



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

DETEKCE TĚŽKÝCH KOVŮ V TVRDÝCH TKÁNÍCH METODOU SPEKTROSKOPIE LASEREM BUZENÉHO PLAZMATU

DETECTION OF HEAVY METALS IN HARD TISSUES BY LASER-INDUCED BREAKDOWN SPECTROSCOPY

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Anna Konečná

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. Pavel Pořízka, Ph.D.

BRNO 2022

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1625/2021 Akademický rok: 2021/22
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Bc. Anna Konečná**
Studijní program: Spotřební chemie
Studijní obor: Spotřební chemie
Vedoucí práce: **doc. Ing. Pavel Pořízka, Ph.D.**

Název diplomové práce:

Detekce těžkých kovů v tvrdých tkáních metodou spektroskopie laserem buzeného plazmatu

Zadání diplomové práce:

1. Literární rešerše analýzy tvrdých tkání se zaměřením na metodu spektroskopie laserem buzeného plazmatu.
2. Optimalizace parametrů měření s ohledem na maximální citlivost sestavy LIBS.
3. Detekce vybraných těžkých kovů v modelových vzorcích a jejich distribuce ve vzorku.
4. Návrh metodiky pro kvantitativní analýzu těžkých kovů v tvrdých tkáních.

Termín odevzdání diplomové práce: 13.5.2022:

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Anna Konečná
studentka

doc. Ing. Pavel Pořízka, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2022

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zabývá detekcí těžkých kovů bioakumulovaných v tvrdých tkáních metodou spektroskopie laserem buzeného plazmatu (LIBS). Jako modelové vzorky byly použity myší čelisti a stehenní kosti jedinců vystavených působení nanočástic oxidu olovnatého nebo oxidu kademnatého. Expozice jedinců trvala 6 nebo 7 týdnů, přičemž byla připravena i kontrolní skupina vzorků exponovaná pouze vzduchu. Distribuce biogenních prvků a kontaminantů byla stanovena mapováním povrchu vzorků metodou LIBS s prostorovým rozlišením 30 a 100 μm . Druhá část práce byla zaměřena na možnost využití metody LIBS pro kvantitativní analýzu. Pro referenci byly připraveny vzorky hydroxyapatitových standardů, jejichž měřením byla sestavena kalibrační křivka a stanoveny limity detekce a kvantifikace. Dále byl představen model pro predikci koncentrace těžkého kovu výpočtem z kalibrační křivky.

ABSTRACT

This master thesis deals with the detection of heavy metals bioaccumulated in hard tissues by laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS). As model samples, murine mandibles and femurs of animals exposed to lead oxide or cadmium oxide nanoparticles were used. The exposure of animals lasted for 6 or 7 weeks. Control group of animals was exposed only to air for a reference. The distribution of biogenic elements and contaminants was determined by mapping the samples' surface using LIBS with a spatial resolution of 30 and 100 μm . The second part of the work focused on the possibility of using the method LIBS for quantitative analysis. Samples of hydroxyapatite standards were prepared as reference material. By their analysis a calibration curve was constructed, and the limits of detection and quantification were determined. Furthermore, a model for prediction of heavy metal concentration by calculation from the calibration curve was presented.

KLÍČOVÁ SLOVA

spektroskopie laserem buzeného plazmatu, mapování, predikce, tvrdé tkáň, bioakumulace, těžké kovy

KEYWORDS

laser-induced breakdown spectroscopy, mapping, prediction, hard tissues, bioaccumulation, heavy metals

KONEČNÁ, Anna. *Detekce těžkých kovů v tvrdých tkáních metodou spektroskopie laserem buzeného plazmatu* [online]. Brno, 2022 [cit. 2022-05-13]. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/139806>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Pavel Pořízka.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

podpis studenta

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala především svému vedoucímu doc. Ing. Pavlovi Pořízkovi, Ph.D. za jeho odborné vedení, cenné rady, připomínky a čas, který mi věnoval při vypracovávání této práce. Dále bych chtěla moc poděkovat všem kolegům ze skupiny laserové spektroskopie CEITEC VUT za jejich ochotu, trpělivost a cenné připomínky. Také děkuji skupině doc. RNDr. Marcely Buchtové, Ph.D. z AVČR a skupině doc. Ing. Lucy Vojtové, Ph.D. z CEITEC VUT za přípravu vzorků, a Mgr. Lucii Šimoníkové a doc. Mgr. Karlovi Novotnému, Ph.D. z MUNI za umožnění XRF a ICP-OES analýz. Na závěr bych ráda poděkovala své rodině a přátelům za jejich trpělivost a podporu nejen při studiu.

OBSAH

1	Úvod.....	7
2	Teoretická část	8
2.1	Spektroskopické metody	8
2.2	Spektroskopie laserem buzeného plazmatu.....	9
2.2.1	Princip metody LIBS	9
2.2.2	Instrumentace	10
2.2.3	Možnosti analýzy	11
2.3	Rentgenová fluorescenční spektrometrie	14
2.4	ICP-OES	15
2.5	Tvrdé tkáně.....	15
2.5.1	Zuby	15
2.5.2	Kosti.....	17
2.5.3	Myší tvrdé tkáně.....	18
2.5.4	Prostorově rozlišená analýza.....	19
2.6	Těžké kovy	19
2.6.1	Olovo.....	20
2.6.2	Kadmium.....	20
2.6.3	Bioakumulace v tvrdých tkáních.....	21
3	Současný stav řešené problematiky	22
3.1	Kvalitativní LIBS analýza tvrdých tkání.....	22
3.2	Kvantitativní LIBS analýza tvrdých tkání.....	24
3.3	Analýza tvrdých tkání dalšími metodami.....	27
4	Experimentální část.....	28
4.1	Použité chemikálie	28
4.2	Použité přístroje a software	28
4.3	Příprava vzorků	29
4.3.1	Vzorky myších čelistí a kostí	29
4.3.2	Hydroxyapatitové standardy	30
4.4	LIBS měření	31
4.4.1	Optimalizace parametrů měření	32
4.4.2	Proces měření.....	33

4.5	Zpracování LIBS dat	33
5	Výsledky a diskuze	36
5.1	Optimalizace parametrů měření	36
5.2	Prostorově rozlišená analýza tvrdých tkání	41
5.3	Kvantitativní analýza	48
6	Závěr	51
7	Literatura	52
8	Seznam zkratk a symbolů	61
8.1	Seznam použitých zkratk	61
8.2	Seznam použitých symbolů	63

1 ÚVOD

Tvrdé tkáně, zuby a kosti, jsou mineralizované biologické tkáně tvořené převážně hydroxyapatitem ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$). Jsou známé svou schopností bioakumulace látek absorbovaných z dutiny ústní nebo krevního oběhu. Mezi snadno akumulovatelné látky patří těžké kovy jako olovo či kadmium. Těžké kovy se do organismů dostávají ze znečištěného ovzduší, výparů barev nebo kontaminované vody a potravy. Expozice těžkými kovy může v organismu způsobovat poruchy funkčnosti buněk a různých orgánů, nebo mohou působit jako potenciální karcinogeny. V organismu se nejvíce inkorporují právě do hydroxyapatitové matrice tvrdých tkání, ze které se následně velice pozvolna uvolňují. Analýza akumulovaných prvků může poskytnout informace o daném jedinci a jeho způsobu života, což je využíváno především v archeologii, antropologii nebo forenzní analýze.

Spektroskopie laserem buzeného plazmatu (LIBS, z angl. laser-induced breakdown spectroscopy) je semidestruktivní analytická metoda na principu optické emisní spektroskopie využívané zejména při materiálové analýze. Díky své jednoduchosti, rychlosti a možnosti víceprvkové analýzy heterogenních vzorků se stává čím dál více populární v mnoha odvětvích výzkumu [1]. Metoda je založena na interakci laseru s povrchem vzorku, při které dochází k ablaci materiálu, tvorbě plazmatu a následné emisi záření. Analýza emitovaného záření poskytuje formou spektrálních čar informaci o prvkovém složení analyzovaného vzorku.

Jednou z možných aplikací metody LIBS je analýza tvrdých tkání. Mapováním povrchu vzorku s prostorovým rozlišením v desítkách mikrometrů lze získat kvalitativní informace o rozložení biogenních prvků ve vzorku. Kvantitativní analýza je také možná, avšak v oblasti tvrdých tkání je obtížnější z důvodu vysoké heterogenity matrice vzorku a nedostatku vhodných referenčních materiálů. V praxi je tato metoda využívána např. v zubním lékařství, kde může poskytnout analýzu zubní tkáně v reálném čase během vrtání.

Cílem této diplomové práce bylo seznámit se s problematikou analýzy tvrdých tkání pomocí metody LIBS se zaměřením na detekci těžkých kovů v těchto tkáních. Na základě poznatků získaných z dostupné literatury byly optimalizovány parametry měření, a poté byla provedena analýza vybraných těžkých kovů (olovo a kadmium) ve vzorcích myších čelistí a stehenních kostí. Jako referenční vzorky byly připraveny hydroxyapatitové peletky o osmi různých koncentracích těžkých kovů. Peletky byly použity také při kvantitativní analýze, v rámci které byly stanoveny limity detekce a kvantifikace pro tuto aplikaci.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Spektroskopické metody

Spektroskopie je věda využívající interakce různých typů záření s hmotou pro získání informací o analyzovaném materiálu. Historicky jsou nejvíce používané interakce s elektromagnetickým zářením [2]. Spektroskopické techniky tvoří rozsáhlou skupinu analytických metod. Jejich velkou výhodou je vysoká citlivost, kdy je možné detekovat až jednotlivé atomy nebo jejich izotopy. Jsou tedy vhodné i pro detekci stopových množství kontaminantů. Díky možnosti použití různých typů záření jsou využívány v mnoha odvětvích od astronomie po biologii nebo chemii [3]. Spektroskopické metody můžeme dělit podle různých kritérií (Tabulka 1) [4].

Tabulka 1: Příklady rozdělení spektroskopických metod podle typu přenosu energie mezi fotonem a vzorkem [4].

Typ přenosu energie	Region ve spektru	Spektroskopická metoda
absorpce	γ záření	Mossbauerova spektroskopie
	RTG záření	RTG spektroskopie
	UV-VIS	UV-VIS spektroskopie
	IR	Infračervená spektroskopie
	mikrovlnné záření	Ramanova spektroskopie
	radiové vlny	Elektronová paramagnetická rezonance Nukleární magnetická rezonance
emise	UV-VIS	Optická emisní spektroskopie
	RTG záření	RTG fluorescence
fotoluminiscence		Fluorescenční spektroskopie
	UV-VIS	Fosforescenční spektroskopie
		Atomová fluorescenční spektroskopie
chemiluminiscence	UV-VIS	Chemiluminiscenční metody

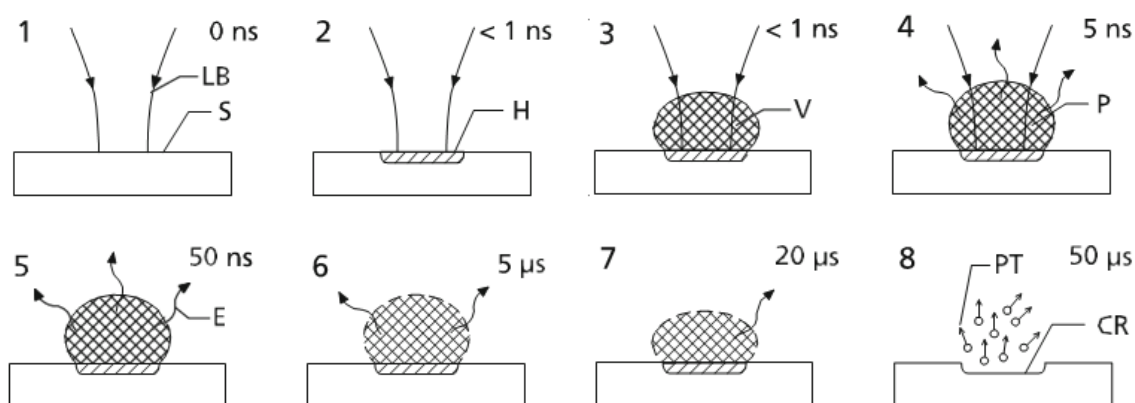
Tato práce se zabývá především metodou spektroskopie laserem buzeného plazmatu (kapitola 2.2), která spadá pod optickou emisní spektroskopii. Jako reference byla využita metoda rentgenové fluorescence (XRF, z angl. X-Ray fluorescence, kapitola 2.3) a optická emisní spektroskopie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-OES, z angl. inductively coupled plasma optical emission spectrometry).

2.2 Spektroskopie laserem buzeného plazmatu

Spektroskopie laserem buzeného plazmatu je analytická metoda patřící mezi optické emisní techniky. Poprvé byla popsána v 60. letech minulého století v návaznosti na první detailní popis principu laseru. Dalšího velkého rozvoje dosáhla až v 80. letech minulého století, kdy se začaly vyrábět více výkonné pulzní Nd:YAG lasery a CCD detektory. Oproti ostatním spektroskopickým metodám má několik výhod jako například rychlá víceprvková kvalitativní a kvantitativní analýza s limity detekce v jednotkách ppm, přímá analýza vzorků bez složitějších úprav apod. Další výhodou je možnost měření vzorků ve všech skupenstvích (plyny, kapaliny, pevné látky). Nejčastěji však bývá využívána pro rychlé semikvantitativní stanovení prvkového složení pevných vzorků [5].

2.2.1 Princip metody LIBS

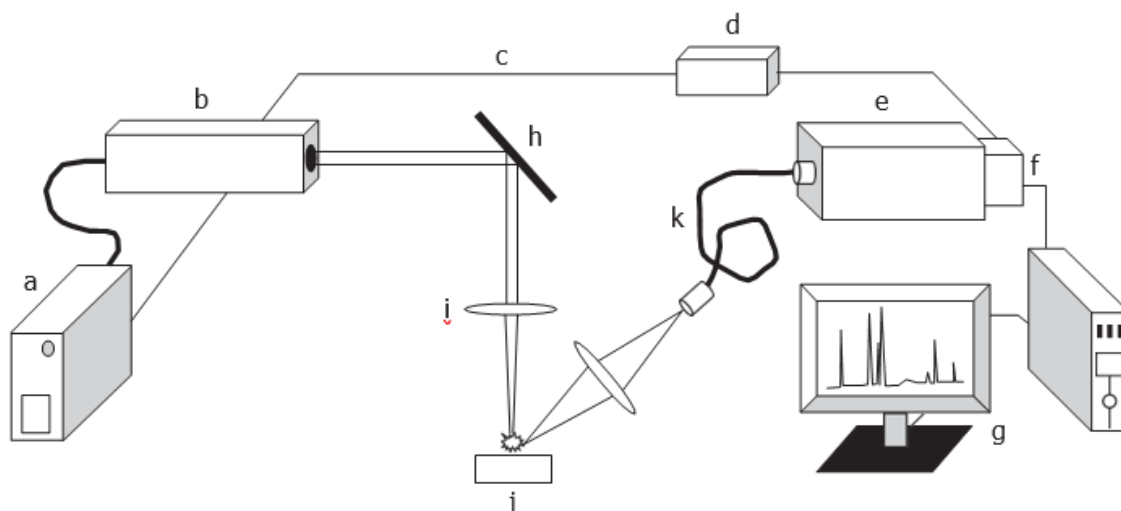
Princip techniky LIBS je založen na interakci pulzního laseru o vysokém špičkovém výkonu se vzorkem. Laserový pulz je zaostřen na povrch analyzované látky, jeho energie je lokálně absorbována vzorkem, dochází k zahřátí malé části vzorku a následně k odpaření malého množství materiálu. Tento proces je souhrnně označován pojmem laserová ablace. Odpařený materiál tlačí na okolní atmosféru, což vede k prudkému ohřevu vzorku, jeho tání a dalšímu odpařování materiálu. Dochází k atomizaci a ionizaci částic odablatovaného materiálu, čímž se vytváří plazma. Ablatované částice jsou v plazmatu excitovány, což vede k jejich spontánní emisi záření. Plazma chladne, ztrácí energii, čímž emituje záření specifické pro daný prvek. Emitované záření je následně rozloženo na vlnové délky a detekováno pomocí spektrometru. U pevných látek tento proces vede k tvorbě kráteru. Odpařovaný materiál je z interakční zóny částečně odstraňován pomocí expanze plazmatu [5]. Běžné LIBS plazma má původní teplotu v rozmezí 10^3 až 10^4 K, velikostně může dosahovat až jednotek milimetrů a jeho doba života se pohybuje v rozmezí 0,5 až 10 μ s. Vlastnosti plazmatu závisí zejména na experimentálních podmínkách (tlak a teplota okolní atmosféry), parametrech laserového pulzu (energie, vlnová délka, délka pulzu) a matrici vzorku [7].



Obrázek 1: Schéma principu LIBS. Fáze 1 – zaostření laserového paprsku na povrch vzorku, fáze 2 – předání energie pulzu vzorku, fáze 3 – odpaření materiálu, fáze 4 – vznik plazmatu, fáze 5 až 7 – emise záření, fáze 8 – tvorba kráteru. LB = laserový paprsek, S = vzorek, H = ohřev vzorku, V = odpařený materiál, P = plazma, E = emise specifického záření, CR = kráter, PT = částice [5].

2.2.2 Instrumentace

Instrumentace LIBS aparatury je znázorněna na Obrázku 2. Skládá se z několika částí. První je vysokoenergetický pulzní laser, který je pomocí zaostřovací optiky zaostřen na vzorek v ablační komoře. Po ablaci vzorku dochází k emisi záření, jež je sběrnou optikou nasměřováno do spektrometru a dále na detektor. Detektor záření převádí na digitální signál, který je ve formě spekter zobrazen na počítači [5]. Aparatura může obsahovat také vzduchotěsnou ablační komoru a systém regulace tlaku. Díky těmto prvkům lze provádět měření v různých atmosférách (nejčastěji vzduch nebo argon) a při různých tlacích [7].



Obrázek 2: Schéma LIBS aparatury: a – zdroj laseru, b – laserová hlava, c – Q-spínání, d – generátor doby zpoždění a integrační doby, e – spektrometr, f – detektor, g – počítač, h – dichroické zrcadlo, i – zaostřovací čočky, j – vzorek, k – optické vlákno [6].

Zdroj záření

Metoda LIBS nejčastěji využívá pulzních nanosekundových nebo méně častěji piko- či femtosekundových pevnolátkových laserů typu Nd:YAG (izotropní krystal yttrium aluminium granát dopovaný ionty neodymu). Ze základní vlnové délky 1064 nm se pomocí generátoru vyšších harmonických frekvencí dá poměrně snadno dosáhnout i dalších často využívaných vlnových délek 532 nm a 266 nm. Kromě vlnové délky laseru má na ablaci vliv také délka a energie pulzu, energetický profil v příčném řezu apod. Pro metodu LIBS jsou dalšími důležitými vlastnostmi laseru opakovací frekvence, požadavky na chlazení, výkon a velikost laseru [8].

Optické prvky

Optické prvky zahrnují všechny optické komponenty použité k vedení laserového záření ke vzorku a následnému sběru a vedení emitovaného záření do spektrometru. Zaostřovací optikou mohou být čočky, objektivy nebo optická vlákna. Sběr emitovaného záření obvykle zajišťuje sběrná optika v kombinaci s optickým vláknem [6].

Výběr vlnové délky

Spektroskopie laserem buzeného plazmatu pro výběr vlnové délky nejčastěji využívá spektrometry s uspořádáním Czerny-Turner (CzT) nebo spektrometry s mřížkou typu Echelle. Hlavním rozdílem mezi těmito typy spektrometrů je rozmezí zaznamenávaného spektra. Spektrometry s mřížkou typu Echelle zaznamenávají větší oblast spektra, nejčastěji v rozsahu přibližně od 200 nm do 800 nm, což umožňuje současnou analýzu více prvků [8, 10]. Spektrometry typu CzT zaznamenávají pouze vybranou část spektra obvykle v rozsahu max. 200 nm. Vstupní štěrbina spektrometru propustí pouze část dopadajícího světla, čímž vytváří úzký zdroj světla. Prošlé záření dále postupuje na konkávní zrcadlo (kolimátor), kde dochází ke sjednocení směru záření jednotlivých vlnových délek, dopadá na difrakční mřížku, která záření odráží a rozkládá na spojité spektrum, odkud dopadá na další konkávní zrcadlo, které je fokusuje do výstupní štěrbiny a dále na detektor. Difrakční mřížku běžně tvoří 600 až 3600 vrypů na milimetr a platí, že čím vyšší je hustota vrypů, tím získáváme lepší rozlišení, ale nižší intenzity. Při malé hustotě vrypů dochází k odrazu většího množství světla, což vede k zisku vyšších intenzit [11].

Detekce

Detektory pro metodu LIBS musí být dostatečně citlivé a synchronizované s laserovými pulzy [11]. Nejjednodušší variantou jsou fotonásobiče (PMT, z angl. photomultipliers) a fotodiody (PD, z angl. photodiodes). Dále jsou využívány detektory diodového pole (PDA, z angl. photodiode arrays) nebo CCD detektory (z angl. charge-coupled devices). Tyto typy detektorů jsou tvořeny malými fotosenzitivními prvky (pixely) v lineárním nebo 2D uspořádání, které obsahují prostorovou informaci o signálu díky signálu zobrazenému na poli pixelů [8]. Dnes se používají výhradně ICCD detektory (z angl. intensified CCD), které díky použití intenzifikátoru mají oproti klasickým CCD i dostatečnou citlivost. S detektory souvisí dva parametry měření – doba zpoždění a integrační doba. Pojmem doba zpoždění (GD, z angl. gate delay) je označován čas počátku měření po výstřelu laserového pulzu. V závislosti na typu vzorku a ostatních parametrech se nejčastěji pohybuje v rozmezí 0,5 až 2 μ s. Integrační doba (GW, z angl. gate width) označuje časový interval, během kterého detektor snímá signál. Velikostně se pohybuje maximálně v desítkách mikrosekund [11].

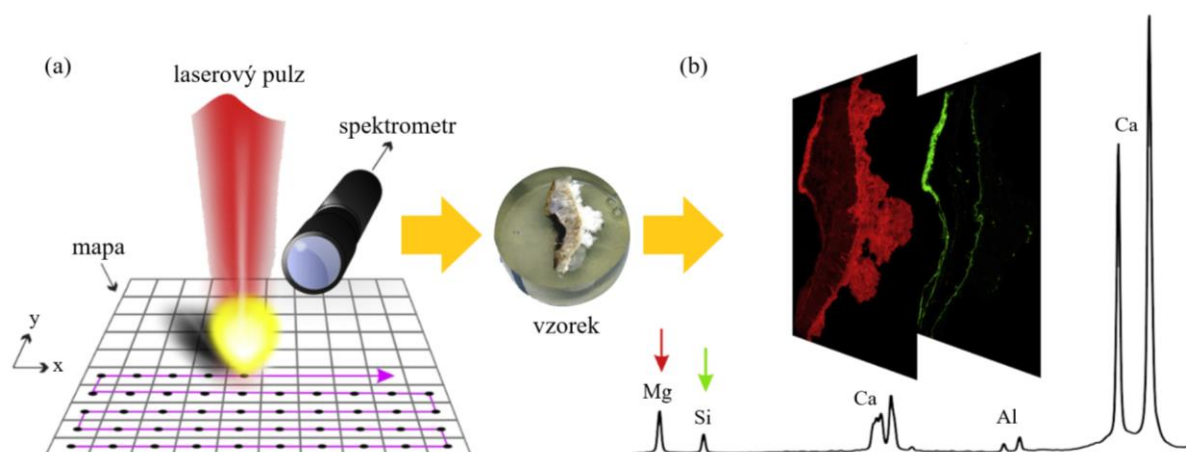
2.2.3 Možnosti analýzy

Metodu LIBS lze použít pro kvalitativní i kvantitativní analýzu. Hlavními přednostmi, které dělají LIBS velmi výkonnou a atraktivní analytickou metodou, jsou možnost simultánní detekce více prvků a analýza materiálů v reálném čase v laboratoři nebo vzdáleně v terénu (měření *in situ*). Její omezení jsou především v případě kvantitativní analýzy, kdy je v některých případech obtížné získat vhodné standardy s odpovídající maticí. Také má ve srovnání s ostatními konvenčními metodami jako LA-ICP-MS (hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem a laserovou ablací) nebo XRF horší limity detekce [12].

Kvalitativní analýza

Kvalitativní analýzou jsme schopni získat informaci nejen o prvkovém složení, ale také o distribuci prvků v heterogenním vzorku. Jelikož je metoda LIBS schopna spojit informace o prvkovém složení s prostorovými souřadnicemi vzorku, je často využívána pro mapování prvků v oborech jako geologie – při klasifikaci minerálů a hornin [13, 14], biologie a medicína – při analýze měkkých [15–18] i tvrdých tkání [19–21] nebo rostlin [22, 23], archeologie [24, 25] apod. Pro tato použití je velkou výhodou možnost simultánní detekce více prvků. Je možné detekovat majoritní, minoritní ale i stopové prvky téměř ve všech pevných materiálech. Touto metodou lze detekovat i nekovy (H, C, N, O a F) avšak s horšími detekčními limity [1].

V případě mapování prvků je využíváno hlavně dvou předností metody LIBS – vysoké opakovací frekvence (řádově až desítky kHz) a prostorového rozlišení (řády desítek μm). Vzorek je při mapování umístěn nejčastěji na motorizovaném podstavci pohyblivém v osách x, y i z, který zajišťuje posouvání vzorku o předem nastavenou vzdálenost (krok) mezi jednotlivými pulzy [1]. Laser tedy každým výstřelem ablatuje materiál vzorku v jiné pozici mapy (Obrázek 3), čímž získáváme informaci o prostorové distribuci analyzovaných prvků [10]. Tímto způsobem je možné provádět 2D i 3D analýzu [25]. Dalšími používanými technikami pro mapování prvkového složení jsou například metody LA-ICP-MS [26], XRF [27], PIXE [28], SIMS [29], AES [29] a další.



Obrázek 3: Schematické znázornění (a) principu mapování a (b) získaných dat. Převzato a upraveno z Jolivet L. a kol. [10].

Kvantitativní analýza

Kvantitativní analýza je poměrně problematická především kvůli nedostatku vhodných standardů či referenčních materiálů. Velký problém představuje také matriční jev, při kterém dochází k ovlivnění intenzity signálu analyzovaných prvků v závislosti na fyzikálních a chemických vlastnostech vzorku. Změna koncentrace jednoho nebo více majoritně zastoupených prvků matrice vzorku vede k detekci rozdílných intenzit signálů minoritních prvků i přes jejich konstantní koncentraci. Následkem tohoto problému je například možné ve vzorcích oceli a půdy detekovat křemík o stejné koncentraci, avšak s rozdílnými intenzitami signálu [8]. Při překonání těchto problémů se stále naráží v dalších ohledech jako citlivost,

přesnost a reprodukovatelnost měření. I přesto se na kvantitativní analýzu začíná zaměřovat čím dál více vědeckých skupin. Kvantitativní analýza může být provedena na základě kalibrace nebo také bezkalibrační metodou (CF-LIBS, z angl. calibration-free LIBS) [5, 30].

Bezkalibrační metoda vyžaduje pouze znalost teploty plazmatu a elektronové hustoty. Teplota plazmatu se získává z tzv. Saha-Boltzman grafu, elektronová hustota z rozšíření spektrální čáry. Kalibrační sada vzorků není nutná, protože se jeden vzorek používá jak pro kalibraci, tak pro analýzu složení. Toto je velká výhoda oproti kalibrační metodě, jelikož odpadají problémy s matričními jevy a vhodnými standardy. Metoda CF-LIBS je však omezená nutností detekce několika spektrálních čar s odlišnými kvantovými vlastnostmi pro všechny analyzované prvky, což není u mnoha prvků snadné [31].

Kalibrační metoda je analytický postup pro určení procentuálního nebo hmotnostního zastoupení sledovaného prvku v daném vzorku za pomoci přesně určených (kalibrovaných) standardů naměřených používanou metodou, v tomto případě LIBS [5]. Problém u této metody je především již zmiňovaný nedostatek referenčních materiálů hlavně v oblasti biologických tkání. Pokud referenční materiály existují, často se skládají z prášků stlačených do peletek, jejichž soudržnost a začlenění vybraného analytu nejsou vždy ideální. Tento problém se ale v některých případech dá vyřešit přípravou vlastních referenčních vzorků, jelikož slisování do peletek přináší i výhody například v podobě rovného povrchu, vysoké homogenizace vzorku apod. [32].

Běžnými kritérii pro vyhodnocení kalibrační funkce jsou citlivost, směrodatná odchylka měření, limit detekce (LOD, z angl. limit of detection) a limit kvantifikace (LOQ, z angl. limit of quantification). Při určování těchto veličin se často využívají poměry signál/šum (SNR, z angl. signal-to-noise ratio) a signál/pozadí (SBR, z angl. signal-to-background ratio), které charakterizují naměřené spektrum. Signál i pozadí jsou vždy ovlivněny hodnotou šumu, který je definován jako náhodná odchylka od průměrné hodnoty signálu či pozadí. Pozadí je část spektra o intenzitě, která neodpovídá přítomnosti spektrální čáry. Nejčastěji je uvažováno v oblasti spektrální čáry analytu, kde jeho hodnota je určena z analýzy blanku (standardu s nulovým zastoupením kalibrovaného prvku).

Detekční limit metody LIBS lze vypočítat dvěma způsoby. Prvním je LOD popisován jako koncentrace (množství), která má výslednou hodnotu rovnu podílu trojnásobku směrodatné odchylky pozadí a hodnoty směrnice kalibrační křivky. To lze zapsat rovnicí 1:

$$c_L \equiv \text{LOD} = \frac{k s_B}{a}, \quad (1)$$

kde $k = 3$, s_B je směrodatná odchylka pozadí nebo referenčního vzorku (blanku) a a je směrnice kalibrační křivky. Druhý způsob vychází z modelu použitého pro ICP emisi, který je popsán rovnicí 2:

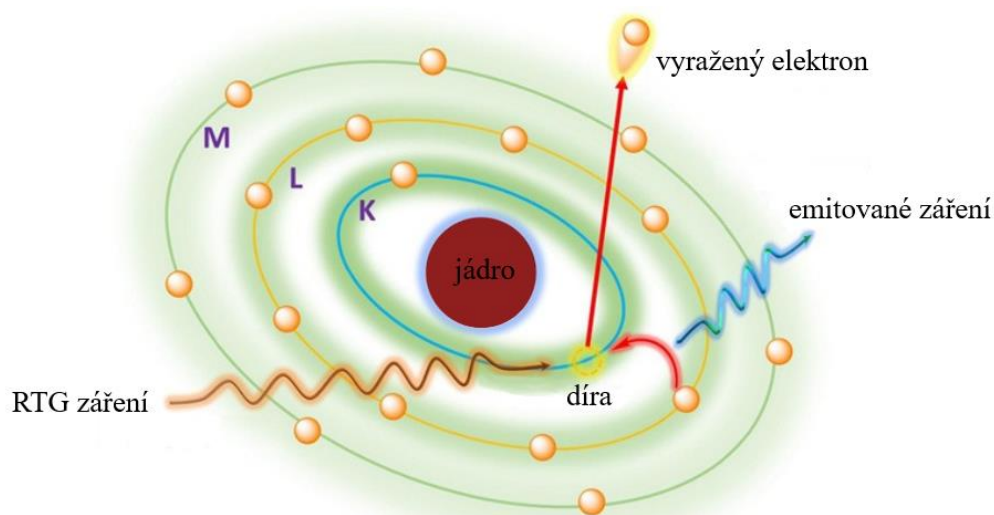
$$c_L = k c_0 (RSD)_B \left(\frac{1}{\bar{X}_S / \bar{X}_B} \right) = k \left(\frac{s_B}{\bar{X}_B} \right) (BEC) = \frac{k c s_B}{\bar{X}_S}, \quad (2)$$

kde $k = 3$, $(RSD)_B$ je relativní směrodatná odchylka pozadí (např. s_B / \bar{X}_B) a BEC je koncentrace odpovídající pozadí ($\text{BEC} = c_0 \bar{X}_S / \bar{X}_B$), \bar{X}_B vyjadřuje průměrnou hodnotu intenzity pozadí a \bar{X}_S průměrnou hodnotu intenzity signálu. Pro výpočet LOQ lze využít stejných vztahů jako pro LOD, jediným rozdílem je $k = 10$ [30].

2.3 Rentgenová fluorescenční spektrometrie

Rentgenová fluorescenční spektrometrie (XRF) je analytická metoda používaná pro stanovení prvkového složení nejčastěji pevných materiálů. Jedná se o rychlou, přesnou a nedestruktivní metodu, díky čemuž nachází své využití v mnoha odvětvích jako například geologie [33], archeologie [34], environmentální analýzy [35], farmacie [36], kovoprůmysl [37], polymerní [38] či potravinářský [39] průmysl apod. Dalšími výhodami metody XRF jsou minimální příprava vzorku, vysoká přesnost a reprodukovatelnost analýz nebo možnost vzdálené analýzy *in situ*. Doba měření se odvíjí od počtu analyzovaných prvků a požadované přesnosti, nejčastěji se pohybuje v rozmezí sekund až 30 minut [40].

Princip metody XRF je založen na interakci vysokoenergetického RTG záření se vzorkem, následné ionizaci atomů vzorku a analýze vyzářeného charakteristického záření (Obrázek 4). Při ozařování atomu vzorku způsobují částice RTG záření vyražení elektronu z vnitřních orbitalů atomu (ionizaci). Po vyražení elektronu zůstává v orbitalu díra, která způsobuje nestabilitu atomu. Atom je poté stabilizován zaplněním díry elektronem z vyššího orbitalu. Tento proces je spojen s uvolněním energie, odpovídající energetickému rozdílu daných orbitalů, ve formě charakteristického záření. Každý atom má specifické energetické hladiny, ze kterých dochází k zaplnění díry po vyražení elektronu, díky čemuž je emitované záření pro daný atom charakteristické. Atom může také vyzařovat více než jednu energii, jelikož mohou vznikat různé díry, které mohou být zaplněny elektrony z různých orbitalů. Soubor těchto vyzařovaných čar je pro každý prvek charakteristický. Měřením energie emitovaného záření je možné určit prvkové složení vzorku – kvalitativní analýza. Pro určení množství jednotlivých prvků, je potřeba měření intenzit vyzařovaných energií – kvantitativní analýza [40].



Obrázek 4: Znárodnění principu metody XRF [41].

XRF systémy je možné rozdělit do dvou hlavních skupin – systémy s energetickou disperzí (EDXRF) a systémy s disperzí vlnové délky (WDXRF). Od použitého systému se odvíjí analyzovatelné prvky i jejich detekční limity. Pro systém EDXRF se rozsah prvků pohybuje od sodíku po uran, pro WDXRF je rozsah širší – od beryllia po uran. Detekční limity se v závislosti na prvku pohybují až v řádech (sub)ppm. Obecně mají lepší detekční limity prvky s vysokými atomovými čísly [40].

2.4 ICP-OES

Optická emisní spektroskopie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-OES) je výkonná analytická metoda s vynikajícími detekčními vlastnostmi v řádech ppb – ppm, kterou lze využít pro víceprvkovou analýzu. Mezi její další přednosti patří vysoká selektivita, široký rozsah analyzovatelných prvků a téměř žádné chemické interference. Metodou je možné analyzovat různé druhy vzorků včetně anorganických a organických kapalin, nebo pevných látek. Kapalné a plynné vzorky lze analyzovat přímo, pevné vzorky vyžadují extrakci nebo kyselý rozklad, čímž jsou převedeny do roztoku [42]. Své využití nachází v oborech jako analýza potravin [43], geologie [44], či environmentální [45] a forenzní vědy [46].

Principem metody je spontánní emise fotonů atomy a ionty, které byly excitovány ve vysokofrekvenčně indukovaném argonovém plazmatu. Nejdříve je roztok analytu zmlžovačem převeden na aerosol, který je pomocí pracovního plynu (nejčastěji argon) nasměrován do centrální části plazmatu. Zde dochází k odpařování rozpouštědla, atomizaci či ionizaci a následné excitaci částic. Emitované záření je detekováno pomocí spektrometru s detektorem. Ze získaných spekter lze získat informaci o prvkovém složení (poloha spektrálních čar) i o obsahu detekovaných prvků (intenzita spektrálních čar) [47].

2.5 Tvrdé tkáně

Tvrdé tkáně jsou biologické, mineralizované tkáně s vysokým stupněm tvrdosti. Jsou tvořeny převážně hydroxyapatitem ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), který zajišťuje jejich pevnost a tuhost. Jeho množství se pohybuje od 20 do 90 % v závislosti na typu tkáně. Míra mineralizace dále závisí také na funkci tkáně, místě v tkáni, věku a druhu jedince. Kromě hydroxyapatitu jsou součástí tvrdých tkání i proteiny, lipidy, voda a buňky [48]. Skupina tvrdých tkání se dělí na kosti a zuby, které si jsou velmi podobné v anatomické struktuře i fyziologické funkci [49].

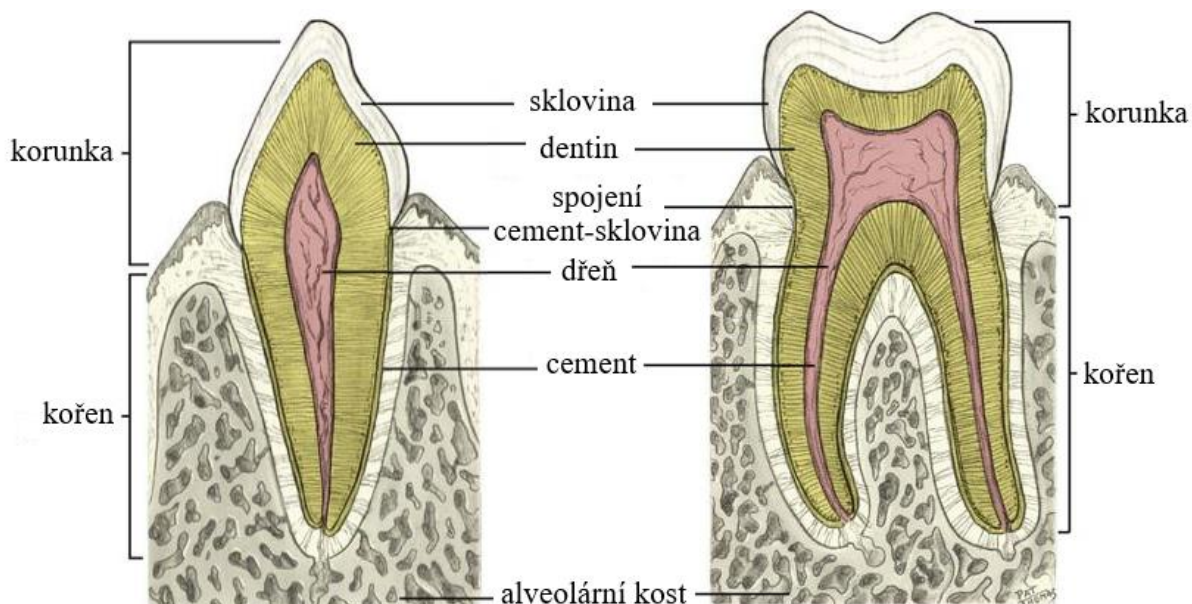
Výhodami analýzy tvrdých tkání je poměrně jednoduché získání vzorků a možnost dlouhodobého skladování. Mezi nevýhody patří nepravidelný povrch vzorků a již zmíněná heterogenní matrice. Nerovný povrch lze vyřešit předúpravou vzorků, kdy se nejčastěji používá zalití do epoxidové pryskyřice, následné zbroušení a naleštění. Heterogenita matrice tvrdých tkání přináší problémy především při analýze kontaminantů, kdy kvůli odlišným vlastnostem jednotlivých částí matrice nedochází k jejich rovnoměrné akumulaci [50].

2.5.1 Zuby

Zuby jsou zvápenaté multifunkční útvary nacházející se v dutině ústní, kde jsou připojeny k horní (maxila) a dolní (mandibula) čelisti. U všech živočichů zajišťují základní funkci – zpracování potravy. U lidí se dále podílejí i na artikulaci řeči a vzhledu obličeje. Zuby dohromady s dalšími částmi dutiny ústní (jazyk, slinné žlázy) tvoří první orgán trávicí soustavy. Ten zajišťuje drcení, rozmělnování a smísení potravy se slinami, čímž se zahájí proces trávení [51].

Anatomie zubu

Anatomie zubu se dělí na dvě části – korunku a kořen. Korunka je část zubu viditelná v ústní dutině. Je obklopena sklovinou (enamel), která má především ochrannou funkci. Kořen zubu je zapuštěn do hřebene čelistní kosti (alveolární kost) a je pokrytý cementem. Kořeny se liší v závislosti na typu zubu, stoličky mají tři kořeny, řezáky a špičáky jen jeden. Část zubu mezi korunkou a kořenem je označována jako krček. Zde se nachází spojení mezi sklovinou a cementem. Vrstvy se nemusí jen dotýkat, může dojít i k jejich překrytí či naopak nedotknutí. Vnitřní část zubu je tvořena zubovinou (dentin), který v centru obklopuje malou centrální dutinu obsahující zubní dřeň [51]. Anatomie zubu je schematicky znázorněna na Obrázku 5.



Obrázek 5: Schematické znázornění zubu s jedním nebo více kořeny. Převzato a upraveno z Fehrenbach M. J. a kol. [52].

Strukturu zubu tedy tvoří čtyři specializované tkáně – sklovina, dentin, cement a zubní dřeň. Sklovina je nejtvrďší tkáň v těle. Obsahuje 96 hm. % anorganického materiálu, 1 hm. % organického materiálu a 3 hm. % vody. Anorganická část je zastoupena především již zmíněným hydroxyapatitem ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) nebo také fluorapatitem ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$). Její tloušťka se liší podle typu zubu. U lidí se v případě řezáků pohybuje v rozmezí 1 až 2 mm, u stoliček pak 1 až 2,6 mm. Nejsilnější vrstva se nachází na žvýkacích plochách a směrem k oblasti krčku se vrstva ztenčuje. Funguje především jako ochrana proti poškození zbytku zubu. Sklovina nepatří mezi obnovitelné tkáně, jelikož nelze nahradit zaniklé ameloblasty (buňky zajišťující vznik skloviny) [52].

Dentin je nejvíce zastoupenou tkání v zubu a většinou je zodpovědný za jejich tvar a velikost. Skládá se ze 70 hm. % anorganického materiálu (hydroxyapatitu), 20 hm. % organického materiálu a 10 hm. % vody. Díky své struktuře poskytuje pružný podklad pro sklovinu. Dentin je ve zdravém zubu krytý ze všech stran – na korunce sklovinou a na kořeni cementem. Sám slouží jako ochranná vrstva zubní dřeně [52].

Cement je specializovaná tvrdá tkáň pokrývající kořenovou část zubu. Poskytuje ochrannou vrstvu a také zub připevňuje k periodontálnímu vazu připojenému k alveolární kosti. Toto spojení funguje jako upevňovací systém, který udržuje zub na místě při žvýkání [51]. Nejsilnější vrstva cementu se vyskytuje na špičkách kořenů (50 až 200 μm), nejslabší podobně jako sklovina v oblasti krčku – v místě spojení cement-sklovina. Na rozdíl od skloviny se však může tvořit po celou dobu života zubu [52].

Zubní dřev je jediná nekalcifikovaná tkáň zubu. Tato specializovaná měkká tkáň obsahuje neurovaskulární struktury (nervy, krevní cévy) a buňky (odontoblasty, fibroblasty) [51]. Dřev zajišťuje několik funkcí, mezi které patří podíl na tvorbě dentinu (její hranici s dentinem lemují odontoblasty – buňky zajišťující tvorbu dentinu), senzorická funkce (nervová vlákna vnímají bolestivé podněty), výživová funkce (dentin neobsahuje vlastní krevní zásobení) a ochranná funkce (sídlo bílých krvinek vyvolávajících imunitní reakci) [52].

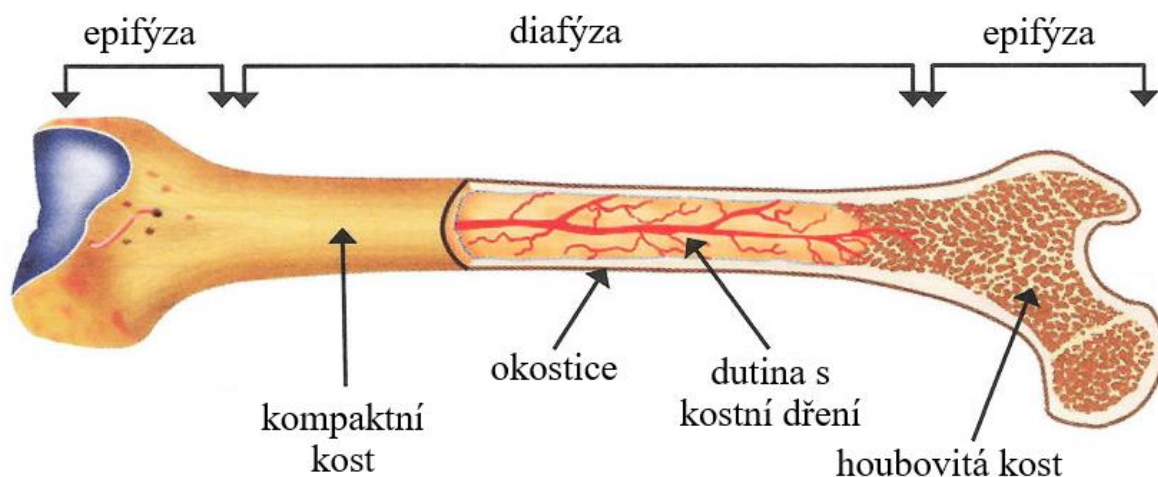
2.5.2 Kostí

Kostí se podobně jako zuby skládají z tvrdé a vysoce kalcifikované tkáně (kostní matrix) a vnitřní měkké tkáně (kostní dřev). Jejich komplexní mineralizovaná struktura poskytuje tělu vhodnou podporu pro udržení jeho váhy [53]. Během života dochází k odstraňování a nahrazování starých či opotřebených částí pro zachování pevnosti a funkce. Kostra plní několik funkcí, mezi které patří zejména opora pro zbytek těla, umožnění pohybu (zajišťuje úchyt svalů), ochrana životně důležitých orgánů (lebka, hrudní koš), udržování homeostázy a acidobazické rovnováhy, zásobárna růstových faktorů a prostředí pro krvetvorbu (kostní dřev) [54].

Anatomie kostí

Existují dva typy kostní tkáně – kompaktní a houbovitá. Kompaktní kost vytváří vnější plášť, je velmi hustě uspořádaná, tvrdá a obaluje kost houbovitou. Na povrchu kompaktní kosti se nachází okostice, což je tuhá vazivová blána tvořená kolagenními vlákny a fibroblasty. Okostice obsahuje nervová vlákna a krevní cévy, které zajišťují výživu kosti. Houbovitá kost se skládá z kostních trámčů, které vytvářejí houbovitě a mřížovité struktury. Čím těsněji jsou struktury uspořádané, tím je stabilita a pevnost kosti větší. Houbovitá kost obklopuje centrální dutinu obsahující kostní dřev, která zajišťuje tvorbu krevních elementů (červené a bílé krvinky, krevní destičky) [55, 56]. Anatomie kostí je znázorněna na Obrázku 6.

Kostra dospělého člověka se skládá z přibližně 80 % kompaktní a 20 % houbovitě kosti. Různé kosti však mají různé poměry těchto dvou tkání, rozdíl může být také v různých místech jedné kosti. Například kost stehenní má poměr kostní tkáně kompaktní ku houbovitě 50:50 v kloubních koncích (epifýzy), ale 95:5 v centrální části (diafýze) [54].



Obrázek 6: Anatomie dlouhé kosti [57].

Kosti lze klasifikovat podle tvaru do čtyř skupin – dlouhé, krátké, ploché a nepravidelné. Dlouhé kosti mají diafýzu tvořenou tlustým pláštěm kompaktní kosti, který vytváří centrální dutinu pro kostní dřeň. Epifýzy jsou naopak tvořeny převážně houbovitou kostí, která je pokryta pouze tenkou vrstvou kompaktní kosti. Spojení diafýzy a epifýzy se nazývá metafýza. Jedná se o část, kde dochází k růstu kosti. Příkladem dlouhé kosti je kost stehenní, pažní nebo klíční. Krátké kosti jsou tvořeny především houbovitou kostí s tenkou vrstvou kompaktní kosti na povrchu a kostní dřeň uvnitř. Příkladem jsou obratle nebo kosti zánártní. Obdobnou stavbu mají i kosti nepravidelné, mezi které patří například kosti obličeje. Ploché kosti (kosti lebky) jsou složeny jen z kosti houbovité pokryté kostí kompaktní [53–55].

Složení kostí je podobné jako složení zubů. Skládají se z kostní matrice tvořené organickými i anorganickými látkami a kostními buňkami (osteoblasty, osteoklasty, osteocyty). Organickou složkou kostní matrice jsou především kolagenní vlákna. Anorganickou látkou je nejčastěji hydroxyapatit [58]. Procentuální zastoupení jednotlivých látek se liší v závislosti na typu kosti. Přibližně se jedná o hodnoty 50 až 60 % hydroxyapatit, 20 % kolagen a 15 až 20 % voda [59].

2.5.3 Myší tvrdé tkáně

Myší zuby jsou v některých vlastnostech velmi podobné těm lidským. Mezi rozdíly patří absence špičáků a třenových zubů, mohutnější čelistní kosti, mezera mezi řezáky a stoličkami, a stálost chrupu [60]. Myší chrup je tvořen celkem šestnácti zuby (čtyři řezáky, dvanáct stoliček), které rostou nepřetržitě po celý život jedince. Nenastává obměna celých zubů jako u lidí, pouze dochází k jejich neustálému obrušování o potravu. Obrušování je umožněno přítomností vrstvy skloviny pouze na přední straně řezáku. Stavba stoliček je podobně jako u lidských zubů rozdělena na korunku, krček a kořen. Strukturně se také skládají ze skloviny, dentinu, cementu a zubní dřeně. Obdobně je to i u dlouhých kostí, stavbou i strukturou se podobají lidským [61, 62].



Obrázek 7: (a) Kostra myši [60], (b) detail horní a dolní čelisti [63].

2.5.4 Prostorově rozlišená analýza

Analýza tvrdých tkání je nezbytnou součástí mnoha oborů, jako je archeologie [64], antropologie [65], forenzní analýza [66] a lékařské aplikace [67]. Výsledky těchto analýz poskytují informace o věku, pohlaví, zdravotním stavu, stravě, místě původu a migraci jedinců [68]. Informace o prostorovém rozložení prvků v tvrdých tkáních lze získat několika analytickými metodami jako je optická emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-OES) [69], LA-ICP-MS a Ramanova spektroskopie [70], XRF [71], mikro XRF [72], LIBS [73] a mnoho dalších.

Výsledkem prostorově rozlišené analýzy jsou mapy distribucí jednotlivých studovaných prvků. Mapy poskytují semikvantitativní informaci, čímž je možné sledovat nejen prvkové rozložení v rámci matrice, ale také změnu jejich koncentrace v jednotlivých částech vzorku [5]. Díky tomu lze rozlišit například zdravou část zubu od nemocné (zubní kaz aj.). V případě tvrdých tkání se jedná nejčastěji o mapy matričních prvků (Ca, Mg, P, Sr) nebo kontaminantů (těžké kovy) [59]. Analýza kontaminantů se používá například v lékařství či forenzní analýze [74].

2.6 Těžké kovy

Těžké kovy jsou definovány jako kovové prvky s relativně vysokou hustotou, které jsou toxické již při nízkých koncentracích. Jedná se o přirozeně se vyskytující prvky (zemská kůra), avšak jejich zvýšená koncentrace v životním prostředí je způsobena především činností člověka jako je těžba, hutnictví, průmyslová výroba apod. Bylo zjištěno, že kontaminaci životního prostředí také výrazně přispívají přírodní jevy jako sopečné erupce nebo zvětrávání [75].

Těžké kovy jsou také řazeny mezi stopové prvky, protože jsou ve stopových koncentracích přítomny v různých biologických maticích. Zde nejčastěji vykonávají biochemické a fyziologické funkce. Jedná se například ligandy v pyrrolových sloučeninách (železo v hemoglobinu, kobalt ve vitamínu B12, mangan v chlorofylu) nebo kofaktory pro enzymy (měď pro katalázy, peroxidázy aj.). Tyto těžké kovy (Fe, Co, Mn, Cu, Zn, Mo) jsou označovány jako esenciální. Ostatní těžké kovy (Pb, Cd, Hg, As, Cr aj.) jsou označovány jako neesenciální [75]. Tato skupina nemá známé biologické funkce a jsou tedy považovány za toxické ve všech koncentracích. Obecně však platí, že vysoké koncentrace všech těžkých kovů jsou toxické [76].

V mnoha publikacích jsou popsány různé dopady těžkých kovů na biologické systémy. Těžké kovy ovlivňují buněčné orgány, některé enzymy a biomolekuly organismů (DNA, proteiny), což vede k jejich poškození nebo konformačním změnám. To může mít za následek modulaci buněčného cyklu, karcinogenezi nebo smrt buněk. Nejznámější kovy známé pro působení těchto problémů jsou As, Cd, Cr, Pb a Hg. Na základě experimentálních studií prokazujících jejich souvislost s výskytem rakoviny u lidí a zvířat jsou podle Agentury pro ochranu životního prostředí USA (US EPA) a Mezinárodní agentury pro výzkum rakoviny (IARC) klasifikovány jako „známé a pravděpodobné“ lidské karcinogeny [75].

2.6.1 Olovo

Olovo je modrošedý kov, který se přirozeně vyskytuje v zemské kůře v průměrné koncentraci asi 14 mg/kg. Jeho obsah je ale zvyšován především spalováním fosilních paliv, těžbou či průmyslovou výrobou. Olovo se využívá například při výrobě olovených akumulátorů, kovových výrobků (kabely, trubky, pájky), střeliva, zařízení pro odstínění RTG záření, oxidů pro barvy, pigmentů apod. Poslední dobou je však jeho průmyslové použití značně omezováno, především v oblasti barev, keramických výrobků a kovových výrobků [75].

K expozici olovem dochází hlavně vdechováním kontaminovaných prachových částic, aerosolů či výparů barev, nebo požitím kontaminovaných potravin a vody. Absorpci olova ovlivňují faktory jako věk a fyziologický stav. Hlavní procentuální podíl absorbovaného olova je přijímán ledvinami, dále játry, srdcem a plicemi, ale největší obsah olova v celém těle je ukládán do kostry, kde dochází k jeho akumulaci (viz kapitola 2.6.3). Na otravu olovem je nejvíce citlivá nervová soustava, častými příznaky jsou bolest hlavy, nepozornost, podrážděnost, ztráta paměti a otupělost [75]. Expozice olovu nebo jeho sloučeninám má za následek poruchy nervové soustavy, gastrointestinálního traktu, funkcí ledvin, jater nebo krvetvorných buněk. Olovo bylo klasifikováno IARC jako potenciálně karcinogenní prvek [77].

2.6.2 Kadmium

Kadmium je bílošedý kov, vyskytující se v zemské kůře v průměrné koncentraci přibližně 0,1 mg/kg. Nejvíce je akumulované v sedimentech a mořských fosfátech, kde koncentrace dosahuje přibližně 15 mg/kg. Tento kov je často využíván pro různé průmyslové aplikace jako například výroba slitin, pigmentů, baterií, mikročipů či základních desek apod [75].

K expozici kadmii dochází několika způsoby. Hlavním způsobem je kouření, dále vdechování kontaminovaného vzduchu a požití kontaminovaných potravin. Vzácným případem může být i absorpce kůží. Distribuční cestou v lidském těle je oběhová soustava. Měřením hodnot kadmia v krvi se detekuje nedávné vystavení, pro detekci akumulovaného množství nebo zátěže ledvin se používá analýza moči. Aktivní kuřáci obvykle vykazují zvýšené hodnoty. Kadmium je silně dráždivé pro plíce a gastrointestinální trakt. Mezi symptomy po akutním požití patří bolest břicha, nevolnost, zvracení, slinění, svalové křeče, šok a ztráta vědomí [75]. Dle IARC je kadmium podobně jako olovo považováno za potenciální karcinogen. Expozice kadmii může mít za následek poruchy nervové soustavy (poruchy koncentrace, hyperaktivita), poškození plic, ledvin či jater, nebo vývojové poruchy skeletu [77].

2.6.3 Bioakumulace v tvrdých tkáních

Bioakumulace je akumulace látek nebo chemikálií v organismech. Mezi jedny z nejčastěji akumulovaných látek patří těžké kovy. K jejich akumulaci dochází při dlouhodobé expozici daného organismu, kterým mohou být rostliny, živočichové i lidé. U rostlin je expozice způsobena především kontaminovanou půdou. Množství přijatého kovu záleží na pH půdy, kdy s rostoucí kyselostí roste i množství přijatého kontaminantu. Rostliny, které velmi snadno absorbují velká množství kontaminantů, se označují jako hyperakumulátory. Požití kontaminovaných rostlin je jedna z hlavních příčin expozice u zvířat a lidí. Dalšími příčinami jsou požití kontaminované potravy (ryb, aj.) nebo vody, nebo inhalace znečištěného vzduchu. Kovy jsou z organismu vylučovány pomalu, čímž dochází především k jejich hromadění v orgánech, kůži, srsti nebo vlasech, a tvrdých tkáních [78].

Těžké kovy mohou kvůli svým oxidačně-redukčním a koordinačním vlastnostem zasahovat do různých biochemických mechanismů jako například homeostáze, transportní procesy nebo vazba na buněčné komponenty. Jejich schopnost vázat se na proteiny způsobuje poruchy funkčnosti buněk a tím i vysokou toxicitu. Akumulované množství závisí na jejich vazbě na okolní molekuly. Krev a moč poskytují informaci pouze o nedávné expozici těžkým kovům. V případě vlasů a nehtů se jedná už o řády několika měsíců až jednotek let, ale výsledky mohou být ovlivněny používáním barev, šamponů a laků. V tvrdých tkáních dochází ke značné akumulaci těžkých kovů. Ta je způsobena jejich vysokou afinitou k hydroxyapatitové matici. Díky tomu lze analýzou tvrdých tkání získat informaci také o dlouhodobé expozici [79].

Pro analýzu lze použít kosti i zuby, ale zuby poskytují záznam jak o dlouhodobé, tak i nedávné expozici. Není nutná analýza celého zubu, stačí pouze část dentinu. Ten je ze všech stran chráněn sklovinou nebo cementem, díky čemuž na něj nemá vliv prostředí ústní dutiny. Obecně je výhodnější analýza tvrdých než měkkých tkání, jelikož vlivem těžkých kovů nedochází k jejich obnově. Další výhodou je možnost jejich dlouhodobého skladování, což poskytuje i historický záznam. Používanými metodami pro analýzu těžkých kovů v tvrdých tkáních jsou například PIXE, AAS, metody s ICP a LIBS [79].

3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

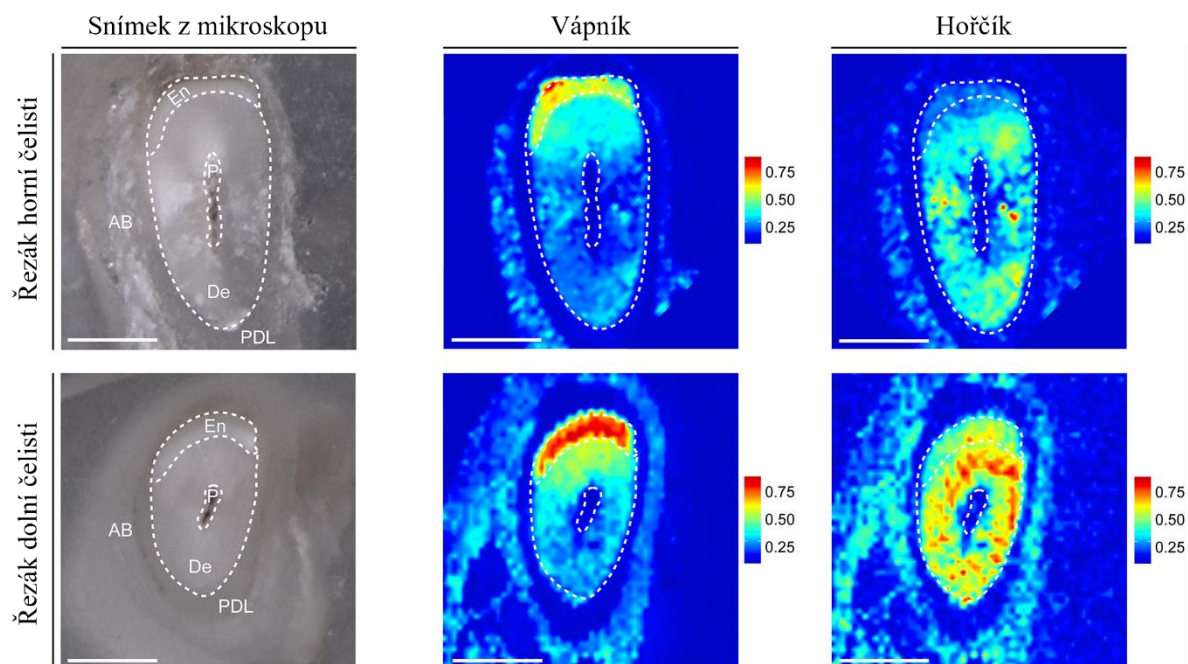
Analýza tvrdých tkání pomocí spektroskopických metod je v současnosti velmi žádaná v mnoha oborech. Studium elementárního složení zubů a kostí je používáno například v archeologii a antropologii, kde poskytuje informace o výživě, zdravotním stavu jedince apod. Další obory jako forenzní analýza či lékařství se při analýze tvrdých tkání zaměřují na detekci stopových prvků (včetně možných kontaminantů) nebo na studium onemocnění těchto tkání. Mezi současně nejpoužívanější spektroskopické metody patří metody s indukčně vázaným plazmatem (ICP-OES, ICP-MS), AAS, OES, XRF a LIBS [50].

LIBS se při studiu tvrdých tkání prosadila především díky své rychlosti a možnosti analýzy *in situ*. Na rozdíl od některých metod je také schopna poskytnout informaci o prostorovém rozložení analyzovaných prvků. Problém této metody však může nastat při detekci stopových prvků, kde naráží na nedostatečnou citlivost (řádově jednotky ppm) [50].

V následujících kapitolách jsou shrnuty vybrané studie zaměřené na kvalitativní a kvantitativní analýzu tvrdých tkání pomocí metody LIBS a některých dalších analytických metod.

3.1 Kvalitativní LIBS analýza tvrdých tkání

Lavický J. a kol. [19] pomocí metody μ LIBS studovali prostorové rozložení vápníku a hořčíku v myších zubech. Celé horní i dolní čelisti byly upevněny v epoxidové pryskyřici a následně rozříznuty pomocí diamantové pily na tři kusy. Byly provedeny dva příčné řezy čelistí a špičákem, jeden v apikální a druhý v distální oblasti. Povrch vzorku byl doleštěn brusnými papíry. Takto připravené vzorky byly měřeny pomocí LIBS sestavy obsahující nanosekundový pulzní Nd:YAG laser o vlnové délce 532 nm, opakovací frekvenci 20 Hz a délce pulzu 10 ns. Použité parametry měření byly – energie 30 mJ, doba zpoždění 1,5 μ s, integrační doba 50 μ s a prostorové rozlišení 30 μ m v obou osách. Naměřená data byla vykreslena ve formě 2D prostorově rozlišených map. Analýza byla provedena ze spektrálních čar Ca II 396,85 nm a Mg II 279,55 nm. Nejvyšší zastoupení vápníku bylo detekováno ve sklovině, naopak hořčík byl více zastoupen v dentinu. V oblasti dentinu bylo pozorováno nerovnoměrné rozložení hořčíku, avšak mírně vyšší intenzity se vyskytovaly v oblasti dentinu u cementu. Naopak vápník vykazoval vyšší intenzity v oblasti dentinu u skloviny. Tento trend poukazuje na různé složení matrice v oblasti dentinu, což může být způsobeno vývojem odontoblastů v průběhu růstu zubů [19].

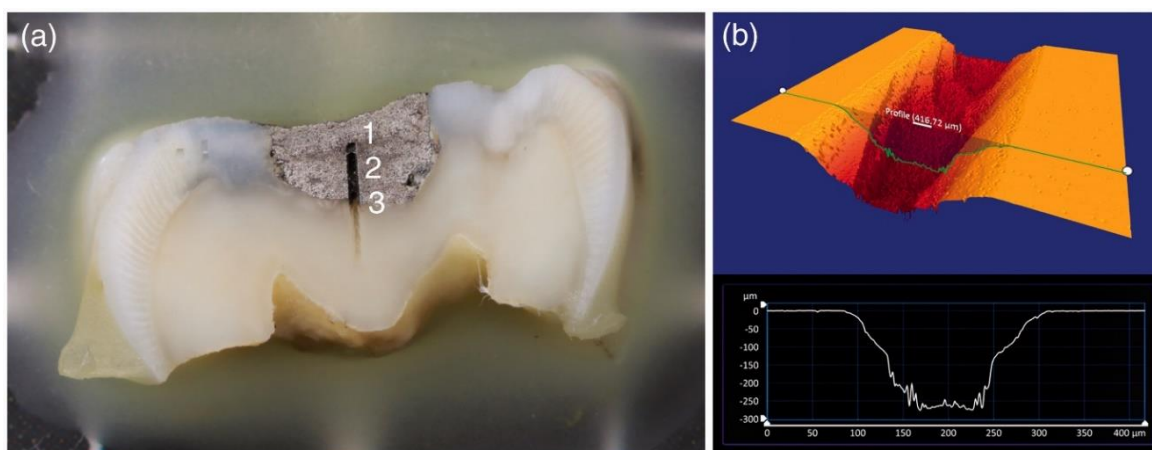


Obrázek 8: Analýza prvkového složení řezáku horní a dolní čelisti pomocí metody LIBS. Zleva znázorněny snímky zubů z mikroskopu následované prostorově rozlišenými 2D mapami vápníku a hořčíku znázorňující jejich relativní množství. Měřítko – 500 μm , AB – alveolární kost, En – sklovina, De – dentin, P – dřeň, PDL – parodontální vaz. Převzato a upraveno z Lavický a kol. [19].

Shahedi a kol. analyzovali prvkové složení stehenních kostí laboratorních potkanů. Experimenty byly prováděny na vzorcích ze dvou skupin laboratorních zvířat. Skupině A bylo denně po dobu 50 dní podáváno 250 ml destilované vody s octanem olovnatým o koncentraci 4 mM, skupině B pouze 250 ml destilované vody. Vzorky kostí byly měřeny pomocí sestavy s Nd:YAG laserem o vlnové délce 1064 nm, délce pulzu 10 ns, opakovací frekvenci 2 Hz a energii 160 mJ. Doba zpoždění byla 10 μs . Na každém vzorku bylo změřeno celkem 10 různých bodů, kdy z každého bylo shromážděno vždy 10 spekter. Spektra byla snímána v rozsahu vlnových délek 115 až 920 nm, byly analyzovány spektrální čáry vápníku, hořčíku, železa a olova. Z výsledků kostí s obsahem olova byl jasně patrný pokles intenzit vápníku i hořčíku, u železa nebyla detekována přímá spojitost s obsahem olova ve tkáni. Pokles u vápníku a hořčíku byl způsoben právě akumulací olova v matrici kosti [80].

Gazmeh M. a kol. se ve své studii zaměřili na možnost využití metody LIBS při rozpoznání zdravých a kazových zubů v procesu vrtání. Také tuto metodu navrhli pro použití v zubním lékařství k vrtání mikrovtorů či odstraňování zubního plaku. Při experimentech byla provedena kvalitativní analýza lidských zdravých zubů. Dále byly analyzovány i zuby s kazy nebo s amalgámovými výplněmi, kde byl pozorován průnik některých prvků amalgámové výplně do matrice zubu. Byla využita sestava skládající se z Nd:YAG laseru o vlnové délce 1064 nm, šířkou pulzu 6 ns, opakovací frekvencí 2 Hz a energií pulzu 90 mJ. Doba zpoždění byla nastavena na 1 μs a integrační doba na 20 μs . Vzorky zubů byly uchovávány v destilované vodě, vždy před měřením byly vysušeny při pokojové teplotě. Výsledky elementární analýzy ukázaly přítomnost i makrogenních či stopových prvků jako Zn, K, Sr, C, Na, H a O. Pro studium difúze prvků amalgámu do matrice zubu byly vzorky příčně rozříznuty. Z výsledků byla dokázána difúze prvků Hg, Ag, Cu a Sn do okolí matrice zubu [73].

Difúzi rtuti z amalgámu se věnoval i Bello L. T. a kol. Ve své práci však analýzu prováděli pomocí femtosekundové metody LIBS. K měření byl tedy použit femtosekundový Ti:safírový laser s vlnovou délkou 800 nm, délkou pulzu 30 fs, opakovací frekvencí 90 Hz a energií 250 μ J. Doba zpoždění byla nastavena na 60 ns, integrační doba na 150 ns. Během celého měření byl vzorek ofukován proudem argonu pro zamezení kontaminace zbytku vzorku ablatovaným prachem. Jako vzorky bylo použito sedm mléčných a osm stálých lidských stoliček obsahující amalgámové výplně. Měření bylo provedeno asi z 20 různých bodů pohybujících se ze zubní výplně, přes rozhraní výplň/dentin až na dentinovou matrici (Obrázek 9a). V každém bodě bylo sejmuto 450 spekter, ze kterých byla následně stanovena hloubka difuze jednotlivých prvků. Maximální dosažená hloubka ablační cesty byla definována pomocí topografické mapy na přibližně 250 μ m (Obrázek 9b). Byly stanoveny hloubky difuze prvků Hg, Ag, Cu a Sn. U všech prvků v rámci jednoho zubu byla hloubka difuze obdobná. Rozdíl byl hlavně mezi mléčnými a stálými zuby, kdy u stálých byly naměřeny větší hloubky difuze prvků, což bylo pravděpodobně způsobeno delší dobou obsahu amalgámové výplně v zubech [74].

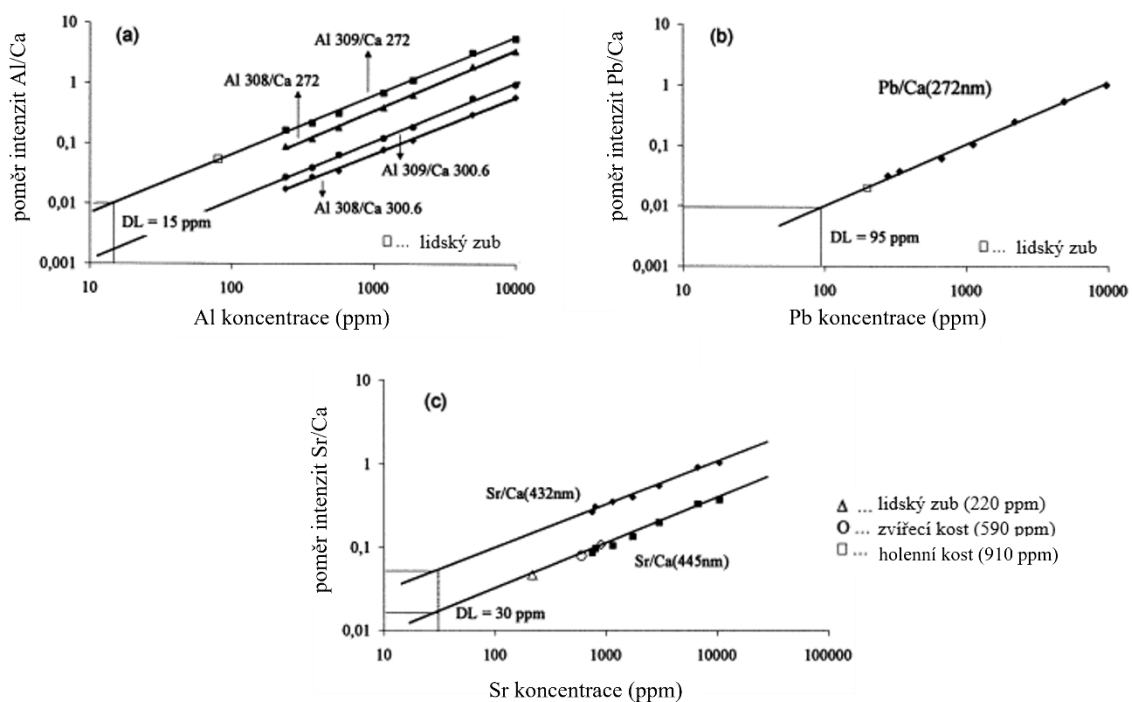


Obrázek 9: (a) Mléčný zub se třemi oblastmi: 1) amalgámová výplň, 2) rozhraní výplň/dentin, 3) dentin, kde měření probíhalo od 1 k 3. Po obou stranách zubní výplně lze pozorovat zašedlou oblast, která naznačuje difuzi kovů do zubní tkáně. (b) Topografická mapa ablační cesty v oblasti dentinové matrice ukazující hloubku ablace přibližně 250 μ m. Převzato a upraveno z Bello L. C. a kol. [74].

3.2 Kvantitativní LIBS analýza tvrdých tkání

První studie na analýzu tvrdých tkání pomocí metody LIBS byla publikována roku 1999 O. Samkem a kol. Jednalo se o kvantitativní analýzu stopových prvků v lidských zubech z několik věkových skupin. Pro měření byl použit systém s Nd:YAG laserem o vlnové délce 1064 nm, délkou pulzu 4 až 6 ns, opakovací frekvencí 20 Hz a energií pulzu 20 mJ. Pro optimalizaci měření byly použity vzorky zubních výplní a zubních past. V obou těchto vzorcích byly detekovány makrobiogenní (Ca, Mg) i stopové prvky (Al, Ti, Hg, Sn), které mohou být při dlouhodobém kontaktu se zubní tkání akumulovány. Proto byly tyto prvky analyzovány také na řezech zubů o tloušťce 1,5 mm. Přítomnost hliníku byla potvrzena až do vzdálenosti 2 mm od zubní výplně, čímž byla prokázána akumulace stopových prvků v zubní tkáni. Dále byla provedena i kvantitativní analýza obsahu hliníku. Normalizací intenzit Al reálných vzorků pomocí intenzity Al ze zubní výplně byly vypočteny relativní koncentrace hliníku ve 20 různých vzorcích zubů. Přítomnost hliníku tak byla prokázána u osob se zubními výplněmi nebo u osob používajících bělicí zubní pasty [81].

V návaznosti na tuto studii byla stejnými autory (Samek O. a kol.) vydána v roce 2001 rozsáhlejší práce, která byla zaměřena na kvalitativní i kvantitativní analýzu stopových prvků v tvrdých tkáních (zubech i kostech). Kromě identifikace a kvantifikace makrogenních i stopových prvků v tkáních byly také vytvořeny prostorově rozlišené mapy. Pro kvantitativní analýzu byly jako referenční vzorky použity lisované peletky z uhlíčitanu vápenatého (CaCO_3) obsahující 10 až 10000 ppm hliníku, stroncia a olova. Měření bylo prováděno se stejným nastavením jako v předchozí práci s rozdílem pouze v energii laseru (30 mJ). Z měření CaCO_3 peletek byly pro všechny prvky sestaveny kalibrační křivky, ze kterých byly následně odhadnuty detekční limity 15, 95 a 30 ppm pro Al, Pb a Sr (Obrázek 10). Dále byly změřeny tři vzorky tvrdých tkání (kosti stehenní a holenní, zub moudrosti). Získané kvantitativní výsledky těchto neznámých vzorků byly velmi podobné hodnotám z referenční analýzy pomocí AAS [59].

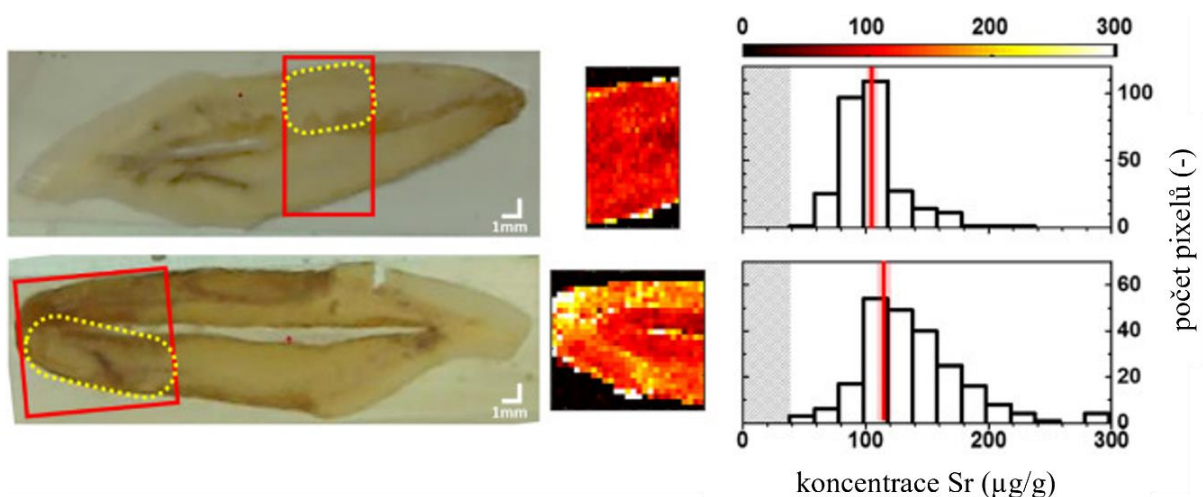


Obrázek 10: Kalibrační křivky jednotlivých detekovaných prvků s vyznačenými limity detekce (DL) a neznámými vzorky (lidské zuby, holenní a zvířecí kost). Převzato a upraveno z Samek O. a kol. [59].

Tofanelli M. a kol. se ve své forenzní studii věnují kvantitativní analýze prasečích pažních kostí metodami LIBS a ICP-OES. Prasečí kosti jsou často používány jako modelový materiál z důvodu jejich podobnosti ve složení a konzistenci s lidskými kostmi. Celkem analyzovali osm vzorků z různých jedinců. Z diafýzy kostí byly vyříznuty tři části podobných rozměrů, které byly vždy označeny A, B a C. Sada A byla ponechána bez čištění, sada B byla podrobena čištění běžně používanému při forenzní analýze a sada C byla spálena pro simulaci posmrtného zhářství. Měření LIBS probíhalo za použití dvojpulzního systému (DP LIBS, z angl. double pulse LIBS), který se skládal z Nd:YAG laseru (vlnová délka 1064 nm, maximální energie pulzu 60 mJ, délka pulzu 8 ns, opakovací frekvence 10 Hz) poskytující dva kolineární pulzy. Pro měření byla použita energie 60 mJ na pulz, zpoždění mezi pulzy 1 μs , doba zpoždění 1,25 μs a integrační doba 2 ms. Z každého vzorku bylo sejmuto 100 spekter v rozmezí 190 až 900 nm ze čtyř různých bodů. ICP-OES analýza byla provedena ze vzorků kostí

rozpuštěných v HNO_3 a H_2O_2 . Pro kalibraci této metody byla použita sada pěti roztoků standardů obsahujících ionty Ca, Mg, Sr, Ba a Zn. Z důvodu nedostatku vhodných referenčních materiálů zvolili autoři pro kalibraci LIBS měření výsledky získané ze sady B pomocí metody ICP-OES. Pomocí obou metod byly analyzovány prvky Ca, Mg, Sr, Ba a Zn. Výsledky z obou metod vykazují vysokou podobnost ve složení neošetřené a ošetřené kosti. Naopak analýza spálených částí ukazuje podstatný nárůst koncentrací všech detekovaných prvků, což bylo způsobeno úbytkem organické části kosti (až 40 % hmotnosti). Tato studie tak ukazuje možnost použití metody LIBS pro kvantitativní analýzu kostí, například i přímo na místě činu díky možnosti měření *in situ* [82].

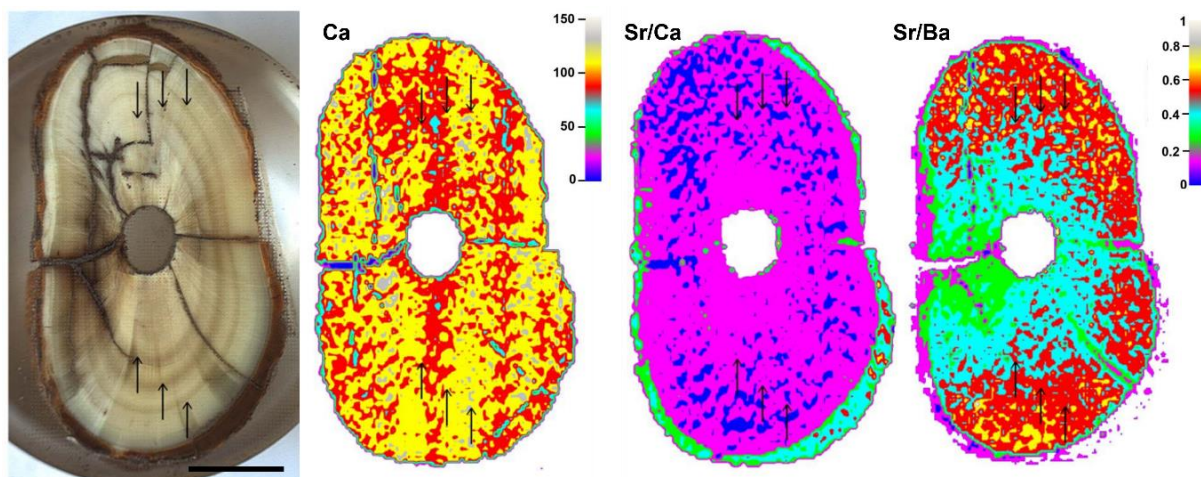
Martinez M. a kol. ve své práci překonávají problém nedostatku vhodných referenčních materiálů pro kvantitativní analýzu pomocí přípravy vlastních hydroxyapatitových (HA) standardů dopovaných vybranými prvky. Celkem byly připraveny čtyři HA standardy obsahující prvky kobalt, hořčík, mangan, nikl, vanad a stroncium v koncentracích 0, 216, 650 a 1083 $\mu\text{g/g}$. Vzniklé peletky vykazovaly velice podobné chemické i ablační vlastnosti jako přirozeně kalcifikované tvrdé tkáně. Ověření vhodnosti standardů bylo provedeno analýzou dvou lidských zubů. LIBS analýza byla provedena na systému s Nd:YAG laserem o vlnové délce 266 nm, délce pulzu 8 ns a energii 15 mJ. Doba zpoždění a integrační doba byly nastaveny na 1 μs a 1 ms. Při měření byl vzorek ofukován proudem argonu (1 l/min) pro zabránění redepozice ablatovaného materiálu. Na každém vzorku byla třikrát změřena mapa velikosti 5×5 s prostorovým rozlišením 215 μm , z každého bodu mapy bylo sejmuto 10 spekter. Měření probíhalo třikrát pro zohlednění možné nehomogenity vzorku. Z naměřených hodnot byly sestaveny kalibrační křivky pro jednotlivé prvky (všechny normalizované pomocí spektrálních čar vápníku). Za stejných podmínek byly také analyzovány dva vzorky zubů pro ověření možnosti použití připravených HA standardů. Pomocí kalibračních křivek byly získány mapy prostorového rozložení Sr. Z dalších prvků byl detekován pouze Ni, a to pouze v jednom ze zubů. HA standardy se i přesto ukázaly jako vhodnou volbou pro referenční materiály [32].



Obrázek 11: Na fotografiích vlevo jsou zobrazeny vzorky zubů použitých pro ověření referenčních materiálů. Červené obdélníky označují oblast analyzovanou metodou LIBS, žluté oblasti byly po přebroušení analyzovány pomocí ICP-MS. Uprostřed jsou zobrazeny mapy prostorového rozložení Sr z LIBS analýz. Napravo jsou vykresleny distribuce koncentrace Sr získané metodou LIBS, červená čára představuje výsledek ICP-MS analýzy. Převzato a upraveno z Martinez M. a kol. [32].

3.3 Analýza tvrdých tkání dalšími metodami

Další analytická metoda využívaná při analýze tvrdých tkání je LA-ICP-MS, protože je, podobně jako LIBS, schopna poskytnout informace o prostorovém rozložení prvků. Mapování pomocí metody LA-ICP-MS využili ve své práci Galiová M. a kol., kteří analyzovali zub prehistorického medvěda hnědého (*Ursus arctos*). Z výsledků získaných touto analýzou bylo možné popsat výživu, zdravotní stav a migraci jedince medvěda. Poměry Sr/Ca a Sr/Ba v celém vzorku vykazovaly sezónní výkyvy, čímž byla prokázána migrace medvěda mezi místem zimní hibernace a nalezištěm fosilií [83].



Obrázek 12: Mapy prostorové distribuce vápníku a poměrů Sr/Ca a Sr/Ba získané pomocí kvantitativní LA-ICP-MS analýzy. Měřítko odpovídá 500 μm . Převzato a upraveno z Galiová M. a kol. [83].

Tanaka Y. a kol. analyzovali možnou souvislost mezi krystalinitou a elementárními poměry (Mg/Ca a Sr/Ca) stehenních kostí potkanů s chronickým onemocněním ledvin nebo cukrovkou. Prvkové poměry byly měřeny pomocí metody LA-ICP-MS, krystalinita pomocí Ramanovy spektroskopie na stejném řezu vzorku. Krystalinita HA standardu (referenční materiál) jasně korelovala s poměrem Mg/Ca získaným z identické polohy vzorku. Výsledky reálných vzorků kostí také vykazovaly jistou souvislost mezi krystalinitou a obsahem elementů. Například u jedinců s chronickým onemocněním ledvin byl detekován zvýšený signál poměru Mg/Ca, což bylo způsobeno v důsledku vyšší absorpce hořčíku do kostí kvůli špatné funkci ledvin. Krystalinita byla v těchto oblastech významně degradována, čímž byl dokázán vliv substituce vápníku hořčíkem na zhoršení krystalinity HA matrice kosti [70].

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité chemikálie

Chlorid olovnatý (čistota 99 %)

LACHEMA n.p. Brno, Česká republika

Chlorid kademnatý hemipentahydrát

LACHEMA n.p. Brno, Česká republika

Argon (čistota 99,996 %)

SAID, Praha, Česká republika

4.2 Použité přístroje a software

Přístroje

LIBS Discovery

CEITEC VUT, Brno, Česká republika

laser Quantel CFR400

Lumibird, Les Ulris, Francie

optická vlákna 400 μm

ThorLabs, Newton, USA

pulzní generátor SyncRay

Lightigo, Brno, Česká republika

spektrometr Shamrock SR-500i

Oxford Instruments, Abingdon, Velká Británie

ICCD detektor iStar 734

Oxford Instruments, Abingdon, Velká Británie

spektrometr AvaSpec EVO-LTG6

Starline, Apeldoorn, Nizozemsko

detektor CMOS

Starline, Apeldoorn, Nizozemsko

LIBS FireFly

Lightigo, Brno, Česká republika

XRF ElvaX PRO

Elvatech, Kyjev, Ukrajina

ICP-OES spektrometr iCAP 6500 Duo

ThermoFisher Scientific, Waltham, USA

optický mikroskop VM12x Video

Image Optics, Berkshire, Velká Británie

kamera Basler acA1920-40uc

Basler, Ahrensburg, Německo

Software

LIBS Navigator

CEITEC VUT, Brno, Česká republika

Andor Solis

Oxford Instruments, Abingdon, Velká Británie

Spectra Controller

Lightigo, Brno, Česká republika

LIBS Analyzer

CEITEC VUT, Brno, Česká republika

Lightigo ImageLab

Lightigo, Brno, Česká republika

Origin 2021b

OriginLab, Northampton, USA

ImageJ Fiji

National Institute of Health, Bethesda, USA

Pylon Viewer

Basler, Ahrensburg, Německo

4.3 Příprava vzorků

4.3.1 Vzorky myších čelistí a kostí

Vzorky byly připravovány ve spolupráci se skupinou doc. Buchtové na Ústavu živočišné fyziologie a embryologie Akademie věd ČR (AV ČR, Brno, Česká republika) a dále s brusírnou na Ústavu geologických věd Masarykovy univerzity (MUNI, Brno, Česká republika). Použitý postup při expozici byl převzat z publikace Dumková J. a kol. [84].

Modelovým organismem byly zvoleny samice myši kmene ICR (z angl. Institute of Cancer Research). Jedinci byli umístěni do uzavřených inhalačních klecí, kam byly přiváděny nanočástice kontaminantu nebo čistý vzduch. Jako kontaminanty byly použity nanočástice oxidu olova (PbO NPs) a kadmia (CdO NPs). Inhalace trvala 6 nebo 7 týdnů. Po skončení inhalace byla pokusná zvířata usmrcena v souladu s projektem a Vyhláškou č. 419/2012 Sb. o ochraně pokusných zvířat. Z jedinců byly vypreparovány dolní čelisti a stehenní kosti. Čelisti byly v prostřední části rozděleny na poloviny. Následně byly všechny preparáty očištěny od zbylých měkkých tkání a umístěny do 4% roztoku formaldehydu. Takto byly vzorky předány do brusírny MUNI. Zde byly vzorky vyjmuty z formaldehydu, opláchnuty vodou, vysušeny v peci a zality epoxidovou pryskyřicí (Araldit 2020) do válcové formy. Zalité vzorky byly pomocí olejové pumpy zbaveny vzniklých bublin a následně byly ponechány vytvrdnout přes noc. Následující den byly vzorky za sucha broušeny postupně pomocí smirkových papírů s hrubostí 320, 500, 800, 1200 až 2400. Po převzetí vzorků byly všechny nafoceny na optickém mikroskopu s objektivem poskytující 1násobné zvětšení.

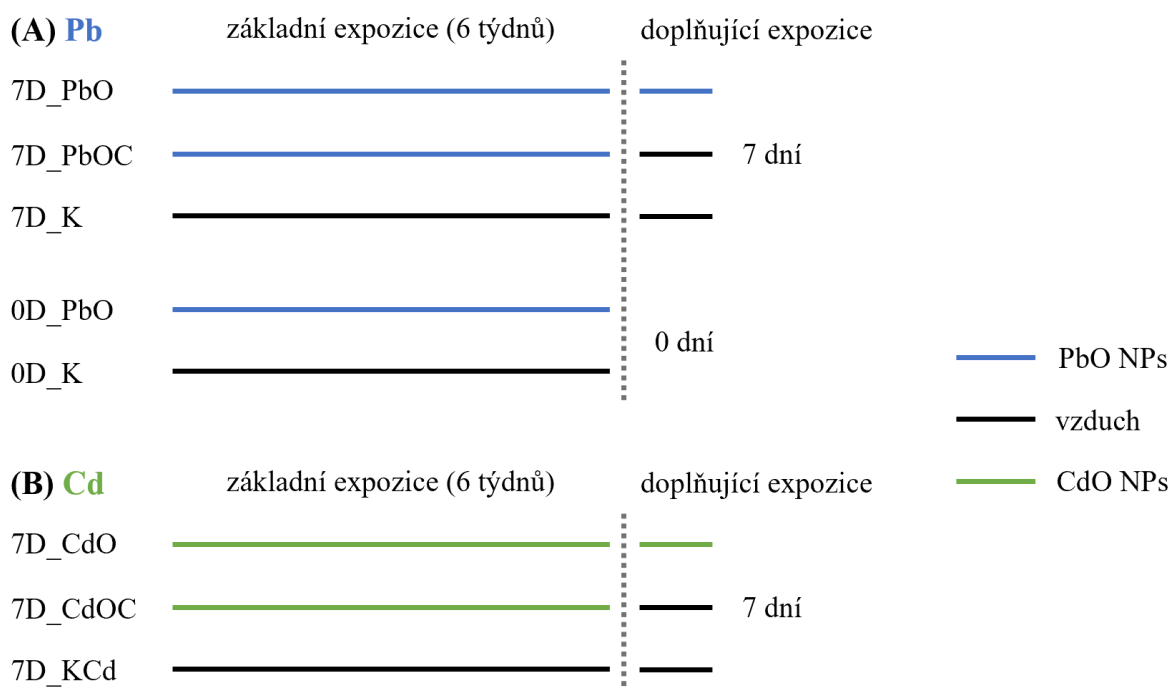
Pro olovo byly provedeny celkem dvě různě dlouhé expozice – 6 a 7 týdnů. V každé expozici byly dvě hlavní skupiny jedinců – exponovaní a kontrolní (K). Exponovaní jedinci se v případě 7týdenní expozice dále dělili na plně exponovanou (PbO) a částečně exponovanou (PbOC) skupinu. Skupina PbO znamenala nepřetržitou expozici PbO NPs po celých 7 týdnů. Skupina PbOC označovala jedince, u kterých byla inhalace PbO NPs ukončena po 6 týdnech, a zbylý čas do konce expozice (7 dní) následovala pouze inhalace vzduchu. Tato skupina byla do experimentu zařazena pro potvrzení úbytku kontaminantu díky opotřebovávání tkáně v průběhu času.

Pro kadmium byla provedena pouze 7týdenní expozice. Podobně jako u olova byly v expozici celkem tři skupiny jedinců – kontrolní (Kcd), částečně exponovaní (CdOC) a plně exponovaní (CdO). Částečně exponovaná skupina byla opět vystavena 6 týdnů CdO NPs a následně 7 dní vzduchu.

Všechny expozice olova i kadmia jsou popsány v Tabulce 2 a znázorněny na Obrázku 13.

Tabulka 2: Popis jednotlivých skupin expozičních. Označení expozičních PbO NPs i CdO NPs udává počet dní navíc od uplynutí základní doby 6 týdnů.

Délka expoziční	Typ expoziční	Označení expoziční PbO NPs	Označení expoziční CdO NPs
7 týdnů	plně exponovaná	7D_PbO	7D_CdO
	částečně exponovaná	7D_PbOC	7D_CdOC
	kontrolní	7D_K	7D_KCd
6 týdnů	plně exponovaná	0D_PbO	
	kontrolní	0D_PbOC	



Obrázek 13: Schéma znázorňující typy jednotlivých expozičních a jejich délku, která je rozdělena na základní a další expoziční. Základní délka je vždy 6 týdnů, délka další expoziční určuje označení celé expoziční (7 týdnů (7D) a 6 týdnů (0D)). (A) Typy expozičních PbO NPs (plně exponovaná (PbO), částečně exponovaná (PbOC) a kontrolní (K)). (B) Typy expozičních CdO NPs (plně exponovaná (CdO), částečně exponovaná (CdOC) a kontrolní (K)).

4.3.2 Hydroxyapatitové standardy

Vzorky hydroxyapatitových standardů byly připraveny Ing. Lenkou Michlovskou, Ph.D. a Ing. Kristýnou Hlinákovou ze skupiny Pokročilých materiálů CEITEC VUT. Tyto standardy byly použity jako kalibrační řada pro kvantitativní LIBS analýzu. Celkem bylo připraveno pět identických řad vzorků, kdy každá byla složena z 8 koncentrací Pb a Cd (0, 50, 100, 200, 300, 400, 500 a 1000 ppm). Vzorky byly zpracovány do formy peletek o průměru přibližně 10 mm.

Pro potvrzení přesnosti připravených koncentrací byly provedeny referenční analýzy standardů pomocí metod XRF a ICP-OES. Měření probíhalo v laboratořích Ústavu chemie Přírodovědecké fakulty MUNI v Brně ve spolupráci s doc. Ing. Karlem Novotným, Ph.D.

a Mgr. Lucií Šimoníkovou. Metodou XRF byly měřeny tři tablety od každé koncentrace, v případě ICP-OES byly analyzovány roztoky jednotlivých koncentrací připravené z jedné tablety. Naměřené koncentrace těžkých kovů v HA standardech získané pomocí obou metod jsou uvedeny v Tabulce 3. Výsledné hodnoty z metody XRF byly vypočteny jako průměr všech tří měření. Naměřené hodnoty vzorků s nejvyšší koncentrací těžkých kovů (1000 ppm) v obou případech odpovídají připravované koncentraci, avšak u ostatních vzorků jsou hodnoty poměrně odlišné. Analýza kadmia byla také pravděpodobně ovlivněna interferencí s jiným prvkem, kvůli čemuž nebylo možné přesně stanovit hodnoty koncentrací pro polovinu vzorků. Z tohoto důvodu tedy byla provedena i analýza pomocí ICP-OES, kterou byly získány průměrné koncentrace těžkých kovů v HA standardech. Z výsledných hodnot je jasně patrný rozdíl oproti připravovaným koncentracím. Pro další postup v této práci byly použity hodnoty získané ICP-OES analýzou.

Tabulka 3: Koncentrace těžkých kovů v HA standardech získané metodami XRF a ICP-OES.

Připravená koncentrace (ppm)	Naměřená koncentrace Pb (ppm)		Naměřená koncentrace Cd (ppm)	
	XRF	ICP-OES	XRF	ICP-OES
0	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
50	52 ± 9	30,3 ± 0,8	< LOD	33,4 ± 0,1
100	105 ± 10	67,0 ± 2,0	< LOD	67,5 ± 0,4
200	188 ± 10	121,0 ± 3,0	< LOD	138,0 ± 0,3
300	280 ± 11	188,0 ± 8,0	278 ± 11	209,0 ± 0,6
400	640 ± 20	252,0 ± 3,0	368 ± 12	284,7 ± 0,9
500	570 ± 20	211,0 ± 2,0	310 ± 11	250,7 ± 0,7
1000	970 ± 20	683,0 ± 5,0	1000 ± 15	774,0 ± 3,0

4.4 LIBS měření

Měření všech vzorků bylo prováděno na přístroji LIBS Discovery pomocí dvou metodik – LIBS a μ LIBS. Přístroj LIBS Discovery (Obrázek 14) se skládá z nanosekundového pulzního Nd:YAG laseru Quantel CFR400 o vlnové délce 532 nm, délkou laserového pulzu 10 ns, opakovací frekvencí 20 Hz a průměrem laserového paprsku 7 mm (LIBS). V případě μ LIBS byl do cesty laserového paprsku přidán navíc prostorový filtr, který dále propouštěl pouze jeho střední nejintenzivnější část. Tím došlo ke zúžení průměru laserového paprsku na 1 mm a poklesu jeho energie. U obou metod byl dále laserový paprsek zaostřen pomocí fokusační optiky na povrch vzorku. Emitované záření ablatovaného materiálu bylo snímáno pomocí sběrné optiky a následně vedeno optickými vlákny do spektrometrů typu Czerny-Turner Shamrock s ICCD detektorem a AvaSpec s detektorem CMOS. Na spektrometru Shamrock byla vždy nastavena vlnová délka zvolené spektrální čáry z celkového možného rozmezí 250 až 800 nm (viz kapitola 4.4.1), šířka vstupní štěrbinu 50 μ m a typ difrakční mřížky 1200 vrypů na mm. Na spektrometru AvaSpec bylo automaticky zaznamenáváno spektrum v rozmezí 245 až 410 nm bez nutnosti nastavování dalších parametrů.



Obrázek 14: Přístroj LIBS Discovery.

4.4.1 Optimalizace parametrů měření

Jak již bylo zmíněno v teoretické části, technika LIBS je silně ovlivněna maticními jevy a parametry experimentu. Před měřením reálných vzorků proto bylo nutné provést optimalizaci parametrů pro zajištění optimálních podmínek analýzy pro metodiky LIBS i μ LIBS. Optimalizace byla nejprve zahájena na vzorku myši čelisti. Kvůli silné nehomogenitě vzorku však bylo měření následně provedeno na vzorku HA standardu o koncentraci 1000 ppm olova, respektive kadmia. Pro μ LIBS i LIBS byly optimalizovány parametry: energie laseru, doba zpoždění, velikost kráteru a centrální vlnová délka na spektrometru Shamrock. Centrální vlnová délka ovlivňovala také oblast snímaného spektra. Celková šířka snímaného spektra byla přibližně 40 nm. Proměnné parametry jsou pro obě metody upřesněny v Tabulce 4. Měření bylo provedeno pomocí mapování. Pro každé nastavení byla měřena mapa 5×2 spotů, v každém místě jeden laserový pulz, s krokem 150 μ m mezi jednotlivými body. Měření probíhalo za ofuku proudem argonu (průtok 9 l/min).

Tabulka 4: Proměnné parametry pro metodu LIBS a μ LIBS.

Parametry	Metoda LIBS	Metoda μ LIBS
energie laseru (mJ)	5,5; 7,5; 8,0; 9,0; 11,0; 14,5; 18,5; 22,5	0,35; 0,41; 0,49; 0,56; 0,62
doba zpoždění (μ s)	0,75; 1,00; 1,25; 1,50; 1,75; 2,00	0,01; 0,03; 0,05; 0,07; 0,09; 0,11
centrální vlnová délka (nm)	Pb: 358; 405 Cd: 358, 508	Pb: 358; 405 Cd: 358, 508

Velikost kráteru byla u obou metod sledována v závislosti na energii laseru. V našem případě byl sledován průměr kráteru, který byl odečten z fotografií pořízených na přístroji FireFly s objektivem s 5násobným zvětšením.

4.4.2 Proces měření

Měření probíhalo u vzorků myších zubů a kostí i HA standardů se stejným nastavením, tj. za optimalizovaných podmínek a ofuku argonem (průtok 9 l/min). Měření byla podobně jako u optimalizace provedena u obou metod (LIBS i μ LIBS) mapováním.

U myších tkání bylo vždy změřeno více kusů vzorků z každé skupiny expozice (3 až 5 kusů). Velikost mapy byla závislá na velikosti vzorku a použité metodice. Pro vybrané vzorky jsou velikosti jednotlivých map uvedeny v Tabulce 5. Nejdříve byly všechny vzorky změřeny metodou μ LIBS, při které byl použit krok 30 μ m. Touto metodou bylo možné detekovat pouze makrogenní prvky (vápník, hořčík). Následně byly proto vzorky přeměřeny metodou LIBS s krokem 100 μ m. Zhoršením rozlišení bylo dosaženo vyšší citlivosti přístroje, díky čemuž bylo možné detekovat mikrobiogenní prvky (fosfor, stroncium) a kontaminanty (olovo, kadmium).

Tabulka 5: Velikosti měřených map metodami μ LIBS a LIBS pro vzorky čelistí a stehenních kostí exponovaných PbO NPs.

Délka expozice	Typ expozice	Čelisti		Kosti	
		μ LIBS	LIBS	μ LIBS	LIBS
7 týdnů	7D_PbO	446×175	136×55	541×125	161×35
	7D_PbOC	426×155	131×50	531×135	161×40
	7D_K	441×170	136×55	535×130	161×40
6 týdnů	0D_PbO	420×155	131×50	546×130	161×40
	0D_K	446×165	136×50	550×115	171×35

Kalibrační řada HA standardů byla měřena za stejných podmínek jako reálné vzorky myších tkání. Měření bylo opět provedeno mapováním pomocí obou metodik (LIBS i μ LIBS) s krokem 100 μ m, respektive 30 μ m. V obou případech byla měřena mapa o velikosti 20×20 spotů s jedním laserovým pulzem v každém bodě. Podobně jako u vzorků tvrdých tkání bylo i u HA standardů možné detekovat kontaminanty pouze v případě LIBS.

4.5 Zpracování LIBS dat

Pro vyhodnocení optimálních parametrů byly používány programy LIBSAnalyzer a Origin2021b. Analýza probíhala nejdříve vyhodnocením poměru signálu ku šumu a také průměru intenzity plochy pod křivkou v programu LIBSAnalyzer. Zvolené spektrální čáry pro vyhodnocení jsou uvedeny v Tabulce 6. Získané hodnoty byly dále zpracovány v programu Origin2021b ve formě grafů.

Tabulka 6: Vybrané spektrální čáry pro vyhodnocení optimálních parametrů.

Metoda	Spektrální čára
LIBS	Pb I 405,78 nm
μLIBS	Ca II 396,85 nm

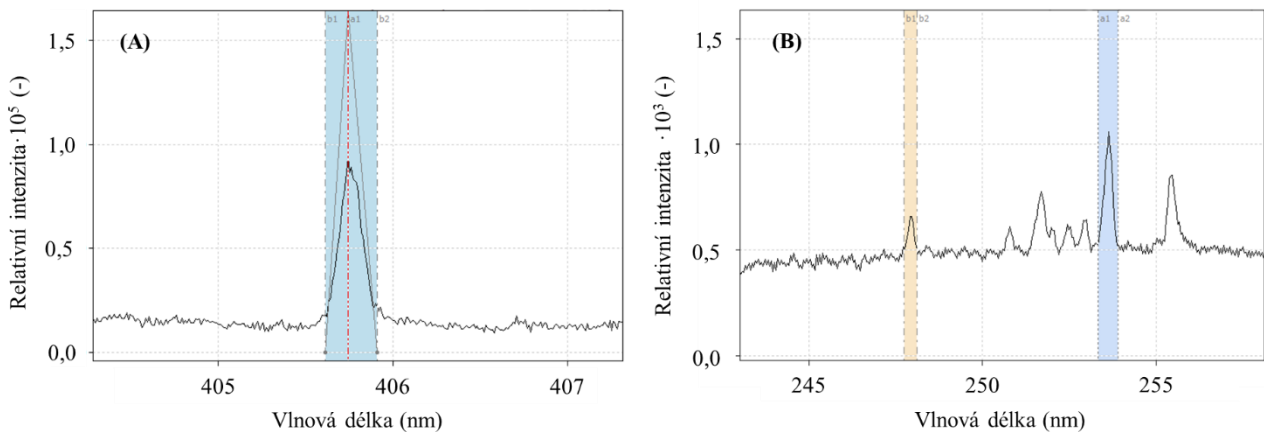
Ze všech vzorků myších tkání byly vybrány pouze reprezentativní kusy, vyřazeny byly například neúplně zbroušené čelisti či stehenní kosti s ulomenou kloubní hlavicí. Data vybraných vzorků byla poté zpracována v programech LIBSAnalyzer a Lightigo ImageLab. Nejprve byly k datům přiřazeny souřadnice jednotlivých bodů mapy v programu LIBSAnalyzer. Dále zpracování probíhalo vykreslením prostorově rozlišených 2D map několika biogenních prvků (vápník, hořčík, stroncium, fosfor) a daného kontaminantu (olovo, kadmium) v programu Lightigo ImageLab. Mapy byly vykreslovány ze spektrálních čar uvedených v Tabulce 7. Identifikace spektrálních čar byla provedena z knihovny spektrálních čar NIST [85]. Pro vykreslení map bylo použito několik způsobů analýzy zvolené spektrální čáry. Byly vyzkoušeny možnosti – maximum čáry, plocha pod křivkou bez i s definovaným pozadím a korelace s trojúhelníkem nebo s Gaussovou křivkou váhovaná intenzitou v definovaném rozsahu. Ze všech variant byla nakonec vybrána korelace s trojúhelníkem váhovaná intenzitou (Obrázek 15A), která poskytovala optimální výsledky analýzy intenzity spektrální čáry.

Tabulka 7: Vybrané spektrální čáry pro vykreslení prostorově rozlišených map.

Metoda	Spektrální čára
LIBS	C I 247,86 nm
	C II 251,21 nm
	P I 253,57 nm
	P I 255,33 nm
	Pb I 405,78 nm
	Sr II 407,77 nm
μLIBS	Mg II 279,55 nm
	Mg I 285,21 nm
	Ca I 364,44 nm
	Ca II 396,85 nm
	Ca I 422,67 nm

Dále byla pro biogenní prvky použita také standardizace intenzitou spektrální čáry uhlíku, který byl detekován v epoxidové pryskyřici i v matici vzorku. Díky jeho přítomnosti v celém vzorku tak mohl být použit pro potlačení matričních jevů. Standardizace byla provedena pomocí poměru spektrálních čar, kdy byl použit poměr ploch pod křivkou spektrálních čar biogenních prvků a spektrální čáry C I 247,86 nm (Obrázek 15B). V poslední řadě byly analýzou poměru intenzit spektrálních čar hořčíku Mg II 279,55 nm a Mg I 285,21 nm

a vápníku Ca II 396,85nm a Ca I 422,67 nm vykresleny mapy zobrazující tvrdost jednotlivých částí vzorku. Tento postup byl převzat z publikace Galiové M. a kol., kde se zabývali výpočtem tvrdosti tkáně špičáku prehistorického medvěda hnědého pomocí podílů iontových a atomových čar hořčíku a vápníku naměřených metodou LIBS. Pro ověření této teorie byla tvrdost vzorku změřena pomocí mikrotvrdoměru. Vypočtené a naměřené hodnoty spolu korelovaly, což potvrdilo možnost analýzy tvrdosti tkáně pomocí podílů spektrálních čar [83].



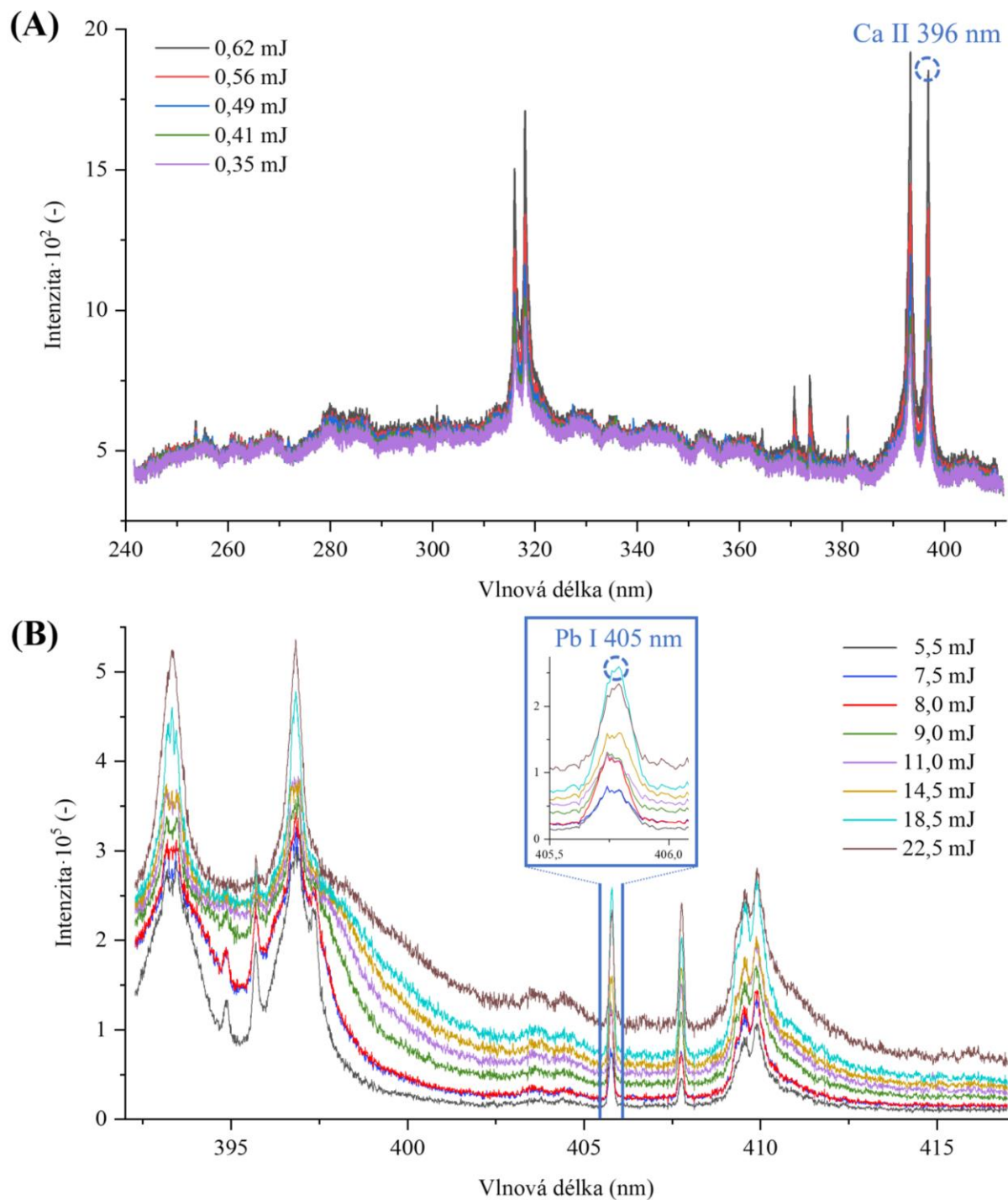
Obrázek 15: (A) Analýza spektrální čáry Pb I 405,78 nm pomocí korelace trojúhelníkem váhované intenzitou spektrální čáry. (B) Poměr spektrálních čar použitý při standardizaci. Vyznačené spektrální čáry C I 247,86 nm (žlutá) a P I 253,57 nm (modrá).

Vzorky kalibrační řady HA standardů byly zpracovány obdobně jako optimalizační měření. Použity byly programy LIBSAnalyzer a Origin2021b. Nejprve byla vyhodnocena plocha pod křivkou spektrální čáry Pb I 405,78 nm, respektive Cd I 361,05 nm. Ze získaných hodnot byl pro každou koncentraci vypočítán průměr a směrodatná odchylka. Z těchto hodnot byla následně v programu Origin2021b sestavena kalibrační závislost.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Optimalizace parametrů měření

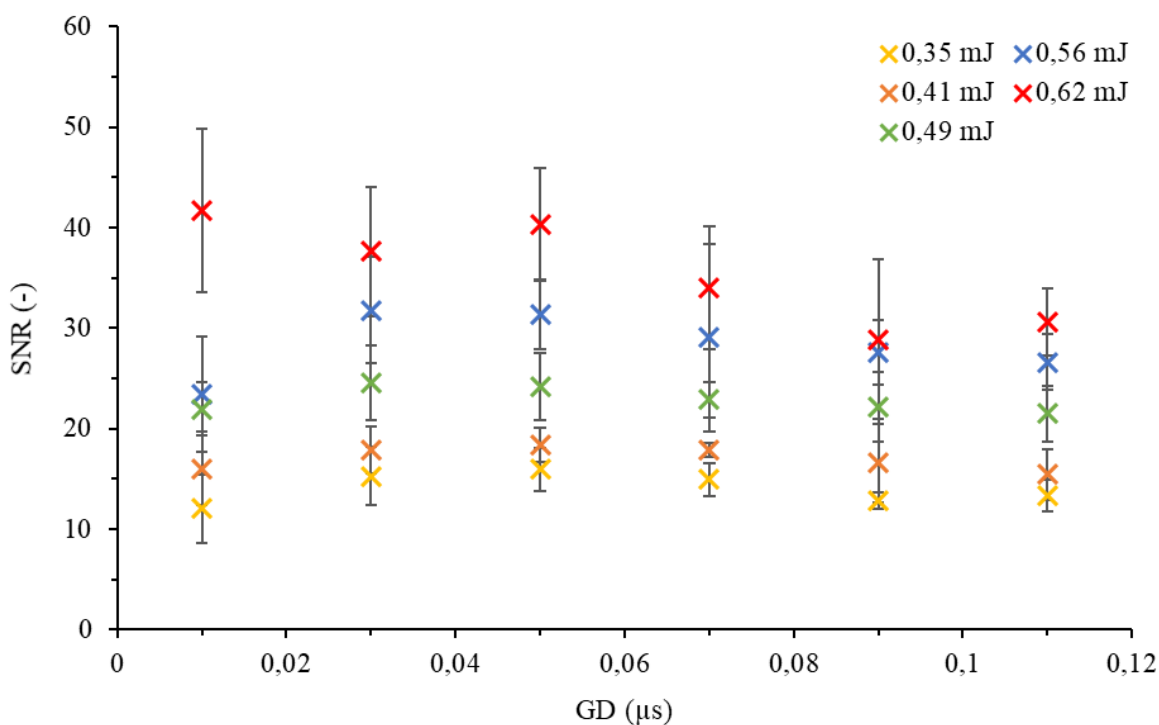
U obou používaných metod byly optimalizovány parametry energie laserového svazku, doba zpoždění a velikost kráteru. Na Obrázku 16 jsou znázorněna maximální spektra naměřená pro jednotlivé energie z optimalizace parametrů metody μ LIBS (A) a LIBS (B).



Obrázek 16: Maximální spektra pro jednotlivé energie detekované při optimalizaci parametrů metody (A) μ LIBS a (B) LIBS. V obou případech jsou ve spektru označeny spektrální čáry používané pro vyhodnocení (Ca II 396,85 nm a Pb I 405,78 nm).

Optimalizační měření probíhalo v obou případech na systému LIBS Discovery, ale s použitím různých spektrometrů. U metody μ LIBS byl použit spektrometr AvaSpec s rozmezím vlnových délek 240 až 410 nm pro detekci vápníkových i hořčíkových čar. Metoda LIBS byla využita pro detekci především kontaminantů (Pb, Cd). K tomu byl použit spektrometr Shamrock s citlivějším detektorem. Pro detekci mikrobiogenních prvků byl opět použit spektrometr AvaSpec s větším detekčním oknem.

Metodou μ LIBS bylo možné detekovat pouze makrobiogenní prvky (vápník, hořčík), proto byla optimalizace provedena ze spektrální čáry Ca II 396,85 nm. Jedná se o velmi intenzivní iontovou čáru, která je nejlépe detekovatelná krátce po ablaci vzorku. S delší dobou zpoždění (GD) dochází k jejímu postupnému vyhasínání, což vede i k nižším intenzitám. Všechny měřené kombinace energií laseru a GD byly vyneseny do grafu na Obrázku 17. Z výsledků poměru signál ku šumu je patrné, že nejvyšší hodnoty byly získány z měření s nejvyšší energií a GD 0,01 a 0,05 μ s. Jako nejvhodnější kombinace parametrů byla zvolena energie 0,62 mJ a GD 0,05 μ s, které vykazovaly menší směrodatnou odchylku.

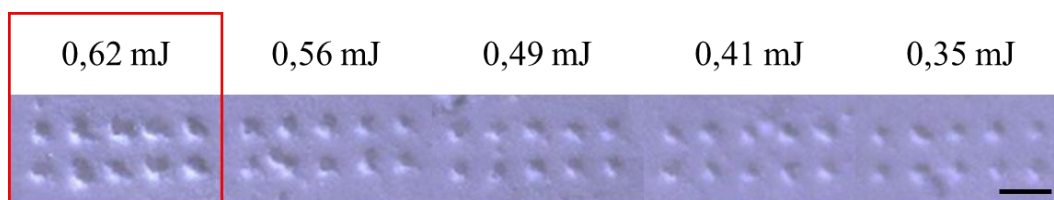


Obrázek 17: Výsledné hodnoty poměru signálu ku šumu pro jednotlivá nastavení optimalizace μ LIBS.

Velikosti kráterů byly zpracovány pomocí programu ImageJ Fiji, kde byly určeny průměry 30 kráterů pro každou energii. Z těchto hodnot byl následně vypočítán průměr a směrodatná odchylka (Tabulka 8). Nejmenší krátery byly vytvořeny u energie 0,49 mJ, avšak kvůli nízkým intenzitám nebyla tato energie použita. U energie 0,62 mJ bylo měření velikosti kráteru zopakováno také na vzorku čelisti. Výsledná hodnota průměru kráteru byla stanovena na 28 ± 2 μ m. Odlišnost od výsledků z HA standardu byla pravděpodobně způsobena různou tvrdostí matrice vzorku. Na základě tohoto zjištění byl pro mapování vzorků nastaven krok mezi jednotlivými spoty 30 μ m.

Tabulka 8: Průměry kráterů vytvořených jednotlivými energiemi pomocí metody μ LIBS.

Energie (mJ)	Velikost kráteru (μm)
0,62	46 ± 4
0,56	44 ± 5
0,49	40 ± 4
0,41	42 ± 4
0,35	42 ± 4

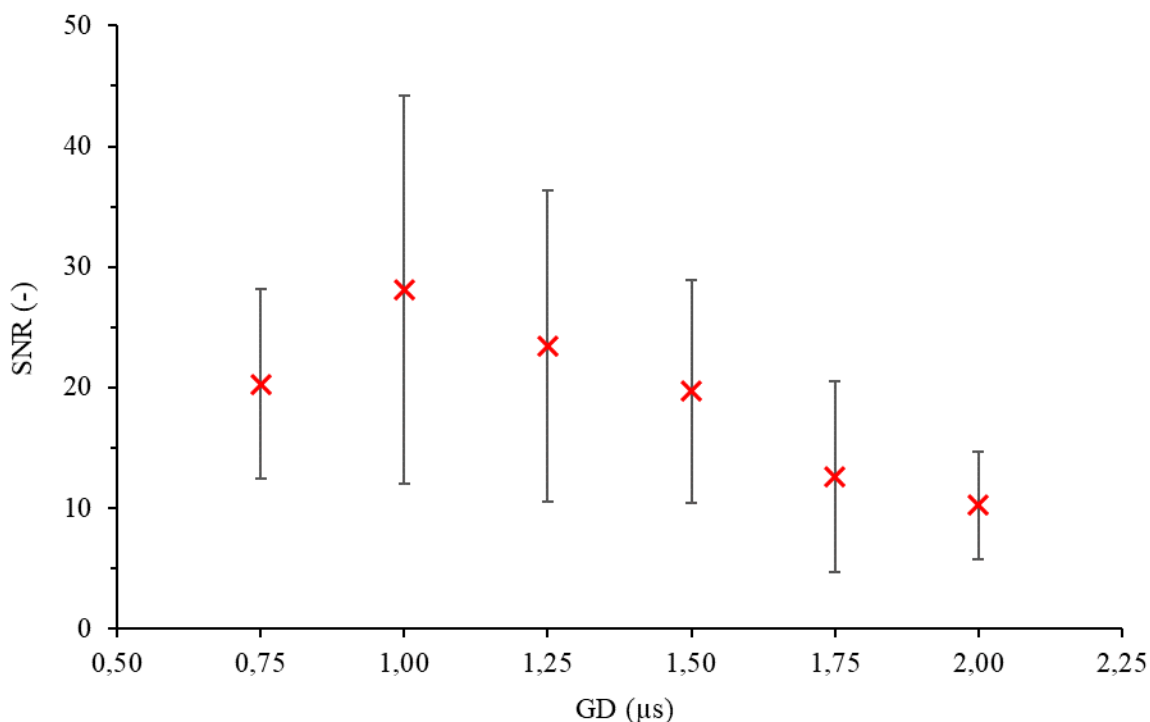


Obrázek 18: Fotografie kráterů vytvořených metodou μ LIBS, červeně orámovaná je zvolená optimální energie. Měřítka představuje 200 μm .

Metoda LIBS byla optimalizována především pro detekci kontaminantů. Jedním z optimalizovaných parametrů proto byly centrální vlnové délky spektrometru Shamrock. Pro olovo byly zkoušeny hodnoty 358 a 405 nm, kde byly analyzovány spektrální čáry Pb I 368,35 nm a Pb I 405,78 nm. Vyšší intenzity byly detekovány ze spektrální čáry Pb I 405,78 nm, která byla proto vybrána pro další měření.

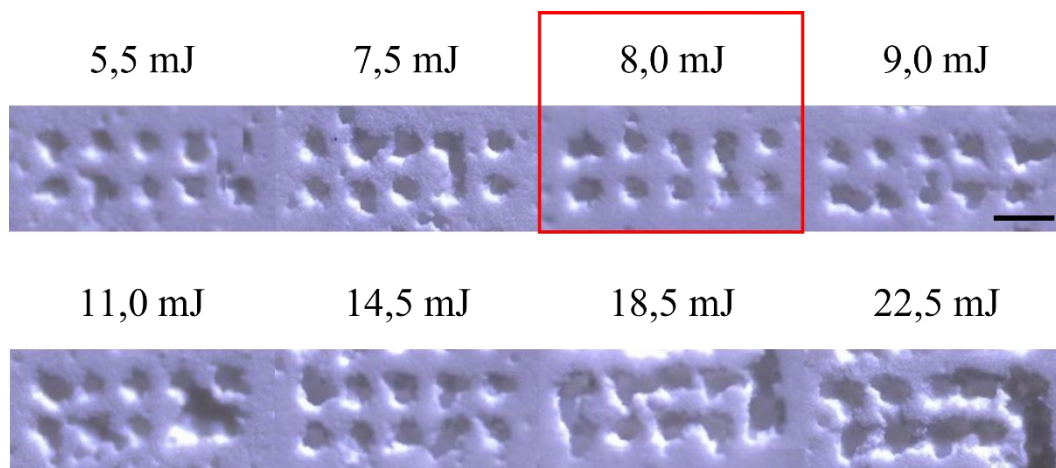
Na rozdíl od μ LIBS byly v případě LIBS analyzovány nejen spektrální čáry iontové (Sr II, C II), ale také atomové (Pb I, P I, C I). Jak již bylo zmíněno, iontové čáry jsou nejlépe detekovatelné krátce po ablaci vzorku kvůli jejich rychlému vyhasínání. Atomové spektrální čáry je však možné detekovat i při delší době zpoždění. Delší dobu zpoždění je vhodné použít především u atomových čar vyskytujících se v blízkosti intenzivních iontových čar (např. Pb I 405,78 nm v blízkosti Ca II 396,85 nm). Ty svým zvýšeným okolím zkreslují intenzity atomových čar a znemožňují tak jejich přesnou detekci. Nárůst pozadí iontových čar je jasně viditelný na Obrázku 16B. Právě z tohoto důvodu byly při optimalizaci analyzovány větší doby zpoždění (1 až 2 μs).

Podobný problém se vyskytoval i u energií, kde hodnoty vyšší než 11,0 mJ byly vyřazeny nejen kvůli vysoké interferenci iontových čar, ale také kvůli velkému poškození vzorku, což bylo nežádoucí. Celkově byla snaha minimalizovat poškození, ale maximalizovat intenzity signálu. Z ostatních energií byla jako optimální zvolena energie 8,0 mJ. Výsledky SNR v závislosti na jednotlivých dobách zpoždění jsou vyneseny na Obrázku 19. Doba zpoždění 1,50 μs byla zvolena jako optimální, jelikož byly ještě dostatečně vysoké hodnoty SNR a zároveň dostatečně nízké hodnoty pozadí.



Obrázek 19: Závislost poměru signálu k šumu pro energii 8,0 mJ a jednotlivé doby zpoždění.

Velikosti kráterů byly analyzovány stejně jako v případě metody μ LIBS. Výsledné hodnoty jsou uvedeny v Tabulce 8. Na Obrázku 20 jsou vyobrazeny krátery vytvořené jednotlivými energiemi. U vyšších energií je jasně patrné větší poškození vzorku. Vybraná optimální energie 8,0 mJ vykazovala poměrně malé krátery bez velkých odchylek. Velikost krátery byla pro tuto energii také stanovena na vzorku čelisti na $74 \pm 3 \mu\text{m}$. Pro mapování vzorků metodou LIBS byl na základě těchto dat použit krok $100 \mu\text{m}$.



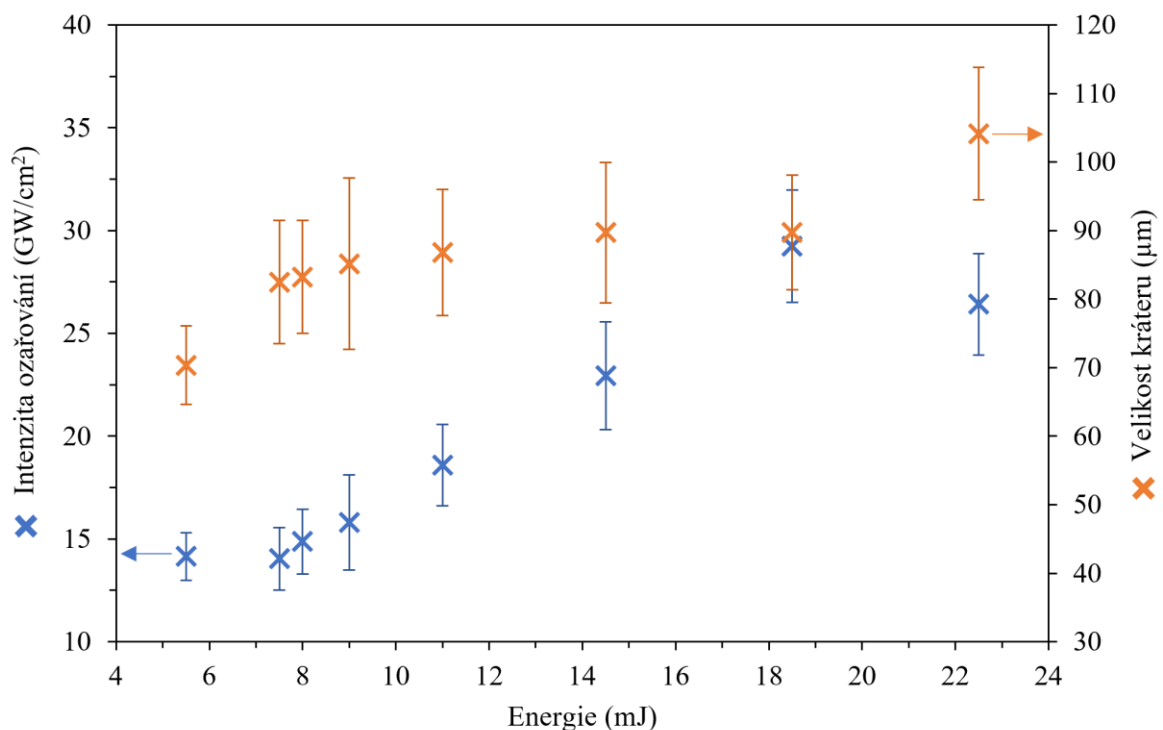
Obrázek 20: Fotografie kráterů vytvořených metodou LIBS, červeně orámovaná je zvolená optimální energie. Měřítka představuje $200 \mu\text{m}$.

Z hodnot nastavované energie, odpovídající velikosti krátery a délky laserového pulzu (10 ns) byly dopočítány hodnoty intenzity ozařování (Tabulka 9), která popisuje výkon laserového pulzu vztahený na plochu ozařeného místa. Tato veličina popisuje systém o něco přesněji než nastavovaná energie laseru. Získané hodnoty intenzity ozařování byly spolu

s velikostí kráteru vyneseny v závislosti na nastavené energii (Obrázek 21). Intenzita ozařování (hlavní osa) se zvyšující se energií rostla, naopak velikost kráteru (vedlejší osa) byla u většiny energií přibližně konstantní. Nejvýhodnější kombinace obou veličin nastala v případě energie 18,5 mJ, avšak z důvodu velkého poškození vzorku tato energie nebyla použita. Spojením výsledků intenzity ozáření a hodnot SNR nebyla se zvyšující se energií pozorována významná odlišnost jednotlivých bodů. Z tohoto důvodu by zvyšující energie nezlepšila citlivost pro danou spektrální čáru.

Tabulka 9: Průměry kráterů vytvořených jednotlivými energiemi a odpovídající intenzita ozařování pro metodu LIBS.

Energie (mJ)	Velikost kráteru (μm)	Intenzita ozařování (GW/cm^2)
22,5	104 ± 10	$14,1 \pm 1,2$
18,5	90 ± 8	$14,0 \pm 1,5$
14,5	90 ± 10	$14,9 \pm 1,6$
11,0	87 ± 9	16 ± 4
9,0	85 ± 19	19 ± 2
8,0	83 ± 8	23 ± 3
7,5	82 ± 9	29 ± 3
5,5	70 ± 6	26 ± 2

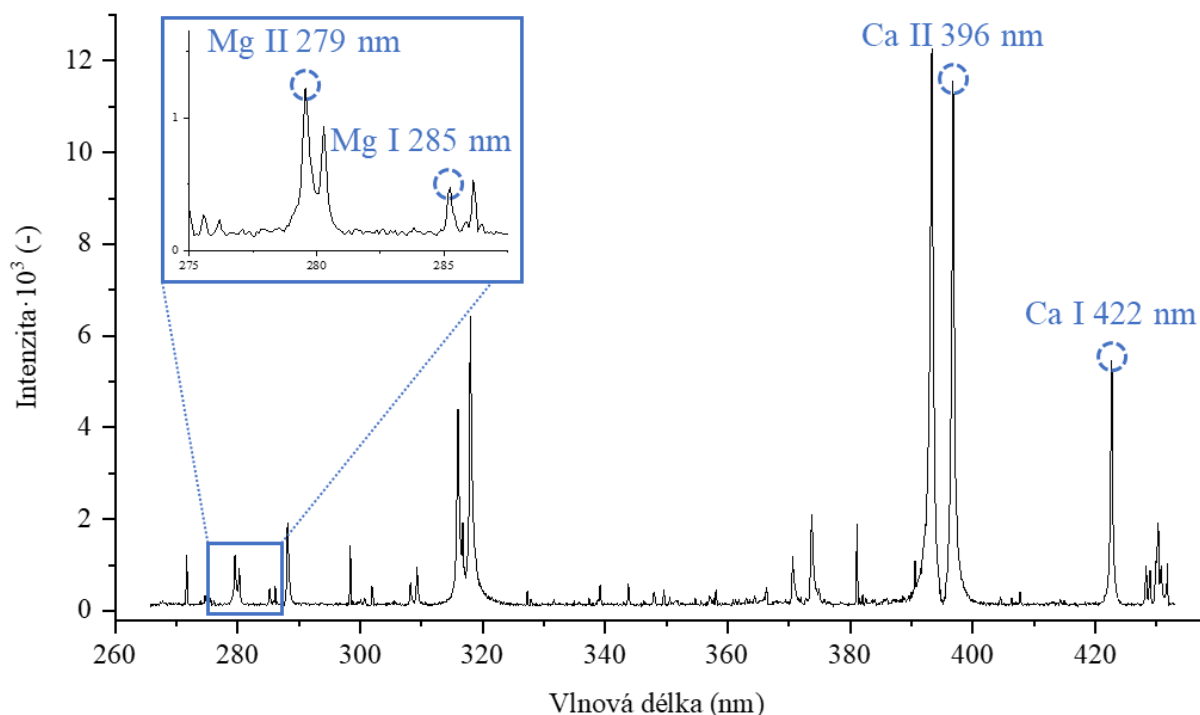


Obrázek 21: Závislost intenzity ozařování a velikosti kráteru na použité energii laseru.

Optimalizace vhodné vlnové délky pro spektrální čáry kadmia byla také prováděna na hodnotě 358 nm, jelikož se v detekčním okně nacházely dvě spektrální čáry (Cd I 346,62 nm a Cd I 361,05 nm). Dále byla analyzována také spektrální čára z vlnové délky 508,58 nm. V případě všech zvolených čar však nebyl detekován žádný signál. To mohlo být způsobeno nehomogenním rozmístěním kadmia v matrici HA standardu, chybou v přípravě, měření vzorku nebo nedostatečnou citlivostí LIBS systému. Referenční analýza HA standardů pomocí ICP-OES prokázala přítomnost kadmia ve vzorcích, i když v nižších koncentracích než původní zvolené koncentrace. Nižší reálné koncentrace naznačují, že problém nastal pravděpodobně již při přípravě vzorků. Další možností neúspěšné detekce kadmia může být již zmíněná nedostatečná citlivost sestavy LIBS, kterou bude nutné v dalších experimentech více otestovat.

5.2 Prostorově rozlišená analýza tvrdých tkání

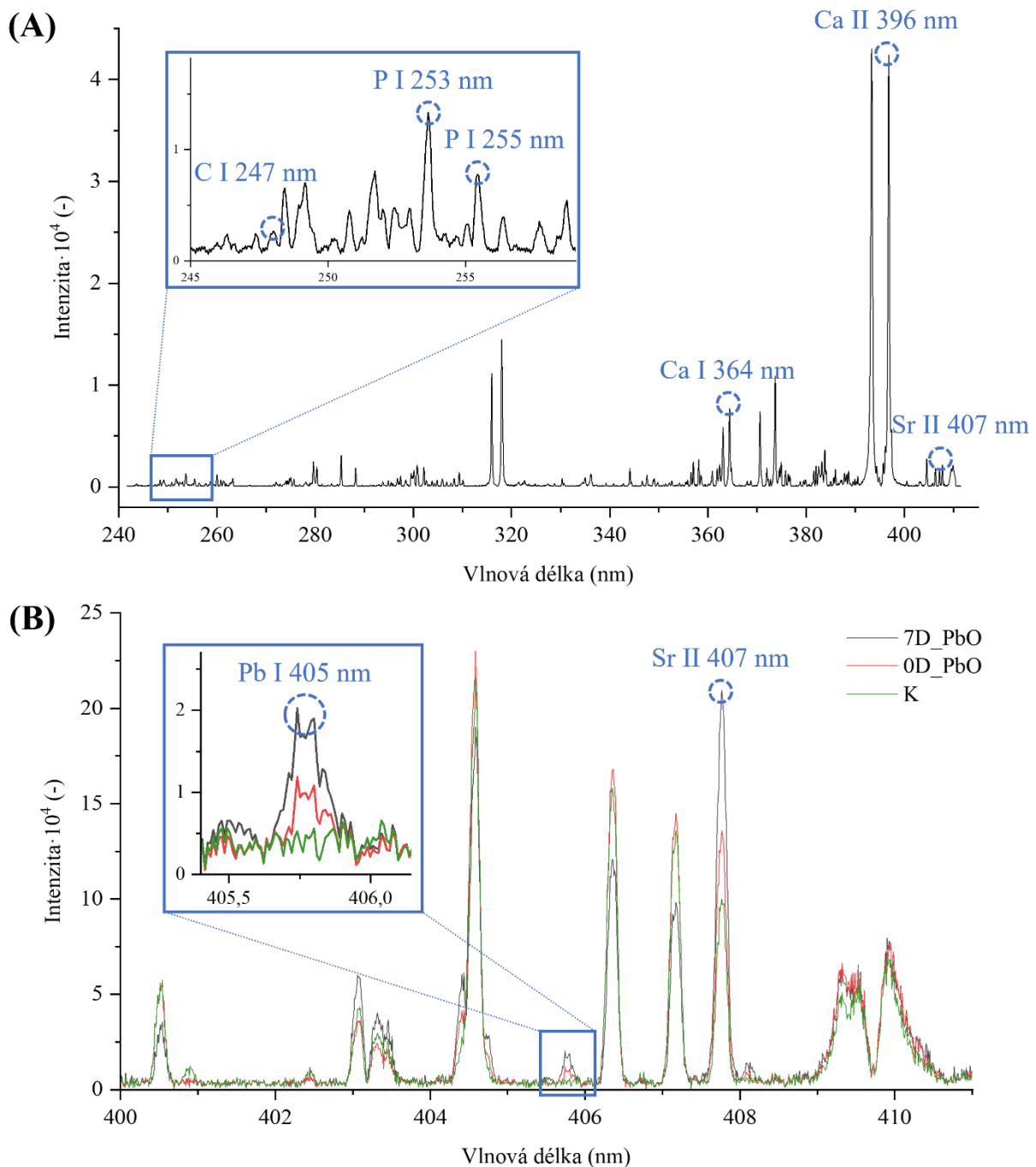
Prostorově rozlišené mapování bylo prováděno nejdříve metodou μ LIBS pro detekci makrobiogenních prvků a následně metodou LIBS pro detekci mikrobiogenních prvků a kontaminantů. Ukázka maximálních spekter z obou analýz je vyobrazena na Obrázcích 22 a 23 spolu s označenými spektrálními čarami použitými pro vykreslování prostorově rozlišených 2D map. Maximální spektra byla použita pro usnadnění identifikace analyzovaných prvků, jelikož zobrazují maxima jednotlivých spektrálních čar z celého vzorku.



Obrázek 22: Maximální spektrum získané měřením vzorku čelisti PbO_{7D} metodou μ LIBS s označenými spektrálními čarami hořčíku a vápníku používanými pro vykreslování 2D map. Přesné vlnové délky spektrálních čar jsou uvedeny v Tabulce 6.

Na Obrázku 23B jsou znázorněna maximální spektra vzorků čelistí ze všech tří skupin expozic (kontrolní, částečně a plně exponovaná). U spektrální čáry Pb I 405,78 nm je jasně patrný rozdíl v intenzitách mezi jednotlivými expozicemi. Pokles intenzit základní exponované skupiny (0D_PbO, červeně) proti déle exponované (7D_PbO černě) dokazuje postupnou bioakumulaci olova v tvrdé tkáni. Ve vzorcích stehenních kostí se nepodařilo detekovat

přítomnost olova v žádném ze vzorků. Tento fakt je možné vysvětlit tím, že struktura kosti se na rozdíl od zubní tkáně v průběhu dospívání obměňuje. Tím pravděpodobně dochází k uvolňování akumulovaného olova ze struktury kostní tkáně. Dalším možným rozdílem může být tvrdost kostní a zubní tkáně. Kostní tkáň se tvrdostí i strukturou nejvíce podobá dentinu, kde Pb také nebylo detekováno.



Obrázek 23: Ukázka maximálních spekter získaných z měření metodou LIBS na spektrometrech (A) AvaSpec a (B) Shamrock s vyznačenými spektrálními čarami používanými pro vykreslování 2D map. (B) Spektra vzorku kontrolní (K), částečně exponované (PbOC) a plně exponované (PbO) skupiny. Přesné vlnové délky všech spektrálních čar jsou uvedeny v Tabulce 6.

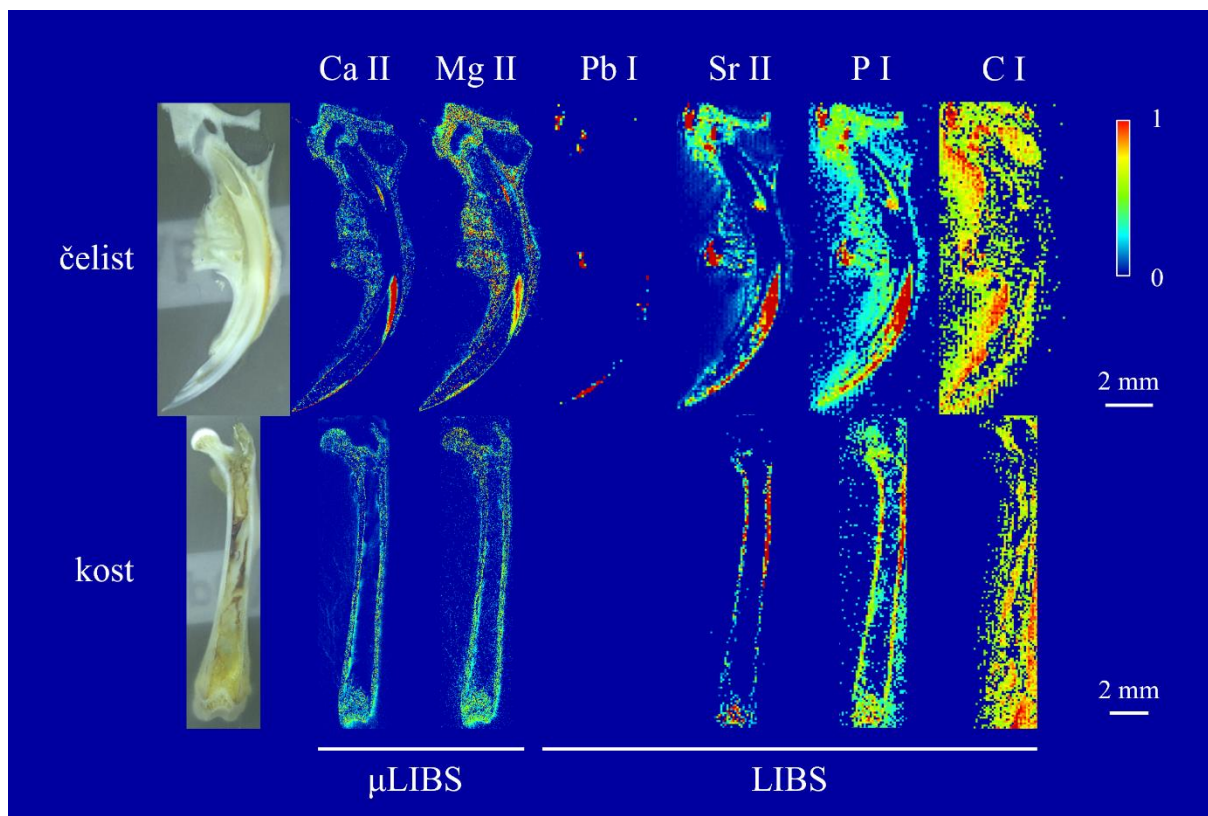
Z vybraných spektrálních čar byly následně vykresleny prostorově rozlišené mapy. Ty zobrazují intenzitu signálu v jednotlivých bodech měření, čímž poskytují také semikvantitativní informaci. Na Obrázku 24 jsou znázorněny výsledné mapy všech analyzovaných prvků pro vzorek čelisti a stehenní kosti. V obou případech se jedná o vzorky plně exponované PbO po dobu sedmi týdnů (7D_PbO). Mapy makrobiogenních prvků (Ca a Mg) byly získány metodou μ LIBS, mapy ostatních prvků (Pb, Sr, P, C) metodou LIBS. Mezi výsledky metody μ LIBS a LIBS je jasně patrný rozdíl – metoda μ LIBS poskytuje nižší intenzity, ale vyšší rozlišení (30 μ m), díky čemuž jsou mapy detailnější a přesnější. Každá mapa má vlastní barevnou škálu kvůli rozdílné intenzitě spektrálních čar jednotlivých prvků. Z tohoto důvodu nebylo možné všechny prvky naškálovat stejně. U všech obrázků s 2D mapami je pro větší přehlednost tedy uvedena pouze škála od 0 do 1, kde 0 je minimální intenzita a 1 je normovaná maximální intenzita každého prvku.

Z map distribuce vápníku a hořčíku byly získány informace o prostorovém složení matrice vzorku. Jelikož se jedná o makrobiogenní prvky, jsou v tvrdých tkáních přítomny v celé oblasti vzorku, avšak v odlišných koncentracích. Jejich rozdílné zastoupení v matrici navíc poukazuje na různou tvrdost tkáně. Vápník je nejvíce koncentrovaný ve sklovině řezáku a stoliček, která je nejtvrďší částí zubu. Směrem od skloviny do zbytku zubu koncentrace vápníku klesá a snižuje se i tvrdost tkáně. Rozložení hořčíku je více rovnoměrné v celé oblasti čelisti. Lehce zvýšené koncentrace byly detekovány v dentinu v blízkosti skloviny. V případě stehenní kosti se zastoupení vápníku i hořčíku v rámci celého vzorku nijak výrazně nelišilo, což lze vysvětlit nízkou heterogenitou složení kostní tkáně.

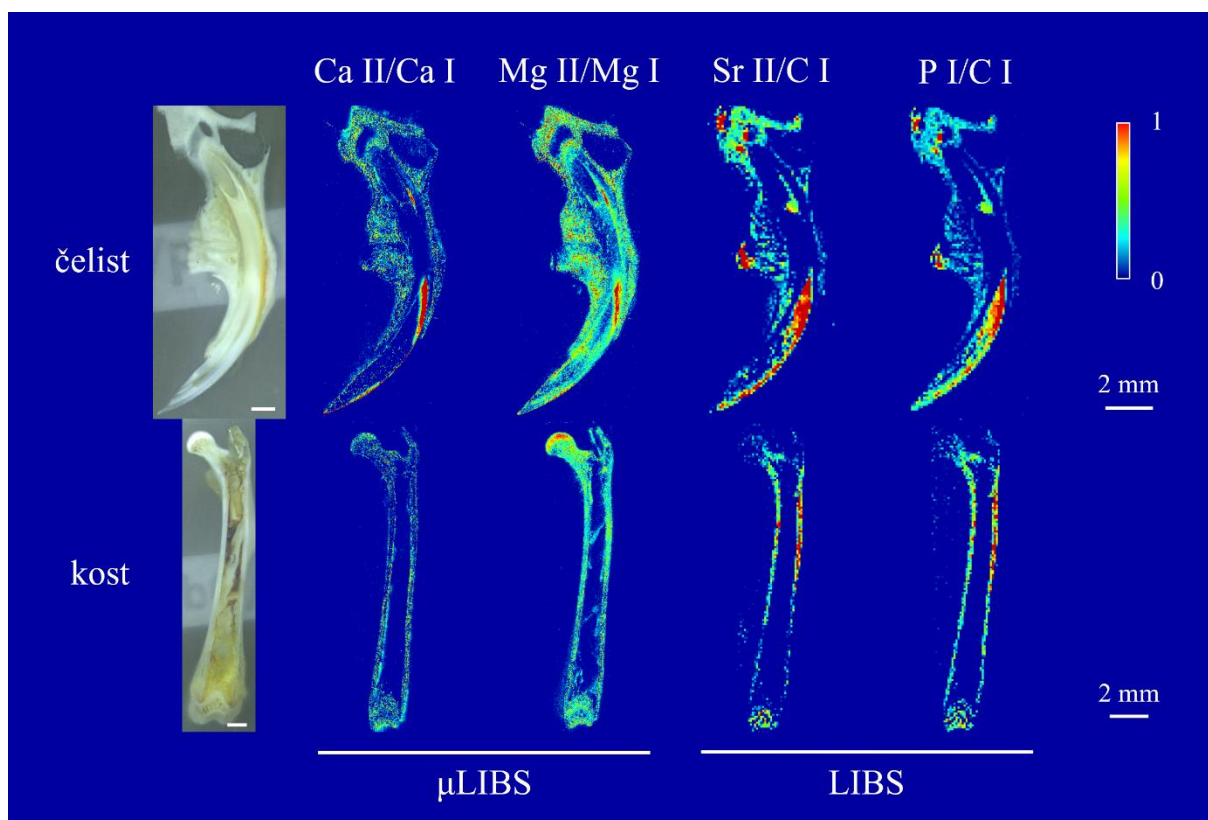
Metoda LIBS byla primárně použita pro detekci olova. Dalšími analyzovanými prvky byly Sr, P a C. Tyto prvky nebylo kvůli vlastnostem spektrálních čar možné detekovat metodou μ LIBS. Stroncium a fosfor jsou biogenní prvky, které svým rozložením přibližně kopírují rozložení vápníku. Nejvíce byly detekovány ve sklovině řezáku a stoliček, tedy v nejtvrďších částech zubu. Z dostupné literatury bylo zjištěno, že se tyto prvky spolu s vápníkem podílejí na tvrdosti tkáně, což potvrzují i získané výsledky.

Mapy stroncia a především fosforu však vykazovaly nepřesné hranice vzorku a epoxidu, což bylo způsobeno vlivem matrice. Z tohoto důvodu byl analyzován uhlík jako standardizační prvek, jelikož je obsažen v celém vzorku i epoxidu. Spektrální čarou uhlíku C I 247,86 nm byly vyděleny spektrální čáry stroncia Sr II 407,77 nm a fosforu P I 253,56 nm. Touto standardizací byl potlačen vliv matrice, čímž došlo ke zpřesnění výsledků. Získané mapy podílů vykazovaly už přesnou hranici vzorku bez interference se signálem epoxidu. Standardizované mapy jsou znázorněny na Obrázku 25.

Obdobným způsobem byly získány také mapy znázorňující tvrdost vzorků. Tu je sice možné přibližně odhadnout z map vápníku, avšak přesnější údaje lze získat z podílů iontových a atomových spektrálních čar vápníku (Ca II/Ca I) a hořčíku (Mg II/Mg I). Pro tyto účely byla použita metoda μ LIBS, při které byly všechny potřebné čáry velmi dobře detekovatelné. Z výsledných map (Obrázek 25) lze jednoduše pozorovat oblasti s nejvyšší intenzitou (a tedy i tvrdostí), které například v případě kosti nebyly na mapách jednotlivých prvků detekované.

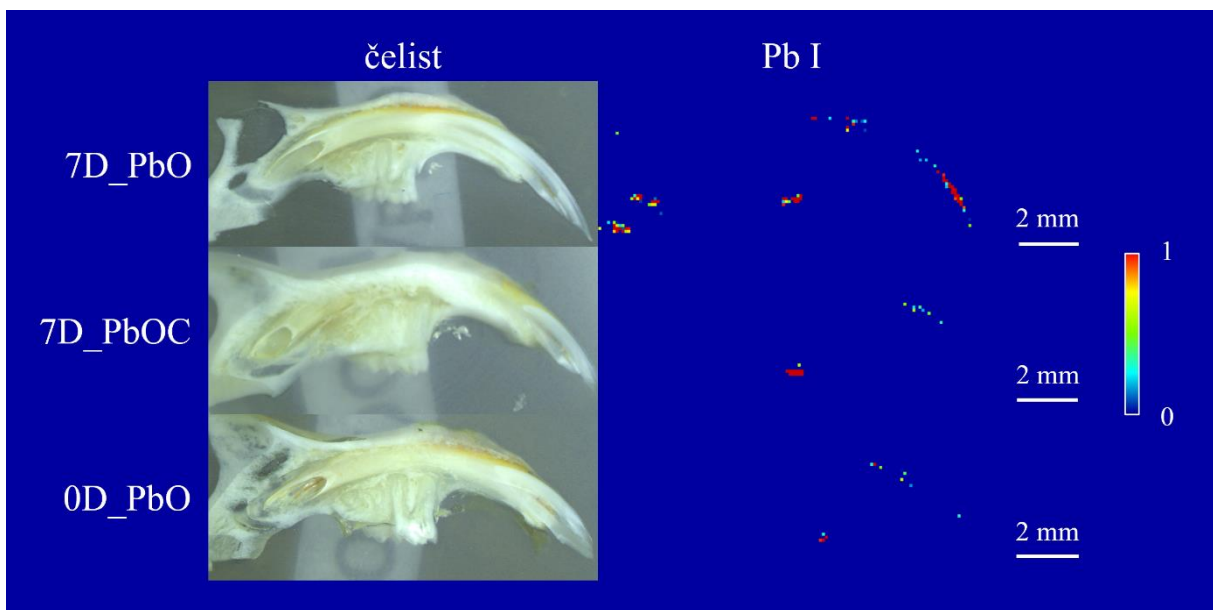


Obrázek 24: 2D mapy všech analyzovaných prvků získaných pomocí metod μ LIBS a LIBS pro vzorek čelisti a stehenní kosti ze skupiny 7D_PbO. Měřítka odpovídají 2 mm.



Obrázek 25: 2D mapy poměrů spektrálních čar určující tvrdost tkáně (μ LIBS – Ca II/Ca I a Mg II/Mg I) a poměrů standardizovaných prvků (LIBS – Sr II/C I a P I/C I). Měřítka odpovídají 2 mm.

Jak již bylo zmíněno, olovo bylo možné detekovat pouze ve vzorcích čelistí, kde nebylo rozloženo homogenně. Z výsledných map distribucí olova (Obrázek 26) je patrné, že k akumulaci olova dochází především v oblasti nejtvrdějších částí tkáně (sklovina řezáku a stoliček včetně blízkého okolí). Obsah olova odpovídal délce expozice, s kratší dobou expozice bylo detekováno méně olova. Porovnáním výsledků 7týdenní plné (7D_PbO) a částečné (7D_PbOC) expozice lze pozorovat postupné uvolňování olova z hydroxyapatitové matrice zubu. Oproti 6týdenní expozici (0D_PbO) bylo u částečně exponované skupiny (7D_PbOC) detekováno více olova v oblasti stoliček. Z toho lze soudit, že uvolňování akumulovaného kovu probíhá nejvíce z řezáku. U vzorků kontrolní skupiny olovo detekováno nebylo, pokud ve vzorcích bylo nějaké obsaženo, jeho koncentrace byla pod limity detekce.

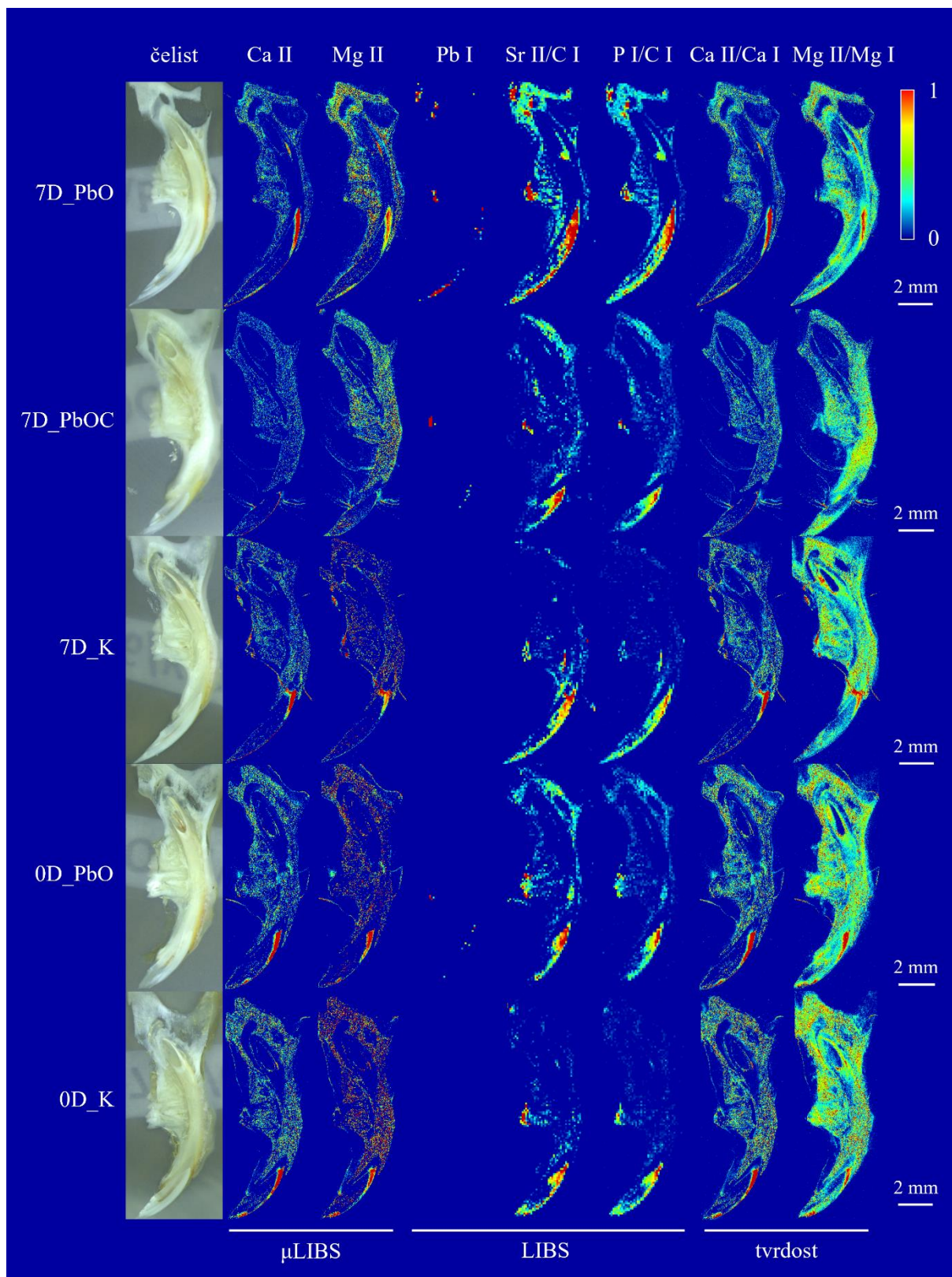


Obrázek 26: Mapy prostorové distribuce olova ve vzorcích čelistí jednotlivých typů expozic (7D_PbO, 7D_PbOC a 0D_PbO) získané ze spektrální čáry Pb I 405,78 nm. Měřítka představují 2 mm.

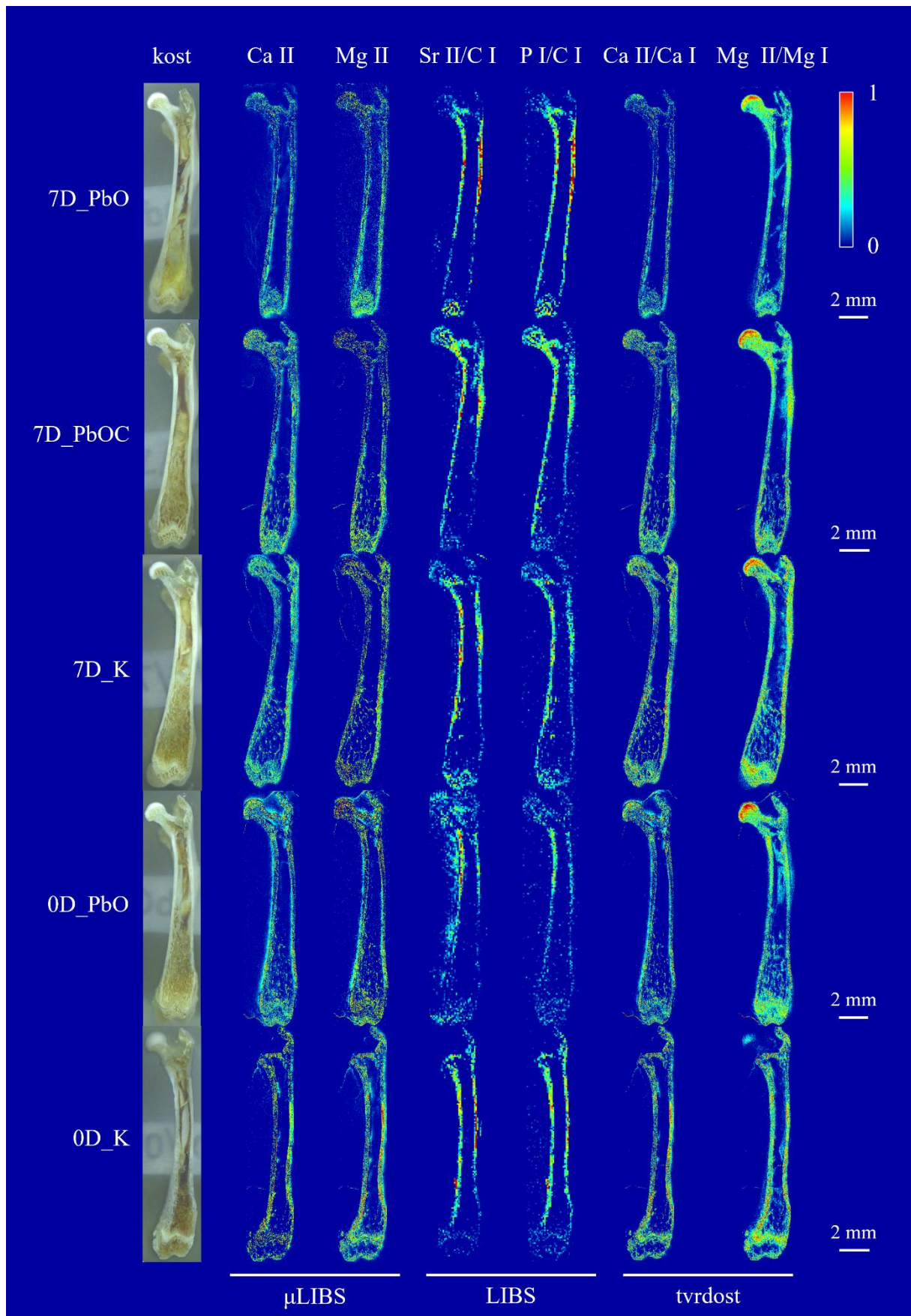
Ze všech výše zmíněných výsledků byl sestaven souhrnný obrázek pro čelisti (Obrázek 27) a stehenní kosti (Obrázek 28) zahrnující všechny typy expozic. Pro lepší přehlednost byly vynechány mapy jednotlivých prvků v případě stroncia, fosforu a uhlíku, jelikož relevantnější výsledky byly získány z map standardizovaných podílů. Škála každého prvku je u všech vzorků v rámci jednoho obrázku normovaná na stejné číslo, čímž je možné mapy vzorků porovnávat.

Na Obrázku 27 jsou znázorněny všechny skupiny expozic pro čelisti. Všechny vzorky vykazují obdobné výsledky v rámci map distribuce jednotlivých prvků. U všech vzorků byl porovnáním informací z map distribuce olova a map tvrdostí potvrzen trend v akumulaci kovu v nejtvrdějších částech zubů – sklovina řezáku a stoliček.

V případě všech vzorků kostí (Obrázek 28) tedy bylo možné detekovat pouze biogenní prvky. Menším prostorovým rozlišením použitým u metody μ LIBS byly získány velmi detailní mapy distribucí jednotlivých prvků. Z map lze rozeznat i trámečkovou strukturu houbovité kosti, což u výsledků metody LIBS bylo kvůli horšímu rozlišení (100 μ m) nemožné. Mapy podílů zobrazujících tvrdost poskytly informaci o nejtvrděší části kosti v oblasti kloubní hlavičky.



Obrázek 27: Mapy prostorové distribuce biogenních prvků (Ca, Mg, Sr, P), kontaminantu (Pb) a poměrů určujících tvrdost získaných metodami μ LIBS a LIBS pro všechny typy expozic čelistí. Měřítka odpovídají 2 mm.

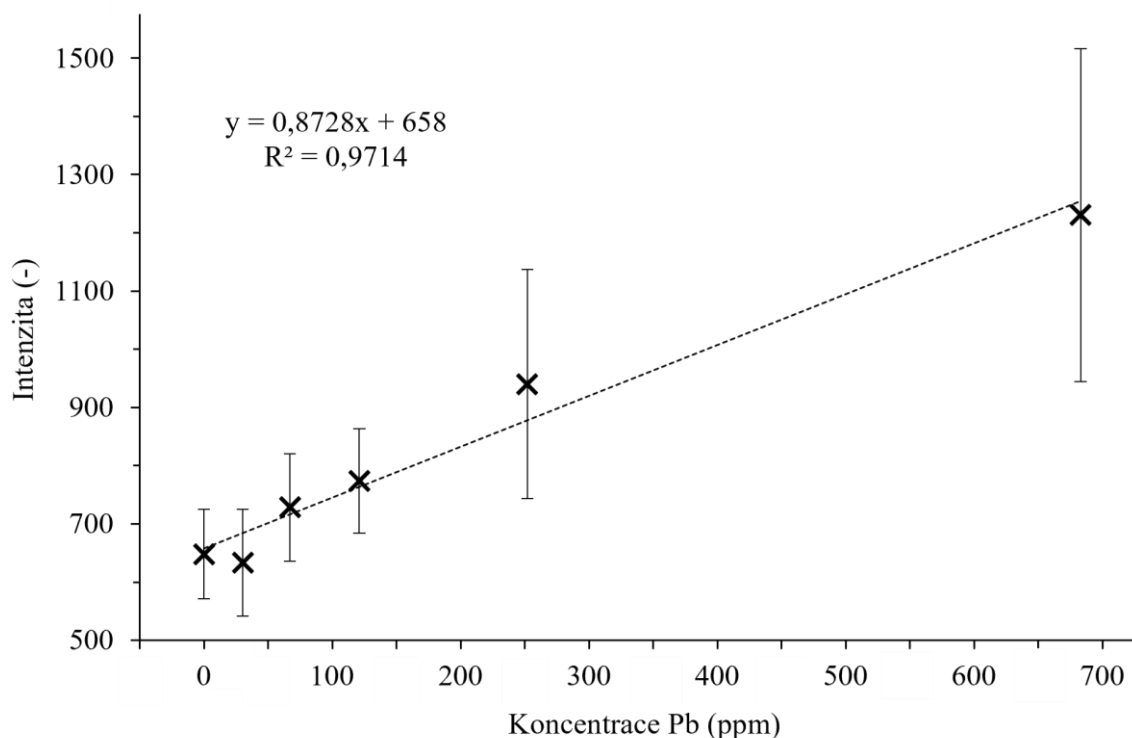


Obrázek 28: Mapy prostorové distribuce biogenních prvků (Ca, Mg, Sr, P) a poměrů určujících tvrdost získaných metodami μ LIBS a LIBS pro všechny typy expozičních stehenních kostí. Měřítka odpovídají 2 mm.

Jelikož kadmium nebylo detekováno na referenčních vzorcích ani při nejvyšší připravené koncentraci (1000 ppm), nebylo možné optimalizovat parametry měření pro jeho detekci. I přes to byla provedena prostorově rozlišená analýza dvou vzorků čelistí plně exponovaných (7D_CdO) a jednoho kontrolního vzorku (7D_KCd). Použitými parametry měření byly optimální hodnoty používané pro olovo, tedy energie 8,0 mJ a GD 1,50 μ s. Důvodem je výrazná podobnost mezi charakteristikami spektrální čáry Pb I 405,78 nm a Cd I 361,05 nm. Z výsledků však nebylo možné prokázat přítomnost kadmia ani v jednom vzorku exponované skupiny. Další vzorky byly proto uchovány pro případnou další analýzu s optimalizovanými parametry v navazující práci.

5.3 Kvantitativní analýza

Kvantitativní analýza byla provedena kalibrační metodou, jelikož pro bezkalibrační metodu nebylo možné získat potřebné parametry (teplota plazmatu, elektronová hustota) z důvodu nedostatku vhodných spektrálních čar. Na Obrázku 29 je znázorněna kalibrační křivka olova sestavená z výsledků měření HA standardů za optimalizovaných podmínek metodou LIBS. Kalibrační závislost byla sestavena ze vzorků o koncentracích 0, 30, 67, 121, 252 a 683 ppm. Pro každou koncentraci bylo naměřeno celkem 400 spekter, ze kterých byly v programu LIBS Analyzer vypočteny průměrné hodnoty a směrodatné odchylky. Vzorek o koncentraci 211 ppm byl z důvodu výrazně vyšší intenzity z kalibrační závislosti vyřazen.



Obrázek 29: Kalibrační křivka pro olovo v HA standardech.

Ze směrnice kalibrační křivky byly pomocí rovnice (1) (kapitola 2.2.3) vypočteny limity detekce a kvantifikace (LOD a LOQ). Pro porovnání byly parametry vypočteny také z rovnice (2). V obou případech byly pomocí zákona šíření nejistot vypočteny odchylky získaných hodnot LOD a LOQ. Zákon šíření nejistot je popsán rovnicí 3:

$$\Delta y = \sqrt{\left(\frac{\partial y}{\partial x_1} \Delta x_1\right)^2 + \left(\frac{\partial y}{\partial x_2} \Delta x_2\right)^2 + \dots + \left(\frac{\partial y}{\partial x_n} \Delta x_n\right)^2}, \quad (3)$$

kde Δy zjišťovaná odchylka veličiny y , x_{1-n} jsou veličiny používané při výpočtu a Δx_{1-n} jsou jejich odchylky [86]. V případě výpočtu odchylek LOD a LOQ ze směrnice kalibrační křivky byla rovnice upravena na tvar 4:

$$\Delta y = \sqrt{(k s_B) \left(-\frac{1}{a^2} \Delta a\right)^2}, \quad (4)$$

kde Δy je vypočtená odchylka LOD nebo LOQ, k je odpovídající konstanta (pro LOD $k = 3$, pro LOQ $k = 10$), s_B je směrodatná odchylka pozadí referenčního vzorku (blanku), a je směrnice kalibrační přímky a Δa je odchylka hodnoty směrnice. Pro výpočet LOD a LOQ ze vzorce byl tvar rovnice upraven na rovnici 5:

$$\Delta y = \sqrt{\left(\frac{k s_B}{\bar{x}_S} \Delta c\right)^2 + \left(k c s_B \left(-\frac{1}{\bar{x}_S^2}\right) \Delta \bar{x}_S\right)^2}, \quad (5)$$

kde Δy je vypočtená odchylka LOD nebo LOQ, k je odpovídající konstanta (pro LOD $k = 3$, pro LOQ $k = 10$), s_B je směrodatná odchylka pozadí blanku, c je koncentrace blanku, Δc je odchylka koncentrace blanku. \bar{x}_S průměrná hodnota intenzity signálu a $\Delta \bar{x}_S$ odchylka průměrné hodnoty intenzity signálu. Získané hodnoty jsou uvedeny v Tabulce 10.

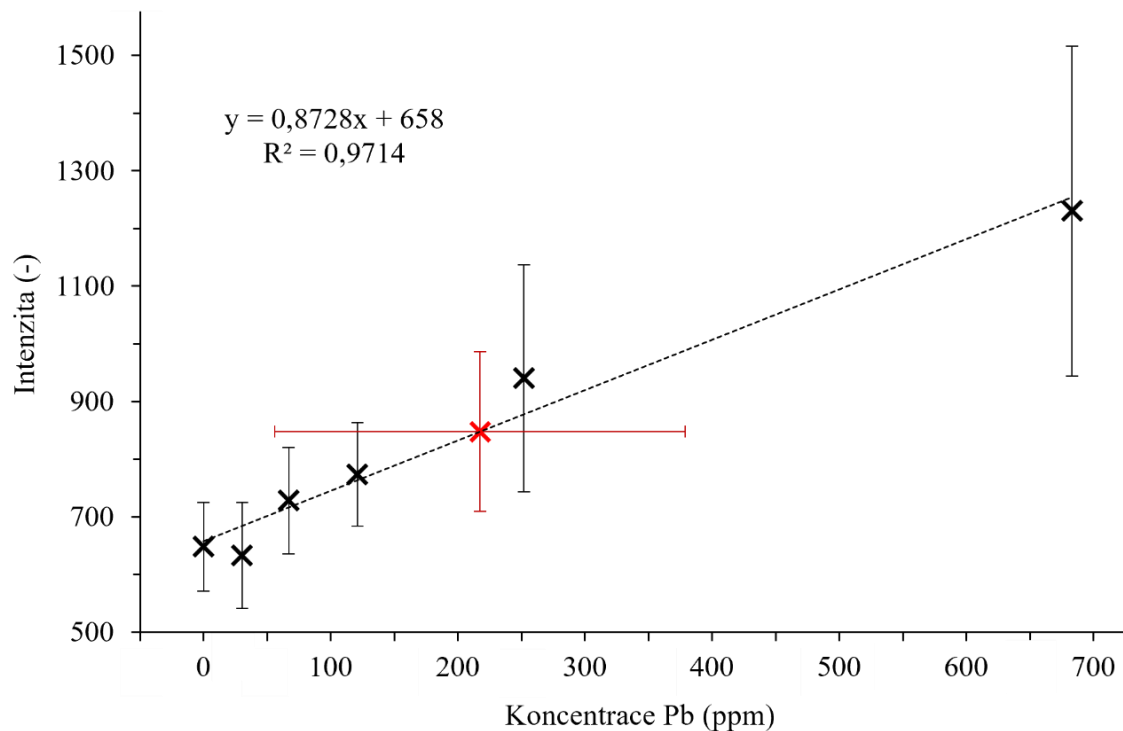
Výpočet pomocí směrnice kalibrační křivky je úzce závislý na hodnotě šumu v oblasti sledované spektrální čáry, čímž bylo možné určit skutečné LOD a LOQ při daných experimentálních podmínkách. Výpočet z rovnice (2) popisuje jednotlivé limity za ideálních podmínek, kde signál zkoumaného prvku není ovlivňován hodnotou šumu. Vliv okolního šumu na analyzovanou spektrální čáru olova byl výrazný především u referenčních vzorků o nižších koncentracích (30, 67 a 121 ppm), kde byla spektrální čára jen velmi málo odlišitelná. Tento mírný nárůst intenzity však výpočet ze směrnice nebyl schopen zaznamenat, což vedlo k vyšším hodnotám limitů. Snížení vlivu pozadí by mohlo vést k přiblížení hodnot LOD a LOQ získaných ze směrnice k hodnotám z rovnice (2). Tento problém však zahrnuje rozsáhlejší zpracování dat, které je nad rámec této diplomové práce.

Tabulka 10: Limity detekce a kvantifikace pro olovo získané výpočtem ze směrnice kalibrační křivky (1) a z rovnice (2).

Metoda výpočtu	LOD (ppm)	LOQ (ppm)
kalibrační křivka (1)	209 ± 18	690 ± 60
rovnice (2)	49 ± 10	160 ± 30

Pomocí rovnice lineární regrese kalibrační křivky byla také provedena predikce obsahu olova ve vzorku HA standardu. Pro potvrzení funkčnosti modelu byl použit vzorek o známé koncentraci (188 ppm). Měření probíhalo metodou LIBS za stejných podmínek jako vzorky kalibrační série (energie 8,0 mJ, GD 1,50 μ s, mapa 20 \times 20, krok 100 μ m). Predikcí byla koncentrace olova ve vzorku stanovena na 220 ppm, což se nijak výrazně neliší od reálné koncentrace. Získaná hodnota byla pro ukázkou vykreslena do kalibrační závislosti. (Obrázek 30). Podobně jako u výpočtu LOD a LOQ byla také pomocí zákona šíření nejistot (rovnice (3)) dopočítána odchylka predikované koncentrace na 160 ppm. Vysoká odchylka je ovlivněna fluktuací intenzit spektrální čáry olova, což může být důsledek nehomogenního rozložení olova na povrchu standardu.

Tento experiment byl proveden jako modelový případ predikce koncentrace olova v neznámém vzorku. Navazující experimenty budou zaměřené na predikci koncentrací kontaminantů i v reálných vzorcích zubů a kostí. V těchto případech však bude pravděpodobně nutné do výpočtu zahrnout i vliv matrice vzorku z důvodu nehomogenity matrice reálných vzorků.



Obrázek 30: Kalibrační závislost zobrazující predikovaný neznámý vzorek HA standardu (červeně).

6 ZÁVĚR

Cílem předložené diplomové práce bylo studium bioakumulace vybraných těžkých kovů v tvrdých tkáních pomocí metody spektroskopie laserem buzeného plazmatu. Experimenty byly prováděny na modelových vzorcích čelistí a stehenních kostí laboratorních myší exponovaných po různou dobu nanočásticím kontaminantu (olovo, kadmium). Odebrané vzorky kostí byly před měřením uchyceny do epoxidové pryskyřice, podélně zbrúšeny a naleštěny. Pro referenci byly připraveny hydroxyapatitové standardy o osmi koncentracích zvolených těžkých kovů. Analýza probíhala na systému LIBS Discovery pomocí dvou metodik (μ LIBS a LIBS) s rozdílným prostorovým rozlišením (30 μ m a 100 μ m).

Před měřením modelových vzorků byla provedena optimalizace parametrů měření obou metodik na HA standardech. V případě μ LIBS bylo možné detekovat pouze makrobiogenní prvky (vápník, hořčík), zbylé biogenní prvky (stroncium, fosfor) byly detekovatelné pouze metodou LIBS. Detekce olova byla také možná pouze metodou LIBS, kadmium nebylo detekovatelné při žádném zkoušeném nastavení. Pro ověření byla provedena referenční analýza standardů pomocí XRF, která však byla v případě kadmia neprůkazná, pravděpodobně z důvodu interference s jiným prvkem. Následně proto byla provedena analýza pomocí metody ICP-OES, kterou byly určeny přesné koncentrace těžkých kovů ve vzorcích. Tyto koncentrace byly poté používány ve zbytku práce.

Prostorově rozlišenou analýzou vzorků tvrdých tkání s krokem 30 μ m byly získány mapy distribuce makrobiogenních prvků (vápník, hořčík). Podílem intenzit iontových a atomových čar těchto prvků bylo také možné sestavit mapy, které reflektovaly změnu tvrdosti matrice vzorků. Informace o tvrdosti tkáně byly následně použity při analýze akumulovaných těžkých kovů. Ostatní biogenní prvky a kontaminanty bylo nutné opět analyzovat s prostorovým rozlišením 100 μ m. I přes vyšší citlivost bylo opět detekovatelné pouze olovo. Bioakumulace olova byla prokázána zejména v nejtvrdějších oblastech zubů (sklovina řezáku a stoliček). Porovnáním výsledků plně a částečně exponované skupiny byl dokázán postupný úbytek olova opotřebením zubu.

Na závěr práce byla vyzkoušena možnost kvantitativní analýzy olova v tvrdých tkáních. Z měření HA standardů byla sestavena kalibrační závislost, ze které byly dopočítány limity detekce a kvantifikace. Za daných experimentálních podmínek byl limit detekce stanoven na 209 ± 18 ppm a limit kvantifikace na 690 ± 60 ppm. Dále byla vyzkoušena predikce koncentrace vzorku o známé koncentraci 188 ppm. Predikovaná hodnota 220 ppm však byla zatížena vysokou odchylkou (160 ppm), která byla způsobena fluktuací intenzity signálu spektrální čáry v průběhu měření.

Navazující práce bude zaměřena zejména na optimalizaci analýzy pro kadmium a detekci těžkých kovů v kostech. V případě olova bude snaha prokázat dekalifikaci tvrdé tkáně v závislosti na akumulovaném kovu. V rámci kvantitativní analýzy bude výzkum směřován k další optimalizaci experimentálních podmínek a zpracování dat pro dosažení lepších detekčních limitů a následně k predikci obsahu kontaminantu v reálných vzorcích.

7 LITERATURA

- [1] LIMBECK, A., L. BRUNNBAUER, H. LOHNINGER, et al. Methodology and applications of elemental mapping by laser induced breakdown spectroscopy. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2021, **1147**, 72-98 [cit. 2022-01-26]. ISSN 00032670. Dostupné z: doi: .1016/j.aca.2020.12.054
- [2] SKOOG, Douglas A., F. James HOLLER a Stanley R. CROUCH. *Principles of instrumental analysis*. Seventh edition. Australia: Cengage Learning, [2018]. ISBN 978-1-305-57721-3
- [3] HURST, G. S., J. D. GRAYBEAL, J. O. STONE a S. CHU. Spectroscopy. *Encyclopedia Britannica* [online]. Edinburgh, VB: Encyclopædia Britannica, 2020 [cit. 2022-01-25]. Dostupné z: <https://www.britannica.com/science/spectroscopy>
- [4] HARVEY, David. *Analytical chemistry 2.1*. [online]. DePauw University, USA, 2016 [cit. 2022-01-25]. ISBN 0-07-237547-7. Dostupné z: [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Analytical_Chemistry_2.1_\(Harvey\)](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Analytical_Chemistry_2.1_(Harvey))
- [5] NOLL, Reinhard. Laser-Induced Breakdown Spectroscopy. *Laser-Induced Breakdown Spectroscopy* [online]. 1. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2012, 2012-9-13, s. 7-15 [cit. 2022-01-25]. ISBN 978-3-642-20667-2. Dostupné z: doi: 10.1007/978-3-642-20668-9_2
- [6] ASQUINI, C.P. Laser induced breakdown spectroscopy (LIBS). *Handbook of Solid-State Lasers* [online]. Elsevier, 2013, 2013, s. 551-571 [cit. 2022-01-25]. ISBN 9780857092724. Dostupné z: doi:10.1533/9780857097507.2.551
- [7] NOVOTNÝ, J., M. BRADA, M. PETRILAK, D. PROHAZKA, K. NOVOTNÝ, A. HRDLIČKA a J. KAISER. A versatile interaction chamber for laser-based spectroscopic applications, with the emphasis on Laser-Induced Breakdown Spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* [online]. 2014, **101**, 149-154 [cit. 2022-01-25]. ISSN 05848547. Dostupné z: doi: 10.1016/j.sab.2014.08.004
- [8] MIZIOLEK, Andrzej W., Vincenzo PALLESCHI a Israel SCHECHTER, ed. *Laser-Induced Breakdown Spectroscopy (LIBS)* [online]. Cambridge: Cambridge University Press, 2006 [cit. 2022-01-25]. ISBN 9780511541261. Dostupné z: doi: 10.1017/CBO9780511541261
- [9] RAI, V.N. a Surya N. THAKUR. Instrumentation for LIBS and recent advances. *Laser-Induced Breakdown Spectroscopy* [online]. Elsevier, 2020, 2020, s. 107-136 [cit. 2022-01-25]. ISBN 9780128188293. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-818829-3.00005-8
- [10] JOLIVET, L., M. LEPRINCE, S. MONCAYO, L. SORBIER, C.-P. LIENEMANN a V. MOTTO-ROS. Review of the recent advances and applications of LIBS-based imaging. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* [online]. 2019, **151**, 41-53 [cit. 2022-01-25]. ISSN 05848547. Dostupné z: doi:10.1016/j.sab.2018.11.008
- [11] NOVOTNÝ, Karel, Jozef KAISER, Aleš HRDLIČKA, Radomír MALINA, Tomáš VÉMOLA, David PROHAZKA, Jan NOVOTNÝ a Viktor KANICKÝ. Spektroskopie laserem buzeného plazmatu (LIBS). *Československý časopis pro fyziku*. Praha: Fyzikální ústav AV ČR, 2010, roč. 60, 4-5, s. 280-285. ISSN 0009-0700

- [12] SINGH, Vivek Kumar a Awadhesh Kumar RAI. Prospects for laser-induced breakdown spectroscopy for biomedical applications: a review. *Lasers in Medical Science* [online]. 2011, **26**(5), 673-687 [cit. 2022-01-26]. ISSN 0268-8921. Dostupné z: doi: 10.1007/s10103-011-0921-2
- [13] LAWLEY, Christopher J.M., Andrew M. SOMERS a Bruce A. KJARSGAARD. Rapid geochemical imaging of rocks and minerals with handheld laser induced breakdown spectroscopy (LIBS). *Journal of Geochemical Exploration* [online]. 2021, **222** [cit. 2022-01-27]. ISSN 03756742. Dostupné z: doi:10.1016/j.gexplo.2020.106694
- [14] SWEETAPPLE, Marcus T. a Steven TASSIOS. Laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS) as a tool for in situ mapping and textural interpretation of lithium in pegmatite minerals. *American Mineralogist* [online]. 2015, **100**(10), 2141-2151 [cit. 2022-01-27]. ISSN 0003-004X. Dostupné z: doi:10.2138/am-2015-5165
- [15] ŠINDELÁŘOVÁ, Anna, Pavel POŘÍZKA, Pavlína MODLITBOVÁ, et al. Methodology for the Implementation of Internal Standard to Laser-Induced Breakdown Spectroscopy Analysis of Soft Tissues. *Sensors* [online]. 2021, **21**(3) [cit. 2022-01-27]. ISSN 1424-8220. Dostupné z: doi:10.3390/s21030900
- [16] KISS, Kateřina, Anna ŠINDELÁŘOVÁ, Lukáš KRBAL, et al. Imaging margins of skin tumors using laser-induced breakdown spectroscopy and machine learning. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* [online]. 2021, **36**(5), 909-916 [cit. 2022-01-27]. ISSN 0267-9477. Dostupné z: doi: 10.1039/D0JA00469C
- [17] BUSSER, Benoit, Samuel MONCAYO, Jean-Luc COLL, Lucie SANCEY a Vincent MOTTO-ROS. Elemental imaging using laser-induced breakdown spectroscopy: A new and promising approach for biological and medical applications. *Coordination Chemistry Reviews* [online]. 2018, **358**, 70-79 [cit. 2022-01-27]. ISSN 00108545. Dostupné z: doi: 10.1016/j.ccr.2017.12.006
- [18] POŘÍZKA, Pavel, Karolína VYTISKOVÁ, Radka OBOŘILOVÁ, et al. Laser-induced breakdown spectroscopy as a readout method for immunocytochemistry with upconversion nanoparticles. *Microchimica Acta* [online]. 2021, **188**(5) [cit. 2022-01-27]. ISSN 0026-3672. Dostupné z: doi: 10.1007/s00604-021-04816-y
- [19] LAVICKY, Josef, Magdalena KOLOUSKOVA, David PROCHAZKA, et al. The Development of Dentin Microstructure Is Controlled by the Type of Adjacent Epithelium. *Journal of Bone and Mineral Research* [online]. [cit. 2022-01-27]. ISSN 0884-0431. Dostupné z: doi: 10.1002/jbmr.4471
- [20] DOSEDĚLOVÁ, Hana, Kateřina ŠTĚPÁNKOVÁ, Tomáš ZIKMUND, et al. Age-related changes in the tooth-bone interface area of acrodont dentition in the chameleon. *Journal of Anatomy* [online]. 2016, **229**(3), 356-368 [cit. 2022-01-27]. ISSN 00218782. Dostupné z: doi: 10.1111/joa.12490
- [21] POŘÍZKA, Pavel, et al. Multi-elemental imaging of human tooth ankylosis by laser-induced breakdown spectroscopy. *Scientific Reports*, article in peer review.
- [22] MODLITBOVÁ, Pavlína, Pavel POŘÍZKA a Jozef KAISER. Laser-induced breakdown spectroscopy as a promising tool in the elemental bioimaging of plant tissues. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2020, **122** [cit. 2022-01-27]. ISSN 01659936. Dostupné z: doi: 10.1016/j.trac.2019.115729

- [23] MODLITBOVÁ, Pavlína, Sára STRÍTEŽSKÁ, Antonín HLAVÁČEK, David PROCHAZKA, Pavel POŘÍZKA a Jozef KAISER. Laser-induced breakdown spectroscopy as a straightforward bioimaging tool for plant biologists; the case study for assessment of photon-upconversion nanoparticles in *Brassica oleracea* L. plant. *Ecotoxicology and Environmental Safety* [online]. 2021, **214** [cit. 2022-01-27]. ISSN 01476513. Dostupné z: doi: 10.1016/j.ecoenv.2021.112113
- [24] GAUDIUSO, Rosalba. Laser-induced breakdown spectroscopy in cultural heritage science. *Spectroscopy, Diffraction and Tomography in Art and Heritage Science* [online]. Elsevier, 2021, s. 209-251 [cit. 2022-01-27]. ISBN 9780128188606. Dostupné z: doi: 10.1016/B978-0-12-818860-6.00002-7
- [25] GERVAIS, Félix, Kheireddine RIFAI, Philippe PLAMONDON, Lütfü ÖZCAN, François DOUCET a François VIDAL. Compositional tomography of a gold-bearing sample by Laser-induced breakdown spectroscopy. *Terra Nova* [online]. 2019, **31**(5), 479-484 [cit. 2022-01-27]. ISSN 0954-4879. Dostupné z: doi: 10.1111/ter.12417
- [26] BECKER, J.Sabine, Andreas MATUSCH a Bei WU. Bioimaging mass spectrometry of trace elements – recent advance and applications of LA-ICP-MS: A review. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2014, **835**, 1-18 [cit. 2022-01-27]. ISSN 00032670. Dostupné z: doi: 10.1016/j.aca.2014.04.048
- [27] COLANTONIO, C., L. CLIVET, E. LAVAL, Y. COQUINOT, C. MAURY, M. MELIS a C. BOUST. Integration of multispectral imaging, XRF mapping and Raman analysis for noninvasive study of illustrated manuscripts: the case study of fifteenth century “Humay meets the Princess Humayun” Persian masterpiece from Louvre Museum. *The European Physical Journal Plus* [online]. 2021, **136**(9) [cit. 2022-01-27]. ISSN 2190-5444. Dostupné z: doi: 10.1140/epjp/s13360-021-01909-8
- [28] DE JESUS, J. Marie, Catia COSTA, Amy BURTON, et al. Correlative Imaging of Trace Elements and Intact Molecular Species in a Single-Tissue Sample at the 50 μm Scale. *Analytical Chemistry* [online]. 2021, **93**(40), 13450-13458 [cit. 2022-01-27]. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi: 10.1021/acs.analchem.1c01927
- [29] COURRÈGES, Cécile, Mélanie BONNECAZE, Delphine FLAHAUT, Sophie NOLIVOS, Régis GRIMAUD a Joachim ALLOUCHE. AES and ToF-SIMS combination for single cell chemical imaging of gold nanoparticle-labeled *Escherichia coli*. *Chemical Communications* [online]. 2021, **57**(44), 5446-5449 [cit. 2022-01-27]. ISSN 1359-7345. Dostupné z: doi: 10.1039/D1CC01211H
- [30] HAHN, David W. a Nicoló OMENETTO. Laser-Induced Breakdown Spectroscopy (LIBS), Part II: Review of Instrumental and Methodological Approaches to Material Analysis and Applications to Different Fields. *Applied Spectroscopy* [online]. 2012, **66**(4), 347-419 [cit. 2022-01-26]. ISSN 0003-7028. Dostupné z: doi: 10.1366/11-06574
- [31] MARÍN-ROLDÁN, Alicia, Shamaila MANZOOR, Jaroslav KRIŠTOF a Pavel VEIS. Enlarged spectral range in Calibration Free - Laser Induced Breakdown Spectroscopy for the qualitative and quantitative analysis of a complex bone matrix. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* [online]. 2019, **156**, 13-19 [cit. 2022-01-26]. ISSN 05848547. Dostupné z: doi:10.1016/j.sab.2019.04.005

- [32] MARTINEZ, Mauro, Courtney BAYNE, Dylan AIELLO, Matthew JULIAN, Romain GAUME a Matthieu BAUDELET. Multi-elemental matrix-matched calcium hydroxyapatite reference materials for laser ablation: Evaluation on teeth by laser-induced breakdown spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* [online]. 2019, **159** [cit. 2022-01-26]. ISSN 05848547. Dostupné z: doi:10.1016/j.sab.2019.105650
- [33] ROWE, Harry, Niki HUGHES a Krystin ROBINSON. The quantification and application of handheld energy-dispersive x-ray fluorescence (ED-XRF) in mudrock chemostratigraphy and geochemistry. *Chemical Geology* [online]. **324-325**, 122-131 [cit. 2022-01-28]. ISSN 00092541. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemgeo.2011.12.023
- [34] SHACKLEY, M. Steven. An Introduction to X-Ray Fluorescence (XRF) Analysis in Archaeology. SHACKLEY, M. Steven, ed. *X-Ray Fluorescence Spectrometry (XRF) in Geoarchaeology* [online]. New York, NY: Springer New York, 2011-9-21, s. 7-44 [cit. 2022-01-28]. ISBN 978-1-4419-6885-2. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4419-6886-9_2
- [35] ROTHWELL, R. Guy a Ian W. CROUDACE. Micro-XRF Studies of Sediment Cores: A Perspective on Capability and Application in the Environmental Sciences. CROUDACE, Ian W. a R. Guy ROTHWELL, ed. *Micro-XRF Studies of Sediment Cores* [online]. Dordrecht: Springer Netherlands, 2015-7-22, s. 1-21 [cit. 2022-01-28]. Developments in Paleoenvironmental Research. ISBN 978-94-017-9848-8. Dostupné z: doi:10.1007/978-94-017-9849-5_1
- [36] ANDO, Hidenori, Amr S. ABU LILA, Masao TANAKA, et al. Intratumoral Visualization of Oxaliplatin within a Liposomal Formulation Using X-ray Fluorescence Spectrometry. *Molecular Pharmaceutics* [online]. **15**(2), 403-409 [cit. 2022-01-28]. ISSN 1543-8384. Dostupné z: doi:10.1021/acs.molpharmaceut.7b00762
- [37] BROOKS, Leslie a Gabrielle GAUSTAD. Positive Material Identification (PMI) Capabilities in the Metals Secondary Industry: An Analysis of XRF and LIBS Handheld Analyzers. CHESONIS, Corleen, ed. *Light Metals 2019* [online]. Cham: Springer International Publishing, 2019-02-16, s. 1375-1380 [cit. 2022-01-28]. The Minerals, Metals & Materials Series. ISBN 978-3-030-05863-0. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-030-05864-7_170
- [38] TURNER, Andrew a Montserrat FILELLA. Field-portable-XRF reveals the ubiquity of antimony in plastic consumer products. *Science of The Total Environment* [online]. **584-585**, 982-989 [cit. 2022-01-28]. ISSN 00489697. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2017.01.149
- [39] SALVADOR, Marcos J., Guido N. LOPES, Virgílio F. NASCIMENTO FILHO a Orghêda L. A. D. ZUCCHI. Quality control of commercial tea by x-ray fluorescence. *X-Ray Spectrometry* [online]. **31**(2), 141-144 [cit. 2022-01-28]. ISSN 0049-8246. Dostupné z: doi:10.1002/xrs.546
- [40] BROUWER, Peter. *Theory of XRF* [online]. 3. Almelo, Netherlands: PANalytical B.V. [cit. 2022-01-28]. ISBN 90-9016758-7. Dostupné z: <https://home.iiserb.ac.in/~ramyasr/files/Manuals/XRF.pdf>

- [41] ZHANG, Run, Li LI, Yasmina SULTANBAWA a Zhi Ping XU. X-ray fluorescence imaging of metals and metalloids in biological systems. *American Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* [online]. **8**(3), 169-188 [cit. 2022-01-28]. PMID: 30042869; PMCID: PMC6056246
- [42] KHAN, Sharib Raza, Babita SHARMA, Pooja A. CHAWLA a Rohit BHATIA. Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry (ICP-OES): a Powerful Analytical Technique for Elemental Analysis. *Food Analytical Methods* [online]. 2022, **15**(3), 666-688 [cit. 2022-05-08]. ISSN 1936-9751. Dostupné z: doi:10.1007/s12161-021-02148-4
- [43] FARAHANI, Shima, Navid ESHGHI, Abolfazl ABBASI, Fereshteh KARIMI, Ebadallah SHIRI MALEKABAD a Mohammad REZAEI. Determination of heavy metals in albumen of hen eggs from the Markazi Province (Iran) using ICP-OES technique. *Toxin Reviews* [online]. 2015, **34**(2), 96-100 [cit. 2022-05-08]. ISSN 1556-9543. Dostupné z: doi:10.3109/15569543.2015.1040166
- [44] WELNA, Maja, Jolanta BORKOWSKA-BURNECKA a Malgorzata POPKO. Ultrasound- and microwave-assisted extractions followed by hydride generation inductively coupled plasma optical emission spectrometry for lead determination in geological samples. *Talanta* [online]. 2015, **144**, 953-959 [cit. 2022-05-08]. ISSN 00399140. Dostupné z: doi:10.1016/j.talanta.2015.07.058
- [45] MODLITBOVÁ, Pavlína, Antonín HLAVÁČEK, Tereza ŠVESTKOVÁ, Pavel POŘÍZKA, Lucie ŠIMONÍKOVÁ, Karel NOVOTNÝ a Jozef KAISER. The effects of photon-upconversion nanoparticles on the growth of radish and duckweed: Bioaccumulation, imaging, and spectroscopic studies. *Chemosphere* [online]. 2019, **225**, 723-734 [cit. 2022-05-08]. ISSN 00456535. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2019.03.074
- [46] VANINI, Gabriela, Caline A. DESTEFANI, Bianca B. MERLO, Maria Tereza W.D. CARNEIRO, Paulo R. FILGUEIRAS, Ronei J. POPPI a Wanderson ROMÃO. Forensic ballistics by inductively coupled plasma-optical emission spectroscopy: Quantification of gunshot residues and prediction of the number of shots using different firearms. *Microchemical Journal* [online]. 2015, **118**, 19-25 [cit. 2022-05-08]. ISSN 0026265X. Dostupné z: doi:10.1016/j.microc.2014.07.016
- [47] MEYERS, Robert A., ed. *Encyclopedia of Analytical Chemistry* [online]. 1. USA: Wiley, 2006 [cit. 2022-05-08]. ISBN 9780471976707. Dostupné z: doi:10.1002/9780470027318
- [48] NORDIN, B. E. C., ed. *Calcium in Human Biology* [online]. London: Springer London, 1988 [cit. 2022-02-01]. ILSI Human Nutrition Reviews. ISBN 978-1-4471-1439-0. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4471-1437-6
- [49] PEI, Fang, Jialing LIU, Lan ZHANG, et al. The functions of mechanosensitive ion channels in tooth and bone tissues. *Cellular Signalling* [online]. 2021, **78** [cit. 2022-02-01]. ISSN 08986568. Dostupné z: doi:10.1016/j.cellsig.2020.109877
- [50] SINGH, Vivek K., Vinay KUMAR a Jitendra SHARMA. Importance of laser-induced breakdown spectroscopy for hard tissues (bone, teeth) and other calcified tissue materials. *Lasers in Medical Science* [online]. 2015, **30**(6), 1763-1778 [cit. 2022-02-03]. ISSN 0268-8921. Dostupné z: doi:10.1007/s10103-014-1549-9

- [51] MORRIS, Alyssa L. a Prasanna TADI. *Anatomy, Head and Neck, Teeth* [online]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2022 [cit. 2022-02-01]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557543/>
- [52] FEHRENBACH, Margaret a Tracy POPOWICS. *Illustrated Dental Embryology, Histology, and Anatomy* [online]. 4. Missouri, USA: Elsevier Saunders, 2015 [cit. 2022-02-01]. ISBN 978-1-4557-7685-6
- [53] NEDOROST, Lukáš, Věra TOMANOVÁ, Lada EBERLOVÁ, et al. *Atlas histologie tvrdých tkání: Příručka pro studenty*. Plzeň: Lékařská fakulta v Plzni, Univerzita Karlova v Praze, 2009. ISSN 1804-4409. Dostupné z: http://histologie.lfp.cuni.cz/wp-content/files/atlas_zub_kost_lowres.pdf
- [54] CLARKE, Bart. Normal Bone Anatomy and Physiology. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* [online]. 2008, **3**(Supplement 3), S131-S139 [cit. 2022-02-01]. ISSN 1555-9041. Dostupné z: doi:10.2215/CJN.04151206
- [55] DRAKE, Richard L., A. Wayne VOGL a Adam W. M. MITCHELL. *Gray's anatomy for students* [online]. 4. Philadelphia, USA: Elsevier, 2019 [cit. 2022-02-01]. ISBN 978-0-323-39304-1
- [56] BARTL, Reiner a Christoph BARTL. *Bone Disorders* [online]. Cham: Springer International Publishing, 2017 [cit. 2022-02-01]. ISBN 978-3-319-29180-2. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-319-29182-6
- [57] Gross and Microscopic Bone Structure. *Quizlet* [online]. Quizlet Inc., 2022 [cit. 2022-02-01]. Dostupné z: <https://quizlet.com/415276051/gross-and-microscopic-bone-structure-diagram/>
- [58] *Biom mineralization and Biomaterials* [online]. Elsevier, 2016 [cit. 2022-02-01]. ISBN 9781782423386. Dostupné z: doi:10.1016/C2014-0-02825-0
- [59] SAMEK, O, D.C.S BEDDOWS, H.H TELLE, J KAISER, M LIŠKA, J.O CÁCERES a A GONZÁLES UREÑA. Quantitative laser-induced breakdown spectroscopy analysis of calcified tissue samples. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* [online]. 2001, **56**(6), 865-875 [cit. 2022-02-03]. ISSN 05848547. Dostupné z: doi:10.1016/S0584-8547(01)00198-7
- [60] Inside a rodent. *DK findout!* [online]. Londýn, VB: Dorling Kindersley Limited, 2022 [cit. 2022-02-01]. Dostupné z: <https://www.dkfindout.com/uk/animals-and-nature/rodents/inside-rodent/>
- [61] MARATOVÁ, Klára. Biologie myši domácí (Mus musculus). *Histologický atlas řezů orgány myši domácí* [online]. Pedagogická fakulta, Univerzita Karlova v Praze, 2013 [cit. 2022-02-01]. Dostupné z: <https://biologie.pedf.cuni.cz/maratova/biologie-mysi-domaci.html>
- [62] PIALEK, Jaroslav, MACHOLAN, Milos, Stuart J. E. BAIRD a Pavel MUNCLINGER, ed. *Evolution of the House Mouse* [online]. Cambridge: Cambridge University Press, 2012 [cit. 2022-02-01]. ISBN 9781139044547. Dostupné z: doi:10.1017/CBO9781139044547
- [63] ROUGE, Melissa. Dental Anatomy of Rodents. *VIVO Pathophysiology* [online]. Colorado State University, USA [cit. 2022-02-01]. Dostupné z: <http://www.vivo.colostate.edu/hbooks/pathphys/digestion/pregastric/rodentpage.html>

- [64] FORSHAW, R. Dental indicators of ancient dietary patterns: dental analysis in archaeology. *British Dental Journal* [online]. 2014, **216**(9), 529-535 [cit. 2022-02-02]. ISSN 0007-0610. Dostupné z: doi:10.1038/sj.bdj.2014.353
- [65] TOMASINI, Eugenia P., Cristian M. FAVIER DUBOIS, Nicole C. LITTLE, Silvia A. CENTENO a Marta S. MAIER. Identification of pyroxene minerals used as black pigments in painted human bones excavated in Northern Patagonia by Raman spectroscopy and XRD. *Microchemical Journal* [online]. 2015, **121**, 157-162 [cit. 2022-02-02]. ISSN 0026265X. Dostupné z: doi:10.1016/j.microc.2015.03.003
- [66] PINCHI, Vilma, Francesco PRADELLA, Jacopo BUTI, Claudio BALDINOTTI, Martina FOCARDI a Gian-Aristide NORELLI. A new age estimation procedure based on the 3D CBCT study of the pulp cavity and hard tissues of the teeth for forensic purposes: A pilot study. *Journal of Forensic and Legal Medicine* [online]. 2015, **36**, 150-157 [cit. 2022-02-02]. ISSN 1752928X. Dostupné z: doi:10.1016/j.jflm.2015.09.015
- [67] NAUTA, Sylvia P., Martijn POEZE, Ron M.A. HEEREN a Tiffany PORTA SIEGEL. Clinical use of mass spectrometry (imaging) for hard tissue analysis in abnormal fracture healing. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)* [online]. 2020, **58**(6), 897-913 [cit. 2022-02-02]. ISSN 1437-4331. Dostupné z: doi:10.1515/cclm-2019-0857
- [68] LUNDY, John K. Forensic Anthropology: What Bones Can Tell Us. *Laboratory Medicine* [online]. 1998, **29**(7), 423-427 [cit. 2022-02-03]. ISSN 0007-5027. Dostupné z: doi:10.1093/labmed/29.7.423
- [69] WALDEN, Steven J., Jacqui MULVILLE, Jeffrey P. ROWLANDS a Sam L. EVANS. An Analysis of Systematic Elemental Changes in Decomposing Bone. *Journal of Forensic Sciences* [online]. 2018, **63**(1), 207-213 [cit. 2022-02-03]. ISSN 00221198. Dostupné z: doi:10.1111/1556-4029.13480
- [70] TANAKA, Yu-ki, Nobuyuki YAJIMA, Masahiro OKADA, Takuya MATSUMOTO, Yusuke HIGUCHI, Shigeaki MIYAZAKI, Hideyuki YAMATO a Takafumi HIRATA. The effect of Mg and Sr on the crystallinity of bones evaluated through Raman spectroscopy and laser ablation-ICPMS analysis. *The Analyst* [online]. 2017, **142**(22), 4265-4278 [cit. 2022-02-03]. ISSN 0003-2654. Dostupné z: doi:10.1039/C7AN00734E
- [71] BUDDHACHAT, Kittisak, Sarisa KLINHOM, Puntita SIENGDEE, et al. Elemental Analysis of Bone, Teeth, Horn and Antler in Different Animal Species Using Non-Invasive Handheld X-Ray Fluorescence. *PLOS ONE* [online]. 2016, **11**(5) [cit. 2022-02-03]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0155458
- [72] MARTIN, Ronald R., Steven J NAFTTEL, Andrew J NELSON a William D. Sapp III. Comparison of the distributions of bromine, lead, and zinc in tooth and bone from an ancient Peruvian burial site by X-ray fluorescence. *Canadian Journal of Chemistry* [online]. 2007, **85**(10), 831-836 [cit. 2022-02-03]. ISSN 0008-4042. Dostupné z: doi:10.1139/v07-100
- [73] GAZMEH, Meisam, Maryam BAHREINI, Seyed Hassan TAVASSOLI a Mohammad ASNAASHARI. Qualitative Analysis of Teeth and Evaluation of Amalgam Elements Penetration into Dental Matrix Using Laser Induced Breakdown Spectroscopy. *Journal of Lasers in Medical Sciences* [online]. 2015, **6**(2), 67-73 [cit. 2022-02-03]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4431966/>

- [74] BELLO, Liciane Toledo, Patricia Aparecida DA ANA, Dário SANTOS, Francisco José KRUG, Denise Maria ZECELL, Nilson Dias VIEIRA a Ricardo Elgul SAMAD. Mercury Amalgam Diffusion in Human Teeth Probed Using Femtosecond LIBS. *Applied Spectroscopy* [online]. 2017, **71**(4), 659-669 [cit. 2022-02-03]. ISSN 0003-7028. Dostupné z: doi:10.1177/0003702816687572
- [75] TCHOUNWOU, Paul B., Clement G. YEDJOU, Anita K. PATLOLLA a Dwayne J. SUTTON. Heavy Metal Toxicity and the Environment. LUCH, Andreas, ed. *Molecular, Clinical and Environmental Toxicology* [online]. 101. Basel: Springer Basel, 2012, 2012-4-24, s. 133-164 [cit. 2022-02-03]. Experientia Supplementum. ISBN 978-3-7643-8339-8. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-7643-8340-4_6
- [76] RAHMAN, Zeeshanur a Ved Pal SINGH. The relative impact of toxic heavy metals (THMs) (arsenic (As), cadmium (Cd), chromium (Cr)(VI), mercury (Hg), and lead (Pb)) on the total environment: an overview. *Environmental Monitoring and Assessment* [online]. 2019, **191**(7) [cit. 2022-02-03]. ISSN 0167-6369. Dostupné z: doi:10.1007/s10661-019-7528-7
- [77] WYCHOWANSKI, Piotr a Konrad MALKIEWICZ. Evaluation of Metal Ion Concentration in Hard Tissues of Teeth in Residents of Central Poland. *BioMed Research International* [online]. 2017, **2017**, 1-7 [cit. 2022-02-03]. ISSN 2314-6133. Dostupné z: doi:10.1155/2017/6419709
- [78] MARTIN, Sabine a Wendy GRISWOLD. Human Health Effects of Heavy Metals. *Environmental Science and Technology Briefs for Citizens* [online]. 2009, **15**, 1-6 [cit. 2022-02-04]. Dostupné z: <https://engg.k-state.edu/chsr/files/chsr/outreach-resources/15HumanHealthEffectsofHeavyMetals.pdf>
- [79] SHARMA, Spriha, Gurleen KAUR a Charanjeet KAUR. Trend in the analysis of heavy metals in human teeth dentine: a review. *Journal of Indo-Pacific Academy of Forensic Odontology* [online]. 2020, **9**(2), 93-112 [cit. 2022-02-04]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/347975986_Trend_in_the_analysis_of_heavy_metals_in_human_teeth_dentine_a_review
- [80] SHAHEDI, Abdolhamed, Esmail ESLAMI a Mohammad Reza NOURANI. Influence of Lead on the Interpretation of Bone Samples with Laser-Induced Breakdown Spectroscopy. *Journal of Spectroscopy* [online]. 2016, **2016**, 1-6 [cit. 2022-04-02]. ISSN 2314-4920. Dostupné z: doi:10.1155/2016/8205479
- [81] SAMEK, O., D.C.S. BEDDOWS, H.H. TELLE, G.W. MORRIS, M. LISKA a J. KAISER. Quantitative analysis of trace metal accumulation in teeth using laser-induced breakdown spectroscopy. *Applied Physics A Materials Science & Processing* [online]. 1999, **69**(S1), S179-S182 [cit. 2022-04-02]. ISSN 0947-8396. Dostupné z: doi:10.1007/s003399900277
- [82] TOFANELLI, Mirko, Lorenzo PARDINI, Matteo BORRINI, et al. Spectroscopic analysis of bones for forensic studies. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* [online]. 2014, **99**, 70-75 [cit. 2022-04-02]. ISSN 05848547. Dostupné z: doi:10.1016/j.sab.2014.06.006

- [83] GALIOVÁ, Michaela, Jozef KAISER, Francisco J. FORTES, et al. Multielemental analysis of prehistoric animal teeth by laser-induced breakdown spectroscopy and laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. *Applied Optics* [online]. 2010, **49**(13) [cit. 2022-04-02]. ISSN 0003-6935. Dostupné z: doi:10.1364/AO.49.00C191
- [84] DUMKOVÁ, Jana, Tereza SMUTNÁ, Lucie VRLÍKOVÁ, et al. Variability in the Clearance of Lead Oxide Nanoparticles Is Associated with Alteration of Specific Membrane Transporters. *ACS Nano* [online]. 2020, **14**(3), 3096-3120 [cit. 2022-04-03]. ISSN 1936-0851. Dostupné z: doi:10.1021/acsnano.9b08143
- [85] KRAMIDA, A., YU. RALCHENKO, J. READER, and NIST ASD Team. NIST Atomic Spectra Database. version 5.6.1 [online]. 2018. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.18434/T4W30F
- [86] MASSARD, D. L., B. G. M. VANDEGINSTE, L.M.C. BUYDENS, S. DE JONG, P.J. LEWI a J. SMEYERS-VERBEKE. *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A*. 20A. Nizozemsko: Elsevier Science B.V., 1997. ISBN 978-0-444-89724-4

8 SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ

8.1 Seznam použitých zkratk

AAS	atomová absorpční spektroskopie
AES	Augerova elektronová spektroskopie
BEC	koncentrace odpovídající signálu pozadí
CCD	charge-coupled device
CdO NPs	nanočástice oxidu kademnatého
CF-LIBS	bezkalibrační LIBS
CzT	Czerny-Turner
DP LIBS	dvojpulzní LIBS
EDXRF	XRF s energetickou disperzí
GD	doba zpoždění
GW	integrační doba
HA	hydroxyapatit
IARC	Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny
ICCD	intensified CCD
ICP	indukčně vázané plazma
ICP-MS	hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem
ICP-OES	optická emisní spektroskopie s indukčně vázaným plazmatem
ICR	Institute of Cancer Research
IR	infračervené záření
LA-ICP-MS	hmotnostní spektroskopie s indukčně vázaným plazmatem a laserovou ablací
LIBS	spektroskopie laserem buzeného plazmatu
LOD	limit detekce
LOQ	limit kvantifikace

Nd:YAG	yttrium aluminium granát dopovaný ionty neodymu
NPs	nanočástice
PbO NPs	nanočástice oxidu olovnatého
PD	fotodioda
PDA	fotodiodové pole
PIXE	z angl. Particle-Induced X-ray Emission
PMT	fotonásobič
RSD	relativní směrodatná odchylka pozadí
RTG	rentgenové záření
SBR	poměr signál/pozadí
SIMS	hmotnostní spektrometrie sekundárních iontů
SNR	poměr signál/šum
US EPA	Agentura pro ochranu životního prostředí USA
UV-VIS	ultrafialové a viditelné záření
WDXRF	XRF s disperzí vlnové délky
XRF	rentgenová fluorescence

8.2 Seznam použitých symbolů

b	směrnice kalibrační křivky
c_L	detekční limit
k	konstanta
s_B	směrodatná odchylka pozadí nebo blanku
\bar{X}_B	průměrná hodnota intenzity pozadí
\bar{X}_S	průměrná hodnota intenzity signálu
x_{1-n}	veličiny používané při výpočtu
Δx_{1-n}	odchyly veličin používaných při výpočtu
Δy	zjišťovaná odchylka veličiny y