

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Stanovení Pb v kostech metodou HR-CS-ETAAS za využití přímého dávkování  
suspenzí

Bc. Lucie Ibrahimová

Diplomová práce

2018

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

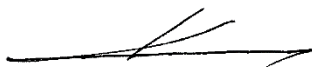
Jméno a příjmení: **Bc. Lucie Ibrahimová**  
Osobní číslo: **C16625**  
Studijní program: **N1407 Chemie**  
Studijní obor: **Analytická chemie**  
Název tématu: **Stanovení Pb v kostech metodou HR-CS-ETAAS za využití  
přímého dávkování suspenzí**  
Zadávající katedra: **Katedra analytické chemie**

### Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Zpracujte literární rešerši zaměřenou na problematiku prvkové analýzy kostí a zubů metodami atomové spektrometrie se zaměřením na metodu atomové absorpční spektrometrie s elektrotermickou atomizací (ETAAS). Pozornost věnujte projevům interference matrice při analýze s ETAAS a možnostem jejího odstranění. Dále se zaměřte na jednotlivé postupy zpracování a přípravy vzorku k analýze.
2. Navrhněte ekologicky a ekonomicky šetrný postup přípravy vzorku k analýze a proveďte jeho optimalizaci.
3. S využitím časově a ekonomicky efektivních nástrojů frakcionálního faktorového plánování proveďte optimalizaci podmínek měření s cílem maximálního potlačení vlivu matrice a dosažení správného a přesného stanovení analytu při zachování nejlepších analytických charakteristik.
4. Správnost a přesnost navrženého postupu stanovení na atomovém absorpčním spektrometru s elektrotermickou atomizací s kontinuálním zdrojem záření a vysokým rozlišením (HR-CS-ET-AAS) ověřte na základě analýzy vhodného referenčního materiálu.
5. Kriticky zhodnoťte dosažené výsledky.

Rozsah grafických prací:  
Rozsah pracovní zprávy:  
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**  
Seznam odborné literatury:  
**Podle pokynů vedoucí práce.**

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Lenka Husáková, Ph.D.**  
Katedra analytické chemie  
Konzultant diplomové práce: **Ing. Tereza Šídová**  
Katedra analytické chemie  
Datum zadání diplomové práce: **20. února 2018**  
Termín odevzdání diplomové práce: **11. května 2018**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.  
děkan

L.S.



prof. Ing. Karel Ventura, CSc.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2018

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 11.05.2018

Lucie Ibrahimová

Poděkování:

Mnohokrát děkuji Ing. Lence Husákové, Ph.D. a Ing. Tereze Šídové, Ph.D. za cenné rady, vedení, trpělivost a přístup.

Děkuji své rodině a mým nejbližším za podporu během studia.

## **ANOTACE**

Předložená diplomová práce je zaměřena na problematiku stanovení olova v kostech pomocí HR-CS-ETAAS za využití přímého dávkování suspenzí. Pro stanovení olova v kostech byl optimalizován postup přípravy suspenze a podmínky měření. Pro tento účel bylo využito frakcionovaného faktorového plánování. Pro korekci matrice bylo použito matematické korekce. Správnost metody byla ověřena analýzou standardního referenčního materiálu.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

olovo, analýza kostí, přímé dávkování suspenzí, korekce pozadí, interference matrice, HR-CS-ETAAS

## **TITLE**

Determination of Pb in bones by HR-CS-ETAAS using slurry sampling

## **ANNOTATION**

The presented diploma thesis is focused on determination of bone lead by HR-CS-ETAAS with direct slurry sampling. Conditions for slurry sample preparing and for analysis were optimized. Fractional factorial plan was used for this purpose. Mathematical corrections were applied to correct the structured background. The accuracy of the method was checked by analysis of standard reference material.

## **KEYWORDS**

lead, bones analysis, direct slurry sampling, background correction, matrix interferences, HR-CS-ETAAS

# OBSAH

1 ÚVOD.....	10
2 TEORETICKÁ ČÁST .....	11
2.1 Olovo.....	11
2.1.1 Toxické účinky .....	11
2.1.2 Absorpce olova .....	12
2.2 Možné způsoby stanovení Pb v kostech.....	14
2.2.1 XRF .....	14
2.2.2 ICP-MS a LA-ICP-MS .....	14
2.2.3 ETAAS .....	16
2.3 Interference v ETAAS.....	18
2.3.1 Nespektrální interference.....	18
2.3.2 Spektrální interference.....	18
2.3.3 Korekce pozadí .....	19
2.3.4 Chemické modifikátory .....	20
2.3.5 Identifikace a eliminace nespektrálních interferencí .....	21
2.4 Příprava vzorků k analýze .....	22
2.4.1 Vyjmutí kostních vzorků .....	22
2.4.2 Odstranění ulpívající tkáně .....	22
2.4.3 Sušení .....	23
2.4.4 Drcení a mletí vzorků .....	23
2.4.5 Rozklady.....	25
2.5 Analýza suspenzí.....	31
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	34
3.1 Vzorky kostí .....	34
3.2 Úprava vzorků k analýze.....	35
3.2.1 Čistění a lyofilizace .....	35
3.2.2 Mletí .....	37
3.2.3 Přesívání .....	37
3.3 Použité chemikálie .....	38
3.4 Příprava roztoků .....	38
3.4.1 Příprava roztoku 2 M HNO <sub>3</sub> .....	38

3.4.2 Příprava zásobních roztoků $Pb^{2+}$ .....	38
3.4.3 Příprava roztoku kyseliny citronové.....	39
3.4.4 Příprava zásobních roztoků glycerolu .....	39
3.4.5 Příprava roztoku Tritonu X-100 .....	39
3.4.6 Příprava roztoku hydroxyapatitu .....	39
3.5 Příprava vzorků .....	40
3.5.1 Příprava suspenze SRM pro optimalizaci stanovení Pb .....	40
3.5.2 Příprava suspenzí reálných vzorků.....	40
3.5.3 Mikrovlnná mineralizace.....	40
3.6 Instrumentace .....	41
3.6.1 Lyofilizátor .....	41
3.6.2 Vibrační kulový mlýn.....	41
3.6.3 Rentgenový difraktometr.....	42
3.6.4 Zařízení pro měření velikosti částic Mastersizer 2000MU .....	42
3.6.5 SEM VEGA3 SBU .....	42
3.6.6 Zařízení pro mikrovlnný rozklad MWS Xpert .....	43
3.6.7 TOF-ICP-MS GBC OptiMass 9500 .....	43
3.6.8 HR-CS-ETAAS 600 contrAA .....	45
3.6.9 Další používané přístroje, pomůcky a softwary .....	45
4 VÝSLEDKY A DISKUZE .....	46
4.1 Optimalizace přípravy suspenze .....	46
4.2 Aplikace matematické korekce pro eliminaci spektrálních interferencí .....	53
4.3 Optimalizace přímé analýzy suspenzí pro stanovení Pb v kostech za využití frakcionovaného faktorového plánování.....	56
4.4 Ověření preciznosti stanovení .....	62
4.4.1 Kalibrace.....	62
ZÁVĚR .....	67
POUŽITÁ LITERATURA .....	69



## SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

<b>AAS</b>	atomová absorpční spektrometrie
<b>AAS-HGA</b>	atomová absorpční spektrometrie s generováním hydridů
<b>APDC</b>	amonná sůl pyrrolidin-1-yl-dithiokarbamátu
<b>BFT</b>	technika křehkého lomu
<b>CA</b>	kyselina citronová
<b>EDX</b>	energieově disperzní spektrometrie
<b>ETAAS</b>	atomová absorpční spektrometrie s elektrotermickou atomizací
<b>ETV-ICP-MS</b>	hmotnostní spektrometrie s ionizací v indukčně vázaném plazmatu a s elektrotermickou vaporizací
<b>FAAS</b>	plamenová atomová absorpční spektrometrie
<b>FFP</b>	frakcionovaný faktorový plán
<b>HR-CS-ETAAS</b>	atomová absorpční spektrometrie s elektrotermickou atomizací, s kontinuálním zdrojem záření a vysokým rozlišením
<b>ICP-AES</b>	atomová emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem
<b>ICP-MS</b>	hmotnostní spektrometrie s ionizací v indukčně vázaném plazmatu
<b>LA-ICP-MS</b>	hmotnostní spektrometrie s ionizací v indukčně vázaném plazmatu a laserovou ablací
<b>LIBS</b>	spektroskopie laserem indukovaného mikroplazmatu
<b>m/m</b>	hmotnostní procenta
<b>MIBK</b>	metylisobutylketon
<b>NAA</b>	neutronová aktivační analýza
<b>PIXE</b>	protonová mikrosonda
<b>SEM</b>	skenovací elektronový mikroskop
<b>SRM</b>	standardní referenční materiál
<b>TA</b>	teplota atomizace
<b>TP</b>	teplota pyrolýzy
<b>XRF</b>	rentgenový fluorescenční spektrometr

# 1 ÚVOD

Analýza kostí nepatří v praxi mezi rutinní záležitosti, ale na poli vědy je to poměrně běžná záležitost. Zvláště pak v oblasti medicíny, archeologie a forenzní antropologie slouží k určení např. živočišného druhu, zdravotního stavu, sociálních vazeb, migrace lidí a zvířat atd.[1, 2]. Nejčastější metodou přípravy kosti k analýze je mikrovlnná mineralizace, která má oproti klasickým postupům samozřejmě hodně kladů, ale v některých ohledech je její nevýhodou časová a finanční náročnost a potřeba chemicky čistých reagensů, což není ani ekologické, ani ekonomické. Levnou a šetrnou alternativou je přímá analýza suspenze, kde je potřeba pouze naprosté minimum reagensů. A navíc se zde eliminuje krok rozkladu, takže je i časově úspornější. Problém ovšem vyvstává při samotné analýze.

Při analýze vzorků dochází v ETA k termickému rozkladu hydroxyapatitu a vzniku PO molekul, které jsou odpovědné za vznik tzv. strukturovaných pozadí a které tak komplikují jakoukoli snahu o stopovou či ultrastopovou analýzu. Korekce takto vzniklého pozadí deuteriovou nebo Zeemanovou korekcí pozadí buď není v takovýchto případech dostatečná, nebo je velmi komplikovaná [3, 4]. Elegantním řešením může být použití HR-CS-ETAAS instrumentace, která díky revoluční technologii umožňující rozlišení 2 pm nabízí rovněž zcela unikátní možnost aplikace matematických principů pro korekci komplikovaných spekter pozadí.

Cílem této práce byla snaha vyvinout časově nenáročnou a ekologicky i ekonomicky šetrnou metodu pro stanovení olova v kostech pomocí speciální HR-CS-ETAAS instrumentace a matematické korekce, což by značně zjednodušilo stanovení pro potřeby rutinní praxe.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Olovo

Olovo je těžký kov se silně toxickými účinky. Jeho sloučeniny jsou běžně obsaženy v půdě, vodě a ve vzduchu. V minulosti způsobilo největší kontaminaci přírody používání olovnatých benzínů do spalovacích motorů, používání olověných trubek pro rozvod vody a odpadní vody z velkých průmyslových objektů, jako např. ocelárny, spalovny a slévárny. Sloučeniny olova se respiračním a gastrointestinálním traktem dostávají do organismů a akumulují se ve tkáních. Zvýšená hladina olova v krvi pak způsobuje otravu [5, 6].

Značným problémem je v současné době používání olověných broků v myslivectví a lovu a dále rybolov pomocí tzv. olůvek (malých olověných závaží). Na následky otravy olovem podle odhadů uhynie v Evropě až jeden milion ptáků, nejčastěji po požití olověných broků nebo olůvek a dále z kontaminované potravy nebo vody. Novodobě je kontaminace životního prostředí způsobena právě olověnými broky. Nejvíce ohroženi jsou tak vodní ptáci a poté dravci a mrchožrouti stojící na vrcholu potravního řetězce, jako jsou orel skalní, orel mořský, moták pochop atd. Evropská ornitologové proto požadují úplný zákaz používání olověných broků. V ČR platí zákaz lovu vodních ptáků olověnými broky na mokřadech od roku 2011 [7, 8].

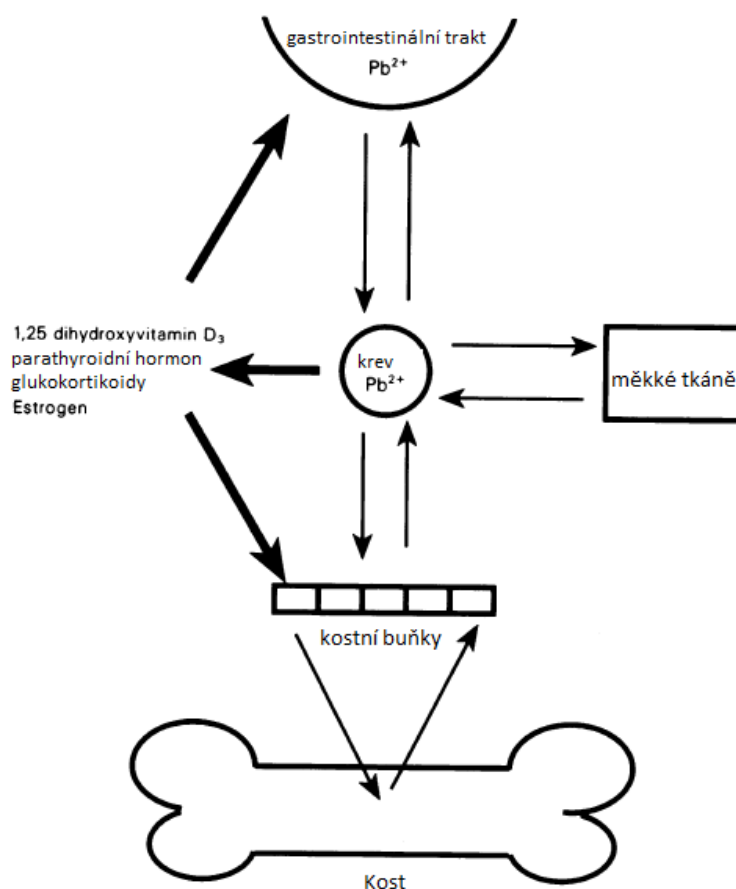
#### 2.1.1 Toxické účinky

Otrava olovem může být akutní, nebo chronická. V dnešním moderním světě se akutní otrava olovem už téměř nevyskytuje. Léčba spočívá v odstranění zdroje intoxikace a zahájení chelatační terapie – podaný lék na sebe v krvi naváže atom olova a následně je vyloučen ledvinami a močí ven z těla. Chronická otrava olovem spočívá v dlouhodobé expozici malých dávek olova na organismus [5, 6, 9]. Vystavení toxickým účinkům olova souvisí se zvýšeným výskytem všech typů rakovin, zejména s rakovinou žaludku, plic a močového měchýře [10, 11]. V dnešní době jsou nejvíce ohroženi pracovníci továren, kde se zpracovává nebo pracuje s olovem. Pro hodnocení expozice zaměstnance olovem je rozhodujícím ukazatelem biologický expoziční test pro stanovení koncentrace olova v krvi (plumbémie). Limitní hodnota plumbémie je  $400 \mu\text{g L}^{-1}$  krve [12]. Poruchu krvetvorby a poruchy centrální nervové soustavy lze ale očekávat již při obsahu olova nad  $200 \mu\text{g L}^{-1}$  krve u dospělých lidí, u dětí už při hodnotách nižších než  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  krve [13].

## 2.1.2 Absorpce olova

Intoxikace olovem nastává nejčastěji skrze respirační a gastrointestinální trakt, méně pak skrz kůži. Respiračním traktem se absorbuje přibližně 30–40 % vdechovaného olova, a to přímo do krevního řečiště. Absorpce trávicím traktem závisí na věku a zdravotním stavu. Největší absorpce je v dětství – děti mohou absorbovat až 50 % olova obsaženého v potravinách, vodě nebo v kontaminovaném prachu, zatímco dospělí absorbují touto cestou pouze 10–15 %. Anorganické olovo se absorbuje skrz kůži pouze minimálně, ale tetraethyl nebo tetramethyl olovo (součást olověného benzínu) se absorbuje skrz kůži výborně. Absorbované olovo se z 99 % naváže na erythrocyty, a to po dobu přibližně 30–35 dní. Pouze 1 % absorbovaného olova je volně obsaženo v plasmě a séru [11].

Krevním oběhem je pak olovo během následujících 4-6 týdnů rozneseno do všech tkání (**obr. 1**). Přibližně 80–95 % zadrženého olova je u dospělých uloženo v kostech, zatímco u dětí je to kolem 70 %. Olovo je v kostech uloženo po desetiletí, poločas rozpadu je odhadnut na 20–30 let [11].



**Obr. 1** Schématické znázornění distribuce olova [14]

Olovo se ve formě  $Pb^{2+}$  kationtovými výměnnými procesy snadno vyměňuje s  $Ca^{2+}$  v krystalu hydroxyapatitu, a to v přírodním i syntetickém [14]. Krystal hydroxyapatitu má vzorec  $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$  [15]. Z tohoto důvodu se kostra považuje za jakousi zásobárnu olova, ze které se olovo průběžně uvolňuje fyziologickými a patologickými procesy. Mezi nejvýznamnější procesy patří těhotenství, laktace a osteoporóza. Uvolněné olovo pak může působit na jiné buňky a tkáně toxicky a způsobovat tak jejich poškození a smrt [14].

Měření na vzorcích měkkých tkání, kostí, vlasů a nehtů vedlo k několika důležitým poznatkům, a to: koncentrace olova ve tkáních se se vrůstajícím věkem zvyšuje a závisí na pohlaví (u dospělých mužů byly koncentrace až o třetinu vyšší než u dospělých žen). Kostí obsahují několikanásobně více olova nežli měkké tkáně. Navíc ale záleží na typu kosti – dlouhé kosti obsahují i dva a půl krát více olova nežli ploché kosti (např. žebro). Nejvyšší koncentrace olova se pak nacházejí v kostech s nejvyšší hustotou [16, 17].

Distribuce olova v kosterním systému je tedy nejednotná a olovo není v kostech rozptýleno rovnoměrně. Jednoznačně závisí na typu kostní tkáně (kompaktní nebo trabekulární), věku a pohlaví. Během aktivního růstu se olovo ukládá především v trabekulární kostní tkáni, ale v dospělosti se olovo aktivněji akumuluje v kompaktní kostní tkáni. Olovo má tendence se ukládat v místech nejaktivnější kalcifikace v době, kdy je absorbováno, dále převážně ve spongiózní části kosti bohaté na přísun krve a také v epifýzách dlouhých kostí, kde jsou růst a remodelace kosti nejrychlejší [18, 19].

Analýza olova v kostech tedy přináší důležité informace o kontaminaci životního prostředí a jeho vlivu na živočichy [7, 8] a lidskou populaci [11, 20]. Dále nese informaci o kumulaci expozice olovem během života [16, 17], čehož může být využito v oblastech archeologie a ve forenzních disciplínách k určování např. sociálních vztahů v populacích [21], či životních podmínek [22].

## 2.2 Možné způsoby stanovení Pb v kostech

Klasické analytické kvantitativní metody využívající atomové spektrometrie jsou založeny buď na mineralizovaných vzorcích kostí [23], analýze suspenzí [24], nebo na nedestruktivní analýze [25]. Pokud se vzorek mineralizuje v kyselinách, materiál je nenávratně zničen. Mineralizovaný materiál pak nemůže být znovu použit v jiných studiích tohoto typu. To má značný negativní dopad při analýze zubního materiálu (skloviny, dentinu), protože hmotnost výstupního materiálu je poměrně malá [26]. Mezi nedestruktivní analýzy se řadí níže uvedené XRF a LA-ICP-MS, a dále třeba PIXE [27], LIBS [28] a NAA [29, 30].

### 2.2.1 XRF

XRF má několik výhod. Mezi hlavní výhody patří schopnost měřit hladinu olova v kostech přímo *in vivo*, dále neinvazivní povaha měření a možnost zakoupení přístroje v přenosné verzi, čímž je umožněna analýza přímo v terénu. Analýza je velmi rychlá, novější verze umožňují proměřit stovky vzorků denně bez ohledu na jejich velikost [25, 31, 32]. Díky těmto výhodám se přístroj uplatňuje především v archeologii a forenzních oborech [25, 33].

Mezi hlavní nevýhody patří zejména fakt, že se jedná o povrchovou analýzu. Dále zde je riziko, že analyzujeme nereprezentativní část vzorku. Starší přístroje navíc jako zdroj záření využívaly radioaktivní materiály. Novější verze přenosných XRF přístrojů již obsahují miniaturizované excitační zdroje, které nepoužívají radioaktivní materiály [31, 32, 33, 34, 35].

Chyby v měření způsobují a závisí na: a) vzdálenosti zařízení od kostního vzorku, b) distribuci olova v kosti, c) rozměrech kostí a d) na tloušťce tkáně překrývající kost, e) interferující prvky v kosti a kůži, f) hustotě kostí a tkání, g) poměru signálu k šumu [36].

Analýzu olova značně komplikuje signál vápníku, kterého je oproti olovu v kostech nadbytek [31, 32] a falešně vysoké hodnoty může způsobit i přítomnost arsenu [37].

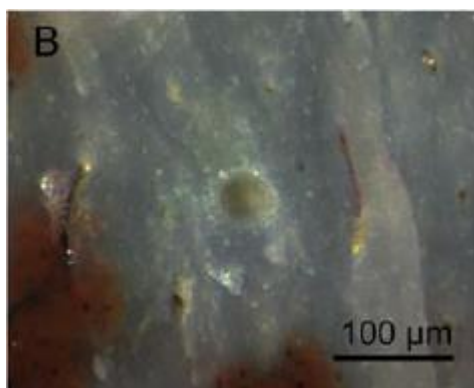
### 2.2.2 ICP-MS a LA-ICP-MS

Největšími výhodami metody ICP-MS jsou: a) vysoká citlivost, b) možnost multielementárního stanovení, c) široký lineární rozsah a d) možnost získat informace o isotopovém složení. Obecně vzato je velkou nevýhodou výskyt interferencí [38]. Většina postupů stanovení pomocí ICP-MS však vyžaduje mineralizaci vzorku [39, 40]. Pro stanovení v pevném vzorku pak může být použito spojení s laserovou ablací (viz níže) [41] nebo ETV-ICP-MS [42].

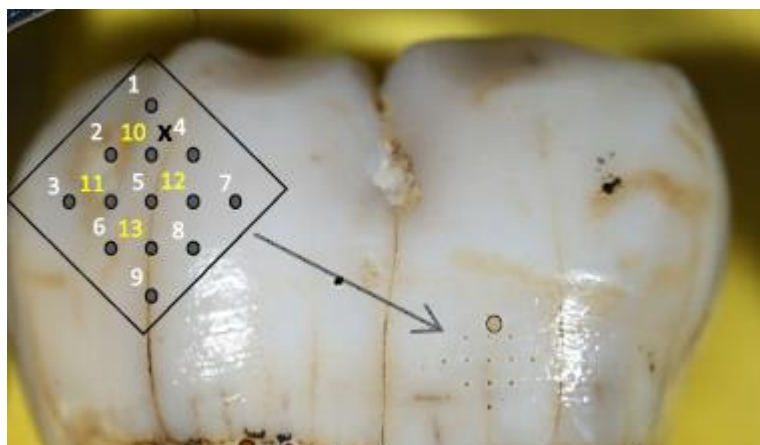
Laserová ablace umožňuje skenování povrchu vzorku, znázornění rozložení prvků ve skenovaném vzorku (dvourozměrné mapy), analýzu vzorků téměř jakéhokoli složení a typu včetně kapalných a práškových vzorků, či měkkých a tvrdých tkání. Dále minimalizuje kontaminaci a ztráty těkavých prvků během rozkladu vzorku a její největší výhodou je minimální příprava vzorku [43, 44].

Při analýze pevných vzorků se vyskytují dva velké problémy. Zaprvé je to neshoda v interakci laserového paprsku s povrchem vzorku různého matricového složení. Částice aerosolu, vytvořené během ablace různých matric, se mohou lišit velikostí a geometrií, což má vliv na účinnost transportu vzorku z místa ablace do plazmy. Zadruhé množství iontů zjištěných po separaci  $m/z$  často není zcela reprezentativní pro složení původního vzorku. Obojí ohrožuje přesnost analýzy a komplikuje kvantifikaci. Citlivost nebo intenzita signálu se tak mohou významně měnit u vzorků se stejnými koncentracemi analytu, avšak s různými matricemi nebo fyzikálními vlastnostmi [43].

Velkou výhodou je minimální invazivní odběr vzorku (**obr. 2**) [43]. Poškození lze ještě minimalizovat vyvrtáním díry, skrz kterou se vede laserový paprsek hlouběji. Na **obr. 3** je patrné, že poškození zubu po 13 odběrech je naprosto minimální [45].



**Obr. 2** Příklad jamky vytvořené v kosti laserem po LA-ICP-MS analýze [46]



**Obr. 3** Zub po kompletní analýze LA-ICP-MS [45]

### 2.2.3 ETAAS

V rutinní analytické praxi je nejčastější a nejúčinnější metodou pro měření Pb v klinických vzorcích ETAAS. Má vysokou citlivost a nízké detekční limity. Kromě toho v kroku pyrolýzy dochází ke zjednodušení matrice, takže je zpravidla potřeba pouze jednoduchá předběžná úprava vzorku [47].

Při stanovení hraje největší roli správné zvolení teploty pyrolýzy a atomizace, dále správně zvolený chemický modifikátor a korekce pozadí (viz dále kapitola 2.3) [48, 49]. Analýzu kostí pak ještě komplikuje složitost kostní matrice [47].

Fosforečnany a palladium jsou nejčastěji používané modifikátory pro stanovení Pb pomocí ETAAS [50, 51, 52]. Palladium stabilizuje olovo tvorbou  $Pd_3Pb$  a  $Pd_3Pb_2$ , fosforečnany tvoří s olovem stabilní soli  $Pb_3(PO_4)_2$ ,  $Pb_8P_2O_{13}$  [53]. Přídavek fosfátu např.  $NH_4H_2PO_4$  nebo  $H_3PO_4$ , stabilizuje Pb až na teplotu pyrolýzy 1200 °C [54].

Ale i s použitím fosfátu jako modifikátoru se objevuje chyba v korekci na 217,0 nm a 283,3 nm (i za užití Zeemanovy korekce pozadí). Navíc vysoké koncentrace Ca, Mg nebo Na, což jsou běžné prvky v kostní matrici, vyvolávají intenzivní absorpci pozadí [4]. Za interferenci jsou odpovědné zejména fosforečnany, resp. PO molekuly vznikající při termickém štěpení hydroxyapatitu. Intenzivně absorbující PO molekulové absorpční pásy s jemnou rotačně vibrační strukturou jsou obtížně korigovány i s použitím Zeemanovy korekce. Pokud absorpční rotační linie molekuly vykazující Zeemanovské štěpení jsou blízko nebo překrývají emisní linii analytu a okolní linie, dochází k nadměrné nebo naopak nedostatečné kompenzaci [3].



Tyto problémy způsobují všechny molekuly s jemnou rotačně vibrační strukturou. Stejně chování vykazují např. i molekuly NO [55] a pravděpodobně také dvouatomové molekuly obsahující síru [56].

Jelikož je hydroxyapatit termicky stabilní a vznikající PO molekuly jsou v ETA pozorovány od teplot cca 1600 °C, je tuto interferenci velice obtížné eliminovat. Zvyšování teploty pyrolýzy nemá na absorpci pozadí výrazný vliv. S rostoucí teplotou atomizace se vliv interference zpravidla zvyšuje [4]. Korigovat či eliminovat takto vzniklá spektra lze do jisté míry s využitím Zeemanovské korekce pozadí, anebo pomocí unikátní a revoluční HR-CS-AAS, která pro tento účel využívá matematické korekce [57].

## 2.3 Interference v ETAAS

Interference jsou jevy, které vedou ke změnám intenzity signálu analyzovaného prvku. Interference v AAS spadají do dvou základních kategorií, a to nespektrální a spektrální. Nespektrální interference ovlivňují samotnou tvorbu analyzovaných položek, spektrální interference vedou k vyšší absorpci záření kvůli přítomnosti jiných absorbujících položek a k rozptylu záření na nevypařených částicích [58].

### 2.3.1 Nespektrální interference

Pokud je vzorek viskózní nebo má větší povrchové napětí než standard nebo roztok, může se vyskytnout chyba v dávkování či v míře absorpce vzorku. Takovéto interference mohou být minimalizovány tím, že matricové složení standardu a vzorku bude co nejpodobnější [58]. Dále je kvantitativní analýza některých prvků komplikována chemickými interferencemi vyskytujícími se během atomizace, nejčastěji je to tvorba termicky stabilních sloučenin analytu s povrchem atomizátoru (např. karbidy) [59]. Některé prvky jako např. Ti, W, Zr, Mo a Al reagují s kyslíkem za vzniku tepelně stabilních oxidů [58]. Dále může dojít ke ztrátám analytu okluzí v mikrokrystalech matrice, nebo vytvořením těkavého halogenidu stanovovaného analytu, kdy se analyzovaný prvek ztrácí už před krokem atomizace [60, 61].

### 2.3.2 Spektrální interference

Spektrální interference jsou způsobeny přítomností jiné atomové absorpční linie nebo pásma molekulové absorpce v blízkosti spektrální čáry našeho zkoumaného analytu [58]. Hlavní příčinou absorpce pozadí je přítomnost nedisociovaných molekul matrice, které mají široký pás absorpčních spekter, a drobných pevných částic, neodpařených kapiček rozpouštědla nebo různých molekul, které mohou rozptylovat světlo v pozorované spektrální oblasti. Pokud se tento typ nespecifické absorpce překrývá s atomovou absorpcí analytu, dochází k absorpci pozadí [58]. Absorpce se přičítá k signálu analytu a způsobuje pozitivní chybu. Takto vzniklou interferenci vyřešíme naměřením a odečtením absorpce pozadí od celkové naměřené absorpce [58]. V některých případech mohou být absorpční pásy natolik komplikované nebo složené z velkého počtu čar, že rozlišení pomocí běžného monochromátoru není možné. Tyto čáry odpovídají vibračně-rotacím složkám elektronových přechodů a tvoří tzv. strukturovaná pozadí, která bylo možné do nedávné doby korigovat pouze Zeemanovou korekcí [60, 61].

### 2.3.3 Korekce pozadí

Spektrální interference jsou korigovány pomocí systému korekce pozadí. Mezi nejčastější techniky korekce pozadí pak patří:

- a) měření absorbance v blízkosti analytické čáry
- b) korekce pozadí pomocí deuteriové lampy
- c) korekce pozadí dle Smith-Hieftje
- d) Zeemanova korekce pozadí
  - aplikována na zdroj záření (přímá)
  - aplikována na atomizátor (inverzní) [62].

- **korekce pozadí pomocí deuteriové lampy**

Základním principem deuteriové korekce pozadí je střídání čárového zdroje se zdrojem kontinuálního záření. HCL výbojka produkuje čárové spektrum, deuteriová lampa produkuje kontinuální záření. Výstupní štěrbina monochromátoru vymezuje spektrální interval a vybírá tak ze spektra příslušnou emisní čáru a pás. Přístroj srovná intenzity na stejnou hodnotu. Snížení intenzity čárového zdroje odpovídá celkové absorpci, snížení intenzity kontinuálního zdroje je v tomto případě zanedbatelné. Oproti tomu u absorpce pozadí se snižuje intenzita u obou zdrojů přibližně stejně. Absorpce čárového zdroje tedy bude odpovídat celkové absorpci a absorpce změřená kontinuálním zdrojem záření je rovna absorpci pozadí. Odečtením těchto dvou absorpcí získáme absorpci specifickou, která je úměrná koncentraci zkoumaného analytu. Metoda je rychlá, jednoduchá a levná, ale nemá schopnost správně korigovat strukturovaná pozadí a nelze ji použít pro celou spektrální oblast (jen pro cca 160–360 nm) [60, 61].

- **Zeemanova korekce pozadí**

Zeemanova korekce pozadí využívá Zeemanova jevu, kdy se energetické hladiny atomu štěpí v magnetickém poli a vytvářejí  $\pi$  a  $\sigma$  komponenty. Konkrétně buď vznikají jako triplety (normální Zeemanův jev), nebo jako multiplety (anomální Zeemanův jev). Komponenta typu  $\pi$  je centrální, neposunutá a je polarizována paralelně s magnetickým polem. Komponenty  $\sigma$  jsou posunuty a k magnetickému poli jsou polarizovány kolmo. Pokud je magnet aplikován na zdroj záření, štěpí se emisní čáry (přímá Zeemanova korekce). Pokud magnet působí na atomizátor, štěpí se absorpční čáry (inverzní Zeemanova korekce). Magnetické pole může být k optické ose kolmo (příčný/transverzální Zeemanův jev), nebo rovnoběžně (podélný/longitudální Zeemanův jev). Nejčastějším typem přístroje je uspořádání s příčným Zeemanovým jevem aplikovaným

na atomizátor. Specifická absorpce analytu se pak měří pomocí složky  $\pi$ , pozadí pak pomocí obou složek. Zeemanovy korekce lze použít pro celou spektrální oblast, dobře korigují složitá spektra, ovšem nevýhodou je zhoršení citlivosti kvůli kratším kyvetám, nebo kvůli používání polarizačního filtru (u příčného/transverzálního Zeemanova jevu) [60, 61]. Unikátním způsobem řešení pak může být použití HR-CS-ETAAS instrumentace (viz dále).

- **HR-CS-ETAAS**

Atomový absorpční spektrometr s kontinuálním zdrojem záření a vysokým rozlišením uvedeným do praxe společností Analytik Jena disponuje rozlišením přibližně 1,5 pm na pixel při 200 nm. Jako zdroj kontinuálního záření je zde použita xenonová oblouková lampa, která poskytuje kontinuální emisní spektrum v celém rozsahu příslušných vlnových délek používaných v AAS. Možné interference při stanovení lze řešit korekčními spektry, či eliminovat metodou nejmenších čtverců. K dispozici pro analytické účely je 200 pixelů detektoru CCD, přičemž všechny pracují jednotlivě, ale zároveň současně. Což znamená, že zařízení pracuje s 200 nezávislými detektory a pro každý vzorek tak vzniká vysoce přesné a široké absorpční spektrum. Při rozlišení více než stokrát vyšší, než mají tradiční AAS monochromátory, jsou atomové absorpční linie zobrazeny v jejich přirozeném tvaru a šířce. Interference od jiných struktur atomové a molekulární absorpce jsou omezeny na minimum. Přístroj dále umožňuje trojrozměrné zobrazení absorbance v závislosti na čase a vlnové délce, což umožňuje detekci a následné zamezení spektrálních interferencí [63, 64].

### **2.3.4 Chemické modifikátory**

Efektivní analýza většiny materiálů vyžaduje přidavek reagensů, které modifikují chování analytu během zahřívání nebo jeho atomizační mechanismus, a redukují tak interference. Výběr modifikátoru často záleží na dostupnosti chemicky čistého materiálu. Mezi nejužívanější patří Pd, HNO<sub>3</sub> nebo NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> nebo (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, Ru, Rh, Pt, W, Ir a celá řada dalších [62]. Aplikovány mohou být samostatně nebo i ve směsi jako např. Pd + Mg, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> + Pd [55], Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> + NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> [65] a mnoho dalších kombinací.

Modifikátor může působit přímo na analyt samotný, buď vytvořením tepelně stabilní sloučeniny, nebo naopak vytvořením těkavější sloučeniny. Také se může podílet na odstranění zbytků analytu v čistící fázi. Stejně účinky může mít modifikátor na matici, tedy vytvářet s interferentem těkavější, nebo naopak termicky stabilní sloučeninu. Případně spolu mohou

vytvářet takové sloučeniny, které neinterferují. V případě, že modifikátorem je např.  $\text{H}_2\text{O}_2$  nebo  $\text{HNO}_3$ , může v závislosti na typu vzorku docházet k částečnému nebo úplnému rozložení matrice. Další účinky modifikátorů už jsou velmi specifické, např. kyselina askorbová v atomizačním prostředí zvyšuje redukční podmínky, ale při jejím použití zůstává na kyvetě významné množství zbytkového uhlíku. Z tohoto důvodu se jeví jako lepší použít např. kyselinu citronovou [66]. Dalším specifickým účinkem modifikátorů je také ovlivnění povrchu kyvety [60, 61].

### **2.3.5 Identifikace a eliminace nespektrálních interferencí**

Nespektrální interference lze odhalit a určit pomocí standardních přídavek, kdy porovnáme směrnici lineární části kalibrační křivky se směrnici přímkou standardních přídavek. Standardní přídatky přidáváme přímo ke vzorku s reálnou maticí. Je nutné mít na paměti dvě věci. Zaprvé je důležité pracovat pouze v lineární části kalibrační křivky, zadruhé objem přídatku musí být v poměru s objemem vzorku zanedbatelný. Pokud se směrnice liší o více jak 10 %, je zapotřebí identifikovat interferenci a eliminovat ji. Jednodušší metodou je vyhodnocení návratnosti v % po použití jednoho standardního přídatku, nebo naředění vzorku a vyhodnocení koncentrace [60].

## 2.4 Příprava vzorků k analýze

### 2.4.1 Vyjmutí kostních vzorků

Veškeré vzorky kostí je třeba odebírat nástroji z nerezové oceli, aby nedošlo ke kontaminaci povrchu kosti, a poté nařezat na menší vzorky, např. pomocí pily z nerezové oceli s diamantovým kotoučem [19]. K získání vzorků lze použít i vrtačku s diamantovým hrotem [67]. Při práci je nutné pamatovat na bezpečnostní opatření a během odebírání vzorků nosit bezpečnostní brýle a respirátor/masku [68].

### 2.4.2 Odstranění ulpívající tkáně

Odstranit zbývající měkkou tkáň a šlachy je možno odstranit buď mechanicky, třeba kostní škrabkou [34], či nechat kost odmočit v peroxidu vodíku [50]. Ulpívající bílkovinné částice ze zubů lze odstranit i enzymaticky, např. papainem [39].

Kosti archeologického původu (bez tkáně) lze zbavit nečistot čistou teplou vodou (ne horkou) a měkkým kartáčkem. Velké kusy nečistot mohou být odejmuty dřevěnými pinzetami nebo hůlkami. Kosti se ale nesmí celé namočit, voda totiž urychluje rozklad a mokré kosti pak mohou při usychání praskat vlivem kolísání teplot nebo vlivem proudění vzduchu. Kosti se proto nechávají vysušit přirozeně a pomalu při pokojové teplotě, nebo se mohou ponořit do alkoholové lázně (z etanolu) – nejdříve na chvilku v 50% roztoku, poté v 75% a nakonec v 95% [69].

V archeologii a forezních vědách se tkáně a nečistoty nejčastěji odstraňují varem. Kosti se vloží do hrnce, zalijí vodou tak, aby byly zcela potopené, přidá se odměrka práškového boraxu a přivede se k varu. Nechají se vařit 30 minut až 2 hodiny, v závislosti na velikosti kostí a jejich stavu, poté se teplota sníží na 75 až 80 °C a vaří se dalších 6 až 8 hodin. Během vaření se musí z povrchu vody odstraňovat vyvařený tuk. Pokud se na koncích kostí objeví počátky eroze, kosti musí být okamžitě vyjmuty z vody. U zubů je důležité nenechávat vodu opakovaně vařit a chladnout, protože mají tendenci při kolísání teplot praskat [69].

Další možností je vaření s přídavkem bělidla. Tato metoda se používá, pokud hrozí nějaké riziko nákazy. Přidává se jedna odměrka do galonu vody (cca 3,785 l). Kosti se pak musí nechat oplachovat pod tekoucí vodou minimálně 15 minut, či převarit v čisté nebo mýdlové vodě [69].

### 2.4.3 Sušení

Nejčastějším způsobem získávání sušiny je lyofilizace neboli vakuové vymrazování. Je to způsob odstranění rozpouštědel z materiálu procesem sublimace, odstranění vázaných molekul vody procesem desorpce a zároveň je to vynikající metoda pro uchování široké škály tepelně citlivých materiálů, jako jsou bílkoviny, mikroby, léčiva, tkáně a plazma. Sestává ze 4 kroků: 1) zmrazení za atmosférického tlaku, 2) primární sušení ve vakuu, 3) sekundární sušení ve vakuu, 4) ustálení při nízkém tlaku. Důležité je, aby byl vzorek dobře promrzlý, jinak hrozí, že částice vody začnou při nízkých tlacích vřít a dojde k porušení materiálu [70, 71].

### 2.4.4 Drcení a mletí vzorků

Bez ohledu na to, který způsob mletí nebo drcení použijeme, musíme mít na paměti několik věcí. Zprv je nutno minimalizovat jakoukoli kontaminaci našeho vzorku, ať už jinými vzorky, nebo částicemi kovů z povrchu přístroje. Dále se snažíme o maximalizaci počtu vzorků, které lze zpracovat najednou. Běžně se používá např. hmoždíř, kulový mlýn, mlýnek s noži, mixér, kryogenický mlýn atd. [50].

Mezi starší, avšak stále užívané způsoby drcení, patří technika křehkého lomu (BFT – brittle fracture technique). Instrumentace je jednoduchá, neboť se zde využívá pouze speciálně připravené teflonové koule s kovovým jádrem a teflonové nádoby s víkem. Vše vyrobeno podobným způsobem a ze stejného kvalitního materiálu. Vzorek se umístí do nádoby společně s kuličkou a pevně se uzavře. Nádoba se potom na několik minut ochladí v tekutém dusíku a vibruje po dobu jedné minuty při 3000 ot/min. Metoda je primárně určena pro drcení tvrdých tkání [72].

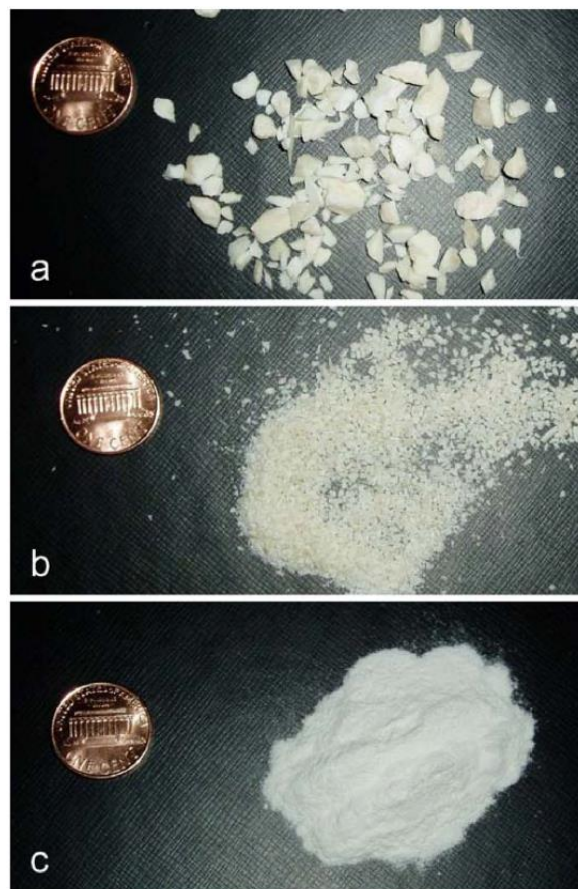
Na podobném principu pracují nové automatické kryogenické mlýnky/drtiče. Zde kapalný dusík uchovává zařízení a vzorky v chladu, zároveň kosti zkřehnou, a tím se výrazně usnadňuje mletí/drcení. Navíc pomáhá uchovat kvalitu a množství DNA obsažené ve vzorcích. Metoda je vhodná nejenom pro kosti, ale i pro měkké tkáně [73].

Mixéry v řádu sekund poskytují zcela homogenní a reprodukovatelné vzorky, takže reprezentativní vzorek může být odebrán z libovolného místa v nádobě. Jsou vhodné pro středně tvrdé a měkké materiály [74].

Pro počáteční zmenšení velkých a pevných kostí (např. koňské a hovězí) na menší fragmenty vhodné k dalšímu rozemletí na prášek je výhodné použít vysoce odolný mlýnek s noži/drtič [50, 75]. Takto získané menší fragmenty lze pak rozmělnit ve speciálních mlecích

nádobách, které provádějí radiální oscilace ve vodorovné poloze a které obsahují malé kuličky pro rozmělnění vzorku. Pohyb mlecích nádob spolu s pohybem kuliček má za následek intenzivní míchání a rozmělnění vzorku. Stupeň míchání lze ještě zvýšit přidáním několika menších kuliček [76].

Výsledný proces tedy může vypadat například takto: první drcení ve vysoce odolném drtiči se sítím s propustností 10 mm (**obr. 4a**), druhé drcení ve stejném přístroji se sítím s propustností 2 mm (**obr. 4b**) a nakonec mletí v ultracentrifugačním mlýně (**obr. 4c**) [50].



**Obr. 4** Kostní fragmenty. K porovnání velikosti částic je přiložen americký cent [50]



## 2.4.5 Rozklady

Klasický suchý rozklad můžeme definovat jako rozklad na vzduchu při atmosférickém tlaku a v otevřeném systému. Celý postup sestává ze čtyř základních kroků – sušení, zuhelnění, zpopelnění a loužení popela [77]. Suchý rozklad je ovšem velmi časově náročný (pro kosti i více než 48 hodin), hrozí zde nemalé riziko kontaminace a ztráta těkavých prvků [50, 54, 78].

Použití kyselin s sebou přináší dvě výhody: zaprvé nadbytek kyseliny můžeme odstranit jednoduchým odpařením do sucha, zadruhé mnoho kyselin lze zakoupit v ultra vysoké čistotě, takže se výrazně minimalizuje kontaminace vzorků [79]. V praxi patří k nejpoužívanějším postupům mikrovlnná mineralizace. Mezi největší výhody patří především zkrácení času potřebného na rozklad, úplné rozložení matrice vzorku, zamezení ztrát těkavých složek vzorku a malé množství potřebných reagensů [79].

Proti těmto tvrzením stojí zastánci přímých analýz, kteří tvrdí, že mokřý rozklad je náročný na práci i čas a že vyžaduje manipulaci a používání korozivních a toxických reagensů [80]. Dále vyžaduje drahé a sofistikované zařízení [81] a zahrnuje významnou manipulaci se vzorkem. Kromě toho rozpouštění přispívá k ředění analytu, což nemusí být nezbytně vhodné pro stanovení nejnižších koncentrací [82, 83, 84].

V **tabulce 1** jsou uvedené příklady dříve publikovaných postupů přípravy kostí nebo zubů k analýze. Většina autorů použila mikrovlnou mineralizaci s použitím  $\text{HNO}_3$ . Některé postupy obsahovaly i přídavky  $\text{H}_2\text{O}_2$  nebo  $\text{HCl}$ . Postupy rozpouštění bez mikrovlnné mineralizace vyžadovaly zahřátí a dlouhý reakční čas (řádově hodiny či dny).



**Tabulka 1 Pokračování**

Vzorek	Analyt	Metoda	Navážka	Postup, nástroje, činidla	LOD	Lit.
kosti krav a koz	Pb	ET-AAS ICP-MS		<ul style="list-style-type: none"> <li>- oddělení epifyzy od diafýzy a vyjmutí kostní dřevě</li> <li>- odstranění srsti a většiny tkáně (skalpel z nerezové ocele)</li> <li>- odstranění zbývající ulpívající tkáně (škrabka na kosti z Ta)</li> <li>- namáčení přes noc v 30% (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></li> <li>- velké kosti – buď (a) drcení pomocí BFT a kladiva, nebo (b) rozřez. pilou</li> <li>- namáčení v diethyleteru po dobu 1-2 hodin</li> <li>- osušení na vzduchu</li> <li>- skladování při -80 °C</li> <li>- lyofilizace</li> <li>- drcení v mlýnech a mixérech</li> </ul>	neuveďeno	[50]
lidské kosti	Fe, Cu, Zn	ICP-MS		<ul style="list-style-type: none"> <li>- obroušení povrchu kosti</li> <li>- rozdrcení v achátovém hmoždíři</li> <li>- louhování ve zředěné kyselině octové (0,1 M), 30 min</li> <li>- promytí destilovanou vodou, 3x, osušení</li> <li>- rozpuštění ve 4,5 M HNO<sub>3</sub></li> <li>- odpaření a znovu rozpuštění v 1 mL 7 M HCl + 0,001% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2x)</li> </ul>	neuveďeno	[87]
zvířecí kosti a zuby	Zn	ICP-MS	kosti 50–120 mg zuby 10–50 mg	<ul style="list-style-type: none"> <li>- mechanické očištění od částic půdy</li> <li>- odebrání vzorků vrtáním</li> <li>- rozpuštění v 1 mL dvakrát destilované HCl 7,0 M + 0,001% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></li> </ul>	ppb	[88]
lidské kosti a zuby		NAA		<ul style="list-style-type: none"> <li>- drcení mezi dvěma titanovými fóliemi v hydraulickém lisu</li> <li>- homogenizace v kulovém achátovém mlýnu</li> <li>- zuby analyzovány vcelku</li> </ul>	neuveďeno	[29]
kosti (nespecif.)	Ni, Cd, Co, Zn, Cu, Pb	AAS-HGA	2 g  2 g	<ul style="list-style-type: none"> <li>- extrakce v 20 mL 7 M HNO<sub>3</sub> na elektrickém ohříváči, 8 hodin</li> <li>- zředění na 50 mL</li> <li>- rozpuštění v 20 mL konc. HNO<sub>3</sub>, později přídavek 2 mL HClO<sub>4</sub></li> <li>- odpaření téměř dosucha</li> <li>- zředění na 50 mL 0,1 M HNO<sub>3</sub></li> </ul>	ppm	[89]

**Tabulka 1 Pokračování**

Vzorek	Analyt	Metoda	Navážka	Postup, nástroje, činidla	LOD	Lit.
lidské kosti	Rb, Zn, Ca, Fe, Al, Cu, Pb	ET-AAS, FAAS	0,05–0,13 g	<ul style="list-style-type: none"> <li>- vzorky získány vrtáním nebo nástroji z nerez. oceli</li> <li>- vzorky před analýzou skladovány při -20 °C</li> <li>- vytemperování na pokojovou teplotu</li> <li>- vysušení do konstantní hmotnosti při 60 °C</li> <li>- mikrovlnná mineralizace</li> <li>(a) 3 mL 65% HNO<sub>3</sub>, ohřátí na 150 °C během 2 minut</li> <li>(b) 150 °C, 13 min</li> <li>(c) 160 °C, 5 min</li> <li>(d) 20 minut chlazení</li> <li>(e) zředění na 10 mL dvakrát destilovanou vodou</li> <li>- vzorek pro porovnání – rozpuštění v isoperibolickém kalorimetru – 3 mL 65% HNO<sub>3</sub>, 160 °C, 12 hodin</li> </ul>	pro olovo 1,0 µg L <sup>-1</sup>	[90]
lidské kosti	Pb	ET-AAS	<p>střed kostí cca 1–7g</p> <p>povrch kostí cca 0,5–2 g</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- odstranění kostní dřevě a ulpívajících tkání skalpelem a kostní škrabkou</li> <li>- omytí metanolem, pak roztokem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a pak deionizovanou vodou</li> <li>- nařezání na menší vzorky a oddělení povrchu kosti od jejího středu</li> <li>- lyofilizace přes noc</li> <li>- mikrovlnná mineralizace</li> <li>(a) 20 mL konc. HNO<sub>3</sub>, 15 min, 30% výkon</li> <li>(b) 60 min, 20% výkon</li> <li>(c) zředění na 40 mL dvakrát destilovanou vodou</li> <li>- mikrovlnná mineralizace</li> <li>(a) 10 mL konc. HNO<sub>3</sub>, 15 min, 30% výkon</li> <li>(b) 60 min, 20% výkon</li> <li>(c) zředění na 20 mL dvakrát destilovanou vodou</li> <li>- na povrchu některých mineralizátů se po mineralizaci objevila lipidová vrstva. Ta byla narušena čistou pipetovací špičkou a pro analýzu se odebíral jen čirý roztok.</li> </ul>	0,6 µg g <sup>-1</sup>	[34]

**Tabulka 1 Pokračování**

Vzorek	Analyt	Metoda	Navážka	Postup, nástroje, činidla	LOD	Lit.
lidské kosti	Pb, F	AAS	0,5 – 1 g	<ul style="list-style-type: none"> <li>- vaření v redestilované vodě, 30 min</li> <li>- očištění od svalů a šlach</li> <li>- vysušení do konstantní hmotnosti při 90 °C</li> <li>- spálení při 480 °C</li> <li>- rozpuštění v horké 5% HNO<sub>3</sub> (pH upraveno na 2,0 pomocí NH<sub>4</sub>OH)</li> <li>- přídavek 0,5 mL 2% APDC a 3 mL MIBK</li> </ul>	neuvedeno	[20]
lidské kosti	Pb	ICP-MS	0,43 g	<ul style="list-style-type: none"> <li>- rozemletí v mixéru</li> <li>- mikrovlnná mineralizace</li> <li>(a) 20 mL HNO<sub>3</sub> + 1 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></li> <li>(b) 200 °C, 10 min</li> <li>(c) 200 °C, 20 min, 1000 W</li> <li>(d) zředění 1:20 demineralizovanou vodou</li> </ul>	0,15 a 0,10 μg g <sup>-1</sup>	[91]
lidské zuby	Pb, Sr, Zn, Ca, Mg, Fe, Mn, K	ICP-MS ICP-AES		<ul style="list-style-type: none"> <li>- máčení v destilované deionizované vodě, 24 hodin</li> <li>- očištění zubním kartáčkem</li> <li>- máčení v 1% papainu</li> <li>- opláchnutí dest. deion. vodou, 3x</li> <li>- máčení v 3% (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 30 sekund</li> <li>- opláchnutí dest. deion. vodou, 10 minut</li> <li>- usušení v digestoři přes noc</li> <li>- rozemletí v hmoždíři</li> <li>- rozpuštění v 2 mL podvar. HNO<sub>3</sub> při pokojové teplotě přes noc</li> <li>- zahřátí na horké desce a vysušení do sucha</li> <li>- přídavek 0,2 mL konc. HCl</li> <li>- přidávání 2mL podílů podvar. HNO<sub>3</sub> a 0,2mL podílů konc. HCl</li> <li>- přidávání až do celkového objemu 10 mL podvar. HNO<sub>3</sub> a 0,8 mL konc. HCl</li> <li>- přídavek 1 mL 30% (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a vychladnutí na pokojovou teplotu</li> <li>- zředění na celkový objem 5 až 10 mL</li> </ul>	pro olovo a ICP-MS 0,1 ng mL <sup>-1</sup>	[39]

**Tabulka 1** Pokračování

Vzorek	Analyt	Metoda	Navážka	Postup, nástroje, činidla	LOD	Lit.
zvířecí kosti	Pb	ET-AAS	cca 0,5 g  cca 0,5 g	<ul style="list-style-type: none"> <li>- odstranění srsti a většiny tkáně (nůž z nerezové ocele)</li> <li>- odstranění zbývající ulpívající tkáně (škrabka na kosti z Ta)</li> <li>- vyjmutí kostní dřene a lyofilizace do konstantní hmotnosti</li> <li>- skladování při -70 °C před analýzou</li> <li>- nařezání na vzorky (pila z nerez. oceli s diamantovým kotoučem)</li> <li>- homogenizace vybraných vzorků v kulovém mlýnu z karbidu wolframu</li> <li>- rozložení pomocí mikrovlnné mineralizace               <ul style="list-style-type: none"> <li>(a) vzorek kosti + 10 mL konc. HNO<sub>3</sub></li> <li>(b) 8 min, 100% výkon</li> <li>(c) 10 min, 65% výkon</li> <li>(d) zředění na objem 50 mL</li> </ul> </li> <li>- rozpuštění při pokojové teplotě               <ul style="list-style-type: none"> <li>(a) 10 mL konc. HNO<sub>3</sub>, 48 h</li> <li>(b) zředění na objem 50 mL</li> </ul> </li> </ul>	0,6 µg g <sup>-1</sup>	[54]
lidské zuby	Cu, Pb, Mn	ET-AAS	20 mg 100 mg	<ul style="list-style-type: none"> <li>- máčení v 30% (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 2 hodiny</li> <li>- opláchnutí Milli-Q vodou a oschnutí v digestoři</li> <li>- vysušení v troubě, 105 °C, 1 hodina</li> <li>- mletí v kryogenickém mlýně               <ul style="list-style-type: none"> <li>(a) předchlazení, 5 min</li> <li>(b) mléčné zuby, 2 min</li> <li>trvalý chrup, 2 min, 3 x</li> </ul> </li> <li>- pro přípravu suspenze</li> <li>- pro porovnání výsledků – mikrovlnná mineralizace               <ul style="list-style-type: none"> <li>(a) 2 mL 20% (v/v) HNO<sub>3</sub>, 3 min, 160 °C, 1000 W</li> <li>(b) 2 min, 160 °C, 0 W</li> <li>(c) 5 min, 230 °C, 1000 W</li> <li>(d) 10 min, 230 °C, 1000 W</li> <li>(e) zředění na objem 10 mL Milli-Q vodou</li> </ul> </li> </ul>	pro olovo 34,0 ng g <sup>-1</sup>	[24]

## 2.5 Analýza suspenzí

Přímá analýza má určité výhody oproti postupům, kde se vzorek rozkládá v kyselinách, jako je např. použití menšího množství vzorku a minimální manipulace. Dalšími výhodami jsou zkrácená doba přípravy vzorku, a tím i rychlejší analýza, vyšší přesnost a citlivost v důsledku absence ředění a nepřítomnost jakéhokoli korozního nebo toxického odpadu [41, 56, 83, 92].

Nevýhodou přímé analýzy v ETA je, že se celá matrice zavádí do kyvety, což má za následek zvýšení spektrálních či nespektrálních interferencí a také vyšší nepřesnost v důsledku přirozené nehomogenity pevných vzorků. Aby bylo dosaženo přesných výsledků, je u analýzy suspenzí zapotřebí zajistit homogenitu vzorku, vhodnou velikost částic a výběr vhodného ředícího prostředku pro stabilizaci suspenze [24, 82].

Velikost částic výrazně ovlivňuje transportní a atomizační účinnost. Znalost distribuce velikosti částic je zásadní pro zajištění homogenity a stability suspenze. Je třeba vzít v úvahu povahu, hustotu i homogenitu vzorku a další parametry [93].

Aby nedocházelo k sedimentaci částic, je suspenzi nutné stabilizovat vhodným kapalným médiem. Pro lehké částice postačí voda [48], pro těžší se nejčastěji používá glycerol a jeho vodné roztoky (viz **tabulka 2**). Dále byly publikovány i méně obvyklá stabilizační činidla, např. někteří autoři použili KO300G [94] nebo agar [95]. Pro podpoření extrakce analytu ze vzorku se používá kyselina dusičná a její roztoky [48]. Další důležitou součástí je povrchově aktivní látka, která snižuje povrchovou či mezifázovou energii. Nejčastěji používanou je Triton X-100 (viz **tabulka 2**). Homogenitu vzorku lze dostatečně zajistit buď ultrazvukem, nebo magnetickým míchadlem [96], případně postačí i ručně promíchat. Doba ultrazvukování, druhy činidel, velikost částic atd. to vše je velmi variabilní a liší se studie od studie [93].

V **tabulce 2** jsou uvedené příklady dříve publikovaných postupů přípravy suspenzí k analýze v různých typech materiálů.

**Tabulka 2** Příklady dříve publikovaných postupů přípravy suspenzí k analýze

<b>Materiál</b>	<b>Analyt</b>	<b>Navážka</b>	<b>Postup, nástroje, činidla</b>	<b>Zdroj</b>
horniny	Cd, Tl	5 mg  40 mg	- 5% (v/v) HNO <sub>3</sub> + 10% (v/v) etanol + 0,05% (v/v) Triton X-100 - rozpuštění v 1,5 mL roztoku - ultrazvuk 30 min, pokojová teplota - pro analýzu Tl	[83]
jogurt	Pb, Cd	40 g L <sup>-1</sup>	- 0,6 mol L <sup>-1</sup> HNO <sub>3</sub> - ultrazvuk 1 min	[92]
	Cu, Cr	40 g L <sup>-1</sup>	- 0,2 mol L <sup>-1</sup> HCl - ultrazvuk 1 min	
med	Pb, Cd,	70 g L <sup>-1</sup>	- 0,1 mol L <sup>-1</sup> HNO <sub>3</sub> + 3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> - ultrazvuk 10 min	[97]
	Cr	70 g L <sup>-1</sup>	- 0,1 mol L <sup>-1</sup> HNO <sub>3</sub> + 10% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> - ultrazvuk 10 min	
měď	Pb	0,03 g	- 100 mL roztoku 15:85 glycerol:voda - ultrazvuk 5 min	[49]
lidské zuby	Pb, Cu, Mn	20 mg	- 1 mL roztoku 0,2% v/v HNO <sub>3</sub> + 0,04% v/v Triton X-100 - ultrazvuk 20 s	[24]
prachové částice	Pb		- 10 mL ultra čisté vody - ultrazvuk 5 min - přídavky 0%, 0,01%, 0,05%, 0,1%, 0,5%, 1% a 2% HNO <sub>3</sub>	[48]
rybí maso	Ca, Mg, Fe, Cu, Zn	3-300 mg	- 10–50 mL 0,1–3 mol L <sup>-1</sup> HCl + 0,07–1,5 mol L <sup>-1</sup> HNO <sub>3</sub> + 0,05–1 mol L <sup>-1</sup> NaOH + 0,05–3% (m/v) EDTA nebo 1-5% (m/v) H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> obsahující 0,1-3% (v/v) glycerol - míchání pomocí magnetického míchadla 5 min - centrifugace 2500 ot/min, 5 min - k analýze odebrán pouze supernatant  pozn.: pokud suspenze obsahovala HNO <sub>3</sub> byl před centrifugací krátce aplikován mikrovlnný ohřev o 75–400 W po dobu 5 min a pak byla suspenze znovu homogenizována magnetickým míchadlem	[96]
půdy a sediment	Be	100 mg na 25ml	- 2 kapky Tritonu X-100 - 5, 10, 20% (w/w) glycerol + 0,1%, 5% a 10% (w/w) HNO <sub>3</sub> - ultrazvuk 1, 3 nebo 5 min	[66]
prach	As, Sb, Sn	0,250 g na 25 ml	- 0,2% (v/v) glycerol nebo 4,0 M HNO <sub>3</sub>	[98]



**Tabulka 2** Pokračování

<b>Materiál</b>	<b>Analyt</b>	<b>Navážka</b>	<b>Postup, nástroje, činidla</b>	<b>Zdroj</b>
kril	Cu, Fe, Zn	250 mg na 25 mL	- 2,0 mol L <sup>-1</sup> HNO <sub>3</sub> - ultrazvuk 15 min	[99]
	Mn	200 mg na 10 mL	- 4,0 mol L <sup>-1</sup> HNO <sub>3</sub> - ultrazvuk 15 min	
půdy	V	10–200 mg	- 3 mL 0,5 a 5% HNO <sub>3</sub> nebo 3 mL 0,6% KO <sub>3</sub> O <sub>9</sub> v 0,5 a 5% HNO <sub>3</sub> - ultrazvuk 15 s	[94]
oxid hlinitý	Si	50–300 mg	- 20 mL roztoku Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (0,95 g) a H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> (0,55 g) - upraveno na pH 11 roztokem 5 mol L <sup>-1</sup> NaOH - ultrazvuková sonda 10 min	[100]
pšeničná mouka	Mn	0,5 g	- 50 mL 2,0 mol L <sup>-1</sup> HNO <sub>3</sub> - ultrazvuk 15 min	[101]
rýžová a pšeničná mouka	As	0,5 g na 25 mL	- 2,5 mL 50% (v/v) HCl + 1,25 mL 20% (m/v) KI - var 5-10 min - po zchlazení přidavek 0,25 g 8-hydroxychinolinu + 0,02 mL n-oktanolu + 7,5 mL 1% (m/v) agaru - ultrazvuk 30 min  - 0,5 mL 50% (v/v) HCl + 0,02 mL n-oktanolu + 0,25 g 8-hydroxychinolinu + 7,5 mL 1% (m/v) agaru - ultrazvuk 30 min	[95]
karbid křemíku nitrid křemičitý	Al, Ca, Fe	20–200 mg	- 20 mL 0,1 mol L <sup>-1</sup> HNO <sub>3</sub> - ultrazvuk 30 min	[102]
potraviny	Cd	25–250 mg na 10 mL	- 2% (v/v) HNO <sub>3</sub> + 1% (v/v) H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> - zahřátí na 120 °C po dobu 20 min - 50 µL 10% Triton X-100 - ultrazvuk 2 min	[103]

## 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1 Vzorky kostí

- **SRM 1486**

Standardní referenční materiál 1486 Bone Meal (dále pak jen SRM 1486) je certifikovaný analytický materiál/vzorek kostní moučky o přesném analytickém složení. Správnost a přesnost složení dokládá certifikát z NIST (National Institute of Standards & Technology).

- **Králík**

Vzorky kostí z králíka byly dodány od soukromých chovatelů z domácího chovu. Po porážce byla z králíků k analýze odebrána žebra a přední běhy.

- **Vydra**

Vzorky vydřích žeber dodala společnost ALKA Wildlife, o.p.s. a byly získány na území České republiky v letech 2008-2015. Jednotlivá místa nálezů jsou zaznamenána a každá vydra je označena číselným kódem. Pod tímto kódem je zanesena do tabulky spolu s údaji o místě a datu nálezu, pohlaví a příčině úmrtí (**tabulka 3**) [104].

**Tabulka 3** Seznam vzorků vydřích kostí

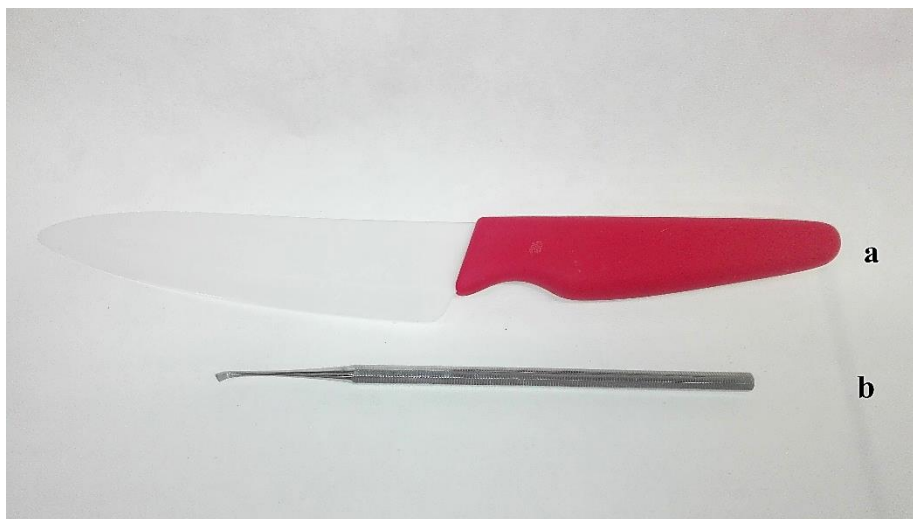
Kód	Místo nálezů	Datum nálezů	Pohlaví	Příčina úmrtí
321	Pondědrážka	23.08.2010	M	srážka s vozidlem
366	Kolín	20.11.2010	M	stáří
367	Jistebník	26.10.2010	M	srážka s vozidlem
406	Dolní Datyně	24.01.2012	M	srážka s vozidlem
470	Hořice u Humpolce	21.04.2013	-	-
478	Šabina	28.02.2013	M	srážka s vozidlem
481	Litvínovice	12.10.2013	M	-
482	Rytířsko	-	M	srážka s vozidlem
487	Hůry	04.11.2013	-	-
489	Přerov	04.12.2013	-	-
497	Dolní Bečva	08.10.2013	-	-
498	Frýdland nad Ostravicí	11.09.2013	-	-

## 3.2 Úprava vzorků k analýze

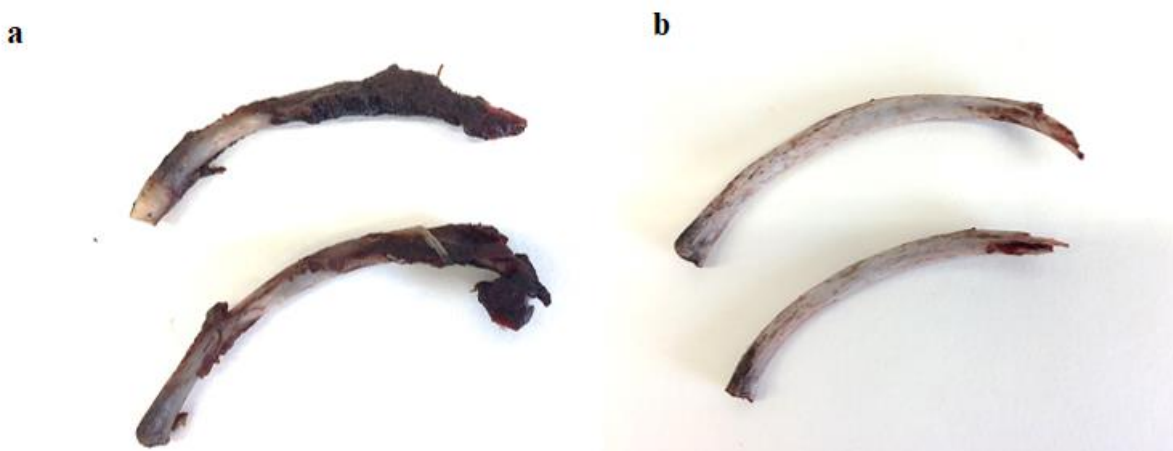
### 3.2.1 Čistění a lyofilizace

Vzorky kostí byly před samotnou úpravou skladovány pod číselným kódem v mrazničce při -18 °C. K očištění kostí byly použity nože s keramickou čepelí (**obr. 5a**) a jakákoli manipulace s kostí probíhala pomocí plastových nástrojů (např. pinzeta, prkénko).

Kosti byly po vyjmutí z mrazničky oškrábány nožem tak, aby byly zbaveny veškerých měkkých tkání včetně šlach, okostice a obou koncových chrupavek (**obr. 6**). Očištěná kost byla nalámána a naštípána na menší části, a pokud to bylo možné, špičkou nože byla vyškrábnuta kostní dřev.



**Obr. 5** a) nůž s keramickou čepelí, b) škrabka na zubní kámen



**Obr. 6** Vzorky vydřích žeber a) před prvním čištěním, b) po prvním čištění

Takto očištěné a naštípané kosti byly vloženy do skleněných lyofilizačních vialek (**obr. 7**). Vialka byla označena číselným kódem vydry a před dalším krokem skladována v mrazničce.



**Obr. 7** Vzorky vydřích žebér připravených k lyofilizaci v lyofilizačních vialkách

Před samotnou lyofilizací bylo nutné kosti na 24 hodin hluboce zamrazit při  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Následná lyofilizace probíhala ve třech krocích:

- I) 1 hodina při 0 Pa
- II) 24 hodin při  $-111\text{ }^{\circ}\text{C}$  a 0 Pa
- III) 4 hodiny při 0 Pa

Po vyjmutí z lyofilizátoru byly kosti opět umístěny do mrazničky, kde byly před dalším postupem skladovány.

Po lyofilizaci byly kosti podrobeny druhému detailnějšímu čištění, kdy škrabkou na zubní kámen (součást zubařského vybavení) (**obr. 5b**) byly odstraněny všechny zbytky tkání z povrchu kosti a všechna kostní dřevě. Je skutečně nutné odstranit většinu tkání a kostní dřevě, jinak hrozí, že při mletí se kostní prach slepí a bude vytvářet hrudky. Poté byl povrch kostí očištěn acetonem, kosti byly vloženy do zkumavek a mikrozkušavek typu Eppendorf a před mletím skladovány v mrazničce  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 3.2.2 Mletí

Samotné mletí probíhalo pomocí kulového vibračního mlýnu Wig-L-Bug 30 (Crescent Dental). Do patronky bylo naváženo  $\pm 200$  mg kosti a mleto 5 nebo 7 minut. Pomletý vzorek (**obr. 8**) byl poté převeden do mikrozkuhavek typu Eppendorf a před samotnou analýzou skladován v mrazničce při  $-18$  °C.

Po pomletí všech vzorků od jedné vydry či králíka bylo nutné patronku vyčistit, aby nedošlo ke cross-kontaminaci. Patronka byla umístěna do kádinky s redestilovanou vodou a vložena na 3 minuty do ultrazvuku. Poté byla řádně omyta v redestilované vodě a osušena.



**Obr. 8** vzorek namleté kosti z králíka (pro porovnání přiložena pětikoruna)

### 3.2.3 Přesívání

Přesně určená a definovaná velikost částic pro přípravu suspenzí byla zajištěna přeseťím vzorků přes síta s deklarovanou velikostí ok. Použila se celkem tři síta. Jedno od firmy pluriSelect Life Science (Leipzig, DEU) s velikostí ok 54  $\mu\text{m}$ , další od firmy Stavební strojírenství n.p. Brno (závod Ivančice, Československo) s velikostí ok cca 160  $\mu\text{m}$  a poslední bylo od firmy Fritsch GmbH (DEU) s velikostí ok 315  $\mu\text{m}$ .

### 3.3 Použité chemikálie

Všechny chemikálie použité pro praktickou část této diplomové práce jsou uvedeny v **tabulce 4**.

**Tabulka 4** Seznam použitých chemikálií

Název	Výrobce
Hydroxyapatit 99,8% syntetický	SIGMA-ALDRICH, Co. (St. Louis, MO, USA)
HNO <sub>3</sub> p.p., 65 % (m/m)	Ing. Petr Švec - PENTA, s.r.o. (Praha)
Standardní roztok Pb – 1,000 ± 0,005 g/l	ANALYTIKA, spol. s r.o. (Praha)
Standardní roztok Pd	SCP Science (Kanada)
Kyselina citronová - monohydrát	SIGMA-ALDRICH GmbH (Sieinheim, DEU)
Glycerin bezvodý p.a.	Lach-Ner, s.r.o. (Neratovice)
Triton X-100 100%	SIGMA-ALDRICH, Co. (St. Louis, MO, USA)
Etanol 96%	Ing. Petr Švec - PENTA, s.r.o. (Praha)
Aceton 100%	Ing. Petr Švec - PENTA, s.r.o. (Praha)
redestilovaná voda Milli-Q Reference	Merck KGaA (Darmstadt, DEU)

### 3.4 Příprava roztoků

#### 3.4.1 Příprava roztoku 2 M HNO<sub>3</sub>

2 M roztok HNO<sub>3</sub> byl připraven odměřením 69 mL podvar. 65% HNO<sub>3</sub> do baňky a následně doplněn redestilovanou vodou na celkový objem 500 mL. Takto připravený roztok byl použit na vymývání a loužení chemického nádobí, a to jak plastového, tak skleněného. Nádobí se nechávalo loužit po dobu 24 hodin.

#### 3.4.2 Příprava zásobních roztoků Pb<sup>2+</sup>

Zásobní roztok olova o koncentraci 10 mg L<sup>-1</sup> byl připraven pipetováním 0,5 mL kalibračního roztoku o koncentraci 1 g L<sup>-1</sup> do baňky o objemu 50 mL a doplněn redestilovanou vodou po rysku. Z takto připraveného roztoku bylo pipetováno 2,5 mL do baňky o objemu 50 mL, přidáno 0,5 mL konc. HNO<sub>3</sub> pro stabilizaci roztoku a doplněno redestilovanou vodou po rysku. Vznikl tak zásobní roztok o koncentraci 500 µg L<sup>-1</sup>.

### **3.4.3 Příprava roztoku kyseliny citronové**

Roztok kyseliny citronové o koncentraci  $200 \text{ g L}^{-1}$  byl připraven navážením 5,469 g (resp. 5,4777 g) monohydrátu kyseliny citronové, rozpuštěním v redestilované vodě, převedením do baňky o objemu 25 mL a doplněním po rysku. Takto připravený roztok byl skladován v chladničce při  $+4^{\circ}\text{C}$ .

### **3.4.4 Příprava zásobních roztoků glycerolu**

20% (m/m) roztok glycerolu byl připraven navážením 52,072 g (resp. 52,076 g) 100% (m/m) roztoku glycerolu, rozpuštěním v redestilované vodě a převedením do baňky o objemu 250 mL a doplněním redestilovanou vodou po rysku.

10% (m/m) roztok glycerolu byl připraven navážením 25,4814 g (resp. 25,4966 g) 100% (m/m) roztoku glycerolu, rozpuštěním v redestilované vodě a převedením do baňky o objemu 250 mL a doplněním redestilovanou vodou po rysku.

### **3.4.5 Příprava roztoku Tritonu X-100**

2% roztok Tritonu X-100 byl připraven pipetováním 1 mL 100% Tritonu X-100 do odměrné baňky o objemu 50 mL a doplněním po rysku 96% etanolem.

### **3.4.6 Příprava roztoku hydroxyapatitu**

Roztok hydroxyapatitu o koncentraci  $10 \text{ g L}^{-1}$  byl připraven navážením 0,25 g (resp. 0,2534 g) syntetického 99,8% hydroxyapatitu, rozpuštěním v redestilované vodě a převedením do baňky o objemu 25 mL a doplněním redestilovanou vodou po rysku.

## 3.5 Příprava vzorků

### 3.5.1 Příprava suspenze SRM pro optimalizaci stanovení Pb

Do 10 mL odměrných baněk bylo naváženo  $\pm 100$  mg SRM 1486 o definované velikosti částic 54, 160 nebo 315  $\mu\text{m}$ . K navážce bylo přidáno cca 5 kapek 2% etanolického roztoku Tritonu X-100 a malý podíl glycerolu o koncentraci 0, 10 nebo 20 % (m/m). V této fázi bylo nutné zkontrolovat, zdali se neutvořily agregáty. Bylo třeba ručně zakroužit s baňkou a prohlédnout obsah. Pokud se po přidání glycerolu utvořily agregáty nebo nešel SRM dostatečně rozmíchat, přidaly se další 1 nebo 2 kapky 2% Tritonu a suspenze se vložila na 1 či 2 minuty do ultrazvuku za občasného zakroužení s baňkou. Tento krok byl opakován tak dlouho, dokud se nerozrušily všechny agregáty. Dále byla pipetována 65% kyselina dusičná, a to 0, 273 nebo 546  $\mu\text{L}$ , baňka byla doplněna po rysku 0, 10 nebo 20% (m/m) roztokem glycerolu a vložena do ultrazvuku na 2, 6 nebo 10 minut. Před samotnou analýzou byla suspenze v baňce ručně promíchána.

### 3.5.2 Příprava suspenzí reálných vzorků

Do 10 mL odměrných baněk bylo naváženo  $\pm 100$  mg vzorku, k navážce bylo přidáno cca 5 kapek 2% roztoku Tritonu X-100 a malý podíl 10% (m/m) glycerolu. Opět bylo nutné zkontrolovat tvorbu agregátů (postup popsán výše). Dále bylo pipetováno 546  $\mu\text{L}$  65% kyseliny dusičné, baňka byla doplněna po rysku 10% glycerolem a vložena do ultrazvuku na 2 minuty.

### 3.5.3 Mikrovlnná mineralizace

Mikrovlnný rozklad kostí byl proveden v zařízení MWS Xpert s použitím systému Multi-tubes . Do každé nádoby byly vloženy tři inserty a do každého insertu bylo naváženo  $\pm 100$  mg vzorku. K navážce bylo pipetováno 1 mL  $\text{H}_2\text{O}_2$  + 1 mL  $\text{HNO}_3$  a do vnější rozkladné nádoby bylo pipetováno 7,5 mL  $\text{H}_2\text{O}_2$  + 7,5 mL  $\text{HNO}_3$ .

**Tabulka 5** Teplotní program pro mikrovlnný rozklad kostí systémem MWS Xpert

Krok	T (°C)	p (bar)	Ramp	Hold	Výkon (%)
1	130	35	5	10	20
2	160	35	5	10	40
3	200	35	5	15	60
4	50	35	1	5	0
5	50	40	0	0	0



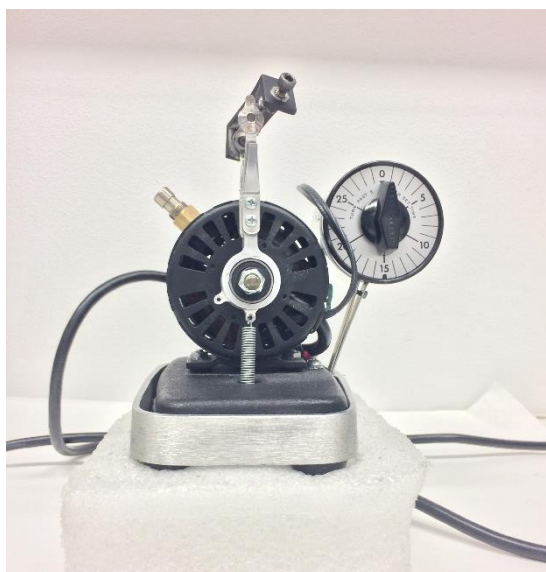
## 3.6 Instrumentace

### 3.6.1 Lyofilizátor

K lyofilizaci kostí byl použit lyofilizátor CoolSafe Pro (LaboGene, Dánsko). Skládá se z komory, kondenzátoru a z vakuového čerpadla. Dále je v přístroji zabudován vestavěný ventil, který umožňuje snadné vypouštění vody po skončení lyofilizace [105]. Postup lyofilizace je popsán v kapitole 2.4.3 na str. 23.

### 3.6.2 Vibrační kulový mlýn

Optimalizace času mletí kostí byla provedena pomocí vibračního kulového mlýnku Wig-L-Bug 30 (Crescent Dental, USA). Vzorke kostí králíků byly mlety po dobu 5 minut, vzorky kostí vyder byly mlety po dobu 7 minut. Mlýn a mlecí patronka jsou na **obr. 9** a **obr. 10**.



**Obr. 9** Vibrační kulový mlýn Wig-L-Bug 30



**Obr. 10** Mlecí patronka s kuličkou

### 3.6.3 Rentgenový difraktometr

Pro zjištění formy kostního minerálu ve vzorcích a jeho procentuálního zastoupení ve vzorku byl použit rentgenový difraktometr D8 Advance (Bruker AXS, DEU) s detektorem LynxEye. Prášková rentgenová difrakce patří mezi základní identifikační a charakterizační metody. Difraktometr nedestruktivně proměřuje téměř jakékoli práškové vzorky bezpečně a jednoduše s minimálním nebo žádným zásahem ze strany uživatele. Výhoda je i minimální množství potřebného vzorku, typicky stačí 0,1 cm<sup>3</sup>, lze však zkoumat i menší objemy. Hlavní účel přístroje je identifikace krystalových fází ve vícefázových vzorcích. Identifikaci napomáhá databáze krystalových struktur [106, 107]. Měření bylo opakováno 200x, difraktogramy sečteny, šum byl potlačen pomocí Fourierovy transformace. Podmínky měření: pokojová teplota, scanování 5–70°, velikost kroku 0,01° za 2 s.

### 3.6.4 Zařízení pro měření velikosti částic Mastersizer 2000MU

Měření velikosti částic v pomletých vzorcích kostí se provádělo na přístroji Mastersizer 2000 MU (Malvern Instruments, Velká Británie), který vyhodnotil velikost částic a jejich procentuální obsah ve vzorku. Přístroj pracuje na principu laserové difrakce a je použitelný pouze pro práškové materiály. Vzorek v práškové formě se smísí s dispergující kapalinou, naředí na správnou koncentraci a vloží do optické části přístroje. Vzorek musí být reprezentativní a dobře dispergovaný, jinak bude měření chybné. Detektory zachycují rozptýlené záření v určitém rozsahu úhlů. Typicky je pro každé měření uděláno přes 2000 snímků. Rychlost snímkování je 1 snímek/ms. Rozsah přístroje je 0,02 – 2000 μm [108]. Měření bylo průtočné, dispergace vzorku proběhla ve vodě pomocí ultrazvuku. Vyhodnocení proběhlo pomocí Fraunhoferovy aproximace. Rozsah měření přístroje je 0,02 – 2000 μm.

### 3.6.5 SEM VEGA3 SBU

Elektronový mikroskop VEGA3 SBU (Tescan, Brno) byl použit pro snímky fragmentů kostí. Mikroskop VEGA3 disponuje vylepšenou vysoce výkonnou elektronikou pro rychlejší pořizování snímků a ultrarychlým skenovacím systémem s kompenzací obrazových odchylek [109]. Mikroskop byl použit ve spojení s analyzátozem Quantax (Bruker Nano XFlash® Detektor 410-M, software Quantax Esprit 1.9, Bruker Nano GmbH, Berlín, DEU). Urychlovací napětí bylo 20 kV. Jako detektory byly použity detektor zpětně odražených elektronů (BSE) a detektor sekundárních elektronů (SE).

### 3.6.6 Zařízení pro mikrovlnný rozklad MWS Xpert

Pro mineralizaci vzorků SRM a kostí vyder bylo použito mikrovlnné rozkladné zařízení MWS Xpert (Berghof, DEU). Zařízení je tvořeno uzavíratelnou kruhovou pecí z masivní nerezové konstrukce. Kruhový tvar pece má za následek vysokou homogenitu mikrovlnného pole (nehomogenita menší než 1 %). Tento typ tlakového mikrovlnného rozkladného zařízení má pomocí dvou magnetronů navýšený maximální výkon na 2000 W, umožňuje bezkontaktní spektrální měření teploty reakční směsi ve všech nádobách pomocí IR spektrometrického čidla a současně bezkontaktní měření tlaku ve všech nádobách. Rozkladné nádoby vydrží tlak až 150 bar a teplotu 300 °C [110, 111].

Vzorek je spolu s činidlem nadávkován do uzavíratelné teflonové nádoby, která se vkládá do teflonového obalu s keramickým tlakovým obalem, který se po uzavření vkládá do zařízení. Všechny rozkladné nádoby jsou vybaveny kovovým diskem, který poskytuje ochranu proti přetlaku [112]. Pro rozklad většího počtu vzorků můžeme použít systém Multi Tube [113].

### 3.6.7 TOF-ICP-MS GBC OptiMass 9500

Přístroj se skládá z hmotnostního spektrometru s ionizací v indukčně vázaném plazmatu a průletového analyzátoru. Vzorek je do přístroje zaváděn pomocí peristaltické pumpy a zmlžen v koncentrickém zmlžovači. Vzniklý aerosol je veden do plazmatu, kde je za atmosférického tlaku atomizován a následně ionizován. Vzniklé ionty jsou vedeny a fokusovány iontovou optikou k ortogonálnímu akcelérátoru, kde jsou urychleny. V poslední fázi ionty vstupují do průletové zóny, kde jsou otočeny iontovým reflektorem a dopadají na detektor.

Současná povaha přístroje OptiMass 9500 umožňuje nejen semikvantitativní, ale i retrospektivní semikvantitativní analýzu. Vysoká skenovací rychlost (30 000 skenů/s) a vysokorychlostní sběr dat umožňují analýzu přechodových signálů generovaných např. z jednorázové laserové ablace, elektrotermického odpařování nebo průtokovou injekční analýzou. Každou sekundu se pak tvoří 50 integrovaných hmotnostních spekter. Tím umožňuje řadu aplikací, které předtím kvůli pomalé sekvenční povaze hmotnostních spektrometrů nebyly možné [114].

Další předností je nový software Fingerprinting, který využívá porovnávání skenů, za účelem zjistit, jak úzce se shodují. Tento typ analýzy zahrnuje statistické porovnání testovacího spektra se spektrem známého materiálu. Může to být například srovnání SRM se vzorkem [114].

**Tabulka 6** Parametry nastavení TOF-ICP-MS GBC OptiMass 9500

<b>ICP Source</b>	
Rf power	1200 W
Plasma gas flow rate	13 Lmin <sup>-1</sup>
Auxiliary gas flow rate	0,550 Lmin <sup>-1</sup>
Nebuliser gas flow rate	0,870 Lmin <sup>-1</sup>
<b>Mass Spectrometr</b>	
<b>Ion optics</b>	
Skimmer	-1200 V
Extraction	-1250 V
Z1 gain	-950 V
Y mean	-200 V
Y deflection	0 V
Z lens mean	-1100 V
Z lens deflection	-2 V
Lens body	-160 V
<b>Pulse shaping</b>	
Fill	-38 V
Fill bias	-0,38 V
Fill grid	-35 V
Pushout plate	645 V
Pushout grid	-480 V
Blanker	150 V
Blanker spectral frequency	33 kHz
Reflectron	670 V
<b>Detection</b>	
Multiplier gain	2650 V
Ion threshold	30,35 mV
Integration Windows	Auto
Measurement mode	Pulse counting/analog

### 3.6.8 HR-CS-ETAAS 600 contrAA

Atomový absorpční spektrometr s elektrotermickou atomizací s kontinuálním zdrojem záření a vysokým rozlišením HR-CS-ETAAS 600 contrAA (Analytik Jena AG, DEU) se skládá z xenonové krátké obloukové lampy jako zdroje kontinuálního záření, Echelle monochromátoru s křemenným hranolem a CCD pole. Intenzita záření z xenonové lampy je značně vyšší, nežli je tomu u tradičních zdrojů záření, což poskytuje excelentní poměr signálu k šumu, zlepšuje detekční limity a přesnost. Integrovaná kamera umožňuje detailní pozorování všech procesů v grafitové peci – dávkování, sušení i pyrolýzu. Přístroj umožňuje simultánní nebo multiprvkovou analýzu v rozsahu vlnových délek 185 až 900 nm a pracuje s přesností 2 pm. Příčný ohřev grafitové pece spolu s přesně programovatelnou teplotou poskytuje optimální atomizační podmínky, vysokou přesnost a dlouhou životnost grafitové pece [63, 64].

**Tabulka 7** Teplotní program pro stanovení Pb<sup>a</sup>

Krok	T (°C)	Nárůst (°C·s <sup>-1</sup> )	Držení (s)	Čas (s)	Průtok plynu Ar (L min <sup>-1</sup> )
Sušení	95	20	40	43,3	3,0
Sušení	120	5	5	10	3,0
Pyrolýza	1100	100	1	9,5	3,0
Pyrolýza	1100	0	10	10	0,0
Atomizace	1600	3000	2	2,2	0,0
Čištění	2450	500	4	5,5	3,0

<sup>a</sup> v přítomnosti 1 µg Pd + 50 µg kyseliny citronové

### 3.6.9 Další používané přístroje, pomůcky a softwary

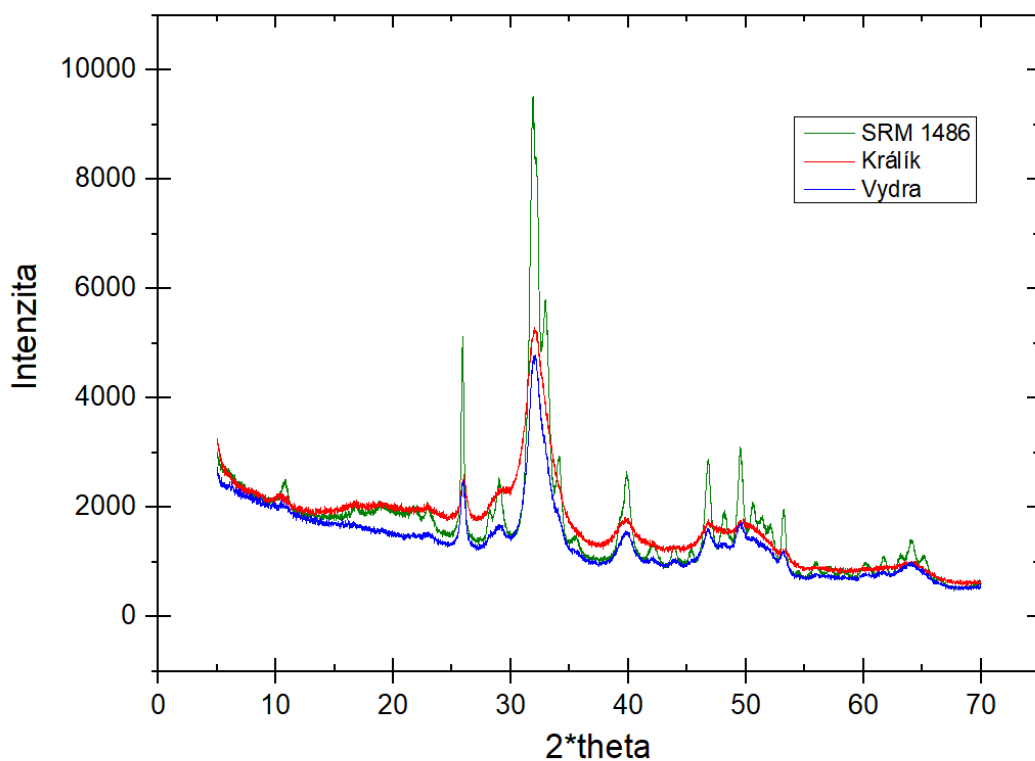
- Podvarové destilační zařízení BSB 939IR (Berghof GmbH, DEU)
- Zařízení pro přípravu redestilované vody Merck KGaA (Darmstadt, DEU)
- Ultrazvuk Bandelin Sonorex (Berlín, DEU)
- Analytické váhy KERN 870 (Kern, DEU)
- Laboratorní nádobí SIMAX (ČR)
- Sada automatických pipet (Biohit, DEU)
- Origin Pro 2017 64Bit (OriginLab, USA)
- Programy STATISTICA (StatSoft, USA) a QC Expert (TriloByte, ČR)

## 4 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 4.1 Optimalizace přípravy suspenze

Z **tabulky 2** v kapitole 2.5 je patrné, že pro analýzu suspenzí může být využita celá řada materiálů – od vzorků potravin, přes biologický materiál, až k půdám a sedimentům. Autoři při přípravě těchto materiálů měli jednu obrovskou výhodu – jejich materiály jsou neživé, v čase neměnné věci. Naproti tomu kost je jejich pravý opak. Kost je živý dynamický systém, který má obrovskou proměnlivost nejen v závislosti na živočišném druhu, ale dále i na věku, pohlaví, fyzické a zdravotní kondici aj. Bohužel nebylo v možnostech této diplomové práce ověřit univerzálnost metody napříč živočišným spektrem, a dále napříč věkem a zdravotním stavem. Pro optimalizaci postupů a metody přípravy suspenze a následnou analýzu bylo využito pouze úzkého spektra dostupných vzorků. Pro optimalizaci postupu přípravy suspenze byly využity kosti vyder a králíků, které jsou malé, praktické a dobře se s nimi manipuluje. Pro optimalizaci samotné analýzy byl použit SRM 1486, který se skládá z kostní moučky koz domácích a krav domácích. Otázka univerzálnosti metody tedy prozatím zůstane neobjasněna a může být tématem jiné práce.

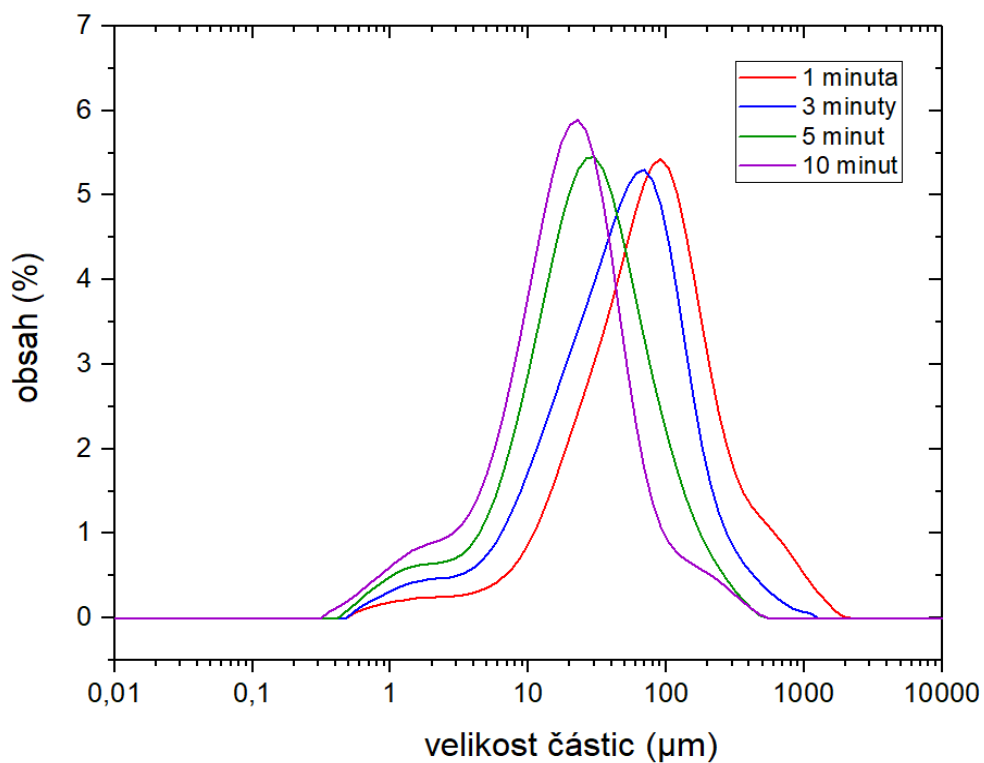
Jak již bylo zmíněno dříve, kosti králíků i vyder byly očištěny, lyofilizovány, pak znovu očištěny, namlety a až poté podrobeny testům a analýzám. Jako první byly vzorky proměřeny na rentgenovém difraktometru D8 Advance (Bruker AXS, DEU) s detektorem LynxEye, za účelem zjistit variabilitu obsahu hydroxyapatitu v kostech a jeho přibližné procentuální zastoupení. Analýzou bylo zjištěno, že obsažený minerál je hydroxyapatit a přibližný obsah ve vzorcích činí v SRM 85 %, v králíčích kostech 84 % a ve vydřích kostech 94 % (**obr. 11**). Vyšší obsah hydroxyapatitu v kostech vydry lze vysvětlit odlišným stářím jedince. Od chovatele králíků zaručeně víme, že poražený jedinec nebyl starší než jeden rok. U vydry věk není znám. Ale čím je kost starší, tím více se amorfni hydroxyapatit mění na svou krystalickou formu zabudováváním kationtů vápníku do své struktury (například u člověka je kostra plně osifikována až kolem 20. roku věku). Jakákoli analýza kostí tedy závisí a bude záviset na obsahu hydroxyapatitu, což dále ovlivňuje i dobu mletí a při vlastní analýze i korekci pozadí (viz dále).



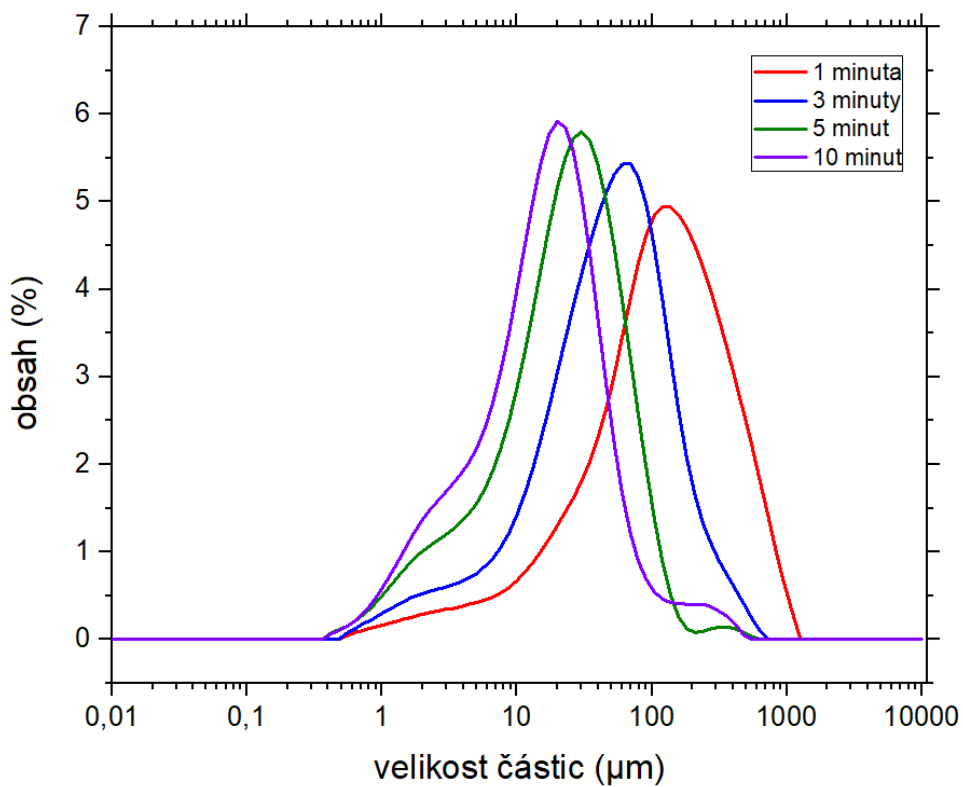
**Obr. 11** Difraktogramy apatitu ve vzorcích SRM 1486 a v pomletých vzorcích králíka a vydry

Jak již bylo zmíněno v textu, při vytváření suspenzí je důležité zajistit vhodnou velikost částic, a ta souvisí s dobou mletí. Z důvodu odlišného procentuálního obsahu hydroxyapatitu v kostech vydry a králíka bylo nutné dobu mletí optimalizovat pro každý druh.. Proto byly vzorky kostí králíka a vydry podrobeny mletí po 4 různě dlouhé časy – 1 minuty, 3 minuty, 5 minut a 10 minut. Tyto 4 vzniklé prášky se pak nechaly proměřit na přístroji Mastersizer 2000MU (Malvern Instruments, Velká Británie), který vyhodnotil velikost částic a jejich procentuální obsah ve vzorku.

Optimální doba mletí byla určena na základě střední velikost částic. Z **obr. 12** a **13** je zjevné, že po 5 minutách mletí se střední velikost částic u obou vzorků spolehlivě pohybovala pod 100  $\mu\text{m}$ , což je pro analytické účely dostačující. Proto pro králíčí vzorky byla optimální doba mletí vyhodnocena na 5 minut. Kratší časy (1 a 3 minuty) nestačí, částice jsou ještě příliš velké. Čas mletí 10 minut je naopak příliš dlouhý a zbytečný, neboť z grafu je patrné, že velikost částic vzniklá po 5 a 10 minutách mletí se zase tolik neliší. Pro vydří vzorky byla optimální doba mletí vyhodnocena na 7 minut, z důvodu větší tvrdosti kostí, která je spojená s vyšším obsahem krystalického hydroxyapatitu.



**Obr. 12** Velikost kostních fragmentů králíka po uvedených časech mletí

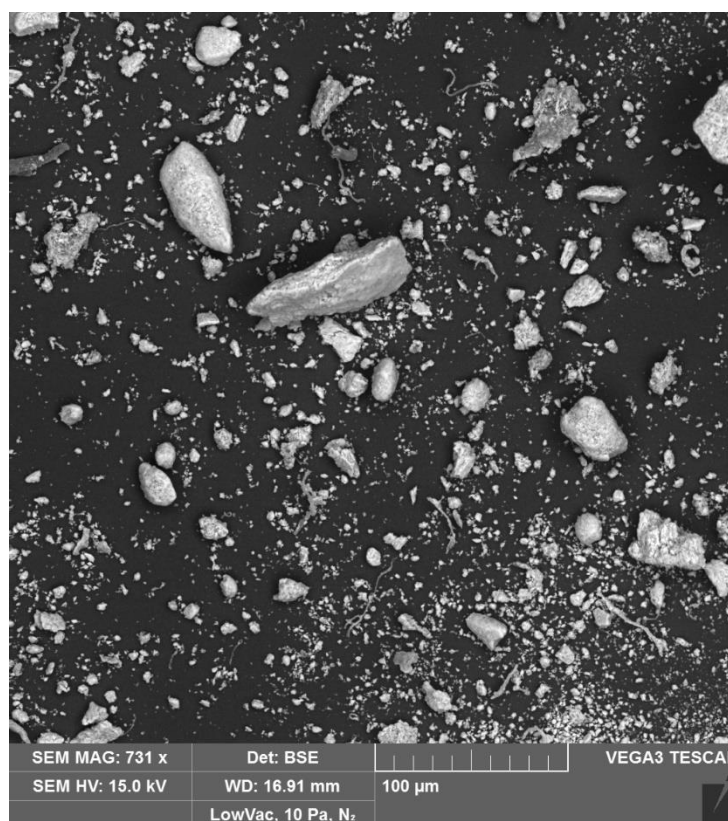


**Obr. 13** Velikost kostních fragmentů vydry po uvedených časech mletí

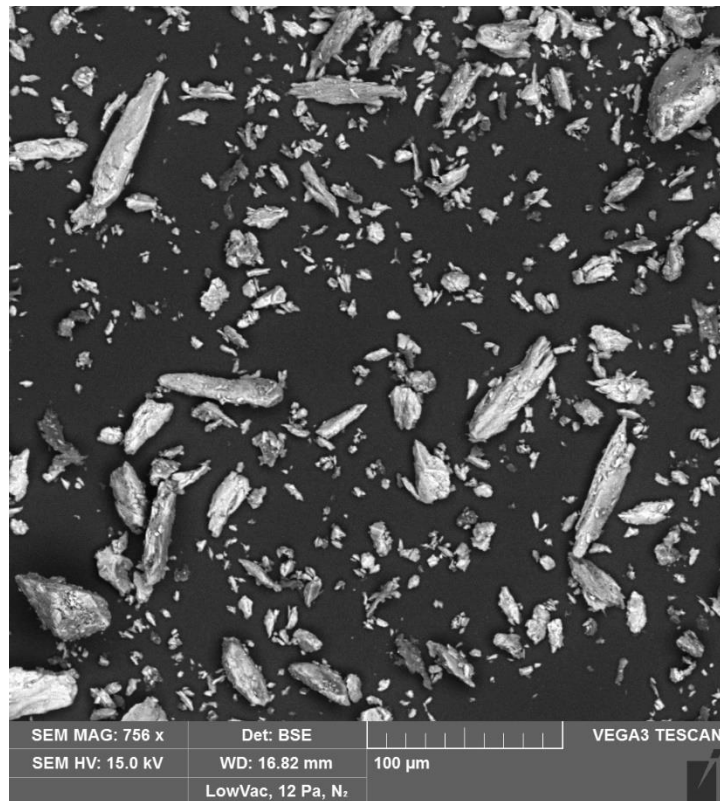


Výsledky laserové difrakce doplňují snímky z elektronového mikroskopu. Mikroskop VEGA3 proměřil vzorek SRM 1486 (**obr. 14**) a pomleté vzorky králíka (**obr. 15**) a vydry (**obr. 16**) po optimalizovaných časech mletí. Pro optimalizaci přímé analýzy suspenze, kde byl využit frakcionovaný faktorový plán (viz kap. 4.3), byla jako horní hranice velikosti částic stanovena hodnota 315  $\mu\text{m}$ . Snímky pomletých vzorků králíka i vydry potvrzují, že velikost částic nepřesahuje 100  $\mu\text{m}$ . Pro SRM 1486 výrobce deklaruje, že největší velikost částic je 355  $\mu\text{m}$ .

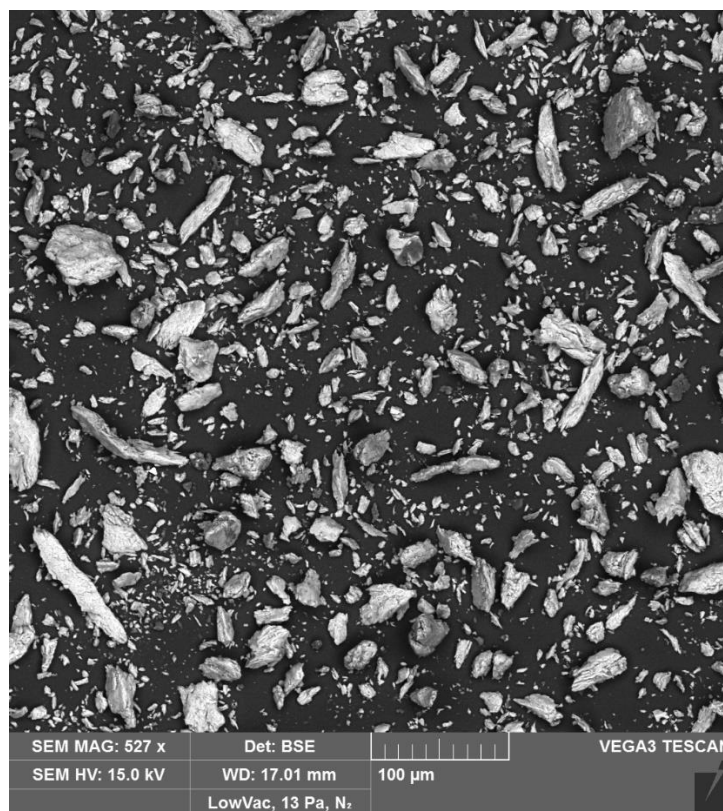
Dále byly kosti proměřeny pomocí EDX pro zjištění prvkového složení a přibližného určení jejich hmotnostních procent. Spektra jsou na **obr. 17, 18 a 19**. **Tabulka 8** pak obsahuje hmotnostní procenta pro jednotlivé prvky zjištěné ve vzorcích.



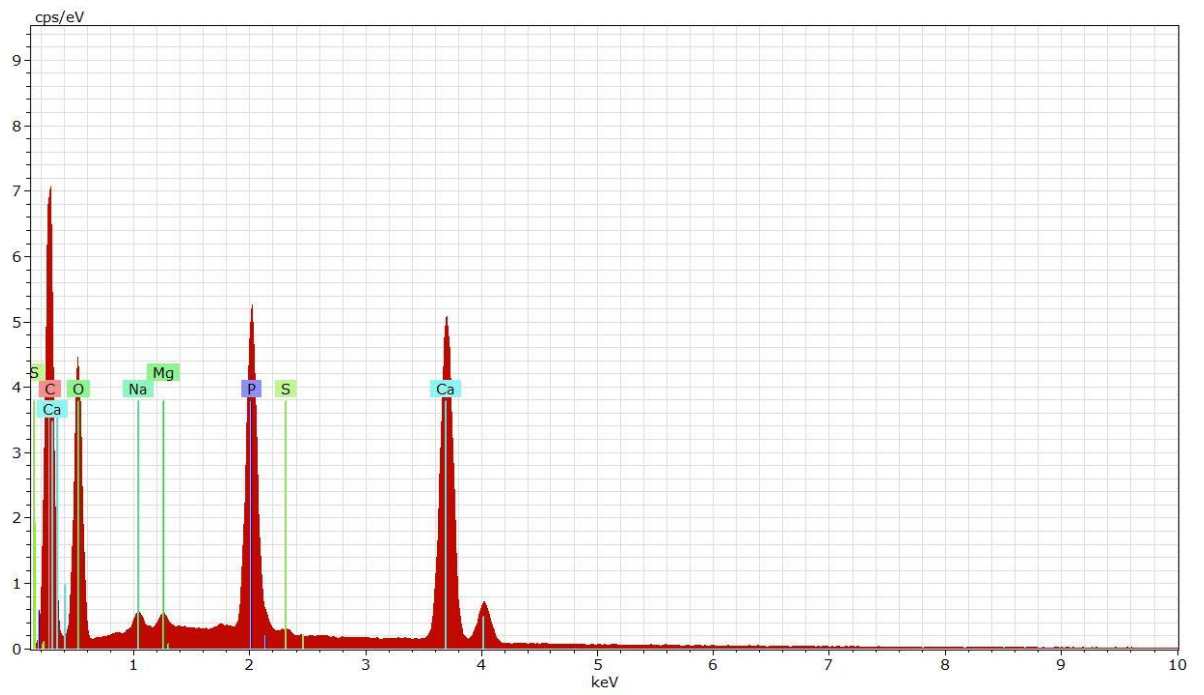
**Obr. 14** Snímek z elektronového mikroskopu pro SRM 1486



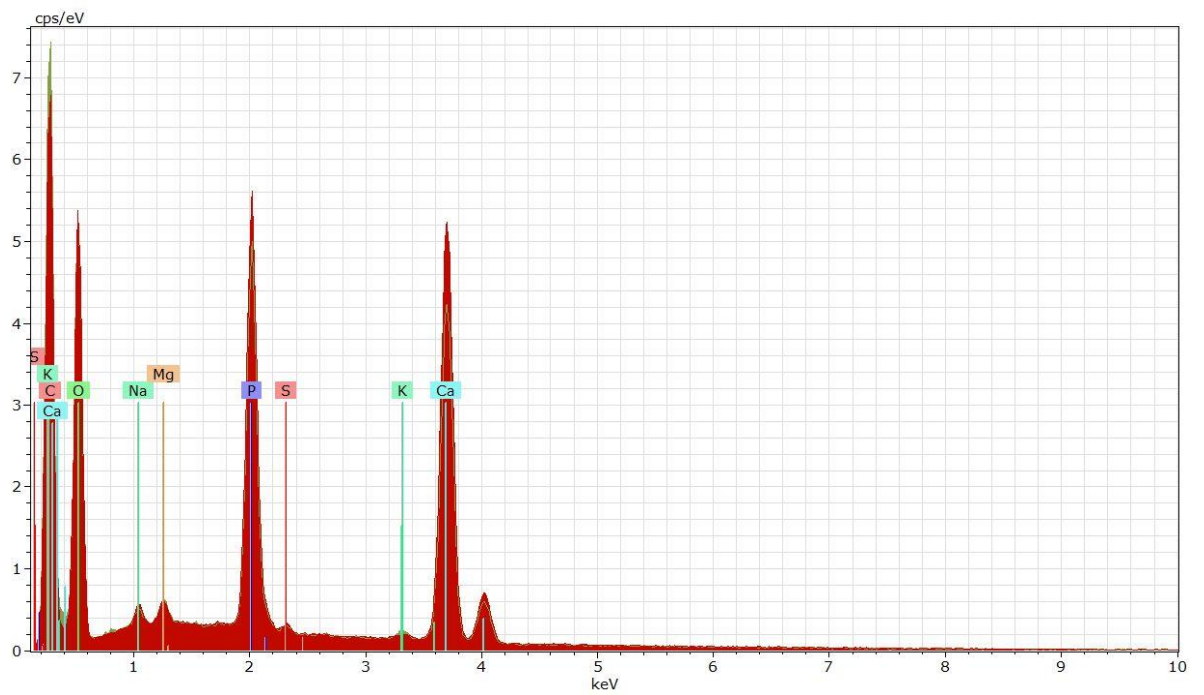
**Obr. 15** Snímek z elektronového mikroskopu pro králičí vzorek



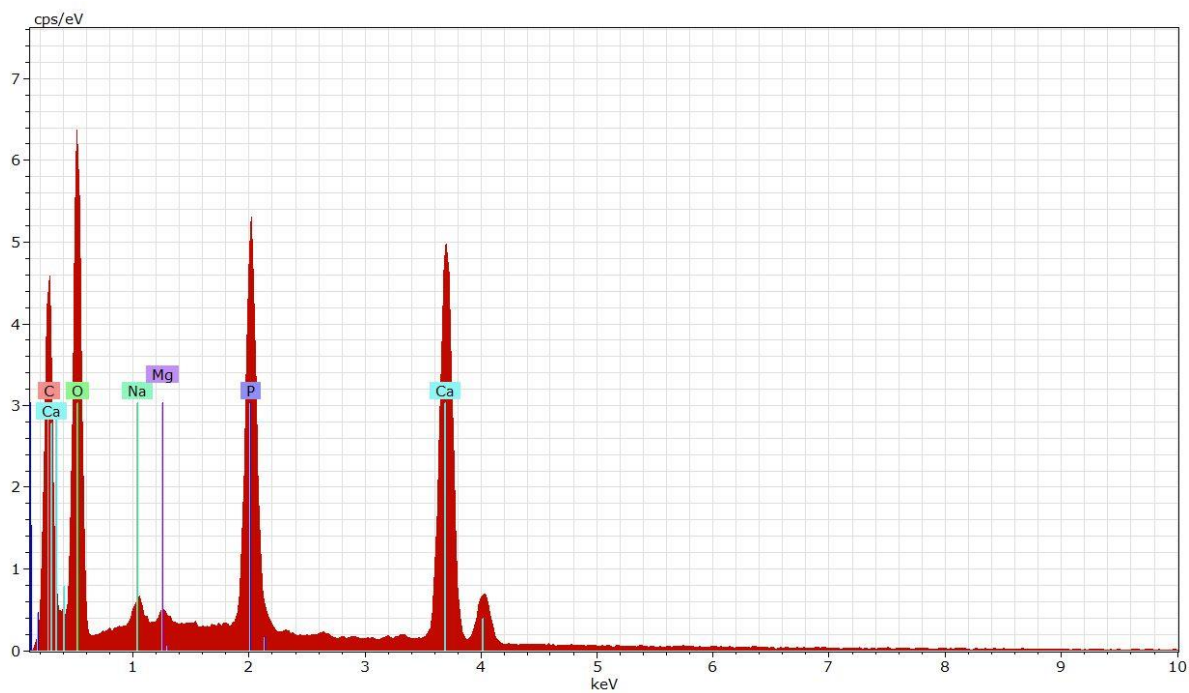
**Obr. 16** Snímek z elektronového mikroskopu pro vydří vzorek



**Obr. 17** Spektrum z EDX pro SRM 1486



**Obr. 18** Spektrum z EDX pro králíčí vzorek



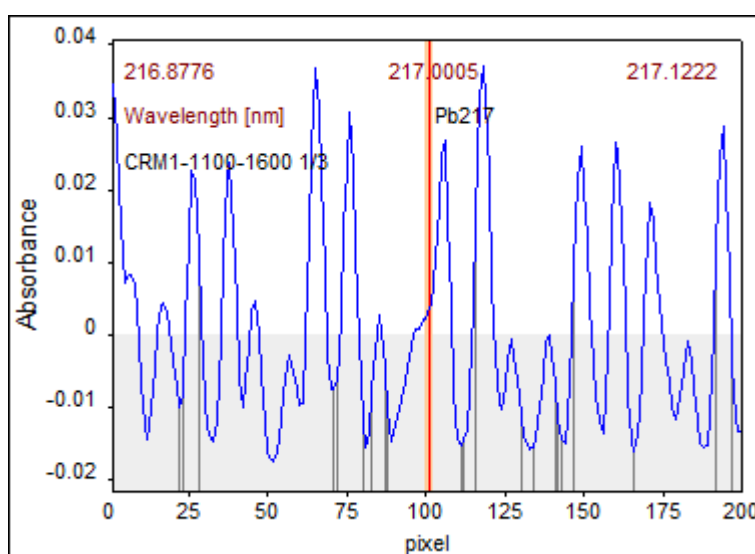
**Obr.19** Spektrum z EDX pro vydří vzorek

**Tabulka 8** Výsledky EDX (% , m/m)

Prvek	SRM 1486 deklarováno	SRM 1486 nalezeno	Králík	Vydra
<b>Ca</b>	26,58 ± 0,24	22 ± 1,4	24,7 ± 1,5	26,6 ± 1,7
<b>O</b>	-	24,4 ± 5,9	33,2 ± 7,9	34,7 ± 8,4
<b>P</b>	12,30 ± 0,19	9,8 ± 0,8	9,9 ± 0,8	9,1 ± 0,8
<b>Na</b>	0,5	0,54 ± 0,13	0,52 ± 0,12	0,67 ± 0,15
<b>Mg</b>	0,466 ± 0,017	0,36 ± 0,09	0,45 ± 0,104	0,25 ± 0,09
<b>S</b>	-	0,21 ± 0,07	0,18 ± 0,07	-
<b>K</b>	0,0412 ± 0,0004	-	0,15 ± 0,07	-

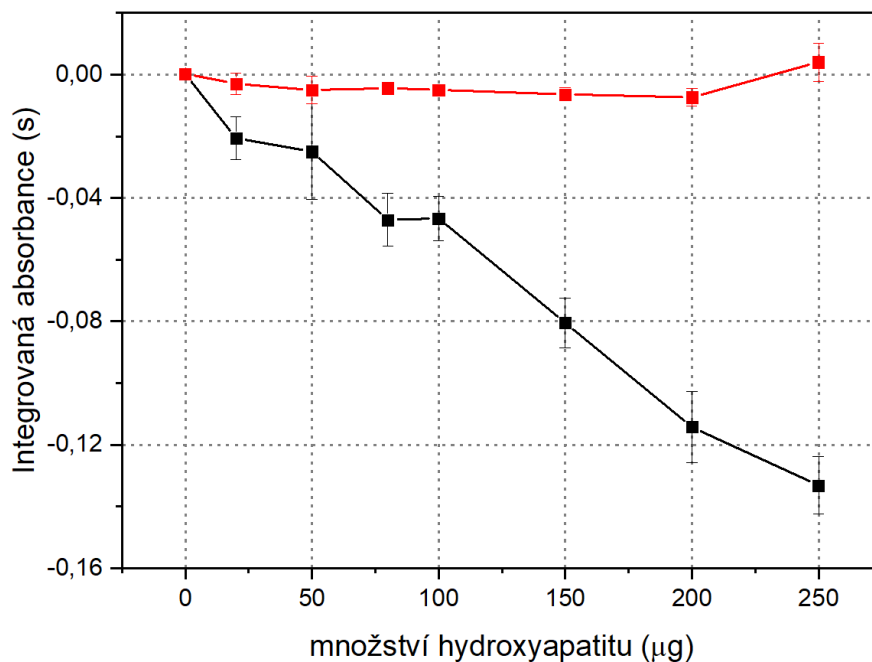
## 4.2 Aplikace matematické korekce pro eliminaci spektrálních interferencí

Jak již bylo zmíněno v předchozím textu, přítomnost PO molekul z krystalů hydroxyapatitu po termickém rozkladu v ETA komplikuje stanovení Pb vytvořením komplikovaných molekulových absorpčních spekter. Na **obr. 20** lze pozorovat složitost tohoto spektra. Červená vertikální linie zobrazuje analytickou čáru olova 217,0 nm. Je zřejmé, že z tohoto spektra nelze správně odečíst absorbanci olova.



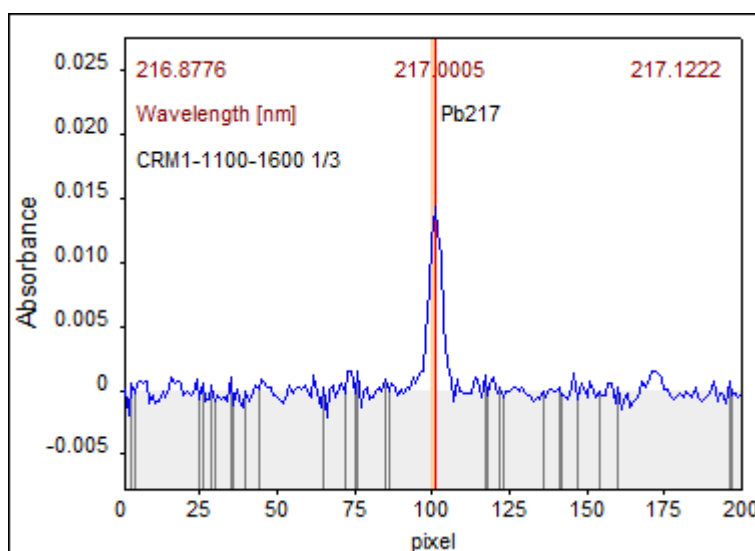
**Obr. 20** HR-CS-ETAAS spektrum SRM 1486 bez aplikace korekce s přidavkem Pd + CA, TP = 1100 °C, TA = 1600 °C

Pro potvrzení myšlenky, že utvořené molekulové spektrum pochází z PO molekul vzniklých termickým rozkladem hydroxyapatitu, bylo zapotřebí proměřit roztok čistého hydroxyapatitu. Pro tento účel byl připraven roztok syntetického hydroxyapatitu o koncentraci 10 g L<sup>-1</sup>. Rozsah měření vychází z předpokladu, že pokud v celém objemu roztoku dávkovaného do kyvety (25 μL) bude obsažen pouze hydroxyapatit, pak obsah hydroxyapatitu v tomto objemu bude 250 μg. Účinnost matematické korekce pak byla proměřena v celém tomto rozsahu. Na **obr. 21** je vidět, že integrovaná absorbance bez aplikace matematické korekce klesá s množstvím obsaženého hydroxyapatitu (černá linie). Je to způsobeno především překorigováním analytického signálu, kdy poté systém integruje absorbanci do záporných hodnot. Po aplikaci matematické korekce (červená linie) je tento problém dostatečně potlačen.



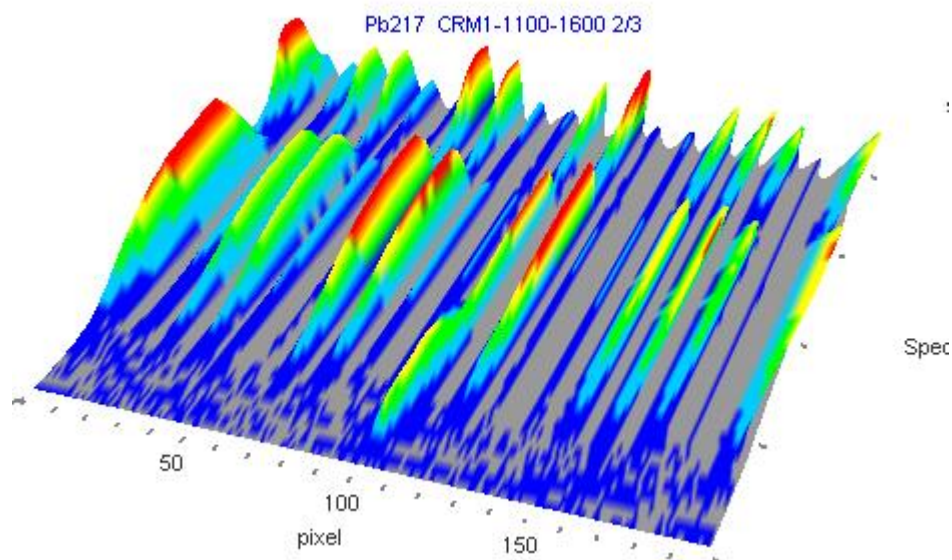
**Obr. 21** Závislost integrované absorbance na množství hydroxyapatitu

Tato matematická korekce byla poté aplikována na spektrum SRM 1486 z **obr. 20**. Po úpravě a odečtení korekčního spektra lze signál Pb bez problému identifikovat a správně vyhodnotit. HR-CS-ETAAS spektrum s aplikovanou matematickou korekcí je uvedeno na **obr. 22**.

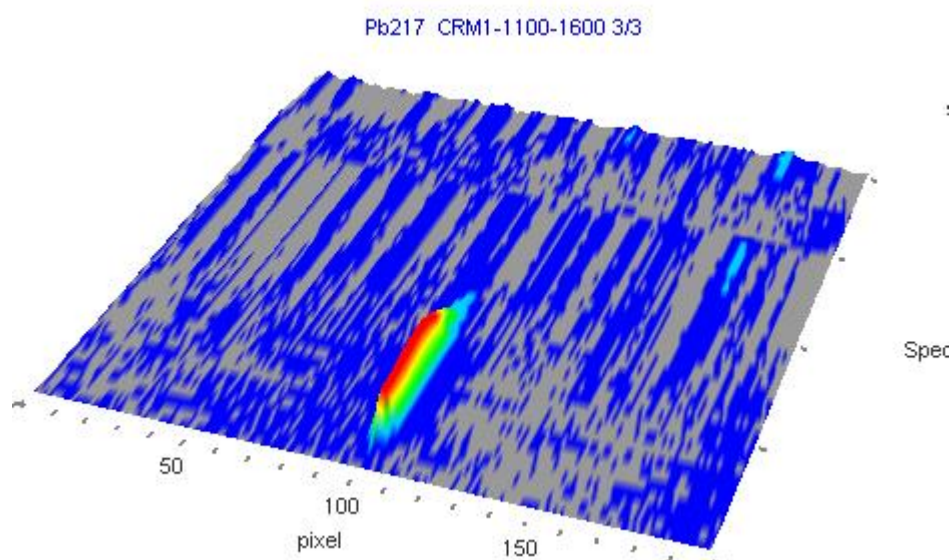


**Obr. 22** HR-CS-ETAAS spektrum SRM 1486 s korekcí a s přidavkem Pd + CA, TP = 1100 °C, TA = 1600 °C

HR-CS-ETAAS také umožňuje zobrazení spektra ve 3D, čímž bylo možné potvrdit účinnost matematické korekce a zobrazení okolí analytické čáry olova. 3D spektra bez aplikace matematické korekce a s její aplikací jsou na **obr. 23** a **obr. 24**.



**Obr. 23** 3D HR-CS-ETAAS spektrum SRM 1486 bez korekce s přidavkem Pd + CA, TP = 1100 °C, TA = 1600 °C



**Obr. 24** 3D HR-CS-ETAAS spektrum SRM 1486 s korekcí a s přidavkem Pd + CA, TP = 1100 °C, TA = 1600 °C

### 4.3 Optimalizace přímé analýzy suspenzí pro stanovení Pb v kostech za využití frakcionovaného faktorového plánování

Bylo vytipováno sedm faktorů, na kterých závisí analýza Pb v suspenzích kostí: koncentrace glycerolu, množství  $\text{HNO}_3$ , velikost částic, doba ultrazvukování, teplota pyrolýzy a atomizace a množství modifikátoru. Význam těchto faktorů a důvod jejich použití byl diskutován v teoretické části této diplomové práce. Směs modifikátorů Pd + CA byla vybrána na základě předchozích dobrých zkušeností [115, 116].

Faktorový plán byl vytvořen v programu Statistica 12 pomocí Box Hunter-Hunterova frakcionovaného faktorového plánování. Tento systém plánování slouží ke zkrácení počtu experimentů s cílem určit hlavní faktory, jejich vliv a nastavení jednotlivých úrovní. Nicméně toto zkrácení má za následek ztrátu informací, které se označují jako interakce vyššího řádu, avšak tyto interakce často postrádají fyzikálně-chemický smysl, zpravidla nejsou statisticky významné, a je proto možné je zanedbat. Plný faktorový plán by vyžadoval 128 experimentů (sedm faktorů na dvou úrovních =  $2^7 = 128$ ), při opakování ( $n = 3$ ) by to bylo celkem 384 pokusů. Frakcionovaným faktorovým plánováním  $2^{7-4}$  se zařazením centrálního bodu a s opakováním ( $n = 3$ ) byl tento počet snížen na 33 pokusů. Sledována byla intenzita analytického signálu Pb, tj. v tomto případě absorbance. Schéma plánu je v **tabulce 9**.

Pro určení statisticky významných faktorů byl po ukončení plánu sestrojen Paretův graf (**obr. 25**), který sestupně seřadil faktory dle jejich významnosti a určil jejich vliv. Červená vertikální linie pak znázorňuje hladinu významnosti, která je dána jako  $p = 5\%$ . Dle Paretova grafu má největší vliv centrální bod a dále teplota pyrolýzy. Velký vliv centrálního bodu poukazuje na nelineární závislost. Vliv teploty pyrolýzy má dle očekávání záporný efekt, tj. se zvyšující se teplotou pyrolýzy klesá absorbance. Dalším významným faktorem je přídavek  $\text{HNO}_3$ , jejíž vliv má kladný efekt. Tedy se zvyšujícím se přídavkem  $\text{HNO}_3$ , roste odezva signálu, protože jak již bylo zmíněno v textu, přídavek  $\text{HNO}_3$  může podporovat extrakci iontů. O něco menší vliv má potom koncentrace modifikátoru a koncentrace glycerolu. Ta je důležitá pro vzhled částic a stabilizaci suspenze. Její vliv je kladný, tedy čím vyšší koncentrace, tím lepší odezva signálu.

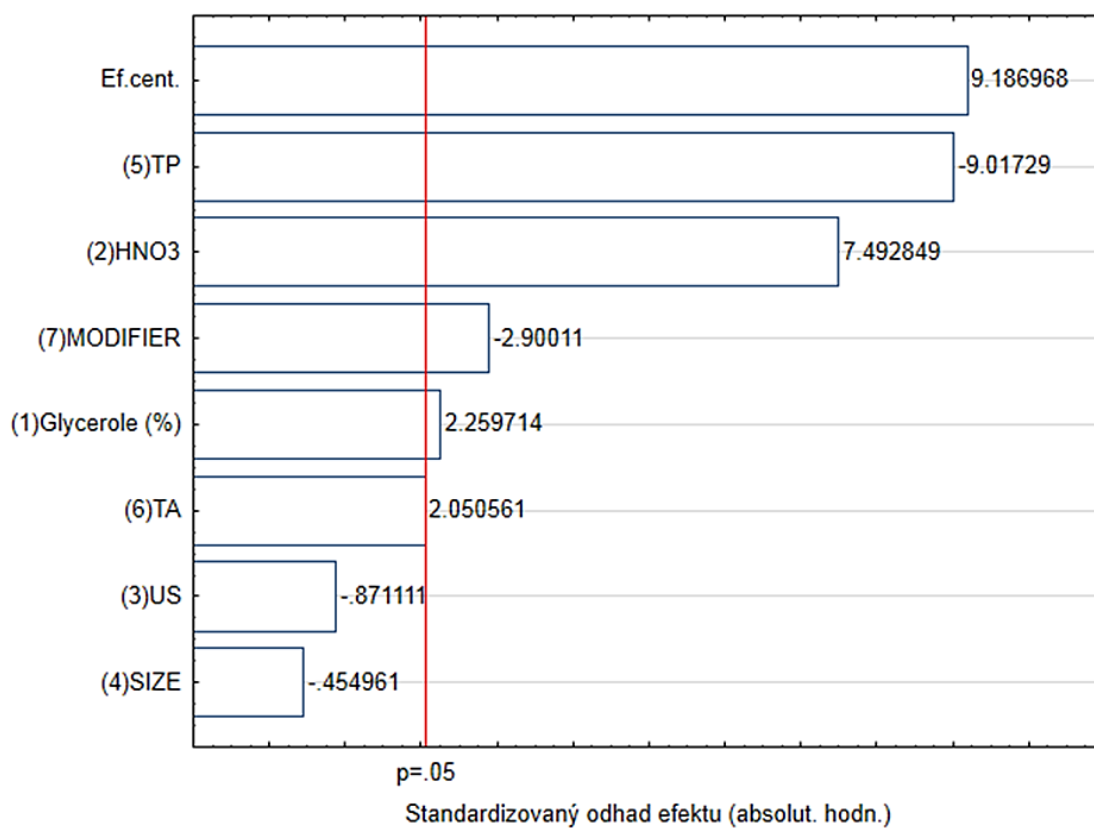
Teplota atomizace, doba ultrazvukování a velikost částic byly označeny jako nevýznamné faktory. Jelikož byla velikost částic označena jako nevýznamná, odpadá další krok



přípravy vzorku, a to je přesívání přes síta o definované velikosti částic, což opět přispívá k urychlení analýzy, neboť přesívání kostní moučky přes síta byl nejvíce časově náročný krok přípravy suspenze.

**Tabulka 9** Frakcionovaný faktorový plán pro optimalizaci přímé analýzy suspenze kostí

Pokus č.	Replika	Centr.b.	Glycerol (%)	HNO <sub>3</sub> (%)	UZ (min)	velikost (μm)	TP (°C)	TA (°C)	modif. (μL)	Absorb.
2	1	1	20.0	0.0	2.0	54	900	2100	10	0.0409
11 (C)	1	0	10.0	2.5	6.0	160	1150	1800	6	0.1297
23	3	1	0.0	0.0	2.0	315	1400	2100	2	0.004
26	3	1	20.0	5.0	2.0	315	900	1500	2	0.1476
13	2	1	20.0	0.0	2.0	54	900	2100	10	0.0367
16	2	1	0.0	0.0	10.0	315	900	1500	10	0.0158
17	2	1	20.0	0.0	10.0	54	1400	1500	2	0.004
22 (C)	2	0	10.0	2.5	6.0	160	1150	1800	6	0.134
1	1	1	0.0	0.0	2.0	315	1400	2100	2	0.0055
12	2	1	0.0	0.0	2.0	315	1400	2100	2	0.004
28	3	1	20.0	0.0	10.0	54	1400	1500	2	0.003
32 (C)	3	0	10.0	2.5	6.0	160	1150	1800	6	0.1316
20 (C)	2	0	10.0	2.5	6.0	160	1150	1800	6	0.1325
8	1	1	20.0	5.0	10.0	315	1400	2100	10	0.0584
33 (C)	3	0	10.0	2.5	6.0	160	1150	1800	6	0.1203
14	2	1	0.0	5.0	2.0	54	1400	1500	10	0.0305
19	2	1	20.0	5.0	10.0	315	1400	2100	10	0.0466
30	3	1	20.0	5.0	10.0	315	1400	2100	10	0.0472
27	3	1	0.0	0.0	10.0	315	900	1500	10	0.0457
4	1	1	20.0	5.0	2.0	315	900	1500	2	0.1303
21 (C)	2	0	10.0	2.5	6.0	160	1150	1800	6	0.1065
9 (C)	1	0	10.0	2.5	6.0	160	1150	1800	6	0.1191
25	3	1	0.0	5.0	2.0	54	1400	1500	10	0.0225
31 (C)	3	0	10.0	2.5	6.0	160	1150	1800	6	0.1237
6	1	1	20.0	0.0	10.0	54	1400	1500	2	0.0017
3	1	1	0.0	5.0	2.0	54	1400	1500	10	0.03
7	1	1	0.0	5.0	10.0	54	900	2100	2	0.1388
15	2	1	20.0	5.0	2.0	315	900	1500	2	0.1233
29	3	1	0.0	5.0	10.0	54	900	2100	2	0.1262
24	3	1	20.0	0.0	2.0	54	900	2100	10	0.1407
18	2	1	0.0	5.0	10.0	54	900	2100	2	0.1217
5	1	1	0.0	0.0	10.0	315	900	1500	10	0.0261
10 (C)	1	0	10.0	2.5	6.0	160	1150	1800	6	0.1271



**Obr. 25** Paretův graf standardizovaných efektů

**Tabulka 10** Tabulka ANOVA

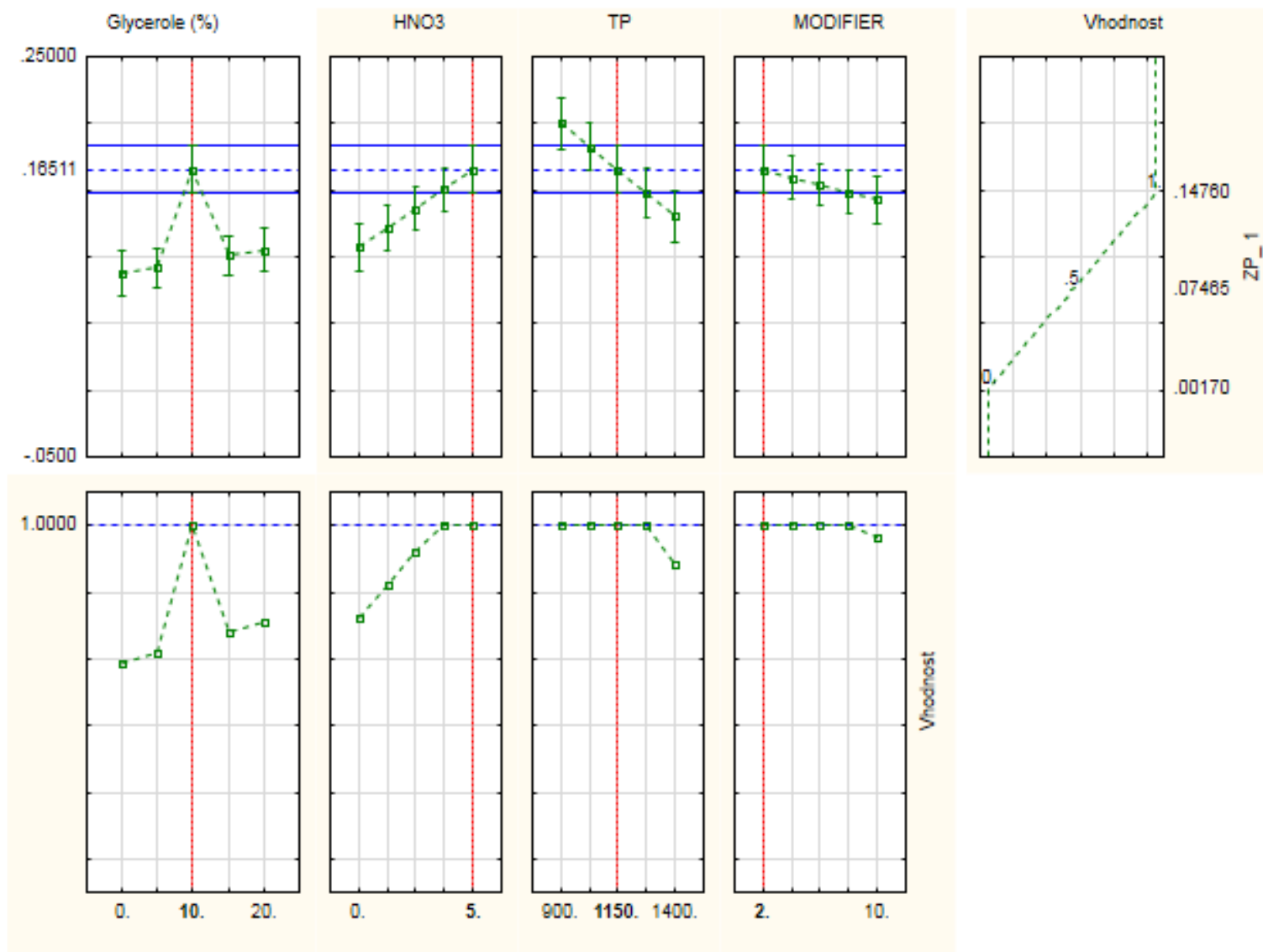
ANOVA, prom. absorbance Pb, $R^2 = 90,984 \%$ , 7 faktorů na 2 úrovních, návrh $2^{7-4}$					
Faktor	SS	df	MS	F	p
<b>Centr. bod</b>	<b>0,030256</b>	<b>1</b>	<b>0,030256</b>	<b>84,40038</b>	<b>0,000000</b>
<b>Glycerol (%)</b>	<b>0,001831</b>	<b>1</b>	<b>0,001831</b>	<b>5,10631</b>	<b>0,033194</b>
<b>HNO<sub>3</sub></b>	<b>0,020126</b>	<b>1</b>	<b>0,020126</b>	<b>56,14279</b>	<b>0,000000</b>
<b>Ultrazvuk</b>	0,000272	1	0,000272	0,75883	0,392324
<b>Velikost částic</b>	0,000074	1	0,000074	0,20699	0,653226
<b>TP</b>	<b>0,029149</b>	<b>1</b>	<b>0,029149</b>	<b>81,31159</b>	<b>0,000000</b>
<b>TA</b>	0,001507	1	0,001507	4,20480	0,051383
<b>Modifikátor</b>	<b>0,003015</b>	<b>1</b>	<b>0,003015</b>	<b>8,41064</b>	<b>0,007858</b>
<b>Chyba</b>	0,008604	24	0,000358		
<b>Celk. SS</b>	0,095420	32			

**Tabulka 10** pak numericky vyjadřuje to, co je patrné z Paretova grafu. Tučně jsou označeny faktory, které ve FFP vyšly jako statisticky významné, dle nastavené hladiny významnosti  $p = 0,05\%$  (poslední sloupec tabulky). Z Paretova grafu není zcela jasné, zdali teplota atomizace je statisticky významná nebo není. Potvrzení o její nevýznamnosti nám dokládá až tato tabulka.

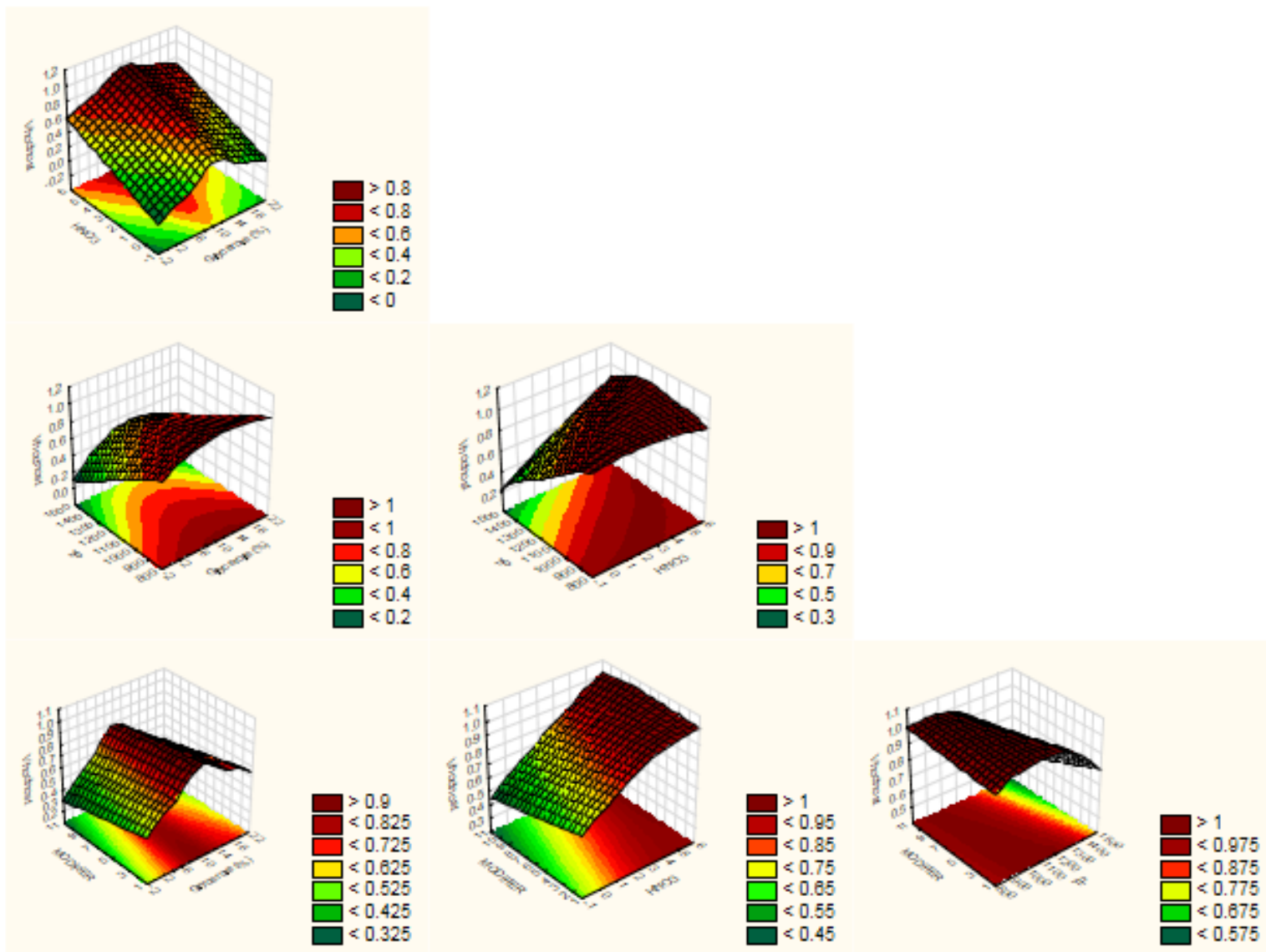
Diagramy profilů, odezev a vhodnosti (**obr. 26**) pro výsledky FFP uvedeného v **tabulce 9** zobrazují vliv sledovaných parametrů v definovaném rozmezí na hodnotu absorbance analytu. Vhodnost nastavení daného parametru se určuje na základě priority sledované veličiny, v našem případě absorbance. Nejmenší stanovené absorbanci byla přiřazena nulová vhodnost, té největší pak byla přiřazena vhodnost o velikosti jedné. Diagramy byly sestaveny jen pro faktory, které byly na základě výsledků z Paretova grafu určeny jako významné. Červené vertikální linie ukazují optimální hodnotu dané proměnné.

Na **obr. 27** jsou pak vhodnosti zobrazeny v podobě 3D ploch. Zakřivení plochy ukazuje vždy hodnotu, kde bylo dosaženo optimálních podmínek.

Na základě těchto vhodnostních profilů byly stanoveny optimální podmínky přípravy a analýzy suspenzí: 10% glycerol, 5%  $\text{HNO}_3$ , teplota pyrolýzy 1150 °C, množství modifikátoru 2  $\mu\text{L}$ . Doba ultrazvukování byla ponechána na nejnižší hodnotě, a to 2 minuty.



**Obr. 26** Diagramy vhodnosti, profilů a odezvy pro výsledky FFP



Obr. 27 Odpovídající plochy vhodnosti pro výsledky FFP

## 4.4 Ověření preciznosti stanovení

Ověření správnosti stanovení proběhlo na základě porovnání výsledků přímé analýzy SRM 1486 pomocí navržené metody a výsledků získaných po mikrovlnné mineralizaci metodou TOF-ICP-MS (**tabulka 11**). Nalezené hodnoty jsou udány jako průměr ze 4 nezávislých stanovení s uvedenou rozšířenou nejistotou odhadu výsledku. Nalezená hodnota určená pomocí optimalizované metody HR-CS-ETAAS je v dobré shodě s hodnotou deklarovanou výrobcem SRM, což dokládá správnost navržené metody. Opakovatelnost metody vyjádřena hodnotou relativní směrodatné odchylky činí 3,4 %.

**Tabulka 11** Porovnání výsledků z jednotlivých analýz SRM 1486

	<b>Certifikováno</b> <b>(mg kg<sup>-1</sup>)</b>	<b>Nalezeno</b> HR-CS-ETAAS <sup>b</sup>	<b>Nalezeno</b> TOF-ICP-MS <sup>c</sup>
<b>SRM 1486</b>	1,335 ± 0,014 <sup>a</sup>	1,31 ± 0,09	1,326 ± 0,202
<b>RSD (%)</b>	-	3,4	7,6

<sup>a</sup> použitá metoda ID-TIMS

<sup>b</sup> průměr ± 2 SD, n = 4

<sup>c</sup> průměr ± 2 SD, n = 10

### 4.4.1 Kalibrace

Kalibrace byla provedena v intervalu 0–40 ug L<sup>-1</sup> (**tabulka 12**), avšak nebyla v uvedeném intervalu lineární. Je to patrné z výstupů programu QC Expert (**tabulka 13**).

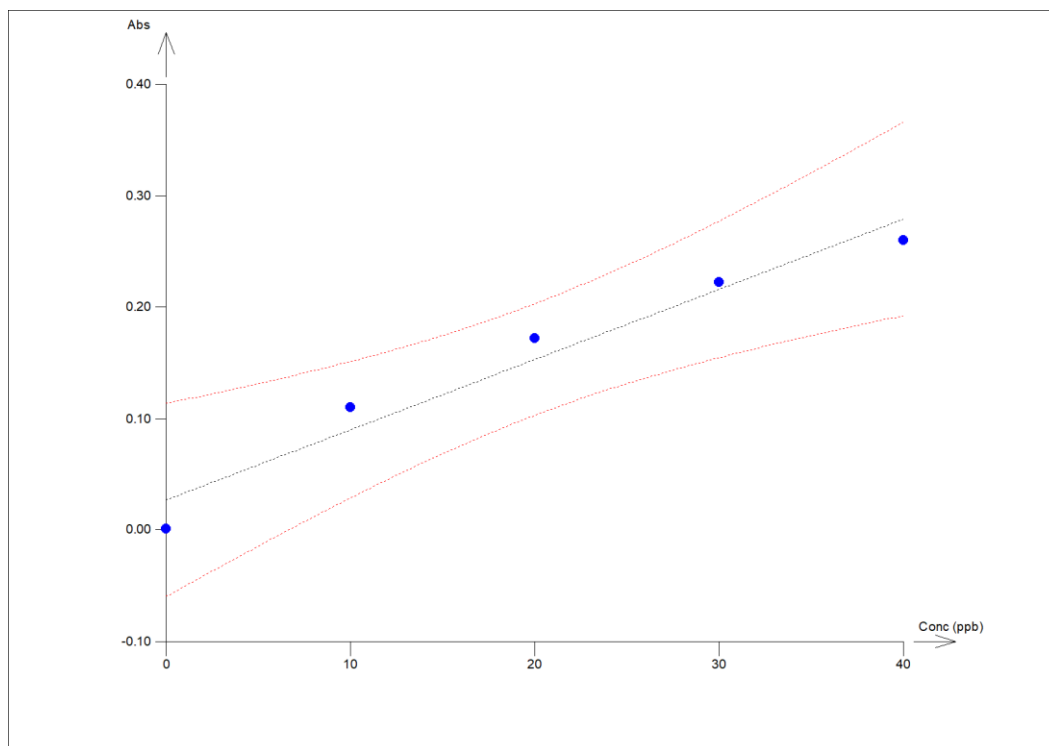
**Tabulka 12** Kalibrace

<b>Koncentrace</b> <b>(ug L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Absorbance</b>	<b>RSD</b> <b>(%)</b>
0	0,00092	158,5
10	0,11018	4
20	0,17182	5
30	0,22254	0,9
40	0,2597	1,2

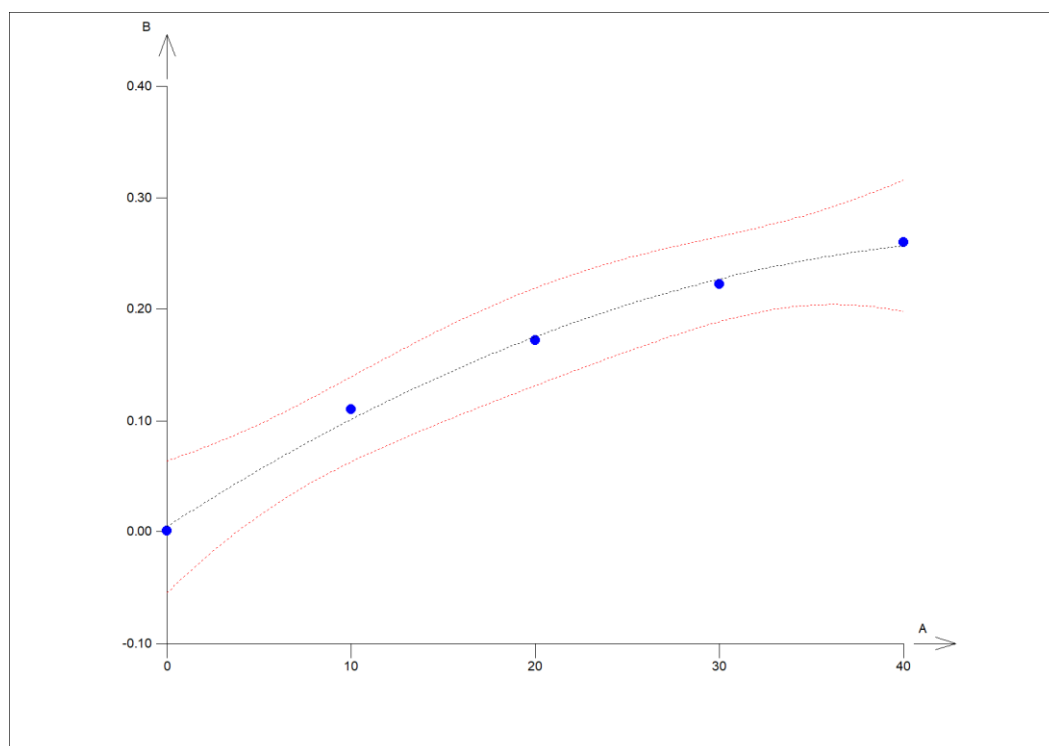
Hledání vhodného kalibračního modelu bylo provedeno pomocí programu QC Expert. Výsledky jsou prezentovány pro model bez transformace (**obr. 28**), polynom druhého (**obr. 29**) a třetího stupně (**obr. 30**). Přestože výsledky koeficientu determinace  $R^2$  a AIC jsou pro třetí stupeň polynomu lepší nežli pro druhý stupeň (**tabulka 13**), rozhodujícím kritériem je nejnížší výsledek MEP a ten byl dosažen u polynomu druhého stupně. Jako nejlepší kalibrační model byl proto zvolen polynom druhého stupně. Jeho statistické charakteristiky a testování regresního tripletu jsou uvedené v **tabulce 14**. Výstup programu QC Expert v modulu kalibrace pak dokumentuje citlivost a detekční schopnost navržené metody, LOD pro stanovení Pb navrženou metodou byl stanoven na  $1,5 \mu\text{g L}^{-1}$ , což odpovídá  $0,15 \text{ mg kg}^{-1}$ . Směrnice standardních přídavků se významně nelišila od hodnoty směrnice lineární části kalibrace a pro stanovení Pb v reálných vzorcích tak může být použita časově úspornější metoda přímé kalibrace.

**Tabulka 13** Porovnání statistických charakteristik pro sledované regresní modely

Statistické charakteristiky	Bez transformace	Polynom 2. stupně	Polynom 3. stupně
Korelační koeficient R	0,9774	0,9983	0,9997
Koeficient determinace $R^2$	0,9553	0,9967	0,9995
Střední kvadratická chyba predikce MEP	0,0016	0,0004	0,0007
Akaikeho informační kritérium	-35,49	-46,48	-53,64

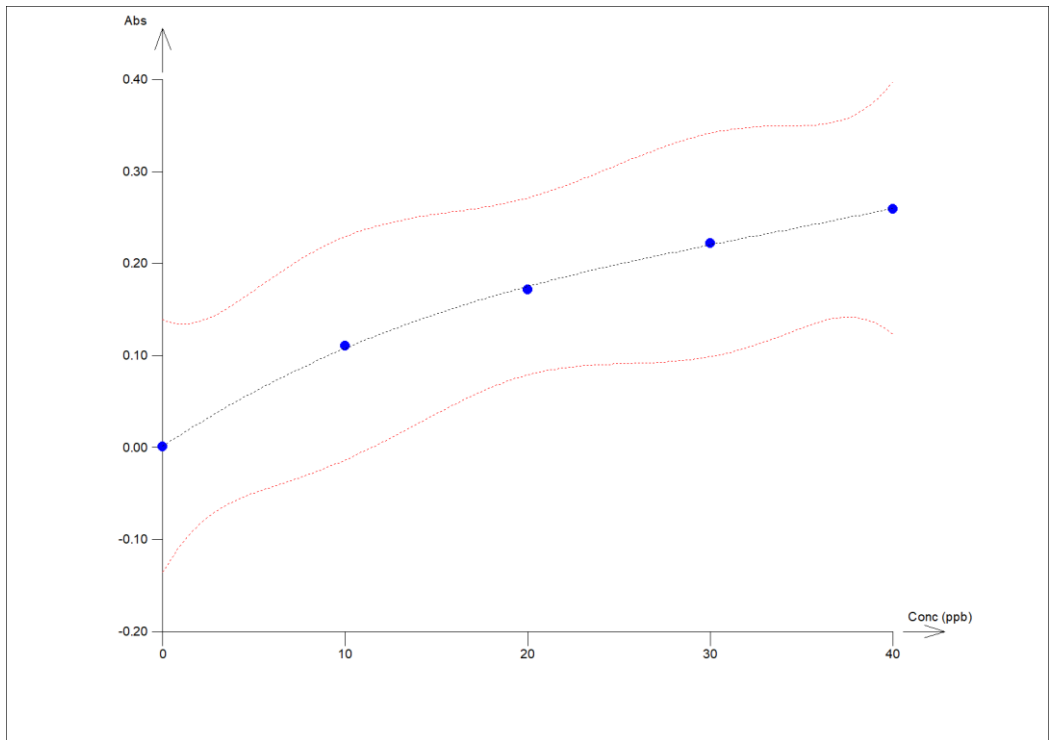


**Obr. 28** Model kalibrace bez transformace



**Obr. 29** Model kalibrace pro polynom druhého stupně





**Obr. 30** Model kalibrace pro polynom třetího stupně

**Tabulka 14** Statistické charakteristiky regrese a testování regresního tripletu pro polynom druhého stupně

<b>Statistické charakteristiky regrese</b>	
Vícenásobný korelační koeficient R :	0,9983
Koeficient determinace $R^2$ :	0,9967
Predikovaný korelační koeficient $R_p$ :	0,9002
Střední kvadratická chyba predikce MEP :	0,0004
Akaikého informační kritérium :	-46,48
<b>Testování regresního tripletu</b>	
<b>Fisher-Snedecorův test významnosti modelu</b>	
Hodnota kritéria F :	299,74
Kvantil F (1-alfa, m-1, n-m) :	19
Pravděpodobnost :	0,0033
Závěr :	<b>Model je významný</b>
<b>Scottovo kritérium multikolinearity</b>	
Hodnota kritéria SC :	0,6988
Závěr :	<b>Model vykazuje multikolinearitu!</b>
<b>Cook-Weisbergův test heteroskedasticity</b>	
Hodnota kritéria CW :	0,0397
Kvantil $\chi^2(1-\text{alfa}, 1)$ :	3,84
Pravděpodobnost :	0,8421
Závěr :	<b>Rezidua vykazují homoskedasticitu.</b>
<b>Jarque-Berrův test normality</b>	
Hodnota kritéria JB :	0,7254
Kvantil $\chi^2(1-\text{alfa}, 2)$ :	5,99
Pravděpodobnost :	0,6958
Závěr :	<b>Rezidua mají normální rozdělení.</b>
<b>Waldův test autokorelace</b>	
Hodnota kritéria WA :	0,2845
Kvantil $\chi^2(1-\text{alfa}, 1)$ :	3,84
Pravděpodobnost :	0,5938
Závěr :	<b>Autokorelace je nevýznamná</b>
<b>Durbin-Watsonův test autokorelace</b>	
Hodnota kritéria DW :	-1
Kritické hodnoty DW	0
Závěr :	<b>Negativní autokorelace reziduí není prokázána.</b>
<b>Znaménkový test reziduí</b>	
Hodnota kritéria $S_g$ :	1,20
Kvantil $N(1-\text{alfa}/2)$ :	1,96
Pravděpodobnost :	0,2301
Závěr :	<b>V reziduích není trend.</b>

## ZÁVĚR

Předložená diplomová práce se zabývá stanovením olova v kostech pomocí HR-CS-ETAAS instrumentace za využití přímé analýzy suspenzí. Analýza suspenzí se projevila jako rychlejší a snadnější způsob analýzy nežli mikrovlnná mineralizace. Také je ekologičtější (výrazně menší spotřeba  $\text{HNO}_3$ ) a ekonomičtější (nevyžaduje zařízení pro mikrovlnný rozklad).

Jako první byla určena variabilita hydroxyapatitu a jeho procentuální zastoupení v kostech rentgenovou difraktometrií. Výsledky podle očekávání odhalily variabilitu v procentuálním zastoupení hydroxyapatitu v kostech. Na základě těchto výsledků z rentgenové difraktometrie bylo nutné optimalizovat dobu mletí proměřením velikosti částic laserovou difrakcí a přibližným stanovením jejich střední velikosti částic. Střední velikost částic byla také potvrzena snímkem z elektronového mikroskopu. Optimální doba mletí pak byla stanovena na 5 minut pro králíka a 7 minut pro vydru.

Samotná analýza SRM 1486 odhalila přítomnost molekulových absorpčních pásů, které znesnadňují stanovení Pb na čáře 217,0 nm. Tento výskyt molekulových absorpčních pásů mají na svědomí termicky stabilní PO molekuly, které vznikají v kroku pyrolýzy termickým rozkladem hydroxyapatitu. Tato skutečnost byla potvrzena proměřením modelového roztoku čistého hydroxyapatitu. Modelová spektra hydroxyapatitu pak byla použita pro eliminaci spektrální interference PO molekul. Účinnost korekce byla potvrzena v rozsahu 0–250  $\mu\text{g}$  hydroxyapatitu.

Pro optimalizaci analýzy suspenze bylo předem vytipováno sedm faktorů, na kterých může záviset analýza Pb v kostech. Pro optimalizaci těchto parametrů pak byl využit frakcionální faktorový plán. Koncentrace glycerolu, zahrnutí centrálního bodu, koncentrace  $\text{HNO}_3$ , množství modifikátoru a teplota pyrolýzy byly určeny jako statisticky významné faktory. Teplota atomizace, doba ultrazvukování a velikost částic vyšly jako nevýznamné faktory. Diagramy vhodnosti, profilů a odezvy a plochy vhodnosti pak dokazují, že optimální podmínky pro všechny faktory byly zahrnuty v mezích frakcionálního faktorového plánu. Finální podmínky analýzy pak jsou: 10% glycerol, 5%  $\text{HNO}_3$ , teplota pyrolýzy 1150 °C, množství modifikátoru 2  $\mu\text{L}$  směsného modifikátoru 0,5  $\text{g L}^{-1}$  Pd + 25  $\text{g L}^{-1}$  kyseliny citronové. Doba ultrazvukování byla ponechána na nejnižší hodnotě, a to 2 minuty.

Správnost a přesnost metody byla ověřena analýzou SRM 1486. Ve studovaném rozsahu 0–40  $\mu\text{g L}^{-1}$  nebyla kalibrace lineární. Jako vhodný model vyhodnotil QC Expert polynom druhého stupně. Hodnota LOD určená z parametrů nalezeného modelu byla 1,5  $\mu\text{g L}^{-1}$ , což odpovídá 0,15  $\text{mg kg}^{-1}$ . LOD této metody je ve shodě s dříve publikovanými pracemi [1, 86, 117]. Vzhledem k obsahu Pb v kostech (kolem 1  $\text{mg kg}^{-1}$ ) je navržená metoda více než dostačující pro analýzu reálných vzorků.

Správnost metody byla ověřena porovnáním získaných výsledků analýzy s výsledky deklarovanými výrobcem a s výsledky po mikrovlnné mineralizaci a analýze na TOF-ICP-MS. Nalezená hodnota Pb analýzou suspenzí ( $1,31 \pm 0,09 \text{ mg kg}^{-1}$ ) je v dobré shodě s hodnotou deklarovanou výrobcem SRM ( $1,335 \pm 0,014 \text{ mg kg}^{-1}$ ), což dokládá správnost navržené metody.

Navržená metoda je vhodná pro běžnou rutinní praxi díky své jednoduchosti přípravy. Oproti mikrovlnné mineralizaci je metoda několikrát rychlejší – pro přípravu jednoho vzorku jsou zapotřebí pouze cca 4 minuty přípravy.

## POUŽITÁ LITERATURA

- [1] GERHARDSSON, L., A. AKANTIS, N. G. LUNDSTRÖM, G. F. NORDBERG, A. SCHÜTZ a S. SKERFVING. Lead concentrations in cortical and trabecular bones in deceased smelter workers. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 2005, **19**(2–3), 209–215.
- [2] REYNARD, B. a V. BALTER. Trace elements and their isotopes in bones and teeth: Diet, environments, diagenesis, and dating of archeological and paleontological samples. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*. 2014, **416**, 4–16.
- [3] WIBETOE, G. a F. J. LANGMYHR. Interferences in inverse zeeman-corrected atomic absorption spectrometry caused by zeeman splitting of molecules. *Analytica Chimica Acta*. 1987, **198**(C), 81–86.
- [4] ZONG, Y. Y., P. J. PARSONS a W. SLAVIN. Background correction errors for lead in the presence of phosphate with Zeeman graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*. 1998, **53**(6–8), 1031–1039.
- [5] KUPEC, J. Toxikologie. 2. vydání, Zlín: Univerzita Tomáše Bati, 2004. ISBN 80-7318-216-5.
- [6] POPL, M. a J. FÄHNRIK. Analytická chemie životního prostředí. 4. vydání, Praha: Vydavatelství VŠCHT, 1999. ISBN 80-7080-336-3.
- [7] ČESKÁ SPOLEČNOST ORNITOLOGICKÁ. Olovo - zabiják ptáků [online]. 2018, [cit. 2018-03-10]. Dostupné z: <http://www.birdlife.cz/co-delame/vyzkum-a-ochrana-ptaku/ochrana-druhu/olovo-zabijak-ptaku/>.
- [8] OCHRANA PŘÍRODY. Evropští ornitologové požadují zákaz olověných broků [online]. 2018, [cit. 2018-03-10]. Dostupné z: <http://www.casopis.ochranaprirody.cz/kuler-zpravy-aktuality-zajimavosti/evropsti-ornitologove-pozaduji-zakaz-olovenych-broku/>.
- [9] ŠTEFÁNEK, J. Medicína, nemoci, studium na 1. LF UK [online]. 2011, [cit. 2017-11-03]. Dostupné z: <http://www.stefajir.cz/?q=otrava-olovem>.
- [10] FU, H. a P. BOFFETTA. Cancer and occupational exposure to inorganic lead compounds : a meta-analysis of published data. *Occupational and Environmental Medicine*. 1995, **52**, 73–81.
- [11] PATRICK, L. Lead toxicity, a review of the literature. Part 1: Exposure, evaluation, and treatment. *Alternative medicine review : a journal of clinical therapeutic*. 2006, **11**(1), 2–22.
- [12] ČESKO. Zákon č. 361 ze dne 12. prosince 2007 kterým se stanoví podmínky ochrany zdraví při práci. In: *Sbírka zákonů České republiky*. 2007, **částka 111**, 5086–5236.
- [13] ČERNÁ, M., A. KRŠKOVÁ-BATÁRIOVÁ a V. PUKLOVÁ. Obsah olova v krvi dětí a dospělých [online]. 2009, [cit. 2017-11-03]. Dostupné z: <http://www.szu.cz/tema/zivotni-prostredi/obsah-olova-v-krvi-deti-a-dospelych>.

- [14] POUNDS, J. G., G. J. LONG a J. F. ROSEN. Cellular and molecular toxicity of lead in bone. *Environmental Health Perspectives*. 1991, **91**, 17–32.
- [15] JUNQUEIRA, L. C., J. CARNEIRO a R. O. KELLEY. *Základy histologie*. Jinočany: H&H, 1997. ISBN 80-85787-37-7.
- [16] BARRY, P. S. a D. B. MOSSMAN. Lead concentrations in human tissues. *British journal of industrial medicine*. 1970, **27**(4), 339–51.
- [17] BARRY, P. S. A comparison of concentrations of lead in human tissues. *British journal of industrial medicine*. 1975, **32**(2), 119–139.
- [18] AUFDERHEIDE, A. C. a L. E. Jr. WITTMERS. Selected aspects of the spatial distribution of lead in bone. *Neurotoxicology*. 1992, **13**(4), 809–19.
- [19] CRETACCI, Y. a P. J. PARSONS. Localized accumulation of lead within and among bones from lead-dosed goats. *Environmental Research*. 2010, **110**(1), 26–32.
- [20] HAĆ, E., W. CZARNOWSKI, T. GOS a J. KRECHNIAK. Lead and fluoride content in human bone and hair in the Gdańsk region. *The Science of The Total Environment*. 1997, **206**(2), 249–254.
- [21] AUFDERHEIDE, A. C., J. L. ANGEL, J. O. KELLEY, A. C. OUTLAW, M. A. OUTLAW, G. RAPP a L. E. WITTMERS. Lead in bone III. Prediction of social correlates from skeletal lead content in four Colonial American populations (Catoctin Furnace, College Landing, Governor's Land, and Irene Mound). *American Journal of Physical Anthropology*. 1985, **66**(4), 353–361.
- [22] AUFDERHEIDE, A. C., F. D. NEIMAN, L. E. WITTMERS a G. RAPP. Lead in Bone II: Skeletal-Lead Content as an Indicator of Lifetime Lead Ingestion and the Social Correlates in an Archaeological Population. *American Journal of Physical Anthropology*. 1981, **55**(3), 285–291.
- [23] ÁLVAREZ-LLORET, P., Ch. M. LEE, M. I. CONTI, A. R. TERRIZZI, S. GONZÁLEZ-LÓPEZ a M. P. MARTÍNEZ. Effects of chronic lead exposure on bone mineral properties in femurs of growing rats. *Toxicology*. 2017, **377**, 64–72.
- [24] SANTOS JR., D., F. BARBOSA JR., S. SIMIÃO DE SOUZA a F.J. KRUG. Cryogenic sample grinding for copper, lead and manganese determination in human teeth by slurry sampling GFAAS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. 2003, **18**(8), 939–945.
- [25] TYKOT, R. H. Using nondestructive portable X-ray fluorescence spectrometers on stone, ceramics, metals, and other materials in museums: Advantages and limitations. *Applied Spectroscopy*. 2016, **70**(1), 42–56.
- [26] SZOSTEK, K. Chemical signals and reconstruction of life strategies from ancient human bones and teeth - problems and perspectives. *Anthropological Review*. 2009, **72**(1), 3–30.

- [27] DEIBEL, M. A., J. M. SAVAGE, J. D. ROBERTSON, W. D. EHMANN a W. R. MARKESBERY. Lead determinations in human bone by particle induced X-ray emission (PIXE) and graphite furnace atomic absorption spectrometry (GFAAS). *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*. 1995, **195**(1), 83–89.
- [28] SHAHEDI, A., E. ESLAMI a M. R. NOURANI. Influence of Lead on the Interpretation of Bone Samples with Laser-Induced Breakdown Spectroscopy. *Journal of Spectroscopy*. 2016, **2016**.
- [29] KAMENÍK, J., J. KUČERA, V. HAVRÁNEK a M. KUBEŠOVÁ. Zkoumání ostatků Tycha Braha v ÚJF AVČR Řež. nedatováno, 46–52.
- [30] ZAMBONI, C. B., L. C. OLIVEIRA, L. DALAQUA JR a J. MESA. Application of neutron activation analysis to bone samples. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*. 2006, **269**(2), 331–334.
- [31] HU, H. Bone lead as a new biologic marker of lead dose: Recent findings and implications for public health. *Environmental Health Perspectives*. 1998, **106**(SUPPL. 4), 961–967.
- [32] SPECHT, A. J., M. WEISSKOPF a L. H. NIE. Portable XRF Technology to Quantify Pb in Bone In Vivo. *Journal of Biomarkers*. 2014, 1–9.
- [33] BYRNES, J. F. a P. J. BUSH. Practical Considerations in Trace Element Analysis of Bone by Portable X-ray Fluorescence. *Journal of Forensic Sciences*. 2016, **61**(4), 1041–1045.
- [34] TODD, A. C., P. J. PARSONS, S. TANG a E. L. MOSHIER. Individual variability in human tibia lead concentration. *Environmental Health Perspectives*. 2001, **109**(11), 1139–1143.
- [35] TODD, A. C., P. J. PARSONS, S. CARROLL, C. GERAGHTY, F. KHAN, S. TANG a E. L. MOSHIER. Measurements of lead in human tibiae. A comparison between K-shell x-ray fluorescence and electrothermal atomic absorption spectrometry. *Physics in medicine and biology*. 2002, **47**(4), 673–87.
- [36] AO, Q., S. H. LEE a R. P. GARDNER. Error Analysis in the In Vivo XRF Measurement of Lead in Bone by Monte Carlo Simulation. *Advances in X-Ray Analysis*. 1999, (C), 898–909.
- [37] XOS. Common Causes of Lead Interference Using XRF [online]. 2013, [cit. 2018-03-11]. Dostupné z: [https://www.xos.com/cms-portals/xos\\_com/cms/documents/case-studies/Common-causes-of-lead-interference-using-XRF.pdf](https://www.xos.com/cms-portals/xos_com/cms/documents/case-studies/Common-causes-of-lead-interference-using-XRF.pdf).
- [38] BALCAEN, L., E. BOLEA-FERNANDEZ, M. RESANO a F. VANHAECKE. Inductively coupled plasma - Tandem mass spectrometry (ICP-MS/MS): A powerful and universal tool for the interference-free determination of (ultra)trace elements - A tutorial review. *Analytica Chimica Acta*. 2015, **894**, 7–19.
- [39] WEBB, E., D. AMARASIRIWARDENA, S. TAUCH, E. F. GREEN, J. JONES a A. H. GOODMAN. Inductively coupled plasma-mass (ICP-MS) and atomic emission spectrometry (ICP-AES): Versatile analytical techniques to identify the archived elemental information in human teeth. *Microchemical Journal*. 2005, **81**(2), 201–208.

- [40] IGUCHI, J., Y. YAMASHITA, K. TOUHATA, T. YABU a M. YAMASHITA. Origin identification method by multiple trace elemental analysis of intermuscular bones in grilled eel products produced in Japan, China, and Taiwan. *Fisheries Science*. 2013, **79**(3), 531–536.
- [41] BADER, N. R. a B. ZIMMERMANN. Sample preparation for atomic spectroscopic analysis: An overview. *Advances in Applied Science Research*. 2012, **3**(3), 1733–1737.
- [42] VANHAECKE, F., M. RESANO a L. MOENS. Electrothermal vaporisation ICP-mass spectrometry (ETV-ICP-MS) for the determination and speciation of trace elements in solid samples – A review of real-life applications from the author's lab. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2002, **374**(2), 188–195.
- [43] LIMBECK, A., P. GALLER, M. BONTA, G. BAUER, W. NISCHKAUER a F. VANHAECKE. Recent advances in quantitative LA-ICP-MS analysis: Challenges and solutions in the life sciences and environmental chemistry ABC Highlights: Authored by Rising Stars and Top Experts. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2015, **407**(22), 6593–6617.
- [44] VAŠINOVÁ GALIOVÁ, M., M. NÝVLTOVÁ FIŠÁKOVÁ, J. KYNICKÝ, L. PROKEŠ, H. NEFF, A. Z. MASON, P. GADAS, J. KOŠLER a V. KANICKÝ. Elemental mapping in fossil tooth root section of *Ursus arctos* by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS). *Talanta*. 2013, **105**, 235–243.
- [45] BENSON, A., L. KINSLEY, M. WILLMES, A. DEFLEUR, H. KOKKONEN, M. MUSSI a R. GRÜN. Laser ablation depth profiling of U-series and Sr isotopes in human fossils. *Journal of Archaeological Science*. 2013, **40**(7), 2991–3000.
- [46] SUAREZ, C. A., G. L. MACPHERSON, L. A. GONZÁLEZ a D. E. GRANDSTAFF. Heterogeneous rare earth element (REE) patterns and concentrations in a fossil bone: Implications for the use of REE in vertebrate taphonomy and fossilization history. *Geochimica et Cosmochimica Acta*. 2010, **74**(10), 2970–2988.
- [47] PEREIRA, H. B., A. S. LUNA, F. W. HERMS a R. C. DE CAMPOS. Determination of Lead in Bone by Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry with Zeeman Effect Background Correction. *J. Braz. Chem. Soc.* 2004, **15**(4), 487–490.
- [48] YU, J. C., K. F. HO a S. C. LEE. Determination of lead in fine particulates by slurry sampling electrothermal atomic absorption spectrometry. *Fresenius J Anal Chem*. 2001, **369**(2), 170–175.
- [49] AHSAN, S., S. KANECO, K. OHTA a T. MIZUNO. Determination of trace lead impurities in pure copper slurry samples by electrothermal atomic absorption spectrometry with molybdenum tube atomizer. *Analisis*. 2000, **28**(5), 413–418.
- [50] HETTER, K. M., D. J. BELLIS, C. GERAGHTY, A. C. TODD a P. J. PARSONS. Development of candidate reference materials for the measurement of lead in bone. *Anal Bioanal Chem*. 2008, **391**(6), 2011–2021.



- [51] SARDANS, J., F. MONTES a J. PEÑUELAS. Determination of As, Cd, Cu, Hg and Pb in biological samples by modern electrothermal atomic absorption spectrometry. *Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy*. 2010, **65**(2), 97–112.
- [52] ZHONG, W. S., T. REN a L. J. ZHAO. Determination of Pb (Lead), Cd (Cadmium), Cr (Chromium), Cu (Copper), and Ni (Nickel) in Chinese tea with high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Journal of Food and Drug Analysis*. 2016, **24**(1), 46–55.
- [53] KOMÁREK, Josef. Atomová absorpční spektrometrie. 1. vydání, Brno: Masarykova univerzita, 2000. ISBN 80-210-2500-X.
- [54] ZONG, Y. Y., P. J. PARSONS a W. SLAVIN. Accurate and Precise Measurements of Lead in Bone Using Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry with Zeeman-effect Background Correction. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. 1996, **11**(January), 25–30.
- [55] BORGES, A. R., E. M. BECKER, M. B. DESSUY, M. G. R. VALE a B. WELZ. Investigation of chemical modifiers for the determination of lead in fertilizers and limestone using graphite furnace atomic absorption spectrometry with Zeeman-effect background correction and slurry sampling. *Spectrochimica Acta - Part B*. 2014, **92**, 1–8.
- [56] GALLINDO BORGES, D. L., A. F. DA SILVA, A. JOSÉ CURTIUS, B. WELZ a U. HEITMANN. Determination of lead in coal using direct solid sampling and high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Microchimica Acta*. 2006, **154**, 101–107.
- [57] RAPOSO, J. L., S. R. OLIVEIRA, J. A. NÓBREGA a J. A. GOMES NETO. Internal standardization and least-squares background correction in high-resolution continuum source flame atomic absorption spectrometry to eliminate interferences on determination of Pb in phosphoric acid. *Spectrochimica Acta - Part B*. 2008, **63**(9), 992–995.
- [58] BHANOT, D. Interferences in Atomic Absorption Spectroscopy [online]. 2013, [cit. 2018-04-01]. Dostupné z: <http://lab-training.com/2013/05/08/aas-free-e-course-interferences-in-atomic-absorption-spectroscopy/>.
- [59] HARVEY, D. 10.4: Atomic Absorption Spectroscopy [online]. 2017, [cit. 2018-04-01]. Dostupné z: [https://chem.libretexts.org/Textbook\\_Maps/Analytical\\_Chemistry\\_Textbook\\_Maps/Map%3A\\_Analytical\\_Chemistry\\_2.0\\_\(Harvey\)/10\\_Spectroscopic\\_Methods/10.4%3A\\_Atomic\\_Absorption\\_Spectroscopy](https://chem.libretexts.org/Textbook_Maps/Analytical_Chemistry_Textbook_Maps/Map%3A_Analytical_Chemistry_2.0_(Harvey)/10_Spectroscopic_Methods/10.4%3A_Atomic_Absorption_Spectroscopy).
- [60] ČERNOHORSKÝ, T. a P. JANDERA. Atomová spektroskopie. 1. vydání, Pardubice: Univerzita Pardubice, 1997. ISBN 80-7194-114-X.
- [61] HUSÁKOVÁ, L. Návod pro laboratoř pokročilé instrumentální analýzy - Atomová absorpční spektrometrie s elektrotermickou atomizací. Pardubice: Univerzita Pardubice.
- [62] LINDON, J. C. *Encyclopedia of spectroscopy and spectrometry. Volume 1. A-H*. 2. vydání. San Diego: Elsevier, 2010. ISBN 978-0-12-374417-3.

- [63] ANALYTIK JENA AG. contrAA® Series — Atomic Absorption. Redefined [online]. 2018, [cit. 2018-04-24]. Dostupné z: <https://www.analytik-jena.de/en/analytical-instrumentation/products/atomic-absorption-spectrometry/hr-cs-aas/features-contraar-800.html#c51891>.
- [64] WELZ, B., M. G. R. VALE, É. R. PEREIRA, I. N. B. CASTILHO a M. B. DESSUY. Continuum Source Atomic Absorption Spectrometry: Past, Present and Future Aspects – A Critical Review. *J. Braz. Chem. Soc.* 2014, **25**(5), 799–821.
- [65] KIM, M., Ch. KIM a I. SONG. Analysis of lead in 55 brands of dietary calcium supplements by graphite furnace atomic absorption spectrometry after microwave digestion. *Food Additives and Contaminants.* 2003, **20**(2), 149–153.
- [66] HUSÁKOVÁ, L., I. URBANOVÁ, M. ŠAFRÁNKOVÁ a T. ŠÍDOVÁ. Slurry sampling high-resolution continuum source electrothermal atomic absorption spectrometry for direct beryllium determination in soil and sediment samples after elimination of SiO interference by least-squares background correction. *Talanta.* 2017, **175**(July), 93–100.
- [67] RASMUSSEN, K. L., L. SKYTTE, C. PILEKÆR, A. LAURITSEN, J. L. BOLDSSEN, P. M. LETH a P. O. THOMSEN. The distribution of mercury and other trace elements in the bones of two human individuals from medieval Denmark -- the chemical life history hypothesis. *Heritage Science.* 2013, **1**(1), 10.
- [68] KERNBACH-WIGHTON, G., A. KUHLENCORD, K. ROBBACH a G. FISCHER. Bone-dust in autopsies: Reduction of spreading. *Forensic Science International.* 1996, **83**(2), 95–103.
- [69] NAWROCKI, S. P. Cleaning Bones. *University of Indianapolis Archeology and Forensics Laboratory.* 1997, 1–4.
- [70] BIOTRADE INSTRUMENTS, s.r.o. Lyofilizace ovoce, zeleniny, masa a jiných potravin [online]. [cit. 2017-12-10]. Dostupné z: <http://www.biotrade.cz/aplikace-11/suseni-13/lyofilizace-ovoce-zeleniny-masa-a-jinych-potravin-108>.
- [71] BARLEY, J. Technical Note: BASIC PRINCIPLES OF FREEZE DRYING. *SP Industries Inc.* [online]. 2009, [cit. 2017-12-20]. Dostupné z: [http://www.biotrade.cz/data/ke-stazeni/Basic Principles of Freeze Drying\\_Final-d1003.pdf](http://www.biotrade.cz/data/ke-stazeni/Basic Principles of Freeze Drying_Final-d1003.pdf).
- [72] IYENGAR, G. V. a K. KASPEREK. Application of the brittle fracture technique (BFT) to homogenise biological samples and some observations regarding the distribution behavior of the trace elements at different concentration levels in a biological matrix. *Journal of Radioanalytical Chemistry.* 1977, **39**, 301–316.
- [73] MORALES COLÓN, E., M. HERNÁNDEZ, M. CANDELARIO, M. MELÉNDEZ a T. DAWSON CRUZ. Evaluation of a Freezer Mill for Bone Pulverization prior to DNA Extraction: An Improved Workflow for STR Analysis. *Journal of Forensic Sciences.* 2018, **63**(2), 530–535.

- [74] RETSCH GMBH. Knife Mills/Blenders [online]. [cit. 2017-12-18]. Dostupné z: <https://www.retsch.com/products/milling/knife-mills/>.
- [75] RETSCH GMBH. Application Database Milling [online]. [cit. 2017-12-17]. Dostupné z: <https://www.retsch.com/applications/application-database/?mode=milling&searchPath=&productGroup=&instrument=11&submit=Search>.
- [76] RETSCH GMBH. Mixer Mill MM 400 [online]. [cit. 2017-12-17]. Dostupné z: <https://www.retsch.com/products/milling/ball-mills/mixer-mill-mm-400/function-features/>.
- [77] MADER, P. a E. ČURDOVÁ. Metody rozkladu biologických materiálů pro stanovení stopových prvků. *Chemické Listy*. 1997, **236**, 227–236.
- [78] EDWARD, J. B., R. A. BENFER a J. S. MORRIS. The effects of dry ashing on the composition of human and animal bone. *Biological Trace Element Research*. 1990, **25**(3), 219–231.
- [79] BARTOŠ, M. Analytická chemie I. Pardubice: Univerzita Pardubice, 2004. ISBN 80-7194-723-7.
- [80] DE PAULA, C. E. R., G. F.B. CRUZ, C. M. S.P. REZENDE a R. J. CASSELLA. Determination of Cr and Mn in moisturizing creams by graphite furnace atomic absorption spectrometry through direct introduction of the samples in the form of emulsions. *Microchemical Journal*. 2016, **127**, 1–6.
- [81] DE OLIVEIRA, R. M., A. C. N. ANTUNES, M. A. VIEIRA, A. L. MEDINA a A. S. RIBEIRO. Evaluation of sample preparation methods for the determination of As, Cd, Pb, and Se in rice samples by GF AAS. *Microchemical Journal*. 2016, **124**, 402–409.
- [82] BORGES, A. R., L. L. FRANÇOIS, E. M. BECKER, M. G. R. VALE a B. WELZ. Method development for the determination of chromium and thallium in fertilizer samples using graphite furnace atomic absorption spectrometry and direct solid sample analysis. *Microchemical Journal*. 2015, **119**, 169–175.
- [83] OLIVEIRA, H. R., M. F. MESKO, M. G. R. VALE, C. A. P. SILVEIRA, R. S. PICOLOTO a E. M. BECKER. Development of methods for the determination of cadmium and thallium in oil shale by-products with graphite furnace atomic absorption spectrometry using direct analysis. *Microchemical Journal*. 2014, **116**, 55–61.
- [84] ZMOZINSKI, A. V., T. PRETTO, A. R. BORGES, Á. T. DUARTE a M. G. R. VALE. Determination of Pb and Cr in sunscreen samples by high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry and direct analysis. *Microchemical Journal*. 2016, **128**, 89–94.
- [85] MARTINIAKOVÁ, M., R. OMELKA, A. JANČOVÁ, R. STAWARZ a G. FORMICKI. Concentrations of selected heavy metals in bones and femoral bone structure of bank (Myodes glareolus) and common (Microtus arvalis) voles from different polluted biotopes in Slovakia. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 2011, **60**(3), 524–532.
- [86] MARTINIAKOVÁ, M., R. OMELKA, R. STAWARZ a G. FORMICKI. Accumulation of lead, cadmium, nickel, iron, copper, and zinc in bones of small mammals from polluted areas in Slovakia. *Polish Journal of Environmental Studies*. 2012, **21**(1), 153–158.

- [87] JAOUEN, K., V. BALTER, E. HERRSCHER, A. LAMBOUX, P. TELOUK a F. ALBARÈDE. Fe and Cu stable isotopes in archeological human bones and their relationship to sex. *American Journal of Physical Anthropology*. 2012, **148**(3), 334–340.
- [88] JAOUEN, K., M. BEASLEY, M. SCHOENINGER, J.-J. HUBLIN a M. P. RICHARDS. Zinc isotope ratios of bones and teeth as new dietary indicators: results from a modern food web (Koobi Fora, Kenya). *Scientific Reports*. 2016, **6**(1), 26281.
- [89] MOSBÆK, H., P. E. HOLM a J. C. TJELL. Automated on-line solvent extraction and AAS-graphite furnace determination of trace metals in difficult matrices. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. 2003, **18**(12), 1489–1492.
- [90] ŠČANČAR, J., R. MILAČIČ, M. BENEDIK a P. BUKOVEC. Determination of trace elements and calcium in bone of the human iliac crest by atomic absorption spectrometry. *Clinica Chimica Acta*. 2000, **293**, 187–197.
- [91] SGUAZZA, E., D. GIBELLI, M. CALIGARA, D. DI CANDIA, P. M. GALIMBERTI a C. CATTANEO. The Role of Toxicological Analyses in Anthropology: A Case Report on Lead Intoxication. *Archaeometry*. 2016, **58**(1), 152–158.
- [92] DE ANDRADE, C. K., P. M. K. DE BRITO, V. E. DOS ANJOS a S. P. QUINÁIA. Determination of Cu, Cd, Pb and Cr in yogurt by slurry sampling electrothermal atomic absorption spectrometry: A case study for Brazilian yogurt. *Food Chemistry*. 2018, **240**, 268–274.
- [93] FERREIRA, S. L. C., M. MIRÓ, E. G. P. DA SILVA, G. D. MATOS, P. S. DOS REIS, G. C. BRANDAO, W. N. L. DOS SANTOS, A. T. DUARTE, M. G. R. VALE a R. G. O. ARAUJO. Slurry sampling-an analytical strategy for the determination of metals and metalloids by spectroanalytical techniques. *Applied Spectroscopy Reviews*. 2010, **45**(1), 44–62.
- [94] BARAŁKIEWICZ, D., H. GRAMOWSKA, K. REN a M. MLECZEK. Determination of vanadium content in soils by slurry sampling electrothermal atomic absorption spectrometry using KO300G as the stabilizing agent. *Central European Journal of Chemistry*. 2006, **4**(2), 363–374.
- [95] SUN, H. a X. LIU. A slurry sampling hydride generation atomic absorption spectrometric method for speciation analysis of trace inorganic arsenic in flours. *Journal of Environmental Chemistry and Ecotoxicology*. 2011, **3**(1), 9–16.
- [96] BUGALLO, R. A., S. R. SEGADE a E. F. GÓMEZ. Comparison of slurry sampling and microwave-assisted digestion for calcium, magnesium, iron, copper and zinc determination in fish tissue samples by flame atomic absorption spectrometry. *Talanta*. 2007, **72**(1), 60–65.
- [97] DE ANDRADE, C. K., V. E. DOS ANJOS, M. L. FELSNER, Y. R. TORRES a S. P. QUINÁIA. Direct determination of Cd, Pb and Cr in honey by slurry sampling electrothermal atomic absorption spectrometry. *Food Chemistry*. 2014, **146**, 166–173.

- [98] MOREDA-PIÑEIRO, J., C. MOSCOSO-PÉREZ, M. PIÑEIRO-IGLESIAS, P. LÓPEZ-MAHÍA, S. MUNIATEGUI-LORENZO, E. FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ a D. PRADA-RODRÍGUEZ. Aqueous and acidified slurry sampling approaches in the As, Sb, and Sn determination of urban dust samples by HG-ETAAS. *Atomic Spectroscopy*. 2007, **28**(4), 137–143.
- [99] ALVES, F. L., P. SMICHOWSKI, S. FARÍAS, J. MARRERO a M. A. Z. ARRUDA. Direct Analysis of Antarctic Krill by Slurry Sampling : Determination of Copper , Iron , Manganese and Zinc by Flame Atomic Absorption Spectrometry. *J. Braz. Chem. Soc.* 2000, **11**(4), 365–370.
- [100] MINAMI, H., T. YOSHIDA, K. OKUTSU, Q. ZHANG, S. INOUE a I. ATSUYA. Direct determination of silicon in powdered aluminium oxide by use of slurry sampling with in situ fusion graphite-furnace atomic-absorption spectrometry. *Fresenius J Anal Chem.* 2001, **370**, 855–859.
- [101] ARAUJO, R. G. O., F. de S. DIAS, S. M. MACEDO, W. N. L. dos SANTOS a S. L. C. FERREIRA. Method development for the determination of manganese in wheat flour by slurry sampling flame atomic absorption spectrometry. *Food Chemistry*. 2006, **101**(1), 397–400.
- [102] MINAMI, H., M. YADA, T. YOSHIDA, Q. ZHANG, S. INOUE a I. ATSUYA. Simultaneous direct determination of aluminum, calcium and iron in silicon carbide and silicon nitride powders by slurry-sampling graphite furnace AAS. *Analytical sciences*. 2004, **20**(3), 455–459.
- [103] PENG, Y., W. GUO, P. ZHANG, L. JIN a S. HU. Heated Slurry Sampling for the Determination of Cadmium in Food by Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry. *Analytical Letters*. 2015, **48**(18), 2894–2907.
- [104] ALKA WILDLIFE. Sběr uhynulých vyder říčních [online]. [cit. 2018-05-02]. Dostupné z: [http://www.alkawildlife.eu/page.php?mx=48\\_projekty/archiv&ax=95\\_sber-uhynulych-vyder-ricnich&lx=cz&ft=&us=](http://www.alkawildlife.eu/page.php?mx=48_projekty/archiv&ax=95_sber-uhynulych-vyder-ricnich&lx=cz&ft=&us=).
- [105] LABOGENE. CoolSafe 4-15L Freeze Dryers [online]. [cit. 2018-04-17]. Dostupné z: <https://www.labogene.com/CoolSafe-4-15L-Freeze-Dryers>.
- [106] BRUKER S.R.O. D8 ADVANCE s designem DAVINCI - první skutečně univerzální řešení pro RTG práškovou difrakci [online]. [cit. 2018-04-20]. Dostupné z: <http://www.bruker-sro.cz/d8advance>.
- [107] FYZIKÁLNÍ ÚSTAV AKADEMIE VĚD ČR, v.v.i. Laboratoř rentgenové práškové difrakce [online]. [cit. 2018-04-21]. Dostupné z: <https://www.fzu.cz/oddeleni/oddeleni-magnetik-a-supravodicu/laboratore/laborator-rentgenove-praskove-difrakce>.
- [108] MALVERN INSTRUMENTS LTD. Mastersizer 2000 User Manual [online]. 2007, [cit. 2018-04-20]. Dostupné z: [https://www.labmakelaar.com/fjc\\_documents/mastersizer-2000-2000e-manual-eng1.pdf](https://www.labmakelaar.com/fjc_documents/mastersizer-2000-2000e-manual-eng1.pdf).
- [109] TESCAN ORSAY HOLDING, a.s. VEGA3 [online]. [cit. 2018-04-21]. Dostupné z: <https://www.tescan.com/en-us/technology/sem/vega3>.
- [110] RMI, s.r.o. Mikrovlnné tlakové rozklady [online]. 2018, [cit. 2018-04-21]. Dostupné z: <http://www.rmi.cz/mw-tlakove-rozklady>.

- [111] RMI, s.r.o. Speedwave Xpert [online]. 2018, [cit. 2018-04-21]. Dostupné z: <http://www.rmi.cz/speedwave-xpert>.
- [112] BERGHOF GMBH. Microwave Digestion System [online]. [cit. 2018-04-21]. Dostupné z: [http://www.dijkstra.net/media/catalog/category/Dijkstra\\_Vereenigde\\_Berghof\\_Speedwave\\_magnetron\\_destructie.pdf](http://www.dijkstra.net/media/catalog/category/Dijkstra_Vereenigde_Berghof_Speedwave_magnetron_destructie.pdf).
- [113] BERGHOF GMBH. Multi Tube System for DAC-100 [online]. [cit. 2018-04-21]. Dostupné z: [http://www.onlinecas.com/Berghof/CATALOGUE\\_BERGHOF/Micro-onde\\_MWS3+/Catal\\_MWS3+\\_pdf/MTS\\_DAC-100\\_PT\\_en.pdf](http://www.onlinecas.com/Berghof/CATALOGUE_BERGHOF/Micro-onde_MWS3+/Catal_MWS3+_pdf/MTS_DAC-100_PT_en.pdf).
- [114] GBC SCIENTIFIC EQUIPMENT. Optimass 9500 [online]. [cit. 2018-04-21]. Dostupné z: <http://www.gbcsoci.com/products/icp-tof-ms/optimass-9500/>.
- [115] URBANOVÁ, I., L. HUSÁKOVÁ a J. ŠRÁMKOVÁ. Direct electrothermal atomic spectrometric determination of Ag in aqua regia extracts of soils, sediments, and sewage sludge with matrix modification. *Environmental Monitoring and Assessment*. 2013, **185**(4), 3327–3337.
- [116] HUSÁKOVÁ, L., T. ČERNOHORSKÝ, J. ŠRÁMKOVÁ, K. HUBÁČKOVÁ a I. DOLEŽALOVÁ. Interference-free determination of thallium in aqua regia leaches from rocks, soils and sediments by D(2)-ETAAS method using mixed palladium-citric acid-lithium chemical modifier. *Anal Chim Acta*. 2008, **614**(1), 38–45.
- [117] SUBRAMANIAN, K. S., J. W. CONNOR a J. C. MERANGER. Bone-lead analysis: Development of analytical methodology for milligram samples. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 1993, **24**(4), 494–497.