižší. Avšak vzhledem k celkovému množství stříbra se uvolnilo přibližně stejné množství v % jako například u obvazu Atrauman Ag či Aquacel Ag. Do deionizované vody se po 24 h uvolnilo $3 - 4 \mu\text{g l}^{-1}$ (0,07 – 0,08 %), po 3 dnech bylo toto množství téměř třikrát vyšší, a to $6 - 8 \mu\text{g l}^{-1}$ (0,15 – 0,2 %). Do fyziologického roztoku se uvolnilo více stříbra, zejména z důvodu přítomnosti iontového stříbra ve formě AgCl stejně jako u obvazu Aquacel Ag. Po 24 h to bylo $16 - 24 \mu\text{g l}^{-1}$ (0,4 – 0,6 %), ale po 3 dnech se toto množství snížilo na $7 - 9 \mu\text{g l}^{-1}$ (0,16 – 0,2 %). Díky roztoku NaCl a hlavně přítomnosti nadbytku chloridových aniontů nejdříve dochází k rozpouštění AgCl, ale po delší době se AgCl opět vysráží díky vyššímu zředění. Proto bylo po 3 dnech naměřeno nižší množství stříbra než po 1 dni.

4.3. Diskuse

Tato práce potvrdila studie Marca Romana¹⁷ i Chiara Rigy¹⁶ a kolektivu. Marco Roman ve své práci uvádí, že mikrovlnný rozklad je mnohem účinnější než rozklad otevřený, což se podařilo potvrdit v případě obvazových materiálů Mepilex Ag, Atrauman Ag a Cosmopor Bacterial. Obvaz Aquacel Ag byl rozložen otevřeným rozkladem. Dále při rozkladu používal teplotní program, který v našich experimentech nebyl potřeba, neboť se celkové množství stříbra podařilo stanovit i bez něj. Bohužel se nepodařilo stanovit množství stříbra, které deklaruje výrobce ve všech obvazových materiálech, výsledek se lišil u obvazu Aquacel Ag. Avšak Marco a kolektiv stanovili deklarované množství ve všech obvazových materiálech. Do všech vzorků po rozkladu také přidávali roztok NH_4OH , v našich experimentech tento postup nevyhovoval pro obvaz Mepilex Ag. Tato práce tedy z velké části potvrzuje výsledky Marca Romana a kolektivu, avšak zejména pro obvaz Aquacel Ag muselo být řada postupů ještě optimalizována.

Chiara Rigo a kolektiv v časopise Burns uvedl možnosti stanovení uvolněného množství stříbra z obvazů Acticoat Flex 3, Actisorb Silver 220, Aquacel Ag a Mepilex Ag. Toto množství bylo stanoveno v ultračisté vodě, fyziologickém roztoku a komerčně dostupném lidském séru. Výsledky získané pro obvaz Aquacel Ag a Mepilex Ag se shodují s výsledky experimentů této

práce. Tato studie se ale zabývala pouze množstvím uvolněného stříbra do roztoků, zde navíc bylo potvrzeno odpovídající množství stříbra, které zůstalo v obvazových materiálech.

Tato práce se ještě navíc podrobněji zabývala rovnováhou NH_4OH v roztocích po rozkladu a přítomností sraženin či komplexů.

5. ZÁVĚR

Předložená práce se zabývá prvkovou analýzou obvazových materiálů hmotnostní spektrometrií s indukčně vázaným plazmatem.

V teoretické části je detailně popsána instrumentace a princip funkce hmotnostního spektrometru s indukčně vázaným plazmatem. Dále byly popsány možné interference, které se mohou objevovat při měření, a možnosti jejich řešení. Důležitým mezníkem při vývoji metody byl rozklad vzorků, který je v teoretické části též zmíněn. Jsou diskutovány i současné poznatky využití hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem při analýze vzorků, které obsahovaly stříbro (zejména různé druhy textilií a obvazových materiálů).

Experimentální část měla hned několik cílů. Prvním cílem byl vývoj metody pro stanovení stříbra v obvazových materiálech. Analyzován byl obyčejný obvaz s přísadkou iontového stříbra i stříbra ve formě nanočástic. Dále byla tato metoda aplikována na reálné vzorky, čtyři komerčně dostupné obvazové materiály, které obsahovaly iontové stříbro i nanočástice stříbra. Dalším cílem bylo tedy potvrzení množství stříbra v obvazech, která udává výrobce, pokud byla tato informace známá. Obvazy byly zanalyzovány i pomocí SEM-EDS, kde byla potvrzena přítomnost stříbra a také jeho forma. Dále bylo provedeno několik experimentů s těmito materiály, které sloužily k získání informací o uvolňování stříbra z obvazů, což je důležité zejména při jejich využití v medicíně. Obvazy byly inkubovány při teplotě 37 °C v termostatu v deionizované vodě a fyziologickém roztoku po dobu 24 h a maximální aplikační dobu daného materiálu. Posledním cílem bylo studium rovnováhy stříbra v roztocích po rozkladu jednotlivých materiálů.

Součástí vývoje metody bylo i stanovení linearitu kalibrace, pravdivosti, preciznosti, meze detekce a meze kvantifikace. Dále byla zjištěna i nehomogenita rozložení stříbra v obvazových materiálech.

Závěrem lze tedy konstatovat, že byla vyvinuta metoda pro stanovení stříbra v obvazových materiálech pomocí ICP-MS. Byly stanoveny statistické parametry této metody a byly vyhodnoceny výsledky všech měření. V případě obvazu Aquacel Ag naměřené množství stříbra neodpovídalo deklarovanému množství výrobce, ostatní obvazy vyhovovaly. Dále byla zjištěna

nehomogenita v rozložení stříbra. Inkubací obvazů v deionizované vodě a fyziologickém roztoku bylo potvrzeno uvolňování stříbra z obvazů, což je významné při léčbě ran.

6. LITERATURA

1. Thomas R.: *Practical guide to ICP-MS*. CRC Press, Boca Raton 2007.
2. Nelms M. S.: *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry Handbook*, Blackwell Publishing, Oxford 2005.
3. Agilent Technologies: *ICP-MS, Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry Primer*, USA 2005.
4. Hill S. J.: *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry and its Applications*, Blackwell Publishing, Plymouth 2007.
5. Becker J. S.: *Inorganic Mass Spectrometry: Principles and Applications*, John Wiley & Sons Ltd, Chichester 2007.
6. Mihaljevič M., Strnad L., Šebek O.: Chem. Listy 98, 123-130 (2004).
7. Krakovská E., Kuss H. M.: *Rozklady v analytickej chémii*. VIENALA, Košice 2001.
8. Churáček J, Jandera P.: *Atomová a molekulová spektrometrie se zaměřením na stopovou analýzu kontaminantů, díl B: Molekulová spektroskopie v organické analýze*, Univerzita Pardubice 1999.
9. <http://www.prvky.com/47.html>, staženo 19. 8. 2015.
10. <http://www.nanostrebro.cz/clanek/koloidni-strebro-na-co-vse-se-da-pouzit-k-leceni/>, staženo 19. 8. 2015.
11. Prabhu S., Poulouse E. K.: Int. Nano Lett. 2, 32 (2012).
12. Poon V. K. M., Burd A.: Burns 30, 140 (2004).
13. Percival S. L., Bowler P. G., Russell D.: J. Hosp. Infect. 60, 1 (2005).
14. Atiyeh B. S., Costagliola M., Hayek S. N., Dibo S.: Burns 33, 139 (2007).
15. Lorenz C., Windler L., von Goetz N., Lehmann L. P., Schuppler M., Hungerbuhler K., Heuberger M., Nowack B.: Chemosphere 89, 817 (2012).
16. Roman M., Rigo Ch., Munivrana I., Vindigni V., Azzena B., Barbante C., Fenzi F., Guerriero P., Cairns W. R. L.: Burns 38, 1131 (2012).
17. Roman M., Rigo Ch., Munivrana I., Vindigni V., Azzena B., Barbante C., Fenzi F., Guerriero P., Cairns W. R. L.: Talanta 115, 94 (2013).

18. <http://www.zdravejsi-zivot.cz/zajimave-clanky/koloidni-stribro/>, staženo 20. 8. 2015.
19. Ding Ch., Shi L., Liu Ch., Sun B.: Burns 39, 1547 (2013).
20. Verbelen J., Hoeksema H., Heyneman A., Pirayesh A., Monstrey S.: Burns 40, 416 (2014).
21. Aziz Z., Abu S. F., Chong N. J.: Burns 38, 307 (2012).
22. Dokter J., Boxma H., Oen I. M. M. H., van Baar M. E., van der Vlies C. H.: Burns 39, 130 (2013).
23. Boonkaew B., Kempf M., Kimble R., Supaphol P., Cuttle L.: Burns 40, 89 (2014).
24. Marx D. E., Barrilo D. J.: Burns 40S, S9 (2014).
25. Abboud E. Ch., Settle J. C., Legare T. B., Marcet J. E., Barillo D. J., Sanchez D. J.: Burns 40S, S30 (2014).
26. Abboud E. Ch., Settle J. C., Legare T. B., Marcet J. E., Barillo D. J., Sanchez D. J., Boubekri A. M.: Burns 40S, S40 (2014).
27. Toy L. W., Macera L.: J. Am. Acad. Nurse Pract. 23, 183 (2011).
28. Karlsson M. E., Hedberg J., Skoglund S., Wold S., Wallinder O. I., Hedberg Y.: Environ. Sci. Technol. 48, 7314 (2014).
29. Kanický V.: *Zavádění vzorku do plazmatu*. In: 8. kurz ICP-MS/OES 2015, Ed. Vítězslav Otruba – Spektroskopická společnost Jana Marka Marci, Brno 2015.
30. http://www.vscht.cz/anl/josef/LabAtom/Navod_ICP-MS_2010.pdf, staženo 30.9.2012. , staženo 20. 8. 2015.
31. <http://meloun.upce.cz/docs/analchem1/skripta.pdf>, staženo 21. 8. 2015.
32. <http://www.molnlycke.cz/produkty-pro-moderni-osetrovani-ran/antimikrobialni-kryti/melgisorb-ag/#confirm>, staženo 21. 8. 2015.
33. <http://www.molnlycke.cz/produkty-pro-moderni-osetrovani-ran/penova-kryti/mepilex/#confirm>, staženo 21. 8. 2015.
34. <http://www.vlhkehojeni.cz/vyrobky-aquacel/aquacelag>, staženo 18. 2. 2016.
35. <http://www.lekarna.cz/naplast-maxivita-rychla-pomoc-se-stribrem-18x70mm-8ks/>, staženo 22. 8. 2015.
36. <http://www.lecbarany.cz/produkty/vlhke-kryti/atrauman-ag>, staženo 21. 9. 2015.

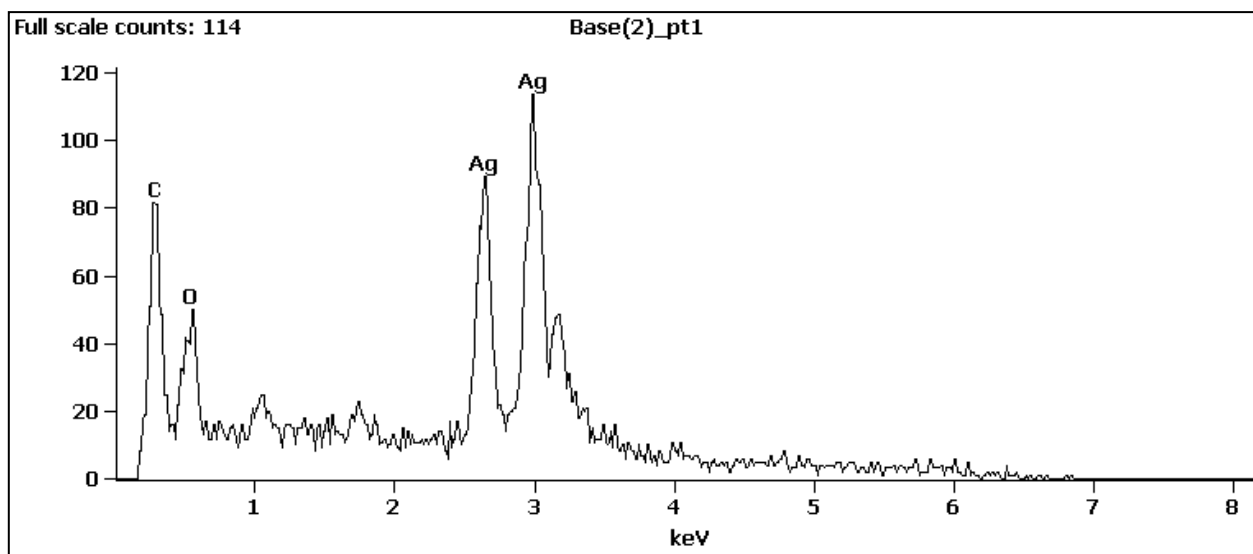
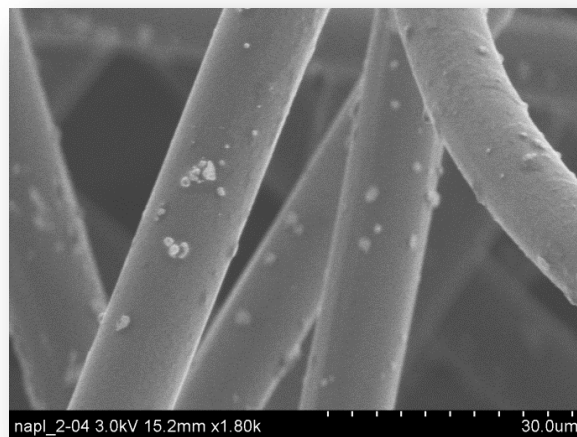
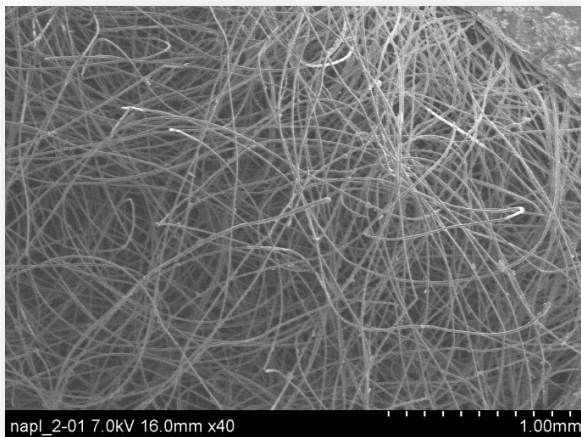
37. <http://www.lecbarany.cz/produkty/tradicni-kryti-obvazy-a-naplasti/cosmopor-antibacterial>, staženo 21. 9. 2015.
38. *Mezinárodní metrologický slovník – Základní a všeobecné pojmy a přidružené termíny (VIM)*, norma TNI 01 0115, ÚNMZ Praha 2009.
39. Veverková L., Hradilová Š., Milde D., Panáček A., Skopalová J., Kvítek L., Petrželová K., Zbořil R.: *Spectrochim. Acta, Part B 102, 7* (2014).
40. Kotrlý S., Šúcha L.: *Chemické rovnováhy v analytické chemii, tabulky a diagramy*, SNTL – Nakladatelství technické literatury, Praha 1988.

7. ZKRATKY

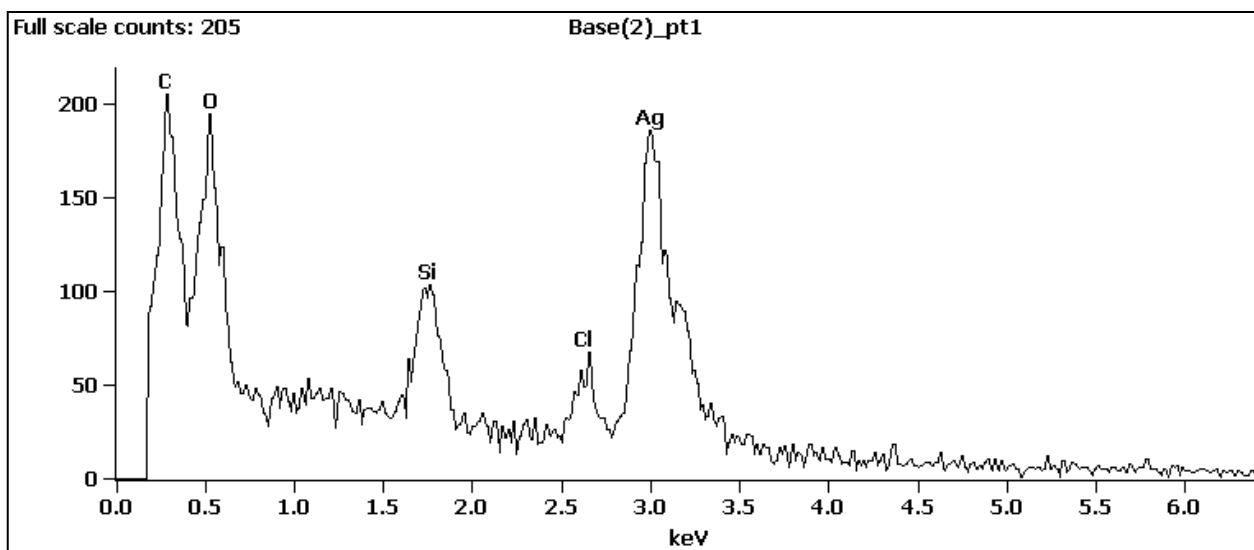
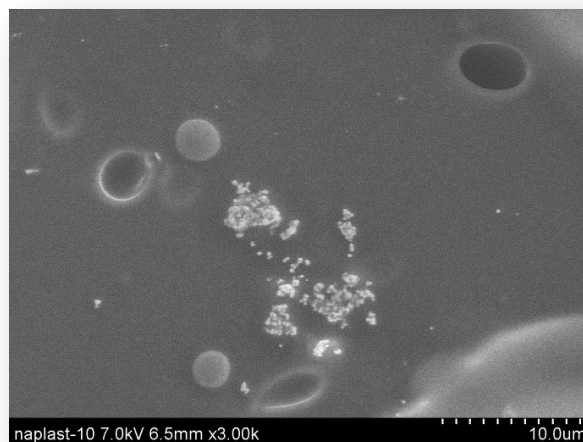
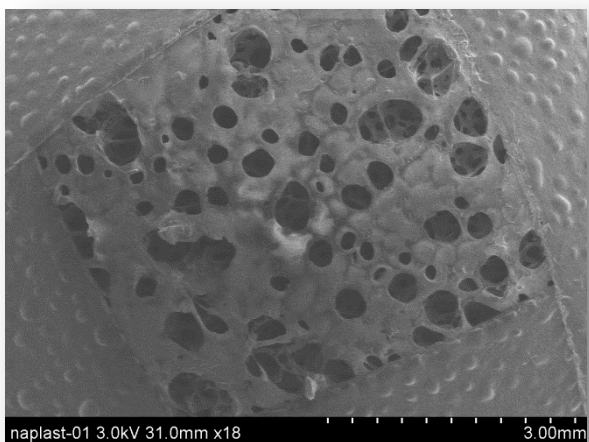
ICP-MS	Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem
CE	Kapilární elektroforéza
HPLC	Vysoce účinná kapalinová chromatografie
GC	Plynová chromatografie
LOD	Mez detekce
HG-ICP-MS	Generování těkavých hydridů ve spojení s hmotnostní spektrometrií s indukčně vázaným plazmatem
ICP	Indukčně vázané plazma
PFA	Perfluoroalkoxypolymer
PTFE	Polytetrafluoroethylen
PVF	Polyvinylfluorid
DCP	Direct Current Plasma, Stejnoseměrně vázané plazma
MIP	Microwave Induced Plasma, Mikrovlnně indukované plazma
RF	radiofrekvenční
ICP-OES	Optická emisní spektrometrie s buzením v indukčně vázaném plazmatu
TOF	Průletový analyzátor
DRC	Dynamic Reaction Cell, reakční cela
KED	Diskriminace podle kinetické energie
MW	Mikrovlnné záření
PBS	Phosphate Buffered Saline, pufrovaný fyziologický roztok
rps	Revolutions per second (počet otáček za sekundu)
cps	Counts per second (počet iontů, které dopadly na detektor za sekundu)

8. PŘÍLOHY

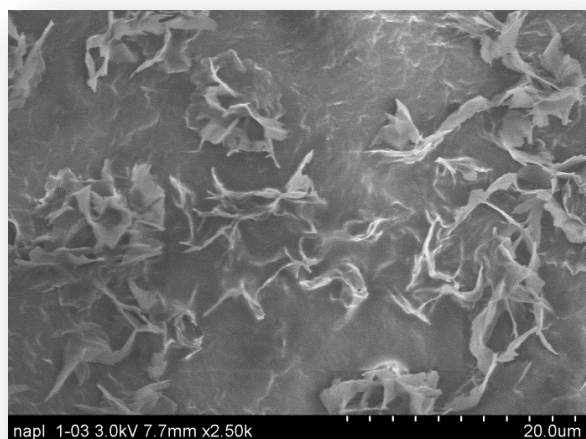
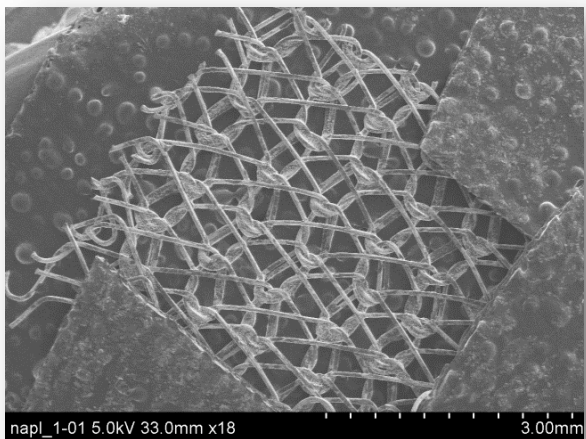
Příloha č. 1: Aquacel Ag



Příloha č. 2: Mepilex Ag



Příloha č. 3: Atrauman Ag



Příloha č. 4: Cosmopor Antibacterial

