

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Fakulta přírodovědecká

Katedra analytické chemie



MOŽNOSTI ANALÝZY KLINICKÝCH MATERIÁLŮ POMOCÍ ICP-MS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor práce:	Bc. Tomáš Pluháček
Studijní program:	N1407- Chemie
Studijní obor:	Analytická chemie
Vedoucí diplomové práce:	Ing. David Milde, Ph.D.

Olomouc 2013

SOUHRN

Tato diplomová práce je zaměřena na vývoj a porovnání dvou instrumentálních technik pro stanovení sedmi vybraných kovů v lidských tkáních pomocí hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem. Dále jsou popsány základní principy, instrumentace hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem a její uplatnění při analýze vybraných kovů v klinických vzorcích (moč, krevní sérum, krev, vlasy,...). Experimentální část uvádí vývoj, verifikaci a porovnání dvou instrumentálních technik (ORS-ICP-MS a ICP-oe-TOF-MS) pro stanovení vybraných kovů (Ti, V, Cr, Mn, Co, Ni a Pb) v lidských tkáních pomocí hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem. Vzorky tkání byly odebrány při revizních operacích pacientům Ortopedické kliniky Fakultní nemocnice v Olomouci. Obě metody byly verifikovány na základě těchto parametrů: pravdivost, preciznost, kalibrační křivka, mez detekce (LOD), mez stanovitelnosti (LOQ) a nejistota měření.

SUMMARY

This diploma thesis is focused on the development and comparison of two instrumental techniques for the determination of seven selected metals in human tissues by inductively coupled plasma mass spectrometry. The basic principles, instrumentation of inductively coupled plasma mass spectrometry and its applications of analysis of selected metals in various clinical samples (urine, blood serum, blood, hair,..) are described. Experimental part of this work presents the development, verification and comparison of two instrumental techniques (ORS-ICP-MS and ICP-oa-TOF-MS) for the determination of selected metals (Ti, V, Cr, Mn, Co, Ni and Pb) in human tissues by inductively coupled plasma mass spectrometry. The samples of human tissues were collected during revision surgeries from the patients from Orthopedics Department of University Hospital in Olomouc. Both methods were verified by the following parameters: trueness, precision, linearity of calibration, limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ) and measurement uncertainty.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, 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

.....

Poděkování

Rád bych poděkoval vedoucímu mé diplomové práce Ing. Davidu Mildemu, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, připomínky a čas, který mi při vypracování práce, zejména experimentální části věnoval.

Dále bych rád poděkoval doc. MUDr. Jiřímu Gallovi, Ph.D. za spolupráci a poskytnutí vzorků tkání, ale i Katedře analytické chemie, Přírodovědecké Fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci za poskytnutí prostoru, přístrojů a chemikálií pro vypracování mé diplomové práce.

Obsah

1. ÚVOD.....	1
2. TEORETICKÁ ČÁST	2
2.1 Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem	2
2.1.1 Zavádění vzorků.....	3
2.1.1.1 Zavádění kapalných vzorků.....	4
2.1.1.1.1 Zmlžovače.....	4
2.1.1.1.2 Mlžné komory.....	6
2.1.1.2 Zavádění pevných vzorků.....	7
2.1.1.2.1 Laserová ablace.....	8
2.1.1.2.2 Elektrotermické vypařování.....	8
2.1.2 Plazma	8
2.1.2.1 Stejnoseměrně vázané plazma (DCP)	9
2.1.2.2 Mikrovlnně indukované plazma (MIP)	9
2.1.2.3 Indukčně vázané plazma (ICP).....	9
2.1.2.3.1 Plazmová hlavice	10
2.1.2.3.2 Princip výboje	11
2.1.2.3.3 Princip ionizace vzorku v ICP	11
2.1.3 Interface.....	12
2.1.4 Iontová optika.....	13
2.1.5 Hmotnostní analyzátoři	14
2.1.5.1 Kvadrupolový analyzátoři	14
2.1.5.2 Průletový analyzátoři (TOF).....	15
2.1.5.3 Sektorový analyzátoři	17
2.1.6 Detektory	20
2.1.6.1 Faradayova klec	20
2.1.6.2 Elektronový násobič	20
2.1.6.3 Elektronový násobič s oddělenými dynodami.....	21
2.1.7 Interference.....	22
2.1.7.1 Nespektrální interference.....	22
2.1.7.2 Spektrální interference.....	22
2.1.7.2.1 Izobarické interference.....	23
2.1.7.2.2 Polyatomické interference	23
2.1.7.3 Eliminace spektrálních interferencí	25

2.1.7.4 Kolizně-reakční cely	26
2.1.7.4.1 Kolizní cely	27
2.1.7.4.2 Reakční cely	28
2.2 Rozklady biologických vzorků	29
2.3 Aplikace ICP-MS v analýze klinických vzorků	31
2.3.1 Stanovení kovů v klinických materiálech	31
2.3.2 Stanovení kovů v klinických materiálech u pacientů s implantovanou kloubní náhradou	32
2.3.3 Stanovení kovů ve zvířecích tkáních a orgánech	37
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	39
3.1 Chemikálie, přístroje a pomůcky	39
3.1.1 Chemikálie	39
3.1.2 Přístroje	40
3.1.3 Pomůcky	41
3.1.4 Analyzované klinické vzorky	42
3.2 Pracovní postupy	42
3.2.1 Příprava vzorků	42
3.2.2 Příprava certifikovaného referenčního materiálu	43
3.2.3 Rozklady klinických vzorků a certifikovaných referenčních materiálů	43
3.2.4 Příprava vodných kalibračních roztoků a interního standardu	44
3.3 Použité instrumentální techniky	45
3.3.1 ORS-ICP-MS	45
3.3.2 ICP-oa-TOF-MS	45
3.4. Statistické vyhodnocení	47
4. VÝSLEDKY A DISKUZE	48
4.1 Stanovení vybraných kovů	48
4.2 Verifikace a porovnání metod	50
4.2.1 Pravdivost	50
4.2.2 Preciznost	51
4.2.3 Kalibrační křivka	51
4.2.4 Mez detekce a mez stanovitelnosti	52
4.2.5 Nejistota měření	53
4.3 Vyhodnocení výsledků	55
5. ZÁVĚR	64
6. LITERATURA	65
7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	67

1. ÚVOD

Tato práce se zabývá možnostmi stanovení kovů v klinických materiálech. Mezi nejhojněji analyzované klinické materiály patří krev, krevní sérum, moč ale i tkáně a orgány. Klinické vzorky patří mezi komplikované matrice, ve kterých se analyzované prvky nacházejí ve stopových až ultrastopových koncentracích, proto je zapotřebí použití selektivní analytické techniky s nízkými mezemi detekce. Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem je v současnosti jednou z nejefektivnějších technik prvkové analýzy, která svou univerzálností, simultánním charakterem a nízkými mezemi detekce předčí klasické metody atomové absorpční ale i emisní spektrometrie^{1,2,3}.

Kovy se v klinických materiálech analyzují z různých důvodů: studium míry opotřebenění kloubní náhrady⁴, určení koncentrace kovů (chrom, kobalt, vanad, titan, hliník, mangan, olovo, molybden,...) uvolňující se z použitých implantátů (kolenní nebo kyčelní protézy, zubní implantáty, podvazovací spony, srdeční chlopně)^{1,2,3}, studium koncentrace kovů s nepříznivými biologickými účinky (toxicita, karcinogenní účinky, cytotoxicita)¹.

Experimentální část diplomové práce se zabývá vývojem, verifikací a porovnáním dvou instrumentálních technik a to ORS-ICP-MS a ICP-oe-TOF-MS pro stanovení vybraných kovů (Ti, V, Cr, Mn, Co, Ni a Pb) v reálných klinických vzorcích. Vzorky lidských tkání byly odebírány při revizních operacích kloubních náhrad pacientů Ortopedické kliniky Fakultní nemocnice Olomouc.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem

Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem je v dnešní době jedna z nejuniverzálnějších analytických technik prvkové analýzy. První komerční přístroj s kvadrupólovým analyzátozem byl představen na začátku osmdesátých let minulého století, od té doby se hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS) uplatnila v řadě aplikací např. při analýze stopových až ultrastopových koncentrací kovových prvků v životním prostředí, klinických vzorcích, potravinářském průmyslu, geologii. Další významnou aplikací ICP-MS je využití pro prvkovou speciální analýzu ve spojení s chromatografickými (HPLC, GC) a elektroforetickými (CZE, ITP) separačními metodami^{5,6}.

Mezi charakteristické vlastnosti ICP-MS patří^{5,6}:

- použitelnost pro většinu prvků periodické tabulky
- nízké meze detekce (na koncentrační úrovni $\mu\text{g/l}$ až pg/l)
- selektivita
- multielementární stanovení
- rychlost a automatizace analýzy
- široký lineární dynamický rozsah
- minimum nespektrálních interferencí
- schopnost analýzy stopových koncentrací v kapalných i pevných vzorcích
- informace o izotopovém složení

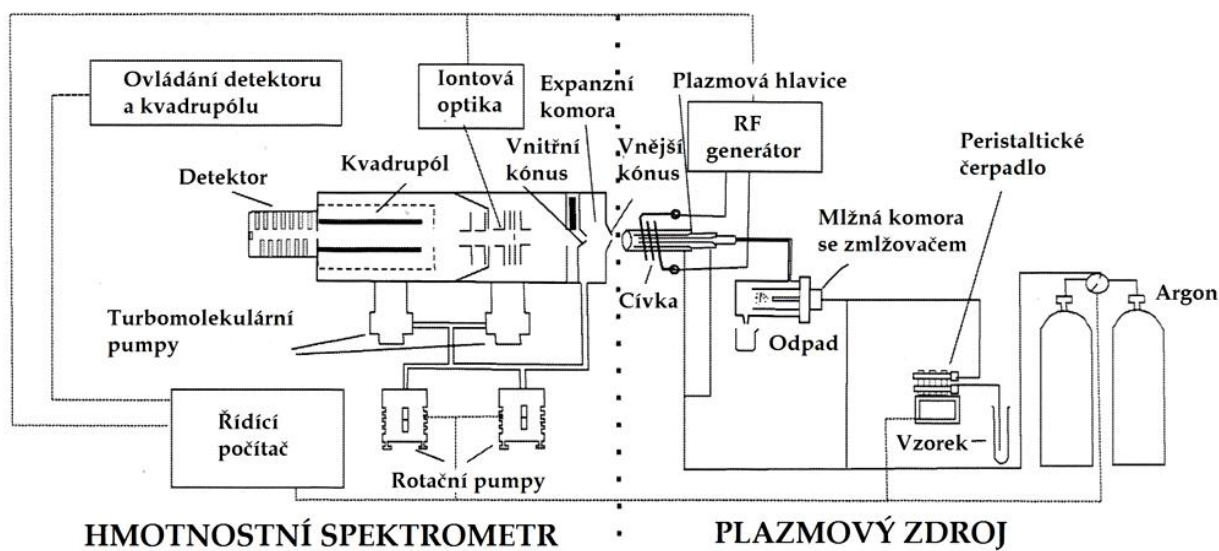
Základní součásti ICP-MS lze rozdělit do dvou skupin:

- součásti nacházející se v atmosférické části přístroje, kterými jsou peristaltické čerpadlo, zmlžovač, mlžná komora, plazmová hlavice
- součásti nacházející se v prostředí s vysokým vakuem, jimiž jsou iontová optika, hmotnostní analyzátor a detektor.

Přechod iontů z atmosférické části přístroje do hmotnostního analyzátoru zajišťuje interface, který se skládá z dvojice popřípadě i trojice kónusů s velmi malými vnitřními

otvory. Ke snížení tlaku v interface a hmotnostním spektrometru slouží vakuový systém, který se skládá ze soustavy rotačních a turbomolekulárních pump (Obr. 1)⁶.

Metoda hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem je založena na zavádění nejčastěji kapalného vzorku přes zmlžovač s mlžnou komorou do plazmatu, ve kterém dojde k ionizaci analytů a vzniku kladně nabitých iontů. Vzniklé ionty procházejí přes interface a iontovou optiku do hmotnostního analyzátoru, kde dojde k separaci iontů podle poměru m/z . Rozseparované ionty následně dopadají na detektor, který převádí proud iontů na měřitelný elektrický signál^{5,6}.



Obr. 1 Schéma ICP-MS⁷

2.1.1 Zavádění vzorků

Zavádění vzorku do indukčně vázaného plazmatu bývá spojeno s problémy, které mohou zapříčinit např. ovlivnění stability výboje, neúplnost vypaření vzorku což souvisí s potenciálním vznikem interferencí.

Ve většině použití je aerosol vytvářen zmlžováním kapalných vzorků. Méně často se ICP-MS používá k analýze pevných vzorků, kde se ke generování aerosolu využívá laserové ablace a elektrotermického vypařování. Speciální technikou zavádění plyných vzorků do plazmatu je generování těkavých hydridů (HG-ICP-MS)^{5,6,8}.

2.1.1.1 Zavádění kapalných vzorků

System tvorby aerosolu z kapalného roztoku se sestává ze dvou částí, kterými jsou zmlžovač a mlžná komora. Aerosol vzniklý ve zmlžovači je veden do mlžné komory, kde dojde k oddělení velkých kapek (průměr větší než $10\mu\text{m}$), u kterých by v plazmatu nedošlo k úplnému vypaření. Volba vhodné kombinace zmlžovače a mlžné komory (typ, vhodný materiál) může značně ovlivnit kvalitu naměřených dat^{5,8}.

K transportu kapalného vzorku do zmlžovače se využívá peristaltického čerpadla. Peristaltické čerpadlo se skládá ze soustavy malých otočných válečků sestavených do kruhu, na něž jsou pomocí přitlačných ramínek přitisknuty hadičky s analyzovanou kapalinou, interním standardem, ale i hadička odvádějící nezmlžený roztok z mlžné komory. Konstantní pohyb peristaltické pumpy a tlak válečků způsobí plynulý peristaltický pohyb kapalného roztoku uvnitř hadičky. Výhodou peristaltického čerpadla je zajištění konstantního toku kapalného roztoku bez ohledu na možné odchylky ve viskozitě vzorků, standardů a slepých pokusů. Další funkcí peristaltického čerpadla je odvod nezmlženého roztoku z mlžné komory do odpadu^{5,8}.

2.1.1.1.1 Zmlžovače

Ke generování aerosolu z kapalných vzorků se používají pneumatické zmlžovače. Kapalina vstupující do zmlžovače je převedena na aerosol v důsledku působení mechanické síly nosného plynu (nejčastěji argonu). Jelikož při generování aerosolu vznikají i větší kapky, které nejsou v plazmatu účinně vypařeny a následně ionizovány, je zpravidla přímo za zmlžovač řazena mlžná komora. Mezi základní druhy používaných pneumatických zmlžovačů patří koncentrický, mikrokoncentrický a úhlový, které jsou nejčastěji vyrobeny ze skla nebo polymerů vykazujících lepší odolnost vůči koroziivním roztokům^{5,6,8}.

Koncentrický zmlžovač

Princip zmlžování spočívá v rozprašování kapalného vzorku proudícího tenkou kapilárou na jemný aerosol v důsledku jeho styku s rychle proudícím plynem (argonem). Vysoká rychlost proudícího argonu ve spojení s nižším tlakem vzorku způsobí nasátí kapalného roztoku přes konec kapiláry a rozprašení na drobný aerosol (Obr. 2). Typický nasávací průtok je kolem 1-3 ml/min. Konstruktivním materiálem je nejčastěji borosilikátové

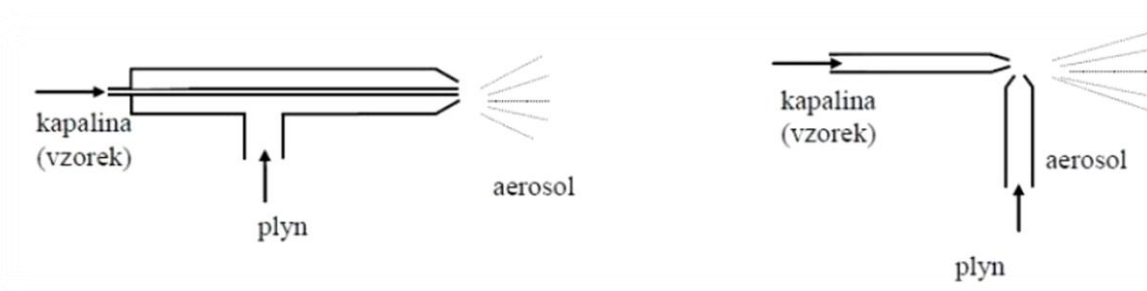
sklo, křemen ale i polymerní materiály, které jsou více odolné vůči korozivním roztokům. Koncentrické zmlžovače vykazují dobrou citlivost a stabilitu při analýzách „čistých“ vzorků, přičemž při analýzách složitějších nebo zasolených vzorků může dojít k ucpání ústí zmlžovače^{5,6,8}.

Mikrokoncentrický zmlžovač

Tento typ zmlžovače je optimalizován pro nižší nasávací průtoky kapalného vzorku (menší než 0,1 ml/min)⁵. Zmlžovač pracuje na principu koncentrického zmlžovače s použitím menších průměrů kapilár přivádějících roztok a aplikací vyšších průtoků argonu. Toto uspořádání účinně generuje velmi jemný aerosol, ale vzhledem k malému průměru použité kapiláry jsou tyto zmlžovače náchylné k ucpání, proto jsou nevhodné k použití pro vzorky s vysokým obsahem rozpuštěných látek nebo suspenze. Konstruktivním materiálem jsou polymerní materiály polyvinylfluorid (PVF), polytetrafluorethylen (PTFE) ale i borosilikátové sklo či křemen. Mikrokoncentrické zmlžovače se uplatňují v případech, kdy máme k analýze malé množství vzorku nebo ve spojení s HPLC^{5,6,8}.

Úhlový zmlžovač

U tohoto typu zmlžovače proud argonu směřuje kolmo na konec kapiláry, na rozdíl od koncentrického a mikrokoncentrického zmlžovače, kde je proud argonu veden v paralelním směru. Ke tvorbě aerosolu dochází opět v důsledku kontaktu rychle proudícího plynu s proudem kapaliny (Obr. 2). Úhlové zmlžovače jsou ve srovnání s koncentrickými méně efektivní ve vytváření drobného aerosolu, ale vzhledem k většímu průměru kapiláry a delší vzdálenosti mezi kapilárou a přívodem argonu je tento typ méně náchylný k ucpání. Z výše uvedené výhody vyplývá použití úhlových zmlžovačů k analýzám složitějších vzorků a vzorků obsahujících malé množství nerozpuštěné látky^{5,6,8}.



Obr. 2 Koncentrický a úhlový zmlžovač⁹

Další typy používaných zmlžovačů

Mezi méně používané zmlžovače patří ultrazvukový zmlžovač, ve kterém je jemný aerosol generován vibracemi pizelektrického krystalu. Výhodou zmlžovače je přeměna téměř veškerého kapalného roztoku na velmi jemný aerosol. Aby nedocházelo k zahlcení plazmatu nadbytečným rozpouštědlem, je nutné odstranit část rozpouštědla před vstupem do plazmové hlavice. K desolvataci se využívají mlžné komory termostatované na nižší teplotu či porézní membrány. K nevýhodám ultrazvukového zmlžovače patří tvorba paměťových efektů a dlouhé promývací časy^{5,6}.

Dalším typem zmlžovače je termosprej (termosprejový zmlžovač). U tohoto typu zmlžovače vzorek prochází tenkou vyhřívanou kapilárou a aerosol je vytvářen na konci kapiláry jako proud směsi zčásti odpařeného rozpouštědla a jemných kapiček. Termosprej je zařízení s podobnými vlastnostmi jako ultrazvukový zmlžovač, ale díky tenké kapiláře je náchylný k ucpávání z čehož vyplývá omezení pro vzorky s vysokým obsahem rozpuštěných pevných částic^{5,6}.

Mezi zmlžovače, které jsou vhodné pro zmlžování viskózních a suspenzních vzorků, patří V-groove a Babingtonův zmlžovač. Ale tyto zmlžovače našly uplatnění zejména v ICP-OES^{5,6,7}.

2.1.1.1.2 Mlžné komory

V současné době se používají dva typy mlžných komor a to Scottova a cyklonická mlžná komora. Funkce mlžné komory spočívá v odstranění větších kapek z aerosolu generovaného zmlžovačem a vyrovnání zmlžovacích pulzů vyvolaných pulzacemi peristaltického čerpadla. Mlžná komora může být vybavena externím chlazením, které zajistí tepelnou stabilitu vzorku a sníží množství rozpouštědel vstupujících do plazmatu. Což může přinést řadu výhod např. zvýšení stability signálu, potlačení vzniku specií oxidů a omezení zatížení plazmatu^{5,6,8}.

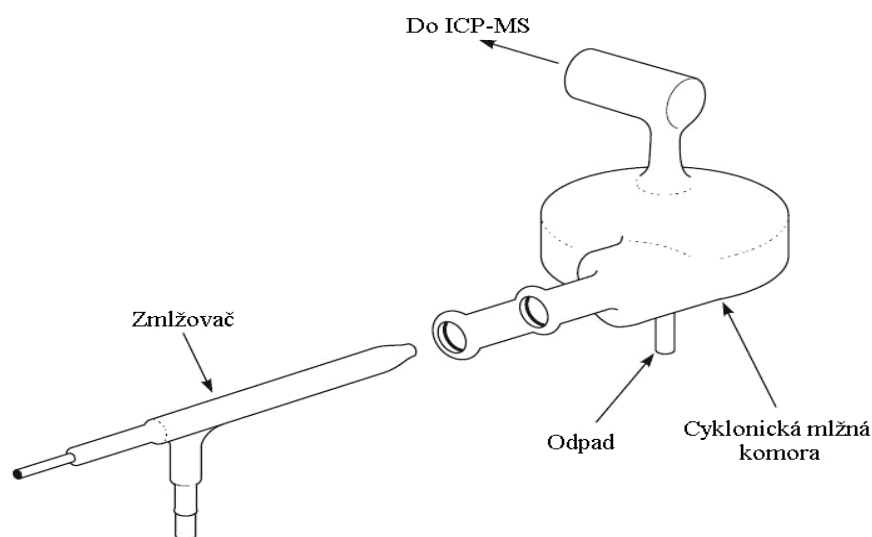
Scottova mlžná komora

Mlžná komora dle Scotta je nejběžněji používanou mlžnou komorou. Komora se skládá z dvojice koncentrických trubíc. Do mlžné komory aerosol vstupuje vnitřní trubicí, na jejímž konci je nucen změnit směr letu o 180° směrem do vnější trubice, ve které se nachází vstup do indukčně vázaného plazmatu. K tvorbě jemného aerosolu a odstranění větších kapek

dochází během cesty aerosolu mlžnou komorou působením gravitační síly, vzájemnou koagulací a nárazy kapek do stěn mlžné komory^{5,6,8}.

Cyklonická mlžná komora

K separaci jemného aerosolu se v cyklonických mlžných komorách využívá odstředivé síly. Kapičky jsou diskriminovány podle své velikosti pomocí víru, který vzniká v důsledku tangenciálního toku aerosolu vzorku a argonu uvnitř mlžné komory. Jemný aerosol je veden spolu s argonem do plazmové hlavice, zatímco velké kapky jsou po kontaktu se stěnou odváděny z mlžné komory do odpadu (Obr. 3). Cyklonická mlžná komora vykazuje vyšší účinnost, což pro čisté vzorky znamená možnost dosažení vyšší citlivosti a nižších mezí detekce. Cyklonické mlžné komory získávají větší popularitu a jejich potenciál je postupně využíván v mnoha aplikacích. Konstrukčním materiálem je nejčastěji sklo, křemen ale i polymerní materiály^{5,6,8}.



Obr. 3 Cyklonická mlžná komora s koncentrickým zmlžovačem⁵

2.1.1.2 Zavádění pevných vzorků

Pevné vzorky, které se nepodaří převést do roztoku přímo nebo s použitím mineralizačních procesů, se analyzují pomocí laserové ablace nebo elektrotermického vypařování.

2.1.1.2.1 Laserová ablace

Suchý aerosol je generován z pevného materiálu pomocí laserového paprsku o vhodné vlnové délce. Fotony laserového záření interagují s povrchem vzorku a výsledkem této interakce je uvolnění malých částic, atomů a iontů z povrchové vrstvy analyzovaného materiálu. Vzniklý aerosol je veden pomocí inertního plynu přímo do plazmové hlavice. Mezi nejčastěji používané lasery patří neodymový nebo excimerový (plynový) laser, které produkují záření v infračervené ($\lambda = 1064 \text{ nm}$) a ultrafialové ($\lambda = 266 \text{ nm}$) oblasti⁷. Výhodou laserové ablace je možnost přímé analýzy jedné či více povrchových vrstev materiálu (tkáň, umělecká díla, porcelán...)^{5,6,10}.

2.1.1.2.2 Elektrotermické vypařování

Elektrotermické vypařování slouží k analýzám kapalných, pevných vzorků a suspenzí. Velmi malé množství vzorku je nadávkováno do elektricky vyhřívané grafitové kyvety, ve které dochází za použití teplotního programu k sušení, pyrolýze a odpaření vzorku. Odpařený vzorek je dále transportován proudem argonu do plazmové hlavice. Mezi výhody můžeme zařadit velmi malou spotřebu vzorku ($5\text{-}40 \mu\text{l}$)⁶ a vhodnou optimalizací teplotního programu rovněž dokážeme eliminovat složky matrice, což vede ke snížení spektrálních i nespektrálních interferencí. Nevýhodou elektrotermického vypařování je vznik přechodových signálů s dobou trvání jen několik sekund oproti stabilním kontinuálním signálům vznikajících při použití klasických zmlžovačů^{5,6,10}.

2.1.2 Plazma

Plazma můžeme definovat jako ionizovaný plyn, který obsahuje dostatečné množství kladně a záporně nabitých iontů. Plazma je elektricky vodivé ale na venek je kvazineutrální (nenese elektrický náboj). Plazma vzniká z plynu po dodání dostatečného množství energie (formou elektrického pole), která převyšuje ionizační energii atomů plynu. Podle typu elektrického pole se plazmata dělí na stejnosměrně vázané plazma (direct current plasma – DCP), mikrovlnně indukované plazma (microwave induced plasma – MIP) a indukčně vázané plazma (inductively coupled plasma – ICP)^{5,6,10}.

2.1.2.1 Stejnoseměrně vázané plazma (DCP)

Stejnoseměrně vázané plazma vzniká v důsledku ionizace plynu (argonu) zaváděného mezi 2-3 elektrody, mezi kterými protéká vysoký proud. Ionizací plynu mezi elektrodami se produkuje plazma ve tvaru písmene Y. Mezi výhody DCP patří nižší spotřeba plazmového plynu, ale hlavně možnost analýzy vzorků s vysokým obsahem rozpuštěných pevných látek a suspenzí. Nevýhodou tohoto uspořádání je tvorba interferencí a nestabilita. V analytické praxi se stejnoseměrně vázaného plazmatu využívá jen zřídka^{5,6,10}.

2.1.2.2 Mikrovlnně indukované plazma (MIP)

Mikrovlnně indukované plazma vzniká v magnetronech pracujících s frekvencí nejčastěji 2,45 GHz (příkon 100 – 200 W)⁵. Mikrovlnné záření je vedeno do výbojové trubice, ve které se plazma generuje ve formě prstence. Výbojová trubice je vyrobena ze skla nebo křemene a jako plazmový plyn se používá argon nebo helium. Při zavádění aerosolu vodných vzorků do MIP se mohou projevit vlivy matrice a nestabilita až zhášení plazmatu. Heliové mikrovlnně indukované plazma našlo využití jako detektor v plynové chromatografii (nekovové prvky – O, S, P, Cl, I, ...) ^{5,6,10}.

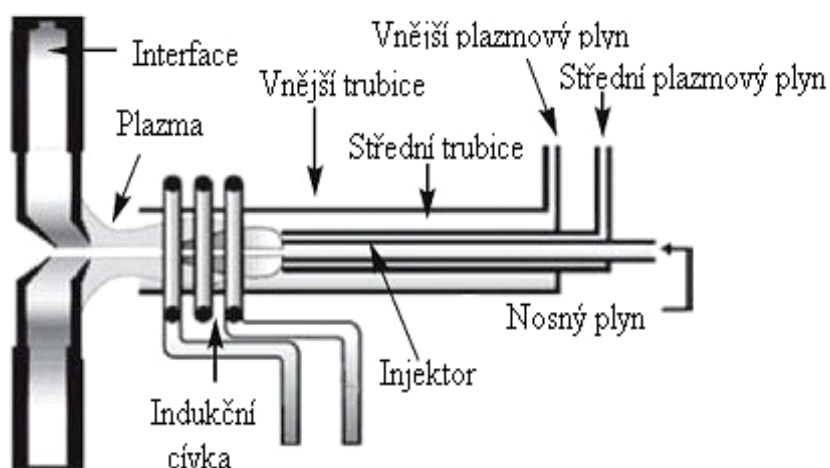
2.1.2.3 Indukčně vázané plazma (ICP)

Indukčně vázané plazma bylo poprvé použito v roce 1960 (cit.¹¹) ve spojení s optickou emisní spektrometrií, kde ICP slouží jako účinný budící zdroj. Další možnosti využití ICP přináší spojení s hmotnostní spektrometrií, kde se ICP uplatní jako zdroj iontů (počátek 80. let 20. století.)¹¹. V současnosti, vzhledem k omezeným aplikacím stejnoseměrně vázaného plazmatu a mikrovlnně indukovaného plazmatu, se indukčně vázané plazma stalo dominantním zdrojem v optické emisní ale i v anorganické hmotnostní spektrometrii.

System vzniku ICP je složen z několika elementárních částí, kterými jsou plazmová hlavice, indukční cívka a vysokofrekvenční generátor (zdroj energie)^{5,6,11}.

2.1.2.3.1 Plazmová hlavice

Plazmová hlavice se skládá ze soustavy tří soustředně uspořádaných křemenných trubic, kterými proudí plazmový plyn. Plazmové hlavice jsou vyráběny jako kompaktní (všechny trubice vytváří pevný celek) nebo kombinované (odnímatelná vnitřní trubice - injektor). Pro analýzu korozivních vzorků bývají injektory vyráběny z platiny, oxidu hlinitého nebo safíru. Plazmový plyn (nejčastěji argon) proudící plazmovou hlavicí je rozdělen do tří toků, kde každý plní jinou funkci. Vnější plazmový plyn proudící mezi vnější a prostřední trubicí průtokem 12 – 17 ml/min je nositelem výboje. Střední plazmový plyn proudící mezi prostřední trubicí a injektorem průtokem do 1 ml/min odděluje plazma od trubice (ochrana před roztavením) a stabilizuje výboj. Nosný plyn proudící injektorem průtokem 1 ml/min transportuje aerosol vzorku a zároveň vytváří uprostřed plazmatu analytický kanál. Plazmovou hlavici, která je umístěna v horizontální poloze ve vzdálenosti přibližně 10 – 20 mm od interface, obklopuje indukční cívka (Obr. 4). Cívka pro ICP-MS je mírně odlišná od cívek využívaných v ICP-OES a to hlavně z důvodu potřeby jejího uzemnění. Uzemněním zamezíme potenciálnímu vzniku sekundárního výboje mezi indukční cívkou a interface, který by mohl negativně ovlivnit stabilitu a chování plazmatu. Cívka je přímo napojena na vysokofrekvenční generátor, který pracuje při frekvenci typicky 27,1 a 40,6 MHz. Současné přístroje jsou vybaveny vysokofrekvenčními generátory s účinností 70 – 75 %, což znamená, že 70 – 75 % dodávané energie produkuje plazma^{5,6,11}.



Obr. 4 Plazmová hlavice⁵

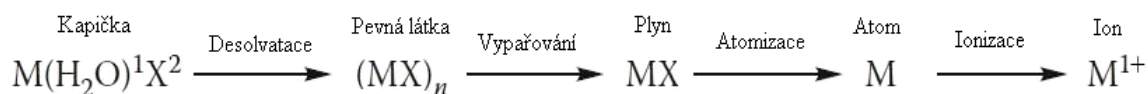
2.1.2.3.2 Princip výboje

Před vlastním vytvořením plazmového výboje musí dojít k vpuštění tangenciálně přiváděného vnějšího plazmového plynu do hlavice. Jakmile začne argon procházet plazmovou hlavici umístěnou uprostřed indukční cívky, je na tuto cívku aplikována radiofrekvenční energie (750 – 1700 W) a vzniklý střídavý proud osciluje uvnitř indukční cívky stejnou frekvencí, jako má použitý radiofrekvenční generátor (27,1 nebo 40,6 MHz). Oscilace proudu vyvolá v horní části plazmové hlavice vznik silného elektromagnetického pole. Na proud argonu v elektromagnetickém poli je následně aplikován vysokonapěťový pulz z Teslova generátoru, který způsobí odtržení elektronů z některých atomů plazmového plynu. Odtržené elektrony jsou urychleny v magnetickém poli a následně svou energii předávají ve formě srážek s dalšími atomy argonu, ze kterých jsou uvolňovány nové elektrony. Tato kolizí indukovaná ionizace nadále pokračuje řetězovou reakcí a vytváří prstencové plazma, které je složeno z neutrálních atomů, kladně nabitých iontů argonu a elektronů. Plazma je udržováno dodáváním radiofrekvenční energie do indukční cívky^{5,6,11}.

2.1.2.3.3 Princip ionizace vzorku v ICP

K ionizaci vzorku dochází při průchodu jemného aerosolu skrz plazmový výboj. Teplota plazmatu není ve všech místech (zónách) stejná, teplota se pohybuje v rozmezí 6 000 – 10 000 K. Cestou skrz plazmový výboj dochází k desolvataci aerosolu, vypařování, atomizaci pevných částic a v neposlední řadě k ionizaci volných atomů v plynném stavu (Obr. 5). Ionty, které vznikají v analytické zóně srážkami volných atomů v plynném stavu s vysokoenergetickými elektrony, jsou vedeny přes interface do hmotnostního analyzátoru^{5,6}.

Vzhledem k vysoké hodnotě 1. ionizačního potenciálu argonu (15,76 eV) lze ionizovat většinu prvků periodické tabulky do prvního stupně (kromě He, Ne, F). V indukčně vázaném plazmatu je 69 prvků ionizováno z 90 – 95 % (nižší % ionizace u S, P, Se, As, Au, halogenů...). Prvky s nízkým 2. ionizačním potenciálem (Ba a Ce) tvoří v plazmatu dvojnásobně nabitě ionty^{6,8,12}.



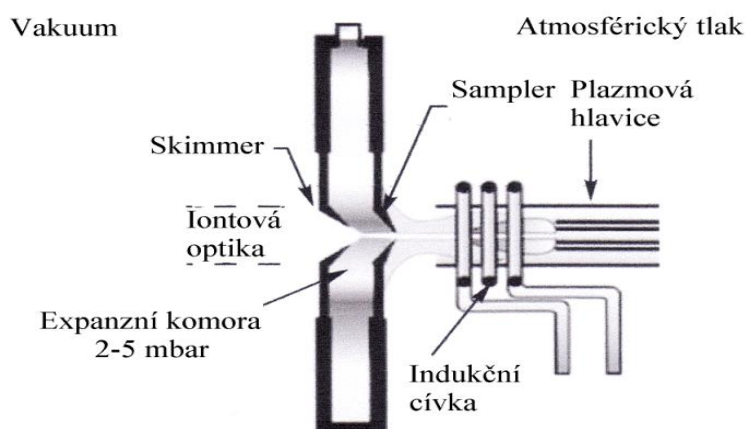
Obr. 5 Ionizace analytu v plazmové hlavici⁵

2.1.3 Interface

Interface patří mezi nejchoulostivější a nejvíce namáhané části ICP-MS. Hlavním úkolem interface je stabilní a účinný transport iontů z plazmatu do hmotnostního analyzátoru pracujícího při pokojové teplotě (300 K) a tlaku $10^{-5} - 10^{-9}$ mbar.

Interface se skládá ze dvojice kovových kónusů, v jejichž vrcholech se nacházejí otvory s velmi malými průměry. Ionty vzniklé v plazmatu jsou při průchodu prvním kónusem odděleny od hlavního toku argonu a vstupují do prostředí s nižším tlakem. První kónus se nazývá sampler (vzorkovací kónus) a otvor ve vrcholu má průměr 0,8 – 1,2 mm. Expanzní komorou je nazýván prostor mezi oběma kónusy, který je za pomoci mechanických rotačních pump udržován na tlaku 2 – 5 mbar. Z důvodu nízkého tlaku uvnitř komory dojde ke zrychlení a adiabatické expanzi proudu iontů, atomů a molekul, což vede ke značnému snížení teploty až na 100 – 200 K. Z expanzní komory je centrální proud iontů veden skrz druhý kónus (skimmer) do hmotnostního analyzátoru. Skimmer, menší z obou kónusů, má mnohem menší průměr otvoru a to obvykle 0,4 – 0,8 mm (Obr. 6).

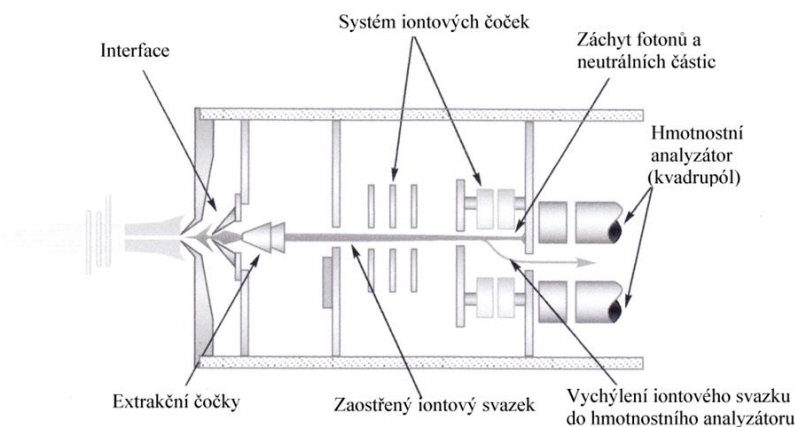
Konstrukčním materiálem kónusů je nikl, měď, hliník ale i platina, která je více odolná vůči korozivním vzorkům. Interface zajišťuje transport iontů z plazmatu (teplota až 7 500 K), proto jsou kónusy zašroubovány do vodou chlazeného bloku, který chrání kónusy před roztavením. Při analýze vzorků s vyšším obsahem rozpuštěných pevných částic, může dojít k depozici méně těkavých složek matrice na kónusech a následně až k ucpání otvorů^{5,6}.



Obr. 6 Interface ICP-MS⁵

2.1.4 Iontová optika

Mezi další důležité části ICP-MS patří iontová optika, která je umístěna mezi skimmerem a hmotnostním analyzátozem. Iontová optika je složena z jedné nebo několika elektrostaticky ovládaných čoček pracujících za tlaku okolo 10^{-3} mbar. Iontovou optiku nelze ztotožňovat s klasickou optikou používanou v AAS nebo ICP-OES, jelikož se jedná o systém kovových destiček nebo válečků, na které je vkládáno různé napětí. Funkce iontové optiky spočívá ve vedení iontů z plazmatu přes interface do hmotnostního analyzátoru a zamezení vstupu neutrálních částic a fotonů. Konstrukce iontových optik jsou založeny na faktu, že všechny neutrální částice a fotony nejsou ovlivňovány elektromagnetickým polem. První možnost eliminace je umístění kovové bariéry přímo do dráhy iontů. Neutrální částice a fotony se na této uzemněné bariéře zastaví, ale ionty jsou vychýleny elektrickým polem iontových čoček tak, aby se vyhnuly bariéře a zároveň utvořili zaostřený proud iontů vstupující do hmotnostního analyzátoru. Druhou možností je uspořádání „Off-axis“, u kterého je uspořádání interface a hmotnostního analyzátoru řešeno tak, že osa hmotnostního analyzátoru je vytočena o úhel přibližně 45° vůči ose interface. Ionty jsou opět do hmotnostního analyzátoru vychýleny pomocí elektromagnetického pole, neutrální částice a fotony jsou zachyceny na kovovém terčiku umístěném v ose proudu vstupujících iontů (Obr. 7). Nenabitě částice a fotony jsou eliminovány, jelikož jejich dopad na detektor způsobuje nestabilitu a zvyšování signálu pozadí. Některé iontové optiky jsou doplněny o extrakční čočky umístěné za posledním kónusem interface. Funkcí extrakčních čoček je podpora extrakce iontů z interface, což vede ke zlepšení mezí detekce lehčích prvků, jejichž ionty jsou z iontového paprsku vytlačovány ionty prvků s vyšší hmotností^{5,6,13}.



Obr. 7 Iontová optika Off-axis⁵

2.1.5 Hmotnostní analyzátory

K separaci iontů se v hmotnostní spektrometrii s indukčně vázaným plazmatem využívá hmotnostních analyzátorů. Mezi používané typy patří kvadrupól, průletový (Time of flight – TOF) a sektorový (Sector field – SF) analyzátor. Hmotnostní analyzátory, umístěné mezi iontovou optikou a detektorem, pracují při tlaku 10^{-6} až 10^{-8} mbar, který je udržován pomocí samostatné turbomolekulární pumpy^{5,6}.

2.1.5.1 Kvadrupólový analyzátor

V současnosti je přibližně 85 % všech používaných přístrojů ICP-MS vybaveno kvadrupólovým analyzátozem. Kvadrupól se sestává ze čtveřice válcových v ideálním případě hyperbolických tyčí, které mají stejný průměr (okolo 1 cm) a jsou i stejně dlouhé (15 – 25 cm). Konstrukčním materiálem je nerezová ocel nebo molybden, pro vyšší odolnost proti korozi mohou být tyče potaženy keramickou vrstvou.

Kvadrupólový analyzátor pracuje na principu vkládání stejnosměrné a vysokofrekvenční střídavé složky elektrického napětí tak, aby vždy dvě protější spojené tyče měly shodnou polaritu. Vhodnou kombinací poměru střídavé a stejnosměrné složky napětí na protilehlých párech dosáhneme toho, že ionty o předem zvolené hodnotě m/z budou vedeny skrz kvadrupól až k detektoru, který převede proud iontů na měřitelný elektrický signál. Ostatní ionty budou v kvadrupólu oscilovat tak, že po srážce s tyčí kvadrupólu dojde k jejich vybití. Tento proces je opakován pro další hodnoty m/z dokud nezměříme všechny vybrané prvky v analyzovaném vzorku. Skenovací rychlost kvadrupólu se pohybuje v řádu 2 500 amu/s, ale ve skutečnosti je čas potřebný pro kvantitativní stanovení 25 prvků okolo 1 - 2 minut^{5,6,14}.

Separace iontů s různou hmotností je u kvadrupólového analyzátoru ovlivněna kombinací několika faktorů, kterými jsou: tvar, průměr a délka tyčí, vakuum, frekvence, aplikované stejnosměrné a střídavé napětí ale rovněž kinetická energie vstupujících iontů.

Mezi parametry charakterizující schopnost analyzátoru separovat analytický signál od interferujícího signálu patří rozlišovací schopnost R a tzv. abundance sensitivity. Rozlišovací schopnost je v ICP-MS definována jako podíl (1)

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

kde m je nominální hmotnost analyzovaného signálu a Δm je definováno jako šířka signálu měřená při 10 % nebo 50 % výšky maxima signálu. Abundance sensitivity je veličinou charakterizující falešně pozitivní signál vedlejšího iontu ($m/z -1$, $m/z +1$), který vzniká v důsledku rozšíření analyzovaného signálu^{5,6,9,12}.

2.1.5.2 Průletový analyzátor (TOF)

Mezi další hmotnostní analyzátorů patří TOF, jehož princip separace byl publikován již v roce 1946 W. E. Stephensem¹⁴, ale až po více jak 50 letech bylo spojení ICP-TOF-MS přizpůsobeno pro komerční použití. Funkce analyzátoru je založena na předpokladu, že iontům dodáme stejnou kinetickou energii (1 keV) pomocí urychlovacího napětí.

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

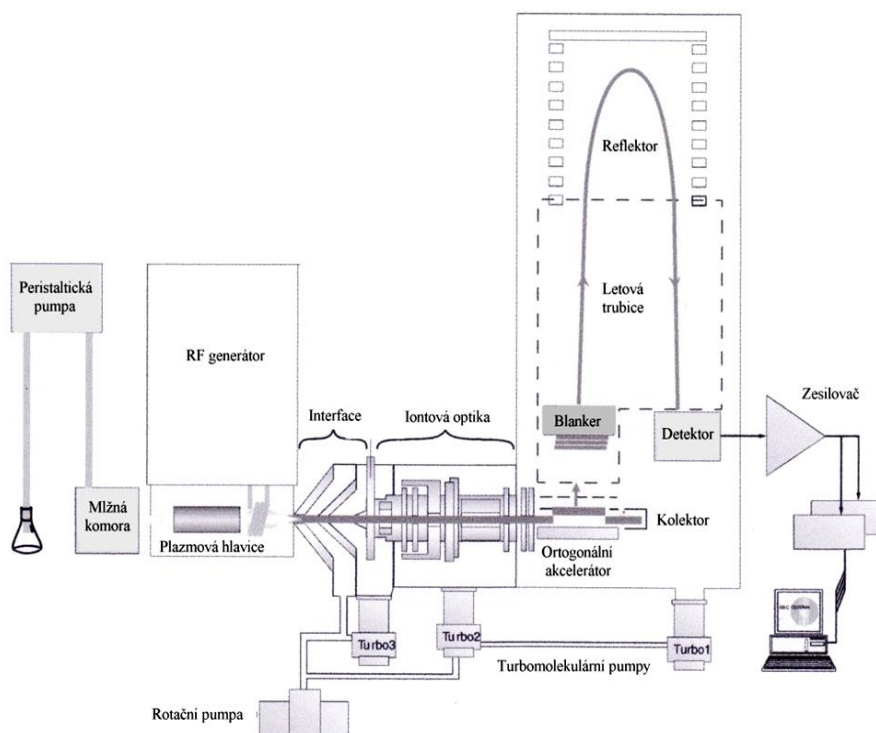
Proto pokud bereme v úvahu ionty o různé hmotnosti, kterým jsme dodali stejnou kinetickou energii, tak se ionty podle rovnice (2) budou pohybovat různou rychlostí v závislosti na jejich hmotnosti. Tento princip je využíván k separaci iontů o různých m/z v čase t s konstantní dráhou letu d , což je popsáno následující rovnicí (3).

$$\frac{m}{z} = \frac{2Ut^2}{d^2} \quad (3)$$

Z výše uvedené rovnice vyplývá, že ionty s různou hmotností dopadnou na detektor v různých časech (nejlehčí ionty dopadají na detektor jako první, dále jsou následovány ionty středně těžkými a nakonec dopadají ionty s nejvyšší hmotností). Tedy měřením intenzity a „doby letu“ iontů dopadajících na detektor přímo vzniká hmotnostní spektrum. Pro ilustraci při

použití 1 m dlouhé letové trubice je ICP-TOF-MS schopno produkovat kompletní hmotnostní spektra za méně než 50 μ s, což znamená možnost nasbírání 20 000 spekter za sekundu^{5,6,8}.

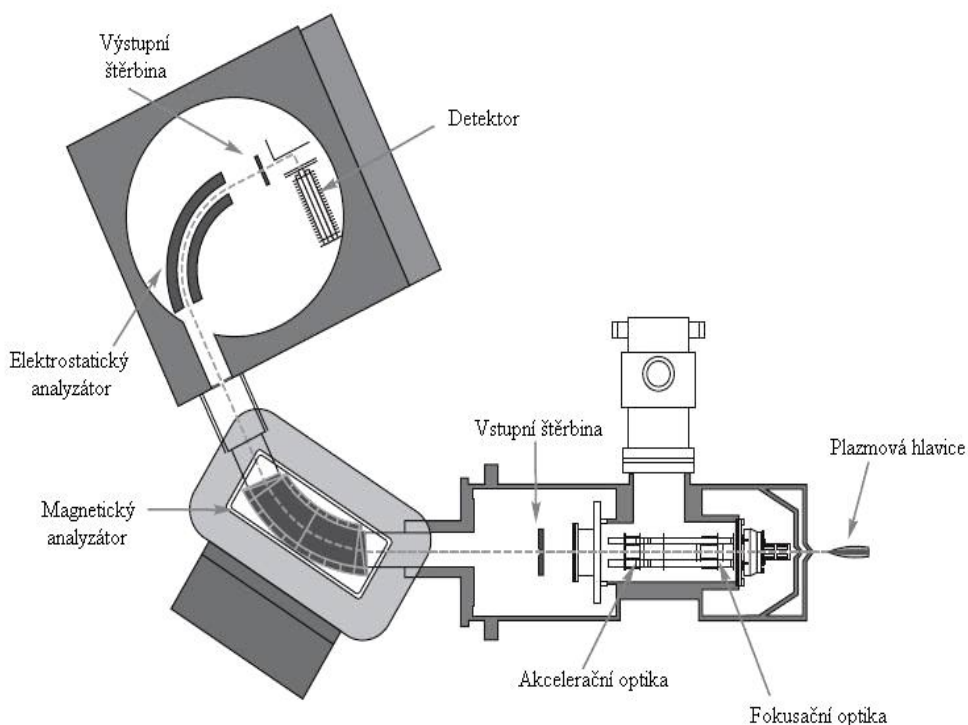
V současnosti se využívá ortogonálního uspořádání průletového analyzátoru, ve kterém je letová trubice umístěna kolmo na proud iontů přicházející z iontové optiky. Ionty z plazmového zdroje jsou po průchodu přes interface zafokusovány pomocí iontové optiky do ortogonálního akcelérátoru, ze kterého je „balík“ iontů elektrostaticky vypuzen do letové trubice. Svazek iontů je poté nasměrován na tzv. ion blanker (SMARTGATE), který z iontového svazku pomocí vychylovací elektrody odstraní nežádoucí ionty (ionty matrice, argonu). Ionty jsou dále vedeny na reflektron, který ionty vychýlí zpět do letové trubice, kde v různých časech dopadají na detektor. Reflektron je soubor elektrod, který slouží ke korekci rozptylu kinetické energie iontů o shodném m/z , tudíž různé ionty se stejným m/z dopadají na detektor ve stejném čase (Obr. 8). Použití reflektronu vede ke zlepšení rozlišovací schopnosti spektrometru. Rozlišení průletového analyzátoru se pohybuje v rozmezí 500 - 2 000, což u některých hmot nedostačuje k oddělení interferujících iontů. Potenciál ICP-TOF-MS je v multielementární analýze přechodových signálů generovaných laserovou ablací, elektrotermickým vypařováním, ale i ve spojení s kapalinovou chromatografií a kapilární elektroforézou^{5,6,13,14}.



Obr. 8 Průletový analyzátor (TOF)⁵

2.1.5.3 Sektorový analyzátor

První komerčně dostupný přístroj ICP-MS ve spojení s jednoduchým magnetickým sektorem byl uveden na trh v roce 1988 (cit.⁶). V současné době se vzhledem k nízkému rozlišení původních spektrometrů využívá analyzátorů s dvojitou fokusací. Analyzátor s dvojitou fokusací je sestaven z elektrostatického a magnetického sektoru. Uspořádání složené z 90° elektrostatického sektoru a 60° magnetického sektoru se nazývá Nier – Johnsonovo uspořádání. Geometrické uspořádání, ve kterém se elektostatický sektor nachází za magnetickým sektorem, se nazývá obrácené Nier – Johnsonovo uspořádání (Obr. 9)^{5,6}.



Obr. 9 Hmotnostní spektrometr s vysokým rozlišením⁵

Ionty jsou před vstupem do hmotnostního analyzátoru urychleny v iontové optice pomocí urychlovacího napětí několika kV. Následně jsou ionty vedeny přes vstupní štěrbinu do magnetického analyzátoru, kde jsou ionty ovlivňovány magnetickým polem. V důsledku působení magnetického pole dojde ke kruhovému zakřivení jejich dráhy s charakteristickým poloměrem r . To znamená, že ionty o různém poměru m/z budou při konstantní magnetické

indukci B a urychlovacím napětí V opisovat dráhu o různém poloměru r , což vyplývá z rovnice: (4)

$$\frac{m}{z} = \frac{B^2 r^2}{2V} \quad (4)$$

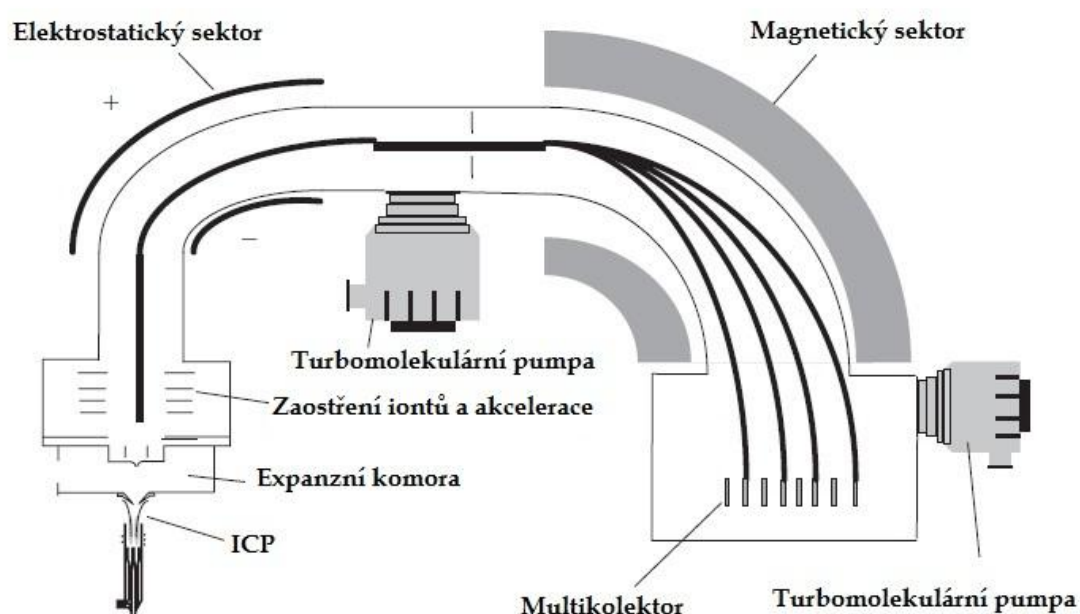
kde m je hmotnost, z náboj, B magnetická indukce, r poloměr dráhy a V urychlovací napětí. Ke skenování dle m/z dochází buď změnou magnetické indukce, nebo změnou urychlovacího napětí. Rozseparované ionty jsou vedeny dále do elektrostatického sektoru, kde dojde k fokusaci iontů podle jejich kinetické energie. Fokusaci lze vyjádřit touto rovnicí: (5)

$$zE = \frac{mv^2}{r} \quad (5)$$

kde E je intenzita elektrického pole. Z elektrostatického sektoru jsou ionty vedeny přes výstupní štěrbinu na detektor^{5,6,14}.

Použitím sektorového analyzátoru lze při měření dosáhnout velmi vysokého rozlišení ($R = 10\,000$), což vede k eliminaci (řešení) spektrálních interferencí, které jsou problémem především u kvadrupolových analyzátorů. Rozlišení se u sektorových analyzátorů ovlivňuje pomocí vhodného nastavení dvou mechanických štěrbin, kde první je umístěna na vstupu do spektrometru a druhá na jeho výstupu, před detektorem. Různě velkého rozlišení dosahujeme vhodným nastavením šířky vstupní a výstupní štěrbin. Při nastavení malých šířek štěrbin dosahujeme vysokého rozlišení, ale zároveň dochází k poklesu průchodu iontů. Tedy nastavení vysokého rozlišení může vést ke snížení citlivosti stanovení a zhoršení mezi detekce. Výhodou spektrometrů s vysokým rozlišením je vysoká citlivost v kombinaci s extrémně nízkým pozadím. Pro ilustraci při použití spektrometru v módu nízkého rozlišení lze u analytů docílit signál až 1 bilion cps (counts per second), zatímco signál pozadí je 0,1 – 0,2 cps. Spektrometry s vysokým rozlišením našly uplatnění zejména při stopových analýzách, kde klademe vysoké nároky na rozlišení, nízké meze detekce a přesnost stanovení. Dále se uplatňují k multielementárnímu stanovení ve spojení s laserovou ablací ale i s vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií^{5,6,14}.

Další aplikací sektorových analyzátorů ve spojení s indukčně vázaným plazmatem pracujících v módu nízkého rozlišení ($R = 400$) je velmi přesné měření izotopových poměrů. Přístroje MC-ICP-MS využívají Nier – Johnsonova uspořádání (elektrostatický a magnetický sektor). Předřazení elektrostatického sektoru nebo hexapólové kolizní cely naplněné kolizním plynem (Ar, He, H) je nutné ke korekci širokého rozložení kinetické energie iontů produkovaných v ICP. Po fokusaci iontů podle jejich kinetické energie jsou ionty převedeny do magnetického sektoru, kde dojde k separaci podle m/z . Rozseparované ionty poté dopadají na detektor skládajících se ze soustavy Faradayových klecí a elektronásobičů (Obr. 10)^{15,16}.



Obr. 10 Multikolektor ICP-MS¹⁵

2.1.6 Detektory

Další částí ICP-MS je detektor, který se nachází za hmotnostním analyzátozem. Svazek iontů procházející skrz hmotnostní analyzátoz dopadá na detektor, který proud iontů převede na měřitelný elektrický signál. Z důvodu analýzy stopových koncentrací analytů je většina spektrometrů vybavena elektronovým násobičem s oddělenými dynodami. Mezi dříve používané typy detektorů patří faradayova klec a elektronový násobič (channeltron)^{5,6,14}.

2.1.6.1 Faradayova klec

Faradayova klec se využívá k analýzám, u kterých se nevyžaduje nízkých mezí detekce. Princip funkce spočívá v dopadu iontů na sběrnou elektrodu a následné zachycení konvertovaných elektronů na „kleci“ obklopující sběrnou elektrodu (měření vybíjecího proudu). Pracovní rozsah detektoru začíná na 10^4 cps, tedy použití Faradayovy klece jako samostatného detektoru snižuje citlivost měření, proto se obvykle používá ve spojení s channeltronem nebo elektronovým násobičem s oddělenými dynodami. Faradayova klec je dále používána jako detektor ve spojení s magnetickým sektorem pro měření vysoce přesných izotopových poměrů^{5,6,14}.

2.1.6.2 Elektronový násobič

Princip detekce je podobný jako u fotonásobičů používaných v ICP-OES. Channeltron je otevřený skleněný kužel potažený vrstvou z polovodičového materiálu. K detekci pozitivně nabitých iontů je na začátek kuželu aplikován vysoký negativní potenciál, zatímco konec kužele je uzemněn. Ionty vystupující z hmotnostního analyzátozu jsou přitahovány negativním potenciálem kužele tak, že po kontaktu iontů s povrchem dojde k vyrazení jednoho nebo více sekundárních elektronů, které jsou vedeny dále dovnitř kužele, kde po jejich dopadu na stěnu detektoru dojde k uvolnění dalších elektronů. Tento proces se mnohokrát opakuje a výsledkem je měřitelný proud obsahující milióny sekundárních elektronů^{5,6,14}.

2.1.6.3 Elektronový násobič s oddělenými dynodami

Elektronový násobič s oddělenými dynodami pracuje na podobném principu jako channeltron s tím rozdílem, že k násobení elektronů využívá oddělených dynod. Elektronový násobič je umístěn v poloze „off axis“ z důvodu minimalizace šumu, který pochází z rozptýleného světla a neutrálních částic vznikajících v ICP. Ionty jsou z hmotnostního analyzátoru nasměrovány na první dynodu, ze které jsou po dopadu iontů emitovány sekundární elektrony. Vzniklé sekundární elektrony jsou urychleny směrem k další dynodě, kde po dopadu opět vzniká velké množství sekundárních elektronů. Tento proces je opakován na dalších dynodách, což vede ke tvorbě mnohonásobně zesíleného elektronového pulzu, který je následně zachycen na anodě. Elektronový násobič je složen z 15 až 20 oddělených dynod, které jsou pokryty vrstvičkou sloučeniny s vysokou emisí elektronů. Vzhledem k použití oxidů kovů s vysokou emisí elektronů a rozdílnému způsobu generování sekundárních elektronů vykazují elektronové násobiče s oddělenými dynodami obvykle 50 – 100 % vyšší citlivost oproti channeltronu^{5,6,14}.

Zvýšení dynamického rozsahu detektoru lze docílit použitím dvou měřících módů a to pulzního a analogového. Pulzní mód poskytuje větší zesílení elektronového pulzu, čehož se využívá ke stanovení nízkých koncentrací (nízké cps). Přejít z pulzního do analogového módu spočívá ve snížení napětí na elektronovém násobiči, které vede ke snížení zesílení elektronového pulzu. Analogový mód se využívá ke stanovení vysokých koncentrací (vysoké cps). V moderních přístrojích se k simultánnímu stanovení širokého rozsahu koncentrací využívá dvoustupňového elektronového násobiče. Jehož princip je založen na měření signálu iontu v analogovém módu na prostřední dynodě, pokud je signál vyšší než prahová hodnota tak je signál zpracován přes analogový obvod. Jestliže je signál nižší než prahová hodnota, tak je signál zesílen na zbývajících dynodách a je zpracován jako pulzní signál klasickým způsobem^{5,6,9}.

2.1.7 Interference

Interference, se kterými se setkáváme v hmotnostní spektrometrii s indukčně vázaným plazmatem, se dělí na dvě hlavní skupiny a to na nespektrální a spektrální interference. Spektrální interference jsou nejvíce problematickým druhem interferencí projevujících se u spektrometrů s nízkým rozlišením^{5,6}.

2.1.7.1 Nespektrální interference

Nespektrální interference lze rozdělit na základě tří různých vlivů na interference ovlivňující transport a zmlžování vzorku, interference ovlivňující ionizaci v plazmatu a posledním typem je blokování kuželů interface usazenými solemi. Tyto interference jsou způsobovány vyšším obsahem rozpuštěných pevných látek, kyselin a snadno ionizovatelných prvků v analyzovaném vzorku, které ovlivňují transport, tvorbu a následnou separaci jemného aerosolu, ionizaci a v neposlední řadě se mohou usazovat na kónusech interface.

Nejčastější způsob eliminace nespektrálních interferencí spočívá v použití vhodného interního standardu, který je v nízké koncentraci (ppb) přidán ke kalibračním standardům, slepým pokusům i reálným vzorkům. Vhodně zvolený interní standard musí splňovat určitá kritéria: nesmí být obsažen v analyzovaném vzorku, musí mít podobný ionizační potenciál a chování v plazmatu a v neposlední řadě by měl mít i podobnou hmotnost, což u multielementárního stanovení vyžaduje použití směsi několika interních standardů. Mezi prvky nejčastěji používané jako interní standard patří ⁴⁵Sc, ⁸⁹Y, ¹⁰³Rh, ¹¹⁵In, ²³²Th (cit.^{5,6}).

2.1.7.2 Spektrální interference

Spektrální interference patří mezi nejvíce problematické interference vyskytující se v ICP-MS. Spektrální interference lze rozdělit do dvou hlavních skupin, kterými jsou izobarické a polyatomické interference. Spektrální interference značně závisí na rozlišovací schopnosti použitého hmotnostního analyzátoru^{5,6}.

2.1.7.2.1 Izobarické interference

Jelikož se prvky v přírodě vyskytují jako směs několika izotopů (až 70 % prvků), může dojít k situaci, kdy izotop prvku vyskytujícího se ve vzorku vytváří izobarickou interferenci na shodné nominální hodnotě hmotnosti jako měřený analyt. Příkladem může být nikl, který má k dispozici dva izotopy na atomové hmotnosti 58 a 60. Izotop ^{58}Ni (relativní zastoupení 67,9 %) je ale zatížen interferencí od izotopu ^{58}Fe (relativní zastoupení 0,31 %). Proto je ke stanovení niklu v přítomnosti železa vhodné využít izotopu ^{60}Ni (relativní zastoupení 26,2 %), který není zatížen interferencemi, nebo použití matematických korekčních rovnic. Jak již bylo naznačeno, tak k eliminaci izobarických interferencí se využívá volby vhodného izotopu a použití matematických korekčních rovnic^{5,17}.

2.1.7.2.2 Polyatomické interference

Polyatomické interference vznikají v důsledku sloučení dvou nebo i více různých atomických iontů, jejichž výsledná hodnota m/z je stejná jako hodnota m/z analyzovaného prvku. Ke vzniku polyatomických interferencí dochází spojením iontů plazmového plynu s matricí vzorku (rozpuštědlo, molekuly vzorku,...), ostatními prvky obsažených ve vzorku ale i s kyslíkem a dusíkem z okolního vzduchu. Při použití argonového plazmatu jsou nejčastěji pozorované interference způsobené ionty vznikající kombinací argonu s jinými atomy. U analýz vodných vzorků se vytváří polyatomický ion $^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}^+$ interferující při stanovení izotopu železa $^{56}\text{Fe}^+$. Při analýzách, kdy se používají mineralizační činidla (nejčastěji anorganické kyseliny), může docházet k tvorbě polyatomických iontů kombinací iontů argonu s atomy pocházející z minerálních kyselin. Například v kyselině chlorovodíkové vzniká kombinací $^{40}\text{Ar}^+$ a ^{35}Cl polyatomický ion $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$, který interferuje stanovení arsenu na jeho jediném izotopu ^{75}As . Při analýzách kovů v organických matricích interferuje stanovení izotopu ^{52}Cr (nejvíce zastoupený izotop Cr) polyatomický ion vznikající kombinací $^{40}\text{Ar}^+$ a ^{12}C (Tab. I)^{5,17}.

Tab. I Polyatomické interference způsobené maticí či rozpouštědlem⁵

Izotop	Matrice	Interference
$^{39}\text{K}^+$	H_2O	$^{38}\text{ArH}^+$
$^{40}\text{Ca}^+$	H_2O	$^{40}\text{Ar}^+$
$^{56}\text{Fe}^+$	H_2O	$^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}^+$
$^{80}\text{Se}^+$	H_2O	$^{40}\text{Ar}^{40}\text{Ar}^+$
$^{51}\text{V}^+$	HCl	$^{35}\text{Cl}^{16}\text{O}^+$
$^{75}\text{As}^+$	HCl	$^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$
$^{28}\text{Si}^+$	HNO_3	$^{14}\text{N}^{14}\text{N}^+$
$^{44}\text{Ca}^+$	HNO_3	$^{14}\text{N}^{14}\text{N}^{16}\text{O}^+$
$^{55}\text{Mn}^+$	HNO_3	$^{40}\text{Ar}^{15}\text{N}^+$
$^{48}\text{Ti}^+$	H_2SO_4	$^{32}\text{S}^{16}\text{O}^+$
$^{52}\text{Cr}^+$	H_2SO_4	$^{34}\text{S}^{16}\text{O}^+$
$^{64}\text{Zn}^+$	H_2SO_4	$^{32}\text{S}^{16}\text{O}^{16}\text{O}^+$
$^{63}\text{Cu}^+$	H_3PO_4	$^{31}\text{P}^{16}\text{O}^{16}\text{O}^+$
$^{24}\text{Mg}^+$	Organická matrice	$^{12}\text{C}^{12}\text{C}^+$
$^{52}\text{Cr}^+$	Organická matrice	$^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}^+$
$^{65}\text{Cu}^+$	Horniny	$^{48}\text{Ca}^{16}\text{OH}^+$
$^{64}\text{Zn}^+$	Horniny	$^{48}\text{Ca}^{16}\text{O}^+$
$^{63}\text{Cu}^+$	Mořská voda	$^{40}\text{Ar}^{23}\text{Na}^+$

Jiný typ spektrálních interferencí vzniká v chladnějším zónách plazmatu kombinací prvků s H^+ , $^{16}\text{O}^+$ a $^{16}\text{OH}^+$ z vody nebo vzduchu. Tedy dochází ke vzniku molekulárních hydridů (+ H^+), oxidů (+ $^{16}\text{O}^+$) a hydroxidů (+ $^{16}\text{OH}^+$), které mají hmotnost o 1, 16 nebo 17 hmotnostních jednotek vyšší než původní prvek. Tento typ interferencí se vyskytuje u vzorků obsahující kovy vzácných zemin a refraktorní prvky, které snadno tvoří molekulární specie (nejčastěji oxidy) vytvářející spektrální překryv s prvky ve stejné skupině. Společně s těmito interferencemi mohou vznikat v plazmovém výboji i dvojnásobně nabití ionty. Jsou to ionty, které nesou dvojnásobný náboj oproti klasickým iontům, tudíž vytváří izotopický pík v oblasti jejich poloviční hmotnosti. Množství vznikajících oxidických a dvojnásobně nabitých iontů lze minimalizovat optimalizací podmínek plazmového výboje (průtok zmlžovacího plynu, RF výkon, pozice plazmové hlavice,...)^{5,17,18}.

2.1.7.3 Eliminace spektrálních interferencí

V současné době existuje mnoho různých přístupů jak eliminovat spektrální interference. V první řadě vhodná volba izotopu, který je co nejméně zatížen polyatomickými interferencemi, dále odstraněním rozpouštědla z aerosolu analyzovaného vzorku (desolvací) snížíme pravděpodobnost tvorby polyatomických interferencí pocházejících z rozpouštědla. Mezi další používané přístupy řadíme použití matematických korekčních rovnic, aplikaci metody tzv. studeného plazmatu, dále využití kolizně-reakčních cel a v neposlední řadě měření na spektrometrech s vysokým rozlišením, které je nejlepším a pravděpodobně nejefektivnějším přístupem k eliminaci spektrálních interferencí^{5,17,18}.

Matematické korekční rovnice

Matematické korekční rovnice se používají k eliminaci izobarických ale i méně závažných polyatomických interferencí (pokud nemáme jiný izotop ke kvantitativnímu stanovení). Principem této metody je měření intenzity interferujícího izotopu nebo interferující specie na jiné hmotě, která není zatížena interferencemi. Korekce se docílí znalostí poměrů relativního zastoupení interferujícího iontu na analytické a alternativní hmotnosti. Například při analýze ^{114}Cd v přítomnosti cínu interferuje stanovení izotop ^{114}Sn s relativním zastoupením 0,65 %). Tedy měříme intenzitu na hmotnosti 114 společně s intenzitou izotopu ^{118}Sn (relativní zastoupení 24,23 %) a pro kvantitativní stanovení kadmia můžeme napsat rovnici⁵: (6)

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

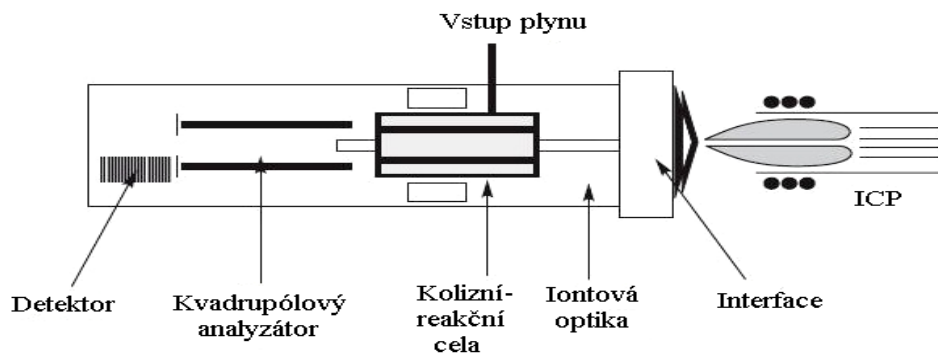
K eliminaci polyatomických interferencí se matematických korekcí využívá ke stanovení ^{51}V , ^{52}Cr , ^{54}Fe , ^{75}As , ^{82}Se , kde stanovení ovlivňují polyatomické ionty $^{35}\text{Cl}^{16}\text{O}^+$, $^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}^+$, $^{37}\text{Cl}^{17}\text{O}^+$, $^{37}\text{Cl}^{16}\text{OH}^+$, $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$, $^{32}\text{S}^{17}\text{O}_2^{16}\text{O}^+$, $^{33}\text{S}^{16}\text{O}_2^{17}\text{O}^+$ (cit.¹⁹).

Cool/Cold plasma

Metoda tzv. studeného plazmatu se používá v případech, kdy je intenzita interferujícího iontu vysoká, ale intenzita (koncentrace) analytu je velmi nízká. Tato metoda byla publikována na konci 80. let 20. století⁵ a využívá plazmatu o nižší teplotě k eliminaci polyatomických interferencí pocházejících z argonu ($^{38}\text{ArH}^+$, $^{40}\text{Ar}^+$, $^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}^+$, ...) ovlivňující stanovení K, Ca, Fe. U této metody se využívá snížení výkonu RF generátoru a zvýšení průtoku nosného plynu (RF výkon 500 – 800 W, průtok nosného plynu 1,5 – 1,8 ml/min) oproti klasickým podmínkám (RF výkon 1000 – 1400 W, průtok nosného plynu 0,8 – 1,0 ml/min), což má za následek potlačení tvorby polyatomických interferencí a tedy zlepšení mezí detekce analyzovaných prvků. Metoda studeného plazmatu není vhodná pro multielementární stanovení kovů, protože nízká energie v plazmatu má vliv na ionizaci prvků s vysokým ionizačním potenciálem (ionizační energie nad 7 eV). Modifikací tohoto přístupu je použití tzv. „shielding“ elektrody umístěné mezi indukční cívku a plazmovou hlavici, která napomáhá zmírnit tvorbu polyatomických interferencí bez ovlivnění signálu analytu^{5,18}.

2.1.7.4 Kolizně-reakční cely

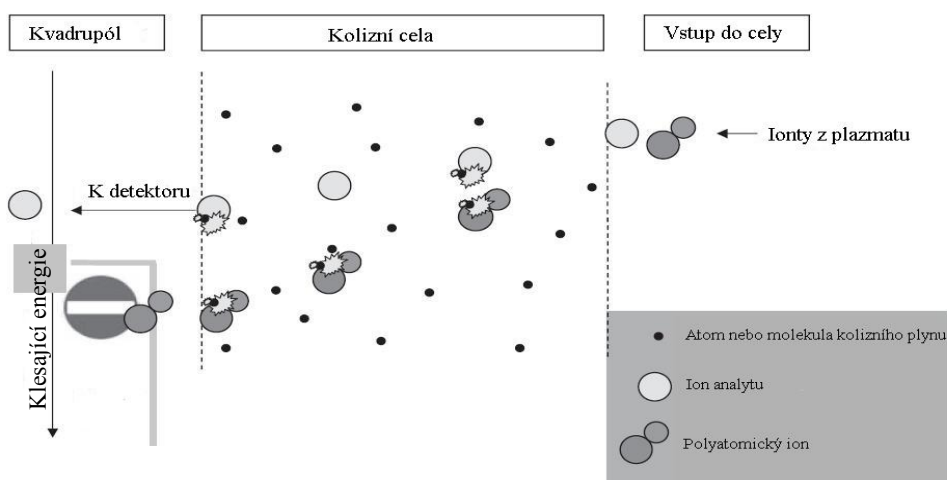
Kolizně-reakční cely se v současnosti využívají k eliminaci polyatomických interferencí ve spojení s kvadrupólovými analyzátory. Ionty vzniklé v plazmatu jsou vedeny přes interface do kolizně-reakční cely umístěné před kvadrupólovým analyzátorem (Obr. 11). Kolizně-reakční plyn (helium, vodík, amoniak, kyslík, methan) je veden přes vstupní ventil do kolizně-reakční cely, kterou je multipól (kvadrupól, hexapól, oktapól) obvykle pracující v RF módu. Radiofrekvenční pole nevykazuje separační účinek jako klasické kvadrupóly, ale slouží k transportu a k zafokusování iontů, které se v cele srážejí a reagují s molekulami pracovního plynu. Polyatomické interference jsou řadou různých iontově - molekulových kolizí a reakcí převedeny na neinterferující specie nebo na jiné ionty, které neinterferují stanovení příslušného analytu. Podle typu použitého kolizního plynu, mechanismu eliminace polyatomických interferencí a typu multipólu se cely dělí: na kolizní a reakční cely^{5,9,18}.



Obr. 11 Pozice kolizně-reakční cely v přístroji⁵

2.1.7.4.1 Kolizní cely

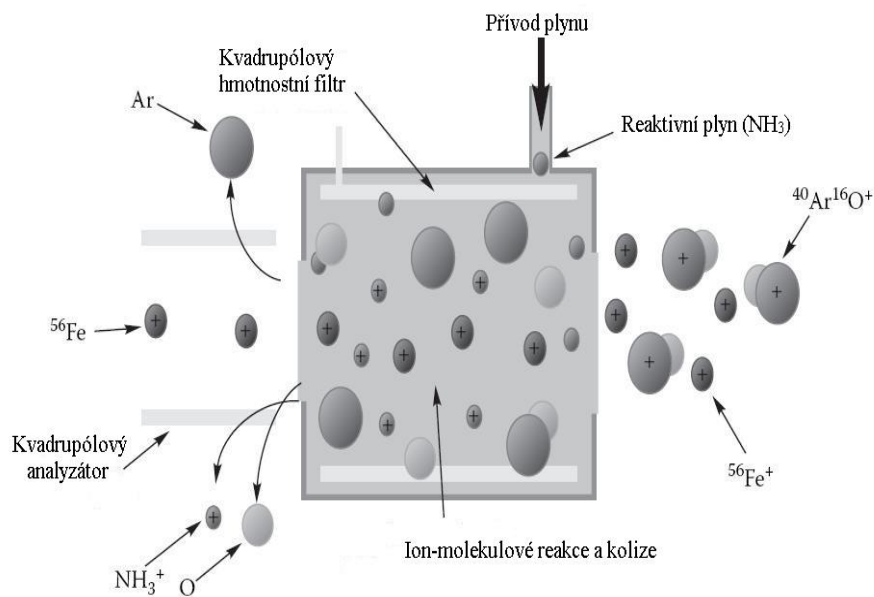
Kolizní celou je nejčastěji hexapól nebo oktapól, který je vyplněn inertním plynem (He, Ne, Ar, Xe)¹⁸. K eliminaci interferencí je využit mechanismus diskriminace kinetické energie (KED – kinetic energy discrimination), který je založen na srážkách analytu a interferentu s nereaktivním kolizním plynem, kdy při každé srážce ion předá část své kinetické energie koliznímu plynem. Srážkový průřez interferujících iontů je podstatně vyšší, tedy interferující ionty podstoupí větší počet ion – molekulových kolizí, což má za následek výraznější snížení kinetické energie oproti iontům analytu. Nastavením vhodného retardačního potenciálu na výstupu z kolizní cely vytvoříme potenciálovou bariéru, kterou nejsou polyatomické ionty s nízkou kinetickou energií schopny překonat. Ionty analytu vzhledem ke své vyšší kinetické energii tuto bariéru překonávají a jsou vedeny dále do hmotnostního analyzátoru (Obr. 12)^{5,9,18}.



Obr. 12 Mechanismus diskriminace kinetické energie⁵

2.1.7.4.2 Reakční cely

Reakční cely (DRC – dynamic reaction cell) využívá kvadrupól, který je vyplněn reaktivním plynem (H_2 , NH_3 , CH_4 , O_2 , atd.)¹⁸. Kvadrupólový analyzátor plní funkci hmotnostního filtru a je charakterizován pásmem propustnosti, které měníme v závislosti na měřené hodnotě m/z analyzovaného prvku. Eliminace polyatomických interferencí je založena na chemické reakci interferentů s reakčním plynem za vzniku neinterferujících specií o rozdílném poměru m/z a nebo neutrálních částic. Ionty analyzovaných prvků poté vstupují do hmotnostního analyzátoru bez interferujících částic (Obr. 13). Po vhodném nastavení šířky pásma propustnosti prochází reakční celou jen stabilní ionty (ionty analytu) a ostatní (nestabilní) ionty se vybíjejí na tyčích nebo stěnách reakční cely, čímž zamezíme vzniku nových interferujících iontů. Použití vysoce reaktivních plynů vede ke zvýšení počtu ion – molekulových reakcí uvnitř reakční cely, což ve výsledku přispívá k rychlejší a efektivnější eliminaci interferujících částic^{5,9,18}.



Obr. 13 DRC – princip eliminace polyatomických interferencí⁵

2.2 Rozklady biologických vzorků

Rozklad můžeme definovat jako chemický proces, při kterém dochází k nevratné destrukci původní sloučeniny, tedy rozložený vzorek není možné po odstranění rozkladné směsi převést na původní sloučeninu²⁰.

Rozklady biologických a organických látek, předcházející stanovení anorganických analytů, můžeme rozdělit podle použitého postupu na:

- **rozklady na suché cestě** (využívající spalování, zpopelňování biologického vzorku)
- **rozklady na mokré cestě** (využívající zejména mineralizaci kyselinami s klasickým a mikrovlnným ohřevem za normálního, zvýšeného ale i vysokého tlaku)
- **ostatní druhy rozkladů** (využívající rozkladu enzymatického, fotolytického,...)

Rozklad na suché cestě

Rozklad vzorků na suché cestě patří mezi nejdéle používané rozklady. Vlastní rozklad se skládá ze čtyř kroků, kterými jsou sušení, spalování, zpopelňování a v neposlední řadě rozpouštění popela v minerální kyselině. Tento rozklad probíhá v otevřených kelímcích (porcelánové, platinové) za atmosférického tlaku, což může vést ke ztrátě těkavých prvků (např. Hg, Pb, Cd, Ca, As, Sb, Cr a Cu)¹⁷. Ztrátu těkavých prvků můžeme částečně potlačit přidáním soli ($Mg(NO_3)_2$, $Ca(NO_3)_2$,...), která s prvky vytvoří méně těkavou sloučeninu. Výhodou zpopelňování je možnost rozkladu vyšších navážek, které eliminují potenciální nehomogenitu vzorku. Analytické využití je limitováno ztrátami analytů vypařováním, rezistencí některých matric vůči zpopelnění, problémy s rozpuštěním popela v minerálních kyselinách, možnost kontaminace a nakonec časová náročnost vlastního rozkladu^{17,20}.

Rozklad na mokré cestě

Mokrý rozklad biologických vzorků je založen na oxidaci vzorků působením koncentrovaných kyselin s oxidačními účinky, které můžeme ještě umocnit přidáním dalšího oxidačního činidla (H_2O_2 , KI,...). K rozkladu se využívá nejčastěji kyselina dusičná, sírová, chloristá ale i jejich libovolné směsi. Na míru rozkladu nemá vliv jen charakter rozkládaného vzorku a rozkladných činidel ale i teplota, při které vlastní rozklad probíhá. Jelikož používané kyseliny nemají dostatečně vysokou teplotu varu, proto se v nutných případech potřebné teploty varu kyselin dosahuje mineralizací za zvýšeného nebo vysokého tlaku. Rozklady na

mokrě cestě lze rozdělit podle toho, jestli probíhají v otevřeném nebo uzavřeném systému ale i podle formy dodávaného tepla na systémy s konvenčním nebo mikrovlnným ohřevem^{17,20}.

Pro stopovou až ultrastopovou analýzu anorganických analytů v biologických vzorcích je nejvíce využíván mikrovlnný rozklad v uzavřeném systému. Výhodami tohoto systému jsou minimalizování možnosti kontaminace z okolního prostředí, nižší spotřeba rozkladných činidel a v neposlední řadě zkrácení doby vlastního rozkladu. Mezi hlavní nevýhody patří možnost rozkladu poměrně malých navážek, omezení možnosti dodatečného či postupného přidávání rozkladných činidel a zvýšení bezpečnostního rizika^{17,20}.

2.3 Aplikace ICP-MS v analýze klinických vzorků

2.3.1 Stanovení kovů v klinických materiálech

Rodushkin a kolektiv publikovali metodu multielementární analýzy prvků ve vzorcích krve s využitím ICP-MS s vysokým rozlišením (ELEMENT (Finnigan MAT, Brémy, Německo)). Analýza je založena na předchozím rozkladu vzorků krve kyselinou dusičnou (1 ml krve a 1 ml kyseliny dusičné o koncentraci 14 mol/l byl vystaven po dobu jedné hodiny mikrovlnnému záření v mikrovlnném mineralizátoru při 600 W). Rozložené vzorky byly naředěny do 20 ml ultračistou čistou vodou a v takto připravených vzorcích byly stanoveny koncentrace prvků. Slepý pokus byl připraven stejným způsobem (místo krve byl použit 1 ml vody). K takto připraveným vzorkům byly přidány vnitřní standardy prvků (^{45}Sc , ^{115}In , ^{175}Lu) o výsledné koncentraci 20 ng/ml.

Meze detekce byly v rozmezí od 0,0006 ng/ml pro ^{185}Re do 28 ng/ml pro ^{79}Br při použití kritéria 3σ pro určení meze detekce. Přesnost a správnost metody byla ověřena pomocí dvou certifikovaných referenčních materiálů krve (IAEA-13 Freeze dried Animal Blood (International Atomic Energy, Vídeň, Rakousko), Seronorm Trace Element Human Whole Blood (šarže 010 012, 404 108 Nycomed Pharma, Oslo, Norsko)²¹.

Alimonti se spolupracovníky použili ke stanovení koncentrace chromu a niklu v krvi hmotnostní spektrometr s indukčně vázaným plazmatem (Sciex Elan 5000 (Perkin-Elmer, Norwalk, USA)). Vzorky krve byly před analýzou rozloženy v mikrovlnném mineralizátoru za použití rozkladného programu. Ke vzorkům krve (1-3 ml) bylo přidáno 2 ml kyseliny dusičné a 2 ml peroxidu vodíku, vzorek byl po rozkladu naředěn ultračistou vodou.

Meze detekce pro ^{52}Cr byla 1,0 $\mu\text{g/l}$ a pro ^{60}Ni 0,5 $\mu\text{g/l}$ při použití kritéria 3σ pro určení meze detekce. Jako vnitřní standard byl použit roztok ^{103}Rh . Přesnost a správnost metody byla ověřena pomocí certifikovaného referenčního materiálu lidského séra materiálu (NIST 909 human serum (National Institute of Standards and Technology))²².

Pro stanovení 17 prvků v krvi vyvinuli D'Ilio a kolegové metodou ICP-MS (ELAN II DRC II (Perkin-Elmer SCIEX, Norwalk, USA)). Analýza je založena na úpravě vzorku v podobě rozkladu v mikrovlnném zařízení (1 ml krve byl smíchán s 2 ml koncentrované kyseliny dusičné a vzniklý roztok byl rozkládán při teplotě 90 °C po dobu 5 hodin). Rozložený vzorek byl naředěn čistou vodou v poměru 1:9. Ke korekci nespektrálních interferencí byly použity roztoky ^{71}Ga a ^{103}Rh o koncentraci 1 $\mu\text{g/l}$.

Meze detekce byly v rozmezí od 0,08 $\mu\text{g/l}$ pro ^{90}Zr do 37,7 $\mu\text{g/l}$ pro ^{78}Se při použití kritéria 3σ pro určení meze detekce. Správnost metody byla stanovena za využití certifikovaného referenčního materiálu krve (Serorm trace elements whole blood level-1, lot MR 4206 (SEROAS, Billingstad, Norsko)²³.

2.3.2 Stanovení kovů v klinických materiálech u pacientů s implantovanou kloubní náhradou

Case a kol. publikovali v roce 2001 postup stanovení stopových koncentrací kovů (Mo, Cr, Ni, Co) u pacientů před voperováním kloubního implantátu. Stanovení je založeno na naředění krve 1:10 roztokem 10 ml/l Triton X-100, 0,0002 mol/l EDTA a 0,01 mol/l hydroxidu amonného. Vzorek byl po naředění uschováván při teplotě 5 °C a analyzován do 48 hodin. Koncentrace kovů byly stanoveny pomocí ICP-MS s magnetickým sektorem (Element, Finnigan MAT, Brémy, Německo). Interním standardem bylo použito ^{103}Rh o výsledné koncentraci 1 $\mu\text{g/l}$.

Koncentrace molybdenu ve vzorcích krve byla $0,62 \pm 0,29 \mu\text{g/l}$, koncentrace chromu $0,22 \pm 0,26 \mu\text{g/l}$, koncentrace kobaltu $0,17 \pm 0,17 \mu\text{g/l}$ a niklu $0,99 \pm 1,15 \mu\text{g/l}$. Mez detekce byla pro ^{98}Mo , ^{52}Cr a ^{59}Co 0,06 $\mu\text{g/l}$ a pro ^{60}Ni 0,3 $\mu\text{g/l}$ při použití kritéria 3σ pro určení meze detekce³.

Hailer a kol. studovali akumulaci kovů (chromu a kobaltu) v krevním séru u pacientů s různými typy kloubní náhrady. Do studie bylo vybráno (podle kritérií věk, pohlaví, váha,...) 85 pacientů, kteří byli rozděleni do dvou skupin podle typu kloubní náhrady. V první skupině bylo 44 pacientů s kloubní náhradou typu kov-polyethylen a v druhé skupině 41 pacientů s kloubní náhradou typu kov-kov. K odběru vzorků krve bylo vybráno 17 pacientů z první a 19 pacientů z druhé skupiny.

Vzorky krve byly odebírány ve 3., 6., 12., 24. a 72. měsíci po operaci. Krev byla odstředěna při 2000 otáčkách za minutu po dobu 10 minut a krevní sérum bylo uchováno v plastové nádobce při -20 °C. Koncentrace kovů byly stanoveny metodou ICP-MS s vysokým rozlišením (Element, Finnigan MAT, Brémy, Německo). Studie prokázala výrazné zvýšení koncentrace chromu a kobaltu po 6 letech od voperování kloubního implantátu typu kov-kov, koncentrace kovů u pacientů s kloubní náhradou typu kov-polyethylen zůstaly prakticky nezměněny. Mez detekce byla 0,2 µg/l pro chrom a 0,05 µg/l pro kobalt²⁴.

Sarmiento-González a kol. studovali akumulaci kovů (Ti, V, Cr, Co, Ni a Mo) v krvi a moči u pacientů s implantovanou kyčelní nebo kolenní kloubní náhradou. Do studie bylo vybráno 74 pacientů ve věku 60 – 80 let, kde devět z nich nemělo implantovanou žádnou kloubní náhradu (kontrolní skupina). Zbývajících 65 pacientů bylo rozděleno do tří skupin podle typu a složení kloubní náhrady a každá tato skupina byla rozdělena na dvě podskupiny v závislosti na době od provedené implantace (hranice 5 let od operace).

Vzorky krve byly odebírány kovovou jehlou obklopenou plastovou kanylou, prvních 5 ml bylo použito na proplach odběrového systému a dalších 5 ml bylo převedeno do odběrové nádoby s draselnou solí heparinu. Vzorky ranní moči byly převedeny do nádobek, kde k nim byl přidán roztok 1 % HNO₃ pro potlačení sorpce kovů na stěnách nádoby. Poté byly vzorky moči 1 min. protřepávány a společně s krví uschovány v mrazničce při -20 °C. Před vlastní analýzou byly vzorky krve rozloženy v mikrovlnném mineralizátoru. Rozložené vzorky krve a vzorky moči byly naředěny 1:9 deionizovanou vodou a byly přidány interní standardy ⁷¹Ga a ⁸⁹Y o výsledné koncentraci 10 µg/l. Koncentrace kovů ve vzorcích byla stanovena pomocí přístroje ICP-MS s vysokým rozlišením (Element 2, Finnigan MAT, Brémy, Německo), kde prvky ⁴⁷Ti, ⁵¹V, ⁵²Cr, ⁵⁹Co, ⁶⁰Ni byly měřeny v módu středního rozlišení (R= 4 000) a ⁹⁸Mo v módu nízkého rozlišení (R= 300).

Studie prokázala zvýšení koncentrace titanu v krvi i moči pacientů s implantovanou kloubní náhradou ze slitiny titanu a prokázala, že koncentrace ostatních kovů v krvi i moči jsou velmi podobné koncentracím naměřeným u pacientů z kontrolní skupiny. Meze detekce byly pro ⁴⁷Ti 66,4 ng/l, pro ⁵¹V 1,5 ng/l, pro ⁵²Cr 4,4 ng/l, pro ⁵⁹Co 0,8 ng/l, pro ⁶⁰Ni 28,6 ng/l a pro ⁹⁸Mo 0,8 ng/l. Přesnost a správnost metody byla ověřena pomocí dvou certifikovaných referenčních materiálů moči a krve (Seronom Trace Elements Urine (Level 2, ref. 201205)

a Seronorm Trace Elements Whole Blood (Level 2, MR 9067), oba od Seronorm (Nycomed AS, Oslo, Norsko)²⁵.

Iavicoli s kolegy publikoval v roce 2006 studii, ve které sledoval akumulaci kovů (Co, Cr, Mn, Mo, Ni) v krevním séru a moči pacientů s implantovanou kyčelní kloubní náhradou. Do studie bylo vybráno 33 pacientů, kteří byli rozděleni do dvou skupin. První skupinu tvořilo 14 pacientů s implantovanou kyčelní kloubní náhradou a druhou (kontrolní) skupinu tvořilo 19 pacientů. Průměrná doba od implantování kloubní náhrady byla $15,37 \pm 4,7$ měsíců.

Vzorky krve byly odstředěny při 1 500 otáčkách za minutu a krevní sérum bylo převedeno do vialek. Vzorky krevního séra byly spolu se vzorky moči uschovány v mrazničce při $-28\text{ }^{\circ}\text{C}$. Před vlastním měřením byly vzorky moči a krevního séra naředěny 1:5 deionizovanou vodou a byl přidán interní standard ^{115}In o výsledné koncentraci 1 ng/ml. Koncentrace kovů ve vzorcích byla měřena na přístroji ICP-MS s vysokým rozlišením (Element 1, Finnigan MAT, Brémy, Německo), kde prvky ^{52}Cr , ^{55}Mn , ^{59}Co , ^{60}Ni byly měřeny v módu středního rozlišení ($R=3\ 000$) a ^{100}Mo byl měřen v módu nízkého rozlišení ($R=300$). Molybden byl stanovován na hmotnosti 100 místo 98 (nejvíce zastoupený izotop) z důvodu potlačení polyatomické interference $^{40}\text{Ar}^{58}\text{Fe}$.

Výsledky studie poukazují na výrazné zvýšení koncentrace kobaltu a chrómu u pacientů s implantovanou kloubní náhradou ale koncentrace manganu, molybden a niklu zůstávají v porovnání s kontrolní skupinou prakticky neměnné. Meze detekce jsou uvedeny v následující tabulce (Tab. II)²⁶.

Tab. II Meze detekce pro stanovení kovů v krevním séru a moči²⁶

Prvek	Meze detekce ($\mu\text{g/l}$)	
	Krevní sérum	Moč
^{59}Co	0,02	0,01
^{52}Cr	0,02	0,02
^{55}Mn	0,03	0,01
^{100}Mo	0,05	0,40
^{60}Ni	0,01	0,03

Cílem studie Sarmiento-Gonzáleze a kol. bylo vyvinutí metody pro stanovení stopových koncentrací kovů (Mo, Co, Cr, Ti, Ni, V) ve vzorcích krve a moči pacientů po 2 letech od voperování kloubního implantátu. Vzorky krve (1 ml) byly smíchány s 2 ml kyseliny dusičné, 1 ml peroxidu vodíku a rozloženy v mikrovlnném mineralizátoru. Rozložené vzorky krve a vzorky moči byly naředěny 1:9 deionizovanou vodou a byly přidány standardy ^{71}Ga a ^{89}Y o výsledné koncentraci 10 $\mu\text{g/l}$. V takto připravených vzorcích byly stanoveny koncentrace kovů pomocí ORS-ICP-MS s využitím kolizně/reakční cely a vodíku jako kolizního plynu (Agilent 7500c, Agilent Technologies, Tokio, Japonsko).

K identifikaci možných spektrální interferencí byl ve studii použit HR-ICP-MS (Element, Finnigan MAT, Brémy, Německo), který pracoval v módu středního rozlišení ($R=3000$). Porovnáním výsledků stanovení referenčních materiálů na obou přístrojích bylo zjištěno, že při použití ORS-ICP-MS nedochází k úplnému potlačení spektrálních interferencí při stanovení ^{47}Ti v krvi (interferující polyatomický iont $^{31}\text{P}^{16}\text{O}$) Tab. III a ^{51}V v moči (interferující polyatomický iont $^{35}\text{Cl}^{16}\text{O}$).

Meze detekce byly v rozmezí 3 – 450 ng/l pro jednotlivé kovy při použití kritéria 3σ pro určení meze detekce (Tab. IV). Správnost metody byla ověřena pomocí dvou certifikovaných referenčních materiálů krve a moči materiálů (Seronorm Trace Elements Urine (Level 2, ref. 201205) a Seronorm Trace Elements Whole Blood (Level 2, MR 9067), oba od Seronorm (Nycomed AS, Oslo, Norsko)²⁷.

Tab. III Výsledky stanovení Seronorm Trace Elements Whole Blood (Level 2) v $\mu\text{g/l}$ ²⁷

Prvek	Referenční hodnota	ORS-ICP-MS		HR-ICP-MS (R = 3000)
		Cela vypnuta	Cela zapnuta	
^{47}Ti	2,5 (0,1)	400,7 (52,8)	338,7 (31,8)	2,3 (0,3)
^{51}V	3,7 (0,6)	6,1 (0,4)	4,0 (0,5)	3,3 (0,2)
^{52}Cr	5,7 (0,6)	40,0 (1,6)	7,3 (1,0)	6,1 (0,5)
^{59}Co	5,2 (0,6)	5,7 (0,4)	5,5 (0,4)	5,3 (0,6)
^{60}Ni	6,8 (1,7)	5,2 (2,4)	5,9 (1,7)	4,8 (0,8)
^{95}Mo	6,0 (0,7)	7,4 (0,5)	6,0 (0,7)	7,3 (0,6)

Tab. IV Meze detekce prvků v ng/l²⁷

Prvek	ORS-ICP-MS		HR-ICP-MS (R = 3000)
	Cela vypnuta	Cela zapnuta	
⁴⁷ Ti	100	70	120
⁵¹ V	350	3	30
⁵² Cr	450	6	70
⁵⁹ Co	7	10	40
⁶⁰ Ni	30	50	130
⁹⁵ Mo	250	260	215

Liu s kolegy publikoval v roce 2011 postup stanovení chromu a kobaltu v lidských vlasech. Do studie bylo vybráno (podle kritérií věk, pohlaví, diagnóza, BMI...) 44 pacientů, kteří byli rozděleni podle typu kloubní náhrady do dvou skupin. V první skupině bylo 22 pacientů s kloubní náhradou typu kov - kov a v druhé skupině 22 pacientů s kloubní náhradou typu kov - polyethylen.

Vlasy (2 g o délce 1,5 cm) byly sbírány ze zadní strany krku nůžkami z nerezové oceli. Předúprava spočívala v jejich promytí rozpouštědly (v pořadí aceton, dvakrát deionizovaná voda, aceton) a sušení při pokojové teplotě. Příprava vzorku, kterou vypracovali Jean-Pierre a kolektiv⁹, byla založena na smísení 25 mg vlasů s 0,25 ml superčisté kyseliny dusičné a rozkladu v mikrovlnném mineralizátoru při teplotě 70 °C po dobu 1 hodiny. Rozložený vzorek vlasů (0,1 ml) byl neředěn 3,9 ml roztoku, který vznikl smícháním 0,5 % butanolu, 0,65 % HNO₃, 0,01 % tritonu X-100 a přidáním Rh (1ppb) jako interního standardu. V takto upraveném vzorku byly stanoveny koncentrace kovů pomocí ORS-ICP-MS (Agilent 7500ce, Agilent Technologies, Tokio, Japonsko).

Studie prokázala výrazné zvýšení koncentrace chromu a kobaltu po 6 a 12 měsících od voperování kloubní náhrady typu kov-kov. Koncentrace chromu a kobaltu se u kloubní náhrady typu kov-polyethylen po operaci výrazně neliší od hodnot naměřených před chirurgickým zákrokem. Z výše uvedených závěrů lze říci, že akumulace chromu a kobaltu v lidském těle značně závisí na typu použité kloubní náhrady²⁸

2.3.3 Stanovení kovů ve zvířecích tkáních a orgánech

Cílem studie Sarmiento-Gonzáleze a jeho spolupracovníků bylo vyvinutí metody pro stanovení titanu v krvi a v různých orgánech krys WISTAR (plíce, játra, ledviny, srdce, slezina). K experimentu bylo použito 16 krys, které byly rozděleny do dvou studií. Do první studie bylo zařazeno 7 krys. Třem zvířatům byl implantován do stehenní kosti titanový drátek o průměru 1 mm na dobu 18 měsíců, zbývající 4 krysy byly použity jako kontrolní skupina. Ve druhé studii bylo použito 9 krys, které byly rozděleny do tří skupin po třech zvířatech. První skupině byla injekčně podána suspenze TiO_2 v 0,9 % roztoku NaCl, druhé skupině byla aplikována suspenze $\text{Ti}(\text{citrate})_3$ v 0,9 % roztoku NaCl a poslední skupině byl injekčně aplikován 0,9 % roztok NaCl (kontrolní skupina).

Vzorky krve byly rozloženy kyselinou dusičnou a peroxidem vodíku (k 1ml vzorku krve bylo přidáno 8 ml HNO_3 (zředěné 1: 3) a 1 ml peroxidu vodíku) v mikrovlnném mineralizátoru za použití rozkladného programu. Rozložený vzorek byl naředěn na 15 ml dest. vodou a byl přidán standard ^{71}Ga o konečné koncentraci 10 ppb. Přesně navážené vzorky orgánů (250 mg) byly připraveny stejným způsobem. Ke stanovení koncentrace ^{47}Ti byl použit ICP-MS s vysokým rozlišením (Element 2 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)).

První studie potvrdila zvýšené koncentrace titanu u skupiny krys s implantovaným titanovým drátkem po dobu 18 měsíců. Druhá studie prokázala zvýšené koncentrace titanu ve všech orgánech po aplikaci $\text{Ti}(\text{citrate})_3$ a zvýšení koncentrace titanu v plicích po aplikaci suspenze TiO_2 . Mez detekce byla pro ^{47}Ti 0,066 $\mu\text{g/l}$ při použití kritéria 3σ pro určení meze detekce. Přesnost metody byla ověřena pomocí dvou certifikovaných referenčních materiálů (Seronorm Trace Elements Urine Blank (ref. 201205, LOT NO 2525) a Seronorm Trace Elements Whole Blood (Level 1, LOT MR 4206), oba od Seronorm (Nycomed, Oslo, Norsko)¹.

Rubio s kolegy publikoval metodu stanovení kobaltu, chromu a titanu v různých orgánech krys po 12 měsících od voperování kovových implantátů. Analýza je založena na rozkladu vzorků kyselinou dusičnou a stanovení koncentrace prvků hmotnostním spektrometrem s indukčně vázaným plazmatem (ELAN 500 (Perkin-Elmer Sciex, Norwalk, USA)). Ke studii byly použity samičky krys WISTAR o hmotnosti cca. 200 g a stáří tři

měsíce. Všem samičkám byl voperován do pravé zadní nohy implantát potažený vrstvičkou $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$ (tloušťka vrstvičky 4 μm) a polovině krys byl implantován do levé zadní nohy Co-Cr implantát a druhé polovině krys byl implantován do levé zadní nohy Ti implantát. Implantáty měli tvar válce (6 mm na délku a 1 mm v průměru).

Po 12 měsících byly krysy usmrceny a jejich orgány (plíce, ledviny, játra a slezina) byly sušeny v sušárně při 110°C po dobu 48 hodin, následně rozetřeny a smíchány v achátové třecí misce. Asi 500 mg každého práškového vzorku orgánu bylo smícháno se 4 ml HNO_3 a rozloženo v mikrovlnném mineralizátoru za použití rozkladného programu. Rozložený vzorek byl odpařen téměř do sucha, ke vzorku byl přidán 1 μg Sc a celý vzorek byl naředěn 0,1 % HNO_3 na 25 ml. Slepý pokus byl připraven stejným způsobem.

Studie prokázala zvýšené koncentrace Co, Cr, Ti v orgánech krys. Nejvyšší koncentrace kobaltu byla naměřena v ledvinách, nejvyšší koncentrace chromu a titanu ve slezině. Koncentrace hliníku se nezměnila, což dokazuje, že nedošlo k degradaci (porušení) vrstvičky $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$ na povrchu implantátu. Meze detekce kovů byly 0,2 ng/ml při použití kritéria 3σ pro určení meze detekce².

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Chemikálie, přístroje a pomůcky

3.1.1 Chemikálie

- CRM jednoprvkových vodných kalibračních roztoků o hmotnostní koncentraci $1,000 \pm 0,002$ g/l (Ni, Pb v 2 % HNO_3 (v/v)) o čistotě 99,999 %, Analytika spol. s.r.o., Praha
- CRM vodného kalibračního roztoku o hmotnostní koncentraci $1,000 \pm 0,002$ g/l (In v 2 % HNO_3 (v/v)) o čistotě 99,999 %, Analytika spol. s.r.o., Praha
- CRM vodného kalibračního roztoku o hmotnostní koncentraci $1,000 \pm 0,002$ g/l (Co v 2 % HNO_3 (v/v)) o čistotě 99,995 %, Analytika spol. s.r.o., Praha
- CRM vodného kalibračního roztoku o hmotnostní koncentraci $1,000 \pm 0,002$ g/l (Cr v 2 % HCl (v/v)) o čistotě 99,995 %, Analytika spol. s.r.o., Praha
- CRM vodného kalibračního roztoku o hmotnostní koncentraci $1,000 \pm 0,002$ g/l (Ti v 5 % HNO_3 + 1 % HF (v/v)) o čistotě 99,98 %, Analytika spol. s.r.o., Praha
- CRM vodného kalibračního roztoku o hmotnostní koncentraci $1,000 \pm 0,002$ g/l (Mn v 2 % HNO_3 (v/v)) o čistotě 99,98 %, Analytika spol. s.r.o., Praha
- CRM vodného kalibračního roztoku o hmotnostní koncentraci $1,000 \pm 0,002$ g/l (V v 2 % HNO_3 (v/v)) o čistotě 99,95+ %, Analytika spol. s.r.o., Praha
- kalibrační roztok interního standardu pro ICP-MS INT MIX1 $10 \pm 0,1$ mg/l (Y, In, Bi, Tb v 5 % HNO_3 (v/v)) Analytika spol. s.r.o., Praha
- kyselina dusičná 67 % (Analpure, pro stopovou analýzu), Analytika spol. s.r.o., Praha
- peroxid vodíku 30 % (pro stopovou analýzu) Analytika spol. s.r.o., Praha
- Tuning Solution for ICP-MS 7500cs $1 \mu\text{g/l}$ (Ce, Co, Li, Mg, Tl, Y v 2 % HNO_3 (v/v)), Agilent Technologies, USA

- Tuning Solution 1 ppm (Ce, U, Ta, Y, La, Bi, Nd, Sr, Li, Pb, In, Ca, B, Mo, Co, Ba), RMI, s.r.o, Lázně Bohdaneč.

- certifikovaný referenční materiál krve SeronomTM Trace Elements Whole Blood L-2 (REF 210205, LOT 1003192), SERO AS, Norsko

certifikovaný referenční materiál krve SeronomTM Trace Elements Whole Blood L-3 (REF 210305, LOT 1003193), SERO AS, Norsko

- certifikovaný referenční materiál tkáně humra Non defatted lobster hepatopancreas reference material for trace metals LUTS-1, NRC-CNRC, Kanada

- deionizovaná voda ($\geq 18,2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$)

3.1.2 Přístroje

- ORS-ICP-MS 7700x, Agilent Technologie, Japonsko

- ICP-oa-TOF-MS spektrometr Optimass 9500, GBC, Austrálie

- lyofilizátor ALPHA 1-2 LD plus, CHRIST, Německo

- mikrovlnný rozkladný systém MLS 1200 mega, Milestone, Itálie

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

- ultrazvuková lázeň D-78224, Elma, Německo

- zařízení k přípravě deionizované vody Direct – Q UV Millipore, Francie

Mikrovlnný laboratorní systém MLS 1200 mega slouží k rozkladům analytických vzorků za zvýšené teploty a tlaku. Rozklad probíhá v šesti uzavřených vysokotlakých mineralizačních kelímcích s využitím mikrovlnného záření. Mikrovlnné záření působí na rozkladnou směs (nejčastěji kyseliny s přidavkem oxidovadla), která účinnou absorpcí mikrovln dosáhne teploty varu, kdy dochází k výraznému zvýšení tlaku v mineralizačních kelímcích. Zvýšením teploty a tlaku dosáhneme maximálního urychlení rozkladu. Pro dosažení konstantního ohřevu jsou mineralizační nádoby umístěny v rotoru, který se pohybuje konstantní rychlostí.

K ORS-ICP-MS byl připojen autosampler ASX-520 (Agilent Technologies, USA), dalšími částmi spektrometru byly peristaltická pumpa (10 válečků), mikrokoncentrický zmlžovač GE Micromist, chlazená Scottova mlžná komora, dvojice niklových kónusů, oktapólová reakčně-kolizní cela a kvadrupólový analyzátor. K analýzám byl použit argon o čistotě nejméně 4.6 (zásobník Euro-Cyl 230, SIAD) a pro potlačení spektrálních interferencí při stanovení Ti, V, Cr, Mn, Co a Ni byla využita oktapólová reakčně-kolizní cela s heliem jako kolizním plynem o čistotě 5.5 (SIAD).

Hlavními součástmi ICP-oe-TOF-MS jsou peristaltická pumpa (12 válečků), skleněný koncentrický zmlžovač, chlazená cyklonická mlžná komora (objem 70 ml), trojice niklových kónusů a průletový analyzátor s ortogonální akcelerací. Letová trubice (délka 0,7 m) byla vybavena reflektorem, který prodlouží efektivní separační délku na 1,4 m. Nejtěžší sledovaný ion (260 amu) dopadne na detektor za 32 μs ²⁹. K měření byl použit argon o čistotě nejméně 4.6 (zásobník Euro-Cyl 230, SIAD).

3.1.3 Pomůcky

- teflonové mineralizační kelímky s víčky
- keramický nůž - Xeramic
- automatické pipety Finnpiquette® F2 (100 – 1000 μl , 1 – 5 ml), Thermo SCIENTIFIC
- skleněné laboratorní nádoby (destičky, odměrné baňky 10, 25 ml, nálevky)
- plastové laboratorní nádoby (zkumavky se závitem a víčky, kelímky, pipetovací špičky)

Skleněné i plastové nádoby, které bylo použito k přípravě vzorků, kalibračních a referenčních roztoků, bylo ponecháno v 10 % kyselině dusičné po dobu 24 hodin. Následně několikrát opláchnuto deionizovanou vodou. Takto připravené laboratorní nádoby bylo vysušeno v sušárně a skladováno v plastových sáčcích s uzávěrem.

3.1.4 Analyzované klinické vzorky

Vzorky tkání byly odebírány přednostou Ortopedické klinice Fakultní nemocnice Olomouc doc. MUDr. Jiřím Gallem, Ph.D. při revizních operacích pacientů s implantovanou kloubní náhradou. Tkáně byly odebírány skalpelem v těsné blízkosti kloubní náhrady a poté byly převedeny do plastových kelímků s víčky. Takto odebrané vzorky byly převezeny do laboratoře a uschovány v mrazničce při -20 °C.

Pro stanovení byly vybrány tyto kovy (Ti, V, Cr, Mn, Co, Ni a Pb). Vybrané kovy jsou součástmi slitin, které se nejčastěji využívají k výrobě kloubních náhrad. Tyto kovy se mohou důsledkem opotřebovávání kloubních náhrad uvolňovat do tělních tekutin (krev, kloubní výpotek, moč,...) a tkání obklopující kloubní náhradu^{1,25}.

3.2 Pracovní postupy

3.2.1 Příprava vzorků

Vzorky tkání byly sušeny za použití lyofilizátoru po dobu 4 hodin (Tab. V), po lyofilizaci byly plastové kelímky se vzorky uschovány v plastových sáčcích v mrazničce. Před vlastní analýzou byly vzorky nechány cca 30 minut rozmrznout při laboratorní teplotě. Z plastových kelímků byly vzorky převedeny na skleněnou destičku, na které byly pomocí keramického nože děleny na menší části. Části tkání byly převedeny do předem zvážených mineralizačních kelímků, navážky vzorků tkání se pohybovaly v rozmezí 0,0708 – 0,2752 g. Ke vzorkům v mineralizačních kelímcích byla přidána rozkladná směs složená z 2 ml 67 % kyseliny dusičné a 1 ml 30 % peroxidu vodíku a takto připravené vzorky tkání byly rozloženy v mikrovlnném rozkladném systému. Z každého vzorku byly připraveny 3 repliky pro kvantitativní stanovení vybraných kovů. Slepý pokus byl připraven z 2 ml 67 % kyseliny dusičné a 1 ml 30 % peroxidu vodíku.

Tab. V Podmínky lyofilizace

Fáze sušení	Čas (h)	Teplota (°C)	Tlak (mbar)
Hlavní sušení	3,5	-25	0,630
Dosušení	0,5	-76	0,001

3.2.2 Příprava certifikovaného referenčního materiálu

Přípravy certifikovaných referenčních materiálů byly provedeny dle návodu uvedeného výrobcem. CRM byly vyjmuty z mrazničky a nechány rozmraznout při laboratorní teplotě. Certifikovaný referenční materiál tkáň humra (LUTS-1) byl homogenizován v ultrazvukové lázni. Z homogenní suspenze byl automatickou pipetou odebrán 1 ml certifikovaného referenčního materiálu, jenž byl převeden do předem zváženého mineralizačního kelímku, který byl opět zvážen (eliminace chyb při pipetování viskózního materiálu). Po rozmražení certifikovaného referenčního materiálu plné krve (Whole Blood L-2, L-3) byl otevřen šroubový uzávěr a mírně pootevřena gumová zátka tak, aby se lahvička zaplnila atmosférickým vzduchem, ale nedošlo ke ztrátám lyofilizátu. Dále byla gumová zátka odstraněna a připipetovány 3 ml deionizované vody. Po uzavření lahvičky byl obsah promíchán krouživým pohybem, tak aby nedošlo ke vzniku pěny a lahvička byla nechána stát po dobu 30 minut. Nakonec byl obsah lahvičky opět promíchán a z takto připraveného roztoku byl automatickou pipetou odebrán 1 ml certifikovaného referenčního materiálu. Certifikované referenční materiály byly rozkládány v jednom kruhu mikrovlnného systému společně s analyzovanými klinickými vzorky.

3.2.3 Rozklady klinických vzorků a certifikovaných referenčních materiálů

Rozklad klinických vzorků a certifikovaných referenčních materiálů probíhal v mikrovlnném laboratorním systému, jenž umožňuje souběžný rozklad v šesti teflonových mineralizačních kelímcích. K mineralizaci byl použit softwarově řízený vícekrokový rozkladný program (Tab. VI).

Po vychladnutí mineralizačních kelímků zhruba na laboratorní teplotu byl mineralizát kvantitativně převeden do 10 ml odměrných baněk a doplněn po rysku deionizovanou vodou. Takto připravené vzorky byly před analýzou převedeny do 10 ml plastových zkumavek, které byly kompatibilní se sloty autosampleru. Po převedení vzorků byly mineralizační kelímky několikrát promyty deionizovanou vodou a po napipetování 3 ml 67 % kyseliny dusičné byl proveden kompletní proces mineralizace (čistící krok).

Tab. VI Rozkladný program

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

3.2.4 Příprava vodných kalibračních roztoků a interního standardu

Pro přípravu kalibračních roztoků byly využity jednoprvkové vodné kalibrační roztoky (Ti, V, Cr, Mn, Ni, Co, Pb) o výchozí hmotnostní koncentraci 1,000 g/l. Pro přípravu kalibračních roztoků byly používány 25 ml skleněné odměrné baňky, pipetovací špičky a plastové kelímky předpřipravené pro stopovou analýzu. V prvním kroku byl ze všech jednoprvkových vodných kalibračních roztoků připraven směsný kalibrační roztok o hmotnostní koncentraci 10 mg/l, který byl dále dle potřeby ředěn. V jednom zředovacím kroku bylo uplatněno maximálně 100 násobné ředění. Konečné kalibrační roztoky byly okyseleny 67 % kyselinou dusičnou na koncentraci, která odpovídala přidavku kyseliny ke klinickým vzorkům a referenčním materiálům. Kalibrační sada pro ORS-ICP-MS se sestávala z pěti kalibračních roztoků o hmotnostní koncentraci 0,1; 1; 10; 100 a 300 µg/l. Kalibrační sada pro ICP-oe-TOF-MS se sestávala opět z pěti kalibračních roztoků o hmotnostní koncentraci 0,01; 0,1; 1; 10 a 100 µg/l, ke kterým byl přidán interní standard In o výsledné koncentraci 10 µg/l.

Pro měření na ORS-ICP-MS byl připraven roztok interního standardu (Bi, Y, Tb, In) o hmotnostní koncentraci 100 µg/l. Standard byl připraven ředěním zásobního roztoku interního standardu pro ICP-MS (INT MIX 1) o výchozí hmotnostní koncentraci 10 mg/l a vzniklý roztok byl převeden do zásobní plastové láhve. Interní standard In o hmotnostní koncentraci 100 µg/l pro měření na ICP-oe-TOF-MS byl připraven ředěním jednoprvkového vodné kalibračního roztoku In o výchozí hmotnostní koncentraci 1,000 g/l. Pro hmotnostní

kalibraci přístroje ICP-oa-TOF-MS byl připraven ladící roztok o koncentraci 1 ppb ředěním zásobního roztoku 1 ppm Tuning solution deionizovanou vodou.

3.3 Použité instrumentální techniky

3.3.1 ORS-ICP-MS

Ke stanovení vybraných prvků ve vzorcích tkání a certifikovaných referenčních materiálech bylo využito přístroje ORS-ICP-MS vybaveného kvadrupólovým analyzátozem a oktapólovou kolizní celou (ICP-MS 7700x). K měření prvků byly využity dva měřicí módy. K analýze Ti, V, Cr, Mn, Co, Ni bylo využito, k potlačení vlivu spektrálních interferencí, oktapólové kolizní cely s heliem jako kolizním plynem a pro stanovení Pb tato kolizní cely použita nebyla. Následující tabulky shrnují základní nastavení hmotnostního spektrometru s indukčně vázaným plazmatem pro stanovení vybraných prvků (Tab. VII, Tab. VIII).

3.3.2 ICP-oa-TOF-MS

Dále bylo ke stanovení vybraných prvků ve vzorcích a certifikovaných referenčních materiálech využito přístroje ICP-oa-TOF-MS vybaveného průletovým analyzátozem a ortogonální akcelerací (Optimass 9500). Následující tabulka shrnuje základní nastavení hmotnostního spektrometru s indukčně vázaným plazmatem pro stanovení vybraných prvků (Tab. VII).

Blanker (vychylovací elektroda) byl nastaven tak, aby vychyloval ionty v rozmezí 10,0 – 42,0 a 78,8 – 81,1 amu. Toto nastavení blankeru přispívá k eliminaci interferujících iontů pocházejících z plazmového plynu (argonu) a specií, které vznikají jako adukty argonu s ionty matrice ($^{12}\text{C}^+$, $^{14}\text{N}^+$, $^{16}\text{O}^+$, $^{17}\text{OH}^+$, $^{18}\text{H}_2\text{O}^+$, $^{28}\text{N}_2^+$, $^{30}\text{NO}^+$, $^{32}\text{O}_2^+$, $^{32}\text{S}^+$, $^{40}\text{Ar}^+$, $^{41}\text{ArH}^+$, $^{80}\text{Ar}_2^+$ (cit.¹⁹).

Tab. VII Nastavení přístrojů ICP-MS

ICP-MS Agilent 7700x

Plazmová hlavice

Příkon generátoru	1 550 W
Vnější plazmový plyn	14,95 l/min
Střední plazmový plyn	0,9 l/min
Nosný plyn	1,09 l/min
rychlost čerpání	0,1 rps

Iontová optika

Extract 1	0 V
Extract 2	-195 V

Mód [No Gas]

Kolizní cela

Cela vstup	-30 V
Cela výstup	-50 V

Mód [He]

Kolizní cela

Cela vstup	-40 V
Cela výstup	-60 V
He průtok	4,3 ml/min
Energetická diskriminace	5 V

Sběr dat

Akviziční mód	Spektrum
Peak Pattern	1 bod
Repliky měření	3
Integrační čas/hmota	Tab. VIII

ICP-oa-TOF-MS GBC Optimass 9500

Plazmová hlavice

Příkon generátoru	1 200 W
Vnější plazmový plyn	10,0 l/min
Střední plazmový plyn	0,5 l/min
Nosný plyn	0,8 l/min
rychlost čerpání	10,0 rps

Iontová optika

Skimmer	-1 250 V
Extrakce	-1 000 V
Z1	-900 V
Y mean	-750 V
Y deflection	0 V
Z lens mean	-1 290 V
Z lens deflection	0 V
Lens body	-190 V

Hmotnostní analyzátor

Reflektron	650 V
Blanker	150 V

Detektor

Elektronový násobič	2 450 V
---------------------	---------

Sběr dat

Repliky měření	5
Spektrální frekvence	33 kHz

Tab. VIII Integrační čas/hmota a měřicí mód pro jednotlivé izotopy

izotop	integrační čas (s)	měřicí mód
⁴⁷ Ti	0,1	[He]
⁵¹ V	0,1	[He]
⁵² Cr	0,3	[He]
⁵⁵ Mn	0,1	[He]
⁵⁹ Co	0,3	[He]
⁶⁰ Ni	0,3	[He]
²⁰⁸ Pb	0,3	[No Gas]

3.4. Statistické vyhodnocení

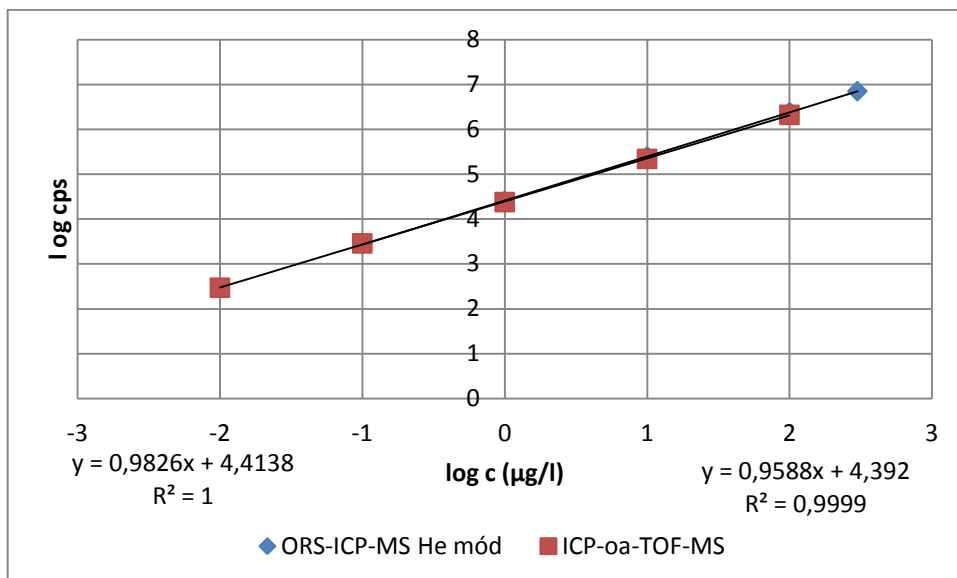
K vyhodnocení naměřených dat byl využit program Microsoft Excel a programu EffiValidation 3.0 (Effichem, Česká Republika) určený pro validaci analytických metod. Program EffiValidation byl použit pro posouzení následujících validačních parametrů: pravdivost, preciznost, mez detekce a mez stanovitelnosti.

4. VÝSLEDKY A DISKUZE

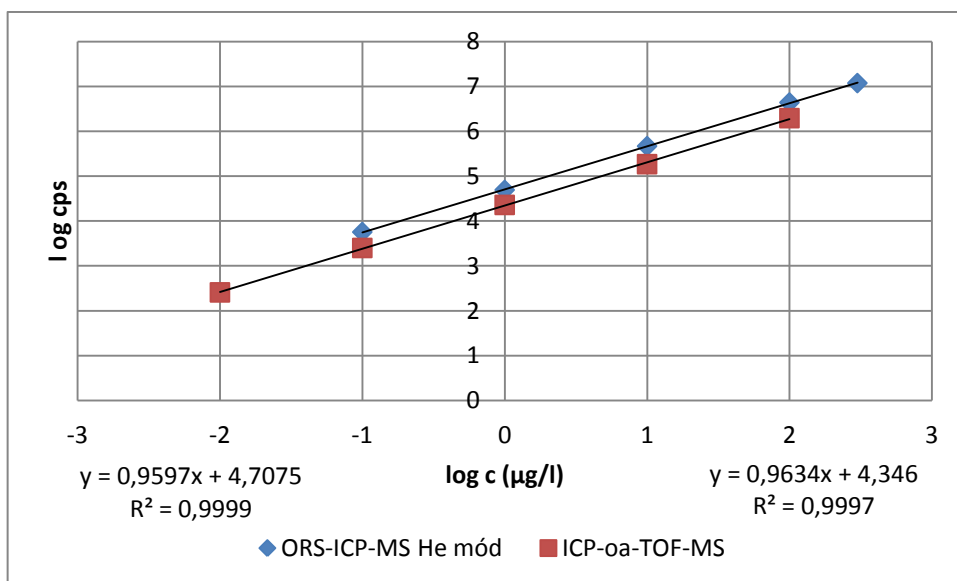
4.1 Stanovení vybraných kovů

Vybrané kovy (Ti, V, Cr, Mn, Co, Ni a Pb) byly stanoveny s využitím obou přístrojů ICP-MS, podmínky měření jsou uvedeny v experimentální části (kap. 3.3.1 a 3.3.2). Vzorky byly měřeny nejprve na přístroji ORS-ICP-MS a před měřením na ICP-*oa*-TOF-MS byly vzorky naředěny tak, aby koncentrace kovů nepřesahovala 100 µg/l (zvyšování životnosti detektoru, doporučená detekce maximálně 1 000 000 cps). Ke kvantifikaci byla využita metoda kalibrační křivky s využitím kalibrační sady sestávající se z 5 kalibračních bodů v rozmezí 0,1 – 300 µg/l pro ORS-ICP-MS a 0,01 – 100 µg/l pro ICP-*oa*-TOF-MS. Na obrázcích (Obr. 14, Obr. 15) jsou vyobrazeny kalibrační křivky pro vanad a kobalt naměřené na obou přístrojích ICP-MS. Oba měřené prvky byly u obou instrumentálních technik vztaženy na interní standard ^{115}In . Pro přehledné znázornění všech kalibračních bodů jsou kalibrační křivky uvedeny po předchozím zlogaritmování obou os.

Při měření na ICP-MS byly analyzované kovy pomocí softwaru vztaženy na interní standard, prostřednictvím kterého byly eliminovány nespektrální interference. Při měření na ORS-ICP-MS byl roztok interního standardu kontinuálně přiváděn peristaltickou pumpou po celou dobu měření spolu s kalibračními standardy, slepými pokusy, vzorky a certifikovanými referenčními materiály ke zmlžení a následné ionizaci v indukčně vázaném plazmatu. Před měřením na ICP-*oa*-TOF-MS byl interní standard přidáván přímo k roztokům kalibračních standardů, slepých pokusů, naředěných vzorků a certifikovaných referenčních materiálů. Při měření na ICP-*oa*-TOF-MS byly všechny analyzované kovy vztaženy na interní standard ^{115}In . U přístroje ORS-ICP-MS byly kovy Ti, V, Cr, Mn, Co, Ni vztaženy na interní standard ^{115}In a Pb na IS ^{209}Bi .



Obr. 14 Kalibrační křivka vanad



Obr. 15 Kalibrační křivka kobalt

4.2 Verifikace a porovnání metod

4.2.1 Pravdivost

Pravdivost definujeme jako těsnost shody aritmetického průměru získaného z většího počtu měření s hodnotou referenční (skutečnou)³⁰. Pravdivost metody byla vypočtena na základě dat získaných ze šestice nezávislých měření rozloženého certifikovaného referenčního materiálu tkáně humra Non defatted lobster hepatopancreas reference material for trace metals LUTS-1 (Tab. IX, Tab. X). Pravdivost byla vypočtena pomocí softwaru EffiValidation 3.0. Certifikované hodnoty jsou uvedeny ve tvaru $\bar{X} \pm U$, kde U reprezentuje rozšířenou nejistotu s koeficientem rozšíření $k = 2$ (95 % hladina spolehlivosti). Přiložený certifikát certifikovaného referenčního materiálu tkáně humra (LUTS-1) neposkytuje certifikované hodnoty pro titan a vanad.

Tab. IX Pravdivost (ORS-ICP-MS)

Izotop	Naměřená hodnota \bar{X} (mg/kg)	Certifikovaná hodnota $\bar{X} \pm U$ (mg/kg)	Výtěžnost (%)
⁴⁷ Ti	0,132	-	-
⁵¹ V	0,196	-	-
⁵² Cr	0,092	0,079 ± 0,012	116,2
⁵⁵ Mn	1,228	1,20 ± 0,13	102,3
⁵⁹ Co	0,055	0,051 ± 0,006	107,8
⁶⁰ Ni	0,204	0,200 ± 0,034	101,9
²⁰⁸ Pb	0,011	0,010 ± 0,002	103,3

Tab. X Pravdivost (ICP-oa-TOF-MS)

Izotop	Naměřená hodnota \bar{X} (mg/kg)	Certifikovaná hodnota $\bar{X} \pm U$ (mg/kg)	Výtěžnost (%)
⁴⁸ Ti	0,982	-	-
⁵¹ V	0,259	-	-
⁵² Cr	0,347	0,079 ± 0,012	439,2
⁵⁵ Mn	1,196	1,20 ± 0,13	99,7
⁵⁹ Co	0,050	0,051 ± 0,006	97,4
⁶⁰ Ni	0,197	0,200 ± 0,034	98,7
²⁰⁸ Pb	0,009	0,010 ± 0,002	90,0

4.2.2 Preciznost

Preciznost definujeme jako těsnost shody mezi vzájemně nezávislými výsledky zkoušek za specifikovaných podmínek³⁰. Preciznost za podmínek opakovatelnosti se vyjadřuje jako směrodatná odchylka s nebo v % jako relativní směrodatná odchylka RSD. Preciznost metody byla vypočtena na základě dat získaných ze šestice nezávislých měření rozloženého certifikovaného referenčního materiálu tkáně humra Non defatted lobster hepatopancreas reference material for trace metals LUTS-1. Hodnoty preciznosti jsou vyjádřeny v % jako RSD a jsou uvedeny v tabulce (Tab. XI). Preciznost byla vypočtena pomocí softwaru EffiValidation 3.0.

Tab. XI Preciznost

Izotop	ORS-ICP-MS	ICP-oa-TOF-MS
	RSD (%)	RSD (%)
⁴⁷ Ti	3,7	-
⁴⁸ Ti	-	3,4
⁵¹ V	3,9	2,7
⁵² Cr	3,6	8,3
⁵⁵ Mn	0,7	1,3
⁵⁹ Co	3,9	3,4
⁶⁰ Ni	6,5	1,7
²⁰⁸ Pb	9,1	9,1

- neměřeno

4.2.3 Kalibrační křivka

Kalibrační křivka je chápána jako závislost mezi dvěma proměnnými (analytickým signálem a koncentrací analytu). Těsnost vzájemného proložení je charakterizována korelačním koeficientem R. Linearita byla prokázána na základě hodnot korelačních koeficientů a příslušných rovnic kalibrační křivky (Obr. 14, Obr. 15). Parametry kalibrační křivky byly stanoveny z kalibračních roztoků pomocí softwaru MassHunter Workstation a Optimass 9500 Ver 2.12 (Tab. XII). Hodnoty korelačních koeficientů byly zaokrouhleny na 4 desetinná místa.

Tab. XII Parametry kalibrační křivky

Izotop	ORS-ICP-MS	ICP-oa-TOF-MS
	Korelační koeficient R	Korelační koeficient R
⁴⁷ Ti	1,0000	-
⁴⁸ Ti	-	0,9999
⁵¹ V	1,0000	1,0000
⁵² Cr	0,9999	1,0000
⁵⁵ Mn	1,0000	1,0000
⁵⁹ Co	1,0000	1,0000
⁶⁰ Ni	1,0000	0,9999
²⁰⁸ Pb	1,0000	1,0000

- neměřeno

4.2.4 Mez detekce a mez stanovitelnosti

Mez detekce (LOD – Limit of Detection) definujeme jako naměřenou hodnotu veličiny získanou daným postupem měření, pro kterou je pravděpodobnost nepravdivého tvrzení o nepřítomnosti složky v materiálu β , přičemž pravděpodobnost nepravdivého tvrzení o její přítomnosti je α ($\alpha, \beta = 0,05$)³¹. Mez detekce je rovna koncentraci, která poskytne signál rovný trojnásobku směrodatné odchylky pro průměr nulového signálu slepého pokusu.

Mez stanovitelnosti (LOQ – Limit of Quantification) definujeme jako nejmenší množství, jenž může být stanoveno s přijatelným stupněm pravdivosti a preciznosti. Vypočte se jako desetinásobek směrodatné odchylky pro průměr nulového signálu slepého pokusu.

Meze detekce a meze stanovitelnosti byly vypočteny na základě dat získaných z měření deseti slepých pokusů připravovaných spolu s reálnými vzorky, které byly nasbírány v období od 5.6.2012 do 5.10.2012. Meze detekce a meze stanovitelnosti byly stanoveny pomocí softwaru EffiValidation 3.0.

Dále byly vypočtené LOD a LOQ přepočteny na navážku 0,2 g a ředění do 10 ml odměrných baněk (Tab. XIII, Tab. XIV).

Tab. XIII Meze detekce a mez stanovitelnosti ORS-ICP-MS

Izotop	LOD (µg/l)	LOD (µg/g)*	LOQ (µg/l)	LOQ (µg/g)*
⁴⁷ Ti	0,299	0,015	0,995	0,050
⁵¹ V	0,031	0,002	0,102	0,005
⁵² Cr	0,144	0,007	0,482	0,024
⁵⁵ Mn	0,247	0,012	0,825	0,042
⁵⁹ Co	0,039	0,002	0,129	0,006
⁶⁰ Ni	0,256	0,012	0,855	0,043
²⁰⁸ Pb	0,067	0,003	0,224	0,011

*hodnoty LOD a LOQ přepočtené na navážku a ředění

Tab. XIV Meze detekce a mez stanovitelnosti ICP-oa-TOF-MS

Izotop	LOD (µg/l)	LOD (µg/g)*	LOQ (µg/l)	LOQ (µg/g)*
⁴⁸ Ti	0,550	0,028	1,834	0,092
⁵¹ V	0,029	0,001	0,095	0,005
⁵² Cr	0,187	0,009	0,624	0,031
⁵⁵ Mn	0,206	0,010	0,687	0,034
⁵⁹ Co	0,033	0,002	0,113	0,006
⁶⁰ Ni	0,330	0,016	1,099	0,055
²⁰⁸ Pb	0,053	0,003	0,177	0,009

*hodnoty LOD a LOQ přepočtené na navážku a ředění

4.2.5 Nejistota měření

Nejistotu měření definujeme jako nezáporný parametr charakterizující rozptýlení hodnot veličiny přiřazených k měřené veličině na základě použité informace³¹. Hodnota výsledku společně s nejistotou měření se nejčastěji uvádí ve tvaru $\bar{X} \pm U$, kde U reprezentuje rozšířenou nejistotu s koeficientem rozšíření $k = 2$ (95 % hladina spolehlivosti). Hodnoty nejistot pro jednotlivé prvky byly vypočteny podle následujících rovnic (7,8) a jsou uvedeny v tabulkách (Tab. XV, Tab. XVI). Odhad dílčích parametrů (b, c, d) kombinované nejistoty pro jednotlivé prvky byl stanoven kvalifikovaným odhadem v souladu s dokumentem EA – 4/16: Vyjadřování nejistot v kvantitativním zkoušení³².

$$u_c = \sqrt{a^2 + b^2 + c^2 + d^2} \quad (7)$$

$$U = u_c \cdot k \quad (8)$$

u_c – kombinovaná nejistota, a – preciznost za podmínek opakovatelnosti, b – příspěvek přístroje a obsluhy, c – ředění a další vlivy, d – vliv matrice, U – rozšířená nejistota, k – koeficient rozšíření (pro 95 % interval spolehlivosti $k = 2$).

Tab. XV Nejistoty měření ORS-ICP-MS

Izotop	Hladina (mg/kg)	Nejistota					
		a (%)	b (%)	c (%)	d (%)	u (%)	U (%)
⁴⁷ Ti	0,X	3,7	3	1	3	5,7	11,4
⁵¹ V	0,X	3,9	3	1	2	5,4	10,8
⁵² Cr	0,0X	3,6	3	1	3	5,6	11,2
⁵⁵ Mn	X,0	0,7	2	1	5	5,5	11,0
⁵⁹ Co	0,0X	3,9	3	1	2	5,4	10,8
⁶⁰ Ni	0,X	6,5	3	1	1	7,3	14,6
²⁰⁸ Pb	0,0X	9,1	3	1	1	9,7	19,4

a – preciznost za podmínek opakovatelnosti, b – příspěvek přístroje a obsluhy, c – ředění a další vlivy, d – vliv matrice, u_c – kombinovaná nejistota, U – rozšířená nejistota

Tab. XVI Nejistoty měření ICP-oa-TOF-MS

Izotop	Hladina (mg/kg)	Nejistota					
		a (%)	b (%)	c (%)	d (%)	u (%)	U (%)
⁴⁸ Ti	X	3,4	3	1	4	6,1	12,2
⁵¹ V	0,X	2,7	3	1	3	5,1	10,2
⁵² Cr	0,0X	8,3	3	1	3	9,4	18,8
⁵⁵ Mn	X,0	1,3	2	1	5	5,6	11,2
⁵⁹ Co	0,0X	3,4	3	1	2	5,0	10,0
⁶⁰ Ni	0,X	1,7	3	1	1	3,7	7,4
²⁰⁸ Pb	0,0X	9,1	3	1	1	9,7	19,4

a – preciznost za podmínek opakovatelnosti, b – příspěvek přístroje a obsluhy, c – ředění a další vlivy, d – vliv matrice, u_c – kombinovaná nejistota, U – rozšířená nejistota

4.3 Vyhodnocení výsledků

V experimentální části bylo analyzováno 7 vybraných kovů (Ti, V, Cr, Mn, Co, Ni a Pb) s využitím dvou přístrojů ICP-MS a to ORS-ICP-MS 7700x od firmy Agilent a ICP-oa-TOF-MS Optimass 9500 od firmy GBC. Vybrané kovy byly měřeny ve vzorcích tkání, které byly odebírány při revizních operacích pacientům Ortopedické klinice Fakultní nemocnice v Olomouci.

Při kvantitativním stanovením prvků v komplexních maticích (např. klinické vzorky) je nutné eliminovat možné spektrální interference, které mohou výrazně ovlivnit hodnoty naměřených koncentrací příslušných prvků. Spektrální interference můžeme eliminovat zejména vhodnou volbou izotopu měřeného prvku, jenž je co nejméně zatížen jak izobarickými tak polyatomickými interferencemi. K eliminaci polyatomických interferencí byla u přístroje ORS-ICP-MS využita kolizní cela s heliem jako kolizním plynem. Cela byla využita pro kvantitativní stanovení Ti, V, Cr, Mn, Co a Ni. K eliminaci polyatomických interferencí se u ICP-oa-TOF-MS nejčastěji využívá matematických korekčních rovnic. Podrobné studium možných interferencí u příslušných kovů a jejich eliminace s využitím matematických korekčních rovnic nebylo v rámci této diplomové práce studováno. Možnosti korekce polyatomických interferencí při měření komplikovaných vzorků pomocí techniky ICP-oa-TOF-MS budou zájmem dalších experimentálních měření.

Ke stanovení titanu byl při měření pomocí ORS-ICP-MS vybrán izotop ^{47}Ti (relativní zastoupení 7,32 %), protože u nejméně zastoupeného izotopu ^{48}Ti (relativní zastoupení 73,98 %) nedocházelo při použití kolizní cely k eliminaci všech spektrálních interferencí. Ke stanovení titanu pomocí ICP-oa-TOF-MS byl vybrán izotop ^{48}Ti , jelikož izotop ^{47}Ti poskytoval až 10 násobně vyšší hodnoty koncentrací. Interferující specie jsou nejčastěji adukty síry, dusíku a kyslíku ($^{32}\text{S}^{14}\text{N}^1\text{H}^+$, $^{32}\text{S}^{15}\text{N}^+$, $^{33}\text{S}^{14}\text{N}^+$, $^{32}\text{S}^{16}\text{O}^+$, $^{34}\text{S}^{14}\text{N}^+$, $^{33}\text{S}^{15}\text{N}^+$, ...) ³³.

Ke stanovení vanadu byl u obou metod vybrán izotop ^{51}V (relativní zastoupení 99,76 %). K eliminaci polyatomických interferencí byla využita kolizní cela (ORS-ICP-MS). Stanovení interferují adukty chlóru, síry a kyslíku ($^{34}\text{S}^{16}\text{O}^1\text{H}^+$, $^{35}\text{Cl}^{16}\text{O}^+$, $^{33}\text{S}^{18}\text{O}^+$, ...) ³³.

Ke stanovení chromu byl vybrán izotop ^{52}Cr (relativní zastoupení 83,76 %). Spektrální interference byly potlačeny použitím kolizní cely. Izotop ^{52}Cr je zatížen interferencemi pocházejícími z argonu, chloru, uhlíku, kyslíku, dusíku, síry ($^{35}\text{Cl}^{16}\text{O}^1\text{H}^+$, $^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}^+$, $^{36}\text{Ar}^{16}\text{O}^+$, $^{37}\text{Cl}^{15}\text{N}^+$, $^{34}\text{S}^{18}\text{O}^+$, $^{36}\text{S}^{16}\text{O}^+$, ...) ³³.

Ke stanovení manganu byl využit jeho jediný izotop ^{55}Mn , jehož stanovení mohou interferovat následující polyatomické interference ($^{40}\text{Ar}^{14}\text{N}^1\text{H}^+$, $^{39}\text{K}^{16}\text{O}^+$, $^{37}\text{Cl}^{18}\text{O}^+$, $^{40}\text{Ar}^{15}\text{N}^+$, ...) ³³. Tyto interference byly při měření na ORS-ICP-MS potlačeny pomocí kolizní cely.

Kobalt byl stanoven s využitím jeho jediného izotopu ^{59}Co , který může být zatížen následujícími interferencemi ($^{43}\text{Ca}^{16}\text{O}^+$, $^{42}\text{Ca}^{16}\text{O}^1\text{H}^+$, $^{24}\text{Mg}^{35}\text{Cl}^+$, $^{36}\text{Ar}^{23}\text{Na}^+$, $^{40}\text{Ar}^{18}\text{O}^1\text{H}^+$) ³³. Stanovení kobaltu bylo těmito interferencemi ovlivněno minimálně a interference byly při měření na ORS-ICP-MS potlačeny pomocí kolizní cely.

Ke stanovení niklu byl vybrán izotop ^{60}Ni (relativní zastoupení 26,16 %), jelikož nejvíce zastoupený izotop ^{58}Ni (relativní zastoupení 67,77 %) je zatížen izobarickou interferencí od izotopu ^{58}Fe (cit. ¹⁷). Izotop ^{60}Ni může být zatížen těmito interferencemi ($^{44}\text{Ca}^{16}\text{O}^+$, $^{23}\text{Na}^{37}\text{Cl}^+$, $^{43}\text{Ca}^{16}\text{O}^1\text{H}^+$) ³³. Interference byly při měření na ORS-ICP-MS potlačeny pomocí kolizní cely.

Ke stanovení olova byly vybrány tyto izotopy ^{206}Pb (relativní zastoupení 24,1 %), ^{207}Pb (relativní zastoupení 22,1 %) a ^{208}Pb (relativní zastoupení 52,4 %). Výsledná koncentrace olova byla za pomoci korekční rovnice započtena do hodnoty koncentrace pro izotop ^{208}Pb . Stanovení olova interferují pouze adukty kyslíku s platinou nebo iridiem ($^{190}\text{Pt}^{16}\text{O}^+$, $^{191}\text{Ir}^{16}\text{O}^+$, $^{192}\text{Pt}^{16}\text{O}^+$) ³³, jelikož se tyto prvky (kovy) v měřených mineralizátech nenacházejí, proto bylo olovo měřeno bez využití kolizní cely.

Pomocí techniky ORS-ICP-MS byly analyzovány CRM plné krve SeronomTM Trace Elements Whole Blood L-2, SeronomTM Trace Elements Whole Blood L-3. Naměřené hodnoty koncentrací kovů jsou společně s certifikovanými hodnotami uvedeny v Tab. XVII (L-2) a Tab. XVIII (L-3). Pravdivost (výtěžnost), preciznost (RSD) a nejistota měření byly vypočteny na základě dat získaných ze šestice nezávislých měření rozložených certifikovaných referenčních materiálů. Certifikované hodnoty jsou uvedeny ve tvaru $\bar{X} \pm U$, kde U reprezentuje rozšířenou nejistotu s koeficientem rozšíření $k = 2$ (95 % hladina spolehlivosti). Z níže uvedených tabulek je patrné, že koncentrace kovů se až na nižší hodnotu koncentrace chromu v certifikovaném referenčním materiálu SeronomTM Trace Elements Whole Blood L-3 shodují s certifikovanými hodnotami referenčního materiálu.

Tab. XVII Naměřené výsledky pro SeronomTM Trace Elements Whole Blood L-2

Izotop	Naměřená hodnota (µg/l)	Certifikovaná hodnota (µg/l)	Výtěžnost (%)	RSD (%)	Nejistota U (%)
⁴⁷ Ti	19,6	19,5 ± 3,1*	100,6	9,3	19,5
⁵¹ V	5,8	5,9 ± 0,5	99,0	2,5	7,8
⁵² Cr	12,3	12,4 ± 1,3	99,4	5,5	14,0
⁵⁵ Mn	32,9	32,7 ± 1,5	100,7	2,5	12,0
⁵⁹ Co	6,1	6,0 ± 0,4	102,5	0,8	6,2
⁶⁰ Ni	18,7	18,5 ± 1,6	101,1	5,1	12,2
²⁰⁸ Pb	342	336 ± 18	101,8	1,2	4,2

* (doporučená hodnota uvedená ve tvaru $\bar{X} \pm s$)Tab. XVIII Naměřené výsledky pro SeronomTM Trace Elements Whole Blood L-3

Izotop	Naměřená hodnota (µg/l)	Certifikovaná hodnota (µg/l)	Výtěžnost (%)	RSD (%)	Nejistota U (%)
⁴⁷ Ti	26,3	24 ± 4*	109,6	4,9	11,5
⁵¹ V	13,1	13,0 ± 1,2	100,6	3,7	9,55
⁵² Cr	35,2	37,3 ± 1,9	94,3	2,8	10,4
⁵⁵ Mn	48,2	49,7 ± 2,5	97,0	2,4	12,0
⁵⁹ Co	11,3	11,3 ± 1,0	100,0	4,2	10,3
⁶⁰ Ni	31,1	30,6 ± 2,6	101,6	1,6	7,4
²⁰⁸ Pb	648	638 ± 22	101,7	1,4	4,5

* (doporučená hodnota uvedená ve tvaru $\bar{X} \pm s$)

Posouzením verifikačních parametrů pro jednotlivé kovy lze usoudit, že verifikace obou metod byla úspěšná. Vysoká hodnota pravdivosti pro chróm (439,2 %) naměřená na přístroji ICP-*oa*-TOF-MS je zřejmě způsobena nedokonalou eliminací spektrálních interferencí doprovázejících toto stanovení. Jak již bylo uvedeno podrobné studium možných interferencí u příslušných kovů a jejich eliminace s využitím matematických korekčních rovnic u přístroje ICP-*oa*-TOF-MS budou náplní dalších experimentálních měření. Volba vhodného izotopu a použití kolizní cely pracující v heliovém módu se u přístroje ORS-ICP-MS ukázaly jako vhodný a účinný nástroj k eliminaci možných interferencí.

Dále byly v experimentální části analyzovány reálné klinické vzorky tkání, které byly odebrány pacientů Ortopedické kliniky Fakultní nemocnice Olomouc při revizních operacích kloubní náhrady. Analyzováno bylo 28 vzorků, které byly před vlastním zpracováním označeny P1 – P28, aby bylo zabráněno jejich záměně během přípravy nebo při vlastní stanovením kovů. Spolu s reálnými vzorky byly měřeny i slepé pokusy, které byly od naměřených hodnot pro reálné vzorky odečítány. Koncentrace vybraných kovů byly přepočítány na hmotnost 1 g lyofilizovaného vzorku. Přepočtené koncentrace kovů byly zprůměrovány a jsou uvedeny v následujících dvou tabulkách (Tab. XIX, Tab. XX).

Tab. XIX Přepočtené koncentrace vybraných kovů ve vzorcích tkání (ORS-ICP-MS)

Vzorek	Koncentrace kovů (μg/g)						
	⁴⁷ Ti	⁵¹ V	⁵² Cr	⁵⁵ Mn	⁵⁹ Co	⁶⁰ Ni	²⁰⁸ Pb
P1	5,784 ± 2,134	0,254 ± 0,099	2,685 ± 0,292	-	5,397 ± 0,358	Det.	0,029 ± 0,008
P2	3,895 ± 1,851	0,106 ± 0,031	4,402 ± 0,965	0,193 ± 0,048	8,296 ± 1,593	0,219 ± 0,091	0,068 ± 0,014
P3	0,568 ± 0,295	0,025 ± 0,019	1,332 ± 0,235	0,191 ± 0,065	0,559 ± 0,071	0,181 ± 0,014	Det.
P4	0,246 ± 0,021	< DL	Det.	0,158 ± 0,052	Det.	Det.	Det.
P5	26,704 ± 7,887	0,639 ± 0,192	45,668 ± 9,153	1,453 ± 0,441	109,199 ± 34,236	0,725 ± 0,077	0,059 ± 0,016
P6	15,885 ± 2,512	0,597 ± 0,103	64,867 ± 4,885	1,507 ± 0,184	121,817 ± 16,804	0,335 ± 0,033	0,038 ± 0,022
P7	18,515 ± 1,867	0,648 ± 0,092	116,003 ± 4,925	2,538 ± 0,049	206,995 ± 4,256	0,648 ± 0,021	0,067 ± 0,016
P8	10,529 ± 1,824	0,432 ± 0,091	0,864 ± 0,164	0,325 ± 0,016	0,339 ± 0,028	0,044 ± 0,002	0,023 ± 0,008
P9	1,735 ± 0,045	< DL	0,197 ± 0,021	0,244 ± 0,001	0,038 ± 0,012	0,207 ± 0,005	0,031 ± 0,011
P10	12,725 ± 3,493	0,442 ± 0,135	1,359 ± 0,545	0,115 ± 0,031	0,432 ± 0,049	< DL	< DL
P11	2,591 ± 1,987	0,121 ± 0,103	0,541 ± 0,049	0,115 ± 0,038	0,009 ± 0,005	0,049 ± 0,015	Det.
P12	8,889 ± 1,686	Det.	0,238 ± 0,021	0,172 ± 0,042	0,013 ± 0,012	0,098 ± 0,001	0,933 ± 0,245
P13	1,738 ± 0,732	0,013 ± 0,006	5,833 ± 2,311	0,459 ± 0,023	6,373 ± 2,901	6,769 ± 3,057	0,048 ± 0,019
P14	8,861 ± 1,405	0,007 ± 0,004	3,833 ± 0,373	0,533 ± 0,007	3,863 ± 0,696	4,116 ± 0,646	0,018 ± 0,004
P15	25,092 ± 0,428	0,011 ± 0,004	9,489 ± 3,805	0,424 ± 0,008	9,416 ± 4,175	7,159 ± 2,265	0,169 ± 0,022

P16	0,073 ± 0,029	0,008 ± 0,007	0,031 ± 0,021	0,107 ± 0,022	0,024 ± 0,022	< DL	0,024 ± 0,015
P17	0,648 ± 0,165	0,019 ± 0,011	0,506 ± 0,093	0,329 ± 0,017	0,025 ± 0,002	2,937 ± 2,602	Det.
P18	0,156 ± 0,091	Det.	0,047 ± 0,009	0,061 ± 0,003	Det.	0,138 ± 0,015	Det.
P19	0,226 ± 0,088	0,009 ± 0,008	0,094 ± 0,012	0,239 ± 0,013	0,006 ± 0,001	0,051 ± 0,034	0,013 ± 0,003
P20	0,076 ± 0,025	Det.	0,374 ± 0,174	0,129 ± 0,037	Det.	Det.	0,026 ± 0,008
P21	1,727 ± 0,419	0,326 ± 0,003	6,432 ± 4,353	1,282 ± 0,111	7,222 ± 1,543	6,576 ± 0,357	0,078 ± 0,023
P22	0,616 ± 0,095	0,007 ± 0,001	2,287 ± 0,889	0,839 ± 0,083	0,548 ± 0,104	4,369 ± 0,836	0,052 ± 0,039
P23	0,197 ± 0,101	Det.	1,192 ± 0,299	0,351 ± 0,104	0,551 ± 0,078	0,213 ± 0,073	0,026 ± 0,008
P24	0,885 ± 0,221	Det.	0,518 ± 0,191	0,264 ± 0,005	0,533 ± 0,169	0,164 ± 0,022	0,045 ± 0,039
P25	2,521 ± 0,207	0,056 ± 0,006	48,799 ± 5,162	1,599 ± 0,383	108,172 ± 7,131	0,997 ± 0,144	< DL
P26	5,519 ± 0,522	0,164 ± 0,021	19,809 ± 5,867	0,682 ± 0,155	56,801 ± 28,238	0,531 ± 0,122	< DL
P27	1,331 ± 0,166	0,036 ± 0,005	9,781 ± 3,028	0,285 ± 0,052	19,393 ± 6,584	0,233 ± 0,066	< DL
P28	0,326 ± 0,057	0,029 ± 0,004	4,193 ± 1,362	0,507 ± 0,101	0,009 ± 0,005	1,252 ± 0,266	0,055 ± 0,008

- nezměřeno, < DL – pod mezí detekce, Det. - detekováno

Tab. XX Přepočtené koncentrace vybraných kovů ve vzorcích tkání (ICP-oe-TOF-MS)

Vzorek	Koncentrace kovů (µg/g)						
	⁴⁸ Ti	⁵¹ V	⁵² Cr	⁵⁵ Mn	⁵⁹ Co	⁶⁰ Ni	²⁰⁸ Pb
P1	5,943 ± 1,958	0,464 ± 0,124	2,352 ± 0,299	-	4,189 ± 0,167	0,107 ± 0,036	0,020 ± 0,007
P2	6,218 ± 1,632	0,621 ± 0,206	4,087 ± 0,858	0,187 ± 0,039	6,823 ± 1,139	0,157 ± 0,049	0,025 ± 0,007
P3	1,645 ± 0,237	0,509 ± 0,045	1,399 ± 0,291	0,182 ± 0,069	0,485 ± 0,035	0,221 ± 0,091	< DL
P4	1,718 ± 0,243	0,134 ± 0,039	0,343 ± 0,209	0,141 ± 0,041	Det.	0,086 ± 0,015	< DL
P5	25,414 ± 1,516	0,672 ± 0,304	31,085 ± 3,973	0,986 ± 0,385	76,515 ± 25,728	1,242 ± 0,344	0,038 ± 0,003
P6	18,501 ± 5,923	0,611 ± 0,121	52,629 ± 5,582	1,145 ± 0,189	77,791 ± 6,957	1,244 ± 0,101	0,016 ± 0,011
P7	18,186 ± 0,506	0,783 ± 0,201	94,196 ± 21,606	1,794 ± 0,131	114,102 ± 23,289	1,855 ± 0,187	0,038 ± 0,009

P8	10,643 ± 0,687	0,432 ± 0,036	0,798 ± 0,031	0,277 ± 0,006	0,319 ± 0,061	0,139 ± 0,071	0,013 ± 0,009
P9	4,059 ± 0,715	0,178 ± 0,042	0,414 ± 0,065	0,248 ± 0,007	0,039 ± 0,008	0,226 ± 0,011	0,024 ± 0,009
P10	22,119 ± 8,284	1,064 ± 0,395	3,212 ± 1,892	0,242 ± 0,072	1,159 ± 0,507	0,173 ± 0,028	< DL
P11	3,891 ± 1,747	0,431 ± 0,033	0,706 ± 0,035	0,088 ± 0,031	0,013 ± 0,007	Det.	0,012 ± 0,011
P12	10,371 ± 1,732	0,123 ± 0,043	0,401 ± 0,087	0,365 ± 0,086	0,032 ± 0,006	0,189 ± 0,041	0,687 ± 0,211
P13	3,515 ± 0,756	0,153 ± 0,019	5,144 ± 1,988	0,399 ± 0,056	5,587 ± 2,581	5,866 ± 2,512	0,033 ± 0,014
P14	9,398 ± 1,567	0,329 ± 0,078	3,008 ± 0,136	0,282 ± 0,045	3,335 ± 0,567	4,222 ± 0,717	0,057 ± 0,028
P15	23,711 ± 0,345	0,361 ± 0,116	7,702 ± 3,247	0,332 ± 0,086	8,522 ± 3,868	11,122 ± 4,804	0,192 ± 0,022
P16	2,053 ± 0,461	0,297 ± 0,028	0,424 ± 0,099	0,113 ± 0,033	0,025 ± 0,017	0,121 ± 0,078	< DL
P17	2,539 ± 0,208	0,318 ± 0,077	0,686 ± 0,058	0,371 ± 0,205	0,032 ± 0,001	0,141 ± 0,008	< DL
P18	1,228 ± 0,699	0,029 ± 0,021	0,667 ± 0,325	0,293 ± 0,279	< DL	< DL	< DL
P19	1,525 ± 0,509	0,062 ± 0,021	0,858 ± 0,134	0,493 ± 0,329	0,039 ± 0,024	1,909 ± 1,813	< DL
P20	1,194 ± 0,343	0,027 ± 0,019	1,222 ± 0,157	Det.	0,006 ± 0,001	< DL	< DL
P21	9,162 ± 1,153	0,751 ± 0,087	5,411 ± 3,449	1,054 ± 0,255	5,534 ± 0,799	5,613 ± 1,539	0,045 ± 0,044
P22	7,756 ± 3,028	0,345 ± 0,026	1,392 ± 0,319	0,313 ± 0,176	0,562 ± 0,231	1,506 ± 1,164	< DL
P23	2,553 ± 0,095	0,285 ± 0,079	1,221 ± 0,491	0,225 ± 0,104	0,499 ± 0,035	0,317 ± 0,108	< DL
P24	43,524 ± 15,558	0,719 ± 0,212	1,434 ± 0,083	0,289 ± 0,019	0,727 ± 0,081	1,235 ± 0,371	< DL
P25	6,169 ± 0,624	0,841 ± 0,125	49,835 ± 5,757	1,491 ± 0,374	106,222 ± 7,769	1,648 ± 0,025	< DL
P26	10,492 ± 1,287	0,963 ± 0,021	19,254 ± 4,823	0,621 ± 0,139	52,901 ± 27,426	0,576 ± 0,193	< DL
P27	3,057 ± 0,202	1,159 ± 0,043	9,854 ± 2,488	0,071 ± 0,019	16,632 ± 5,962	0,171 ± 0,074	< DL
P28	3,923 ± 0,144	1,163 ± 0,468	4,341 ± 1,502	0,374 ± 0,076	0,032 ± 0,007	1,069 ± 0,243	< DL

- nezměřeno, < DL – pod mezí detekce, Det. - detekováno

V následujících tabulkách jsou uvedena rozmezí koncentrací vybraných kovů v slepých pokusech (Tab. XXI) a rozmezí koncentrací vybraných kovů v analyzovaných tkáních (Tab. XXII).

Tab. XXI Rozmezí koncentrací kovů ve slepých vzorcích

Izotop	Rozmezí koncentrace (µg/l)
⁴⁷ Ti	0,026 – 0,563
⁴⁸ Ti	0,486 – 1,382
⁵¹ V	< DL – 0,037
⁵² Cr	0,014 – 1,168
⁵⁵ Mn	0,093 – 0,653
⁵⁹ Co	< DL – 0,113
⁶⁰ Ni	0,376 – 1,635
²⁰⁸ Pb	< DL – 0,276

< DL – pod mezí detekce

Tab. XXII Rozmezí koncentrací kovů ve vzorcích tkání

Izotop	Rozmezí koncentrace (µg/g)
⁴⁷ Ti	0,044 – 72,067
⁴⁸ Ti	0,527 – 105,029
⁵¹ V	< DL – 1,802
⁵² Cr	< DL – 226,314
⁵⁵ Mn	< DL – 80,315
⁵⁹ Co	< DL – 421,024
⁶⁰ Ni	< DL – 621,941
²⁰⁸ Pb	< DL – 1,215

< DL – pod mezí detekce

Hodnoty naměřených koncentrací kovů v lidských tkáních značně závisí na použitém materiálu kloubní náhrady, době od provedené implantace, správném usazení kloubní náhrady, opotřebení ale i vzdálenosti od implantované endoprotézy. Mezi nejčastěji používané materiály pro výrobu kloubních náhrad patří nerezová ocel, titan, slitiny titanu a kobaltu s příměsí dalších kovů, které zlepšují chemické a mechanické vlastnosti celé slitiny (Ti-6Al-4V, Ti-6Al-7Nb, Co-Cr-Ni-Mo,...)²⁷. Z celého souboru vzorků byly jen dva vzorky (P4, P19) odebrány pacientům při primární operaci, ostatní vzorky byly odebírány při revizních operacích kloubních náhrad, které byly provedeny za účelem kontroly nebo

reimplantace uvolněné kloubní náhrady. V následujících tabulkách jsou porovnány koncentrační hladiny uvolňovaných kovů s ohledem na dobu od implantace kloubní náhrady, typu kloubní náhrady, použitím materiálu a důvodu reoperace (Tab. XXIII, Tab. XXIV). Vzorky s označením P4 a P19 byly použity jako kontrolní pacienti při porovnání koncentračních hladin uvolňovaných kovů.

Tab. XXIII Porovnání koncentrací vybraných vzorků (slitina Co-Cr-Mo-Ni)

Vzorek	Koncentrace kovů (µg/g)					Délka implantace (rok)	Kloub	Důvod reoperace*
	⁵¹ V	⁵² Cr	⁵⁵ Mn	⁵⁹ Co	⁶⁰ Ni			
P4	<DL	Det.	0,158	Det.	Det.	-	kol.	-
P19	0,009	0,094	0,239	0,006	0,051	-	-	-
P3	0,025	1,332	0,191	0,559	0,181	1	kol.	3
P10	0,442	1,359	0,115	0,432	<DL	13	kol.	2
P8	0,432	0,864	0,325	0,339	0,044	15	kol.	2

Det. – detekováno, < DL – pod mezí detekce

* 2 - aseptické uvolnění, 3 – protéza je stabilní, jiný důvod operace

Tab. XXIV Porovnání koncentrací vybraných vzorků (slitina Ti-6Al-4V, Co-Cr-Ni-Mo)

Vzorek	Koncentrace kovů (µg/g)					Délka implantace (rok)	Kloub	Důvod reoperace*
	⁴⁷ Ti	⁵¹ V	⁵² Cr	⁵⁹ Co	⁶⁰ Ni			
P4	0,246	<DL	Det.	Det.	Det.	-	kol.	-
P19	0,226	0,009	0,094	0,006	0,051	-	-	-
P25	2,521	0,056	48,799	108,172	0,997	7	kyč.	3
P17	0,648	0,019	0,506	0,025	2,937	15	kyč.	3
P2	3,895	0,106	4,402	8,296	0,219	15	kyč.	3
P7	18,515	0,648	116,003	206,995	0,648	17	kyč.	2

Det. – detekováno, < DL – pod mezí detekce

* 2 - aseptické uvolnění, 3 – protéza je stabilní, jiný důvod operace

V dalších tabulkách jsou porovnány koncentrační hladiny kovů v tkáni u pacienta s implantovanou kloubní náhradou ze slitiny Ti-6Al-4V, Co-Cr-Ni-Mo (délka implantace 7 roků, důvod reoperace - protéza je stabilní, jiný důvod operace) s ohledem na vzdálenost od voperované kloubní náhrady (Tab. XXV) a také porovnání koncentrací uvolňovaných kovů v kloubním výpotku a tkáni obklopující kloubní náhradu (Tab. XXVI), hodnoty koncentrací

vybraných kovů v kloubních výpotcích byly převzaty z diplomové práce Mgr. Martina Kuby³⁴.

Tab. XXV Porovnání koncentrací kovů s ohledem na vzdálenost od kloubní náhrady

Vzorek	Koncentrace kovů (μg/g)						Vzdálenost od kloubní náhrady*	Kloub
	⁴⁷ Ti	⁵¹ V	⁵² Cr	⁵⁵ Mn	⁵⁹ Co	⁶⁰ Ni		
P25	2,521	0,056	48,799	1,599	108,172	0,997	1	kyč.
P26	5,519	0,164	19,809	0,682	56,801	0,531	2	kyč.
P27	1,331	0,036	9,781	0,285	19,393	0,233	3	kyč.

* Se vzrůstajícím číslem roste vzdálenost odebrané tkáně od kloubní náhrady

Tab. XXVI Porovnání koncentrací kovů v kloubních výpotcích a tkáních

Označení laboratoře		Koncentrace kovů (μg/g)*									
		⁴⁷ Ti		⁵² Cr		⁵⁹ Co		⁶⁰ Ni		²⁰⁸ Pb	
P2	A7	3,895	0,014	4,402	0,0008	8,296	0,0006	0,219	0,001	0,068	0,005
P3	A18	0,568	0,027	1,332	0,003	0,559	0,004	0,181	< DL	Det.	< DL
P4	A10	0,246	0,009	Det.	0,0001	Det.	0,0001	Det.	0,002	Det.	0,0002
P7	A8	18,515	0,239	116,003	0,046	206,995	0,054	0,648	0,008	0,067	0,002
P8	A5	10,529	0,032	0,864	0,006	0,339	0,003	0,044	< DL	0,023	0,0004

*první sloupec daného kovu = tkáň, druhý sloupec = výpotek, Det. – detekováno, < DL – pod mezí detekce

Z výše uvedených porovnání lze vyvodit závěr, že koncentrace uvolňovaných kovů silně závisí na materiálu kloubní náhrady, nahrazovaném kloubu, opotřebení kloubní náhrady, době od provedené implantace ale i vzdálenosti od implantované kloubní náhrady.

5. ZÁVĚR

V teoretické části této diplomové práce byla podrobněji popsána instrumentace ICP-MS, interference s možnostmi jejich eliminace a dále byly diskutovány možnosti stanovení kovů v různých klinických materiálech (moč, krevní sérum, krev, vlasy ale i krev a různé orgány krysy) pomocí metody ICP-MS.

Cílem experimentální části bylo vyvinutí a verifikace dvou metod pro stanovení vybraných kovů (Ti, V, Cr, Mn, Co, Ni, Pb) v klinických materiálech s využitím přístrojů ICP-MS. Vybrané přístroje byly ORS-ICP-MS (7700x, Agilent) vybavený kvadrupólovým analyzátozem a oktapólovou kolizní celou a dále ICP-oe-TOF-MS (Optimass 9500, GBC) vybavený průletovým analyzátozem a ortogonální akcelerací. K optimalizaci a verifikaci obou metod byl použit certifikovaný referenční materiál tkáň humra a plně krve. Reálné vzorky tkání byly před vlastním rozkladem sušeny v lyofilizátoru. K rozkladu lyofilizovaných vzorků tkání a certifikovaných referenčních materiálů byl využit mikrovlnný systém Milestone s využitím rozkladné směsi složené s kyseliny dusičné a peroxidu vodíku.

Součástí verifikace obou metod bylo vypočtení pravdivosti, preciznosti, linearity, meze detekce, meze stanovitelnosti a nejistoty měření pro všechny analyzované kovy.

V rámci experimentální části byly obě verifikované metody použity ke stanovení koncentrací vybraných kovů ve 28 vzorcích tkání, které byly odebírány při revizních operacích pacientům Ortopedické kliniky Fakultní nemocnice v Olomouci. Analýzou vybraných kovů ve vzorcích tkání bylo zjištěno, že koncentrace uvolňovaných kovů silně závisí na materiálu použité kloubní náhrady, době od provedené implantace, opotřebení kloubní náhrady ale i na vzdálenosti, ve které se nachází od implantované kloubní náhrady.

Na závěr lze říci, že cíle kladené na tuto práci byly splněny. Byla vypracována literární rešerše a provedena verifikace metod, která zahrnovala následující parametry: pravdivost, preciznost, kalibrační křivka, mez detekce (LOD), mez stanovitelnosti (LOQ) a nejistota měření. Obě verifikované metody byly použity k analýze vybraných kovů v reálných klinických vzorcích tkání obklopující implantovanou kloubní náhradu.

6. LITERATURA

1. Sarmiento-González A., Encinar J. R., Marchante-Gayón J. M, Sanz-Medel A.: *Anal. Bioanal. Chem.* **393**, 335-343 (2009).
2. Rubio J. C., Garcia-Alonso M. C., Alonso C., Alobera M. A., Clemente C., Munuera L., Escudero M. L.: *J Mater Sci: Mater Med* **19**, 369-375 (2008).
3. Case C. P., Ellis L., Turner J. C., Fairman B.: *Clin. Chem.* **47**, 275-280 (2001).
4. Kretzer J. P., Krachler M., Reinders J., Jakubowitz E., Thomsen M., Heise C.: *Tribol Lett.* **37**, 23-29 (2010).
5. Thomas R.: *Practical guide to ICP-MS*. CRC Press, Boca Raton 2007.
6. Nelms, Simon M.: *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry Handbook*. Blackwell Publishing, Oxford 2005.
7. Mihaljevič M., Strnad L., Šebek O.: *Chem. Listy* **98**, 123-130 (2004).
8. Kanický V.: *Zavádění vzorku do plazmatu*. In: 5. kurz ICP spektrometrie, Ed. Vítězslav Otruba – Spektroskopická společnost Jana Marka Marci, Brno 2009.
9. http://www.vscht.cz/anl/josef/LabAtom/Navod_ICP-MS_2010.pdf, staženo 30.9.2012.
10. Černohorský T., Jandera P.: *Atomová spektroskopie*. Univerzita Pardubice, Pardubice 1997.
11. Kanický V.: *Fyzikální základy ICP*. In: 5. kurz ICP spektrometrie, Ed. Vítězslav Otruba – Spektroskopická společnost Jana Marka Marci, Brno 2009.
12. Kanický V.: *Analytické vlastnosti ICP-MS*. In: 5. kurz ICP spektrometrie, Ed. Vítězslav Otruba – Spektroskopická společnost Jana Marka Marci, Brno 2009.
13. Otruba V.: *Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem*. In: 5. kurz ICP spektrometrie, Ed. Vítězslav Otruba – Spektroskopická společnost Jana Marka Marci, Brno 2009.
14. Hoffmann E., Stroobant V.: *Mass spectrometry: principles and applications 2nd Ed.*. John Wiley & Sons, Chichester 2002.
15. Hill S. J.: *Inductively Coupled Plasma Spectrometry and its Applications*. Blackwell Publishing, Oxford 2007.
16. Rehkämper M., Schönbacher M., Stirling C. H.: *Geostandard. Newslett.* **25**, 23-40 (2001).

17. Dean J. R.: *Practical Inductively Coupled Plasma Spectroscopy*. John Wiley & Sons, Chichester 2005.
18. Machát J.: *Kolizně-reakční cela pro eliminaci spektrálních interferencí v ICP-MS*. In: 5. kurz ICP spektrometrie, Ed. Vítězslav Otruba – Spektroskopická společnost Jana Marka Marci, Brno 2009.
19. Husáková L., Urbanová I., Audrlická-Vavrušová L., Šrámková J., Černohorský T., Bednaříková M., Pilařová L.: *Microchim. Acta* **173**, 173-181 (2011).
20. Krakovská E., Kuss H.- M.: *Rozklady v analytické chemii*. VIENELA Košice, Košice 2001.
21. Rodushkin I., Ódman F., Branth S.: *Fresenius' J. Anal. Chem.* **364**, 338-346 (1999).
22. Alimonti A., Petrucci F., Santucci B., Cristaudo A., Caroli S.: *Anal. Chim. Acta* **306**, 35-41 (1995).
23. D'Ilio S., Violante N., Di Gregorio M., Senofonte O., Petrucci F.: *Anal. Chim. Acta* **579**, 202-208 (2006).
24. Hailer N. P., Blaheta R. A., Dahlstrand H., Stark A.: *Acta Orthopaedica* **82**, 6-12 (2011).
25. Sarmiento-González A., Marchante-Gayón J. M., Tejerina-Lobo J. M., Paz-Jiménez J., Sanz-Medel A.: *Anal. Bioanal. Chem.* **391**, 2583-2589 (2008).
26. Iavicoli I., Falcone G., Alessandrelli M., Cresti R., De Santis V., Salvatori S., Alimonti A., Carelli G.: *J. Trace Elem. Med. Bio.* **20**, 25-31 (2006).
27. Sarmiento-González A., Marchante-Gayón J. M., Tejerina-Lobo J. M., Paz-Jimenez J., Sanz-Medel A.: *Anal. Bioanal. Chem.* **382**, 1001-1009 (2005).
28. Liu F. C., Qin J., Wu H. S., Wu Y. L., Zhu Y. L.: *J. Surg.* **81**, 436-439 (2011).
29. Willie S., Mester Z., Sturgeon R. E.: *J. Anal. At. Spectrom.* **20**, 1358-1364 (2005).
30. Plzák Z., Milde D.: *Chem. Listy* **106**, 41-44 (2012).
31. <http://www.eurachem.org/index.php/publications/guides>, staženo 18.4.2013
32. http://www.cia.cz/files/01_08-P010%20EA%2004_16_20061023.pdf, staženo 20.3.2013.
33. May T. W., Wiedermeyer R. H.: *At. Spectrosc.* **19**, 150-155 (1998).
34. Kuba M.: *Vývoj a verifikace metody pro stanovení vybraných kovů v klinických materiálech*. Diplomová práce, Univerzita Palackého, Olomouc 2012.

7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AAS	Atomová absorpční spektrometrie
CPS	Počet iontů, které dopadly na detektor za 1 sekundu (counts per second)
CRM	Certifikovaný referenční materiál
CZE	Kapilární zónová elektroforéza
DCP	Stejnoseměrně vázané plazma
DRC	Dynamická reakční cela
GC	Plynová chromatografie
HG-ICP-MS	Generování těkavých hydridů ve spojení s hmotnostní spektrometrií s indukčně vázaným plazmatem
HPLC	Vysoce účinná kapalinová chromatografie
ICP	Indukčně vázané plazma
ICP-MS	Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem
ICP-oa-TOF-MS	ICP-MS ve spojení s průletovým analyzátozem a ortogonální akcelerací
ICP-OES	Optická emisní spektrometrie s buzením v indukčně vázaném plazmatu
ITP	Izotachoforéza
KED	Diskriminace podle kinetické energie
MIP	Mikrovlnně indukované plazma
LOD	Mez detekce (Limit of Detection)
LOQ	Mez stanovitelnosti (Limit of Quantification)
ORS-ICP-MS	ICP-MS ve spojení s oktapólovým reakčním systémem
SF	Sektorový analyzátoz
TOF	Průletový analyzátoz