

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická

Multiprvková analýza kostí metodou oa-TOF-ICP-MS

Bc. Monika Svízelová

Diplomová práce

2018

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2017/2018

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Monika Svízelová**  
Osobní číslo: **C16550**  
Studijní program: **N1407 Chemie**  
Studijní obor: **Analytická chemie**  
Název tématu: **Multiprvková analýza kostí metodou oa-TOF-ICP-MS**  
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 anorganické prvkové analýzy kostí a zubů metodami atomové spektrometrie se zaměřením na metodu ICP-MS. Pozornost věnujte zpracování vzorku i přípravě vzorku k analýze za využití klasických i moderních časově úsporných a ekologicky šetrných postupů.
2. Proveďte optimalizaci lyofilizace a mikrovlnné mineralizace vzorků kostí a optimalizaci parametrů měření techniky oa-TOF-ICP-MS.
3. Určete analytické charakteristiky stanovení vybraných elementů.
4. Ověřte správnost a přesnost navrženého postupu a aplikujte jej pro stanovení vybraných prvků ve vzorcích kostí vyder říčních.
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.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 9.5.2018

.....

Bc. Monika Svízelová

Ráda bych poděkovala vedoucí mé diplomové práce Ing. Lence Husákové, Ph.D. a Ing. Tereze Šídové, Ph.D., které mi věnovaly čas a odborné rady při experimentální činnosti v laboratoři a při zpracování diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat mé rodině a snoubenci Pavlovi Kolářovi za podporu a trpělivost po celou dobu mého studia.

## **ANOTACE**

Diplomová práce byla věnována optimalizaci přípravy vzorků kostí vyder říčních pro potřeby multielementární analýzy metodou oa-TOF-ICP-MS a ICP-OES. Byla provedena optimalizace lyofilizace, mletí vzorku a mikrovlnného rozkladu. Správnost metody pro stanovení 14 elementů byla ověřena pomocí certifikovaného referenčního materiálu SRM<sup>®</sup> Bone Meal 1486.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Multiprvková analýza; Analýza kostí; Lyofilizace; Mikrovlnná mineralizace; ICP-MS; AMA 254; FAAS; ICP-OES; Vydra říční

## **TITLE**

Multielement analysis of bone samples by oa-TOF-ICP-MS

## **ANNOTATION**

The diploma thesis was focused on the optimization of preparation of samples of bones of river otter for multielement analysis by oa-TOF-ICP-MS and ICP-OES. Optimization of lyophilization, sample milling and microwave digestion was performed. The accuracy of the method for determination of 14 elements was verified by analysis of SRM<sup>®</sup> Bone Meal 1486.

## **KEYWORDS**

Multielement analysis; Analysis of bones; Lyophilization; Microwave digestion; ICP-MS; AMA 254; FAAS, ICP-OES; River otter

# OBSAH

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 1     | Úvod.....   | 10 |
| 2     | Teoretická část.....  | 11 |
| 2.1   | Biologické a chemické složení kostí a zubů.....   | 11 |
| 2.1.1 | Složení kostí.....  | 11 |
| 2.1.2 | Složení zubů.....   | 12 |
| 2.2   | Chemická analýza tkání a její význam.....   | 13 |
| 2.2.1 | Tkáně vhodné pro chemickou analýzu.....   | 13 |
| 2.3   | Izotopická analýza a její využití.....  | 15 |
| 2.3.1 | Izotopy.....  | 15 |
| 2.3.2 | Využití izotopických analýz.....  | 16 |
| 2.4   | Analytické metody prvkové analýzy kostí a zubů.....   | 19 |
| 2.4.1 | Atomová absorpční spektrometrie.....  | 19 |
| 2.4.2 | Rentgenfluorescenční analýza.....   | 20 |
| 2.4.3 | Laserová ablace ve spojení s hmotnostní spektrometrií s ionizací v indukčně vázaném plazmatu..... | 21 |
| 2.4.4 | Optická emisní spektrometrie s ionizací v indukčně vázaném plazmatu.....                          | 21 |
| 2.4.5 | Hmotnostní spektrometrie s ionizací v indukčně vázaném plazmatu.....                              | 21 |
| 2.5   | Problematika prvkové analýzy kostí a biologických materiálů.....                                  | 22 |
| 2.5.1 | Spektrální interference.....  | 22 |
| 2.5.2 | Nespektrální interference.....  | 23 |
| 2.5.3 | Přístupy k odstranění interferencí.....   | 23 |
| 2.6   | Příprava vzorku k analýze.....  | 26 |
| 2.6.1 | Odstranění ulpívajících tkání z povrchu kostí a jejich řezání.....                                | 26 |
| 2.6.2 | Lyofilizace.....  | 27 |
| 2.6.3 | Drcení a mletí vzorku.....  | 27 |
| 2.6.4 | Rozklady vzorku.....  | 28 |
| 3     | Experimentální část.....  | 36 |
| 3.1   | Použité chemikálie.....   | 36 |
| 3.2   | Příprava roztoků.....   | 36 |
| 3.2.1 | Příprava 2M roztoku HNO <sub>3</sub> .....  | 36 |
| 3.2.2 | Příprava zásobních roztoků a standardů.....   | 36 |
| 3.2.3 | Kalibrační roztoky.....   | 37 |
| 3.3   | Kontrola kvality analytických výsledků.....   | 37 |
| 3.4   | Seznam, odběr a uchování vzorků vydrých tkání.....  | 38 |
| 3.5   | Příprava vzorků k analýze.....  | 38 |
| 3.5.1 | Odstranění ulpívajících tkání.....  | 38 |

|        |   |    |
|--------|---|----|
| 3.5.2  | Lyofilizace.....  | 39 |
| 3.5.3  | Odstanění zbytků tkání a krve po lyofilizaci .....                      | 40 |
| 3.5.4  | Mletí .....   | 40 |
| 3.5.5  | Mikrovlnná mineralizace.....  | 41 |
| 3.6    | Instrumentace.....  | 42 |
| 3.6.1  | Mikrovlnné zařízení Speedwave Xpert .....                               | 42 |
| 3.6.2  | Lyofilizátor CoolSafe Pro .....   | 43 |
| 3.6.3  | Podvarové destilační zařízení.....                                      | 44 |
| 3.6.4  | Skenovací elektronový mikroskop VEGA3 SBU .....                         | 44 |
| 3.6.5  | Analyzátor velikosti částic Mastersizer 2000MU .....                    | 45 |
| 3.6.6  | Analyzátor rtuti AMA 254 .....  | 45 |
| 3.6.7  | Atomový absorpční spektrometr GBC SensAA.....                           | 46 |
| 3.6.8  | ICP-OES spektrometr GBC Integra XL.....                                 | 47 |
| 3.6.9  | oaTOF-ICP-MS spektrometr GBC OptiMass 9500 oaTOF.....                   | 48 |
| 3.6.10 | Ostatní přístroje a pomůcky .....                                       | 50 |
| 3.6.11 | Použitý software .....  | 50 |
| 4      | Výsledky a diskuze.....   | 51 |
| 4.1    | Optimalizace lyofilizace .....  | 51 |
| 4.2    | Optimalizace mletí.....   | 52 |
| 4.3    | Optimalizace mikrovlnné mineralizace reálných vzorků .....              | 53 |
| 4.4    | Ověření přesnosti a správnosti stanovení .....                          | 56 |
| 4.5    | Detekční limity a meze stanovitelnosti.....                             | 57 |
| 4.6    | Stanovení vybraných prvků ve vzorcích kostí vydry říční .....           | 58 |
| 4.6.1  | Ověření předpokladů o datech.....                                       | 59 |
| 4.6.2  | Mocninná transformace .....   | 61 |
| 4.6.3  | Konfirmatorní analýza dat.....  | 61 |
| 4.7    | Časová náročnost analytického postupu / Rychlost zpracování vzorků..... | 63 |
| 5      | Závěr.....  | 64 |
| 6      | Seznam použité literatury .....   | 66 |
| 7      | Přílohy .....   | 73 |



## SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ

|               |  |
|---------------|--|
| AAS           | Atomová absorpční spektrometrie  |
| ET-AAS        | Atomová absorpční spektrometrie s elektrotermickou atomizací   |
| F-AAS         | Atomová absorpční spektrometrie s atomizací v plameni  |
| F-AES         | Atomová emisní spektrometrie s atomizací v plameni   |
| ICP-AES       | Atomová emisní spektrometrie s atomizací v indukčně vázaném plazmatu   |
| ICP-MS        | Hmotnostní spektrometrie a ionizací v indukčně vázaném plazmatu  |
| oa-TOF-ICP-MS | Hmotnostní spektrometr s ionizací v indukčně vázaném plazmatu s průletovým analyzátozem a ortogonální akcelerací iontů |
| LA-ICP-MS     | Laserová ablace ve spojení s hmotnostní spektrometrií s ionizací v indukčně vázaném plazmatu                           |
| HR-ICP-MS     | Hmotnostní spektrometrie a ionizací v indukčně vázaném plazmatu s vysokým rozlišením                                   |
| XRF           | Rengtenfluorescenční analýza   |
| TMAH          | Tetramethylamonium hydroxid  |
| UV            | Ultrazvuk  |
| DV            | Deionizovaná voda  |
| ETV           | Elektrotermické vypařování   |
| MD            | Membránová desolvatace   |
| GVC           | Generování chemických výparů   |
| DNA           | Deoxyribonukleová kyselina   |
| SF-ICP-MS     | ICP-MS se sekto  |
| MC-ICP-MS     | Multikolektorový ICP-MS  |
| PFA           | Perfluoroalkoxy  |

# 1 ÚVOD

Kosti a zuby mohou být velmi důležitým zdrojem informací asimilace stopových prvků ze životního prostředí [1]. Ze životního prostředí se do těl zvířat, ale i lidí, ukládají zejména těžké kovy [2] (např. Hg, Cd, As nebo Pb), jejichž dlouhodobá expozice je nebezpečná a může vyvolat nežádoucí účinky na zdraví jak u zvířat, tak u lidí [3]. Zajímavé informace o historii uhynulých jedinců, mezi které patří migrace populace [4], stravování, bioarcheologie nebo kriminalistika lze získat analýzou izotopů stroncia, barya, zinku, vápníku, fosforu, uhlíku, dusíku či různými kombinacemi poměrů těchto prvků.

Analýza kosti je obtížná z důvodu komplexní matrice kosti a složité, časově náročné přípravy vzorku [5]. Navržený postup přípravy vzorku byl optimalizován s ohledem na současné trendy zelené chemie tak, aby byl co nejrychlejší, nejpresnější a ekonomicky přijatelný pro analýzu omezeného množství biologických vzorků [6].

Hlavním zájmem této práce je multiprvková analýza kostí pomocí hmotnostního spektrometru s ionizací v indukčně vázaném plazmatu s průletovým analyzátozem a ortogonální akcelerací iontů. Prvky, které jsou předmětem našeho zájmu, jsou v kostech obsaženy v ultrastopových koncentracích, a tak bylo velmi důležité pracovat ve vysoké čistotě, aby nedošlo ke kontaminaci. Navržený analytický postup byl ověřen pomocí certifikovaného referenčního materiálu a analytických návratností.

Pro tuto práci byly k dispozici kosti vydry říční od společnosti ALKA Wildlife, o.p.s., která organizuje sběr uhynulých těl vyder říčních na území České republiky již od 90. let a zabývá se jejich ochranou [7]. Závěry této práce by mohly pomoci právě při ochraně tohoto živočišného a na našem území stále ohroženého druhu.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Biologické a chemické složení kostí a zubů

#### 2.1.1 Složení kostí

Jako jiné pojivové tkáně i kostní tkáň se skládá z buněk vložených v extracelulárním matrix (ECM). Přestože je kost považována za neživou, ve skutečnosti se jedná o živou, dynamickou tkáň, která se neustále obnovuje. Odhaduje se, že 10–15 % kostí v celém těle je každý rok nahrazeno novou kostní hmotou. Proces remodelace kostí je prováděn specializovanými buňkami kostní tkáně. Jsou tři typy těchto buněk a to osteoblasty, osteoklasty a osteocyty. Osteoblasty slouží k syntéze kosti, osteoklasty k odbourávání kostní tkáně a osteocyty jsou v kosti trvale přítomny [8].

Matrice kosti je složena z organické fáze na bázi kolagenu a minerální fáze. Sušinu tvoří přibližně 70 hm. % minerální a 30 hm. % organické fáze [9]. Minerální fáze poskytuje kosti zejména tuhost a pevnost. Hlavní složkou organické fáze je kolagen [10], který tvoří přibližně 85–90 hm. %, zbytek tvoří nekolagenní proteiny, proteoglykany a lipidy [9]. Jedná se o strukturální protein, který se vyskytuje ve šlachách, vazech, chrupavkách, rohovce, kůži a také kosti. Kolagen je nejhojněji zastoupeným proteinem v lidském těle (cca 1 kg kolagenu na 23,3 kg tělesné hmotnosti) a vyskytuje se ve 20 různých podobách. Není tedy divu, že kolagen patří mezi nejvíce studované proteiny náchylné k diagenetickým a degradačním změnám. Na druhou stranu je kostní kolagen jedním z nejodolnějších proteinů, které zůstanou nepoškozené i po smrti až tisíce let. Kolagen je tedy dobrým zdrojem informací pro různé životní strategie člověka [10].

Hlavními složkami kosti jsou vápník a fosfor ve formě hydroxyapatitu, jehož vzorec je  $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]_3 \cdot \text{Ca}(\text{OH})_2$ . V minerální fázi je obsaženo 39,9 % (m/m) Ca a 18,5 % (m/m) P a také jsou tam přítomny stopové a minoritní prvky jako Sr, Ba, Zn, Cu, Mn, Mg a Na [11]. Vzhledem k rozdílům mezi chemickým složením a krystalickou strukturou těchto anorganických minerálů, byl zaveden pojem bioapatit. V bioapatitu, na rozdíl od hydroxyapatitu nahrazují uhličitánové ionty  $\text{CO}_3^{2-}$ , hydroxylové ionty  $\text{OH}^-$  a fosfátové ionty  $\text{PO}_4^{3-}$ . Bioapatit je tak popsán jako na uhličitán bohatý a na hydroxylové ionty chudý apatit [10].

### 2.1.2 Složení zubů

Zuby jsou malé, kalcifikované útvary nacházející se v čelistech mnoha obratlovců a jejich primární funkcí je rozmělnění potravy. Jsou zakotveny v alveolách, což jsou dutiny v čelisti. Na místě jsou zuby drženy tenkou cementovou mezivrstvou. Část zubu vystupující do úst se nazývá korunka a druhá část, ukrytá pod dásněmi, se nazývá kořen zubu [12].

Zub je složen ze tří vrstev – skloviny, dentinu a kostní dřevě. Vnější vrstvu korunky tvoří sklovina, která je nejtvrďší tkání v těle. Sklovina je nejen tvrdá, ale také velmi odolná proti mechanickému poškození. Na rozdíl od kosti se sklovina během života neremodeluje, protože buňky vytvářející sklovinu zaniknou poté, co zub vyrostl do ústní dutiny. Sklovina se skládá z minerálního nestechiometrického hydroxyapatitu vápenatého podobně jako kost. Poměr vápníku a fosforu je u apatitu skloviny nižší než u kosti. Hydroxyapatit skloviny na rozdíl od kosti neobsahuje kolagen a buňky a skládá se z dlouhých vláken tkaných do tkaniny [12]. Hydroxyapatit tvoří přibližně 98 hm. % složení skloviny. Zbylé 2 hm. % tvoří malé množství proteinu podobného kolagenu a zbytky organické matrice mineralizované při vývoji zubů [13]. Minimální obsah vody a bílkovin je to, co drží vlákna hydroxyapatitu pohromadě [12]. Hydroxyapatit je schopen také iontové výměny. Anionty jako je fluorid  $F^-$  nebo uhličitan  $CO_3^{2-}$  mohou nahradit hydroxidový aniont  $OH^-$  a kationty jako zinečnatý  $Zn^{2+}$ , strontnatý  $Sr^{2+}$  a hořečnatý  $Mg^{2+}$  mohou nahradit kation vápenatý  $Ca^{2+}$ . Například náhrada fluoridového aniontu  $F^-$  za hydroxidový anion  $OH^-$  chrání sklovinu vůči kyselé demineralizaci. Stejně jako všechny fosforečnany vápenaté je i zubní sklovina rozpustná v kyselině. Zuby jsou velmi stabilní nad hodnotou pH 5,5. Pod touto hodnotou, která je označována za kritickou, jejich stabilita klesá. Když pH klesne pod tuto hodnotu, dochází k demineralizaci [13].

Vrstva pod sklovinou, která je od skloviny oddělena cementovou vrstvou, se nazývá dentin. Dentin je méně tvrdý než sklovina a jeho složení je také podobné složení kosti [12]. Obsahuje přibližně 70 hm. % hydroxyapatitu a zbytek tvoří kolagen (20 hm. %) a voda (10 hm. % vody) [12, 13]. Na rozdíl od struktury skloviny, kterou tvoří hustě zabalené krystaly, matrice dentinu je perforovaná množstvím malých kanálků vyplněných tekutinou. Dentin je stejně jako sklovina rozpustný v kyselině. Uvnitř dentinu se nachází třetí vrstva, zubní dřev, která obsahuje cévy a nervy [12].

## 2.2 Chemická analýza tkání a její význam

Kosti a zuby jsou tvrdé a chemicky velmi stabilní lidské tkáně a jsou-li správné podmínky, mohou zůstat nedotčené po stovky až tisíce let [10, 14]. Jsou velmi bohatým zdrojem důkazů, protože jsou organizovány do strukturální hierarchie, ve které je každá úroveň určena místním prostředím [14] a mají schopnost akumulovat prvky, zejména těžké kovy, ze životního prostředí [2]. Obsah prvků v kostech se pohybuje od hmotnostních procent až po  $\text{ng g}^{-1}$ . Stopové prvky, které jsou pro člověka esenciální, mohou poskytnout informace o jedinci v raném věku nebo v posledních letech jeho života. Zvýšená koncentrace železa, hliníku nebo hořčíku může být způsobena působením okolního prostředí na ostatky [15, 16]. Chemická analýza kostí a zubů je tak velmi významná pro zjištění různých životních strategií jednotlivce i celé populace [4]. Lze zjistit například stravovací návyky, výživové údaje, klimatické změny v době života organismu, migrační strategii, geografickou polohu nebo přibližný čas smrti [4, 10].

Životní strategie jednotlivce lze sledovat pomocí retrospektivní analýzy ontogenetického vývoje. To je možné díky znalosti mineralizace trvalých a mléčných zubů a zároveň díky rozdílům mezi mírou přestavby skloviny, dentinu a kosti v závislosti na věku jednotlivce. Velký potenciál izotopových analýz je však velmi omezen diagenézí<sup>1</sup> [4].

### 2.2.1 Tkáně vhodné pro chemickou analýzu

První tkání používanou pro analýzu stabilních izotopů byla kost. Konkrétní analyzovanou složkou kosti byla bílkovina kolagen. Kolagen je obložen krystaly fosforečnanu vápenatého převážně ve formě hydroxyapatitu. Díky pevné vazbě mezi kolagenem a hydroxyapatitem může kolagen vydržet až tisíce let. Kolagen obsahuje přibližně 35 hm. % uhlíku a 11-16 hm. % dusíku. Ale vzhledem k tomu, že kolagen časem degraduje, bylo nutno najít jiné reprezentativní zdroje uhlíku. Tím může být karbonát ( $\text{CO}_3$ ) vyskytující se v zubech a kostech a nacházející se v jejich anorganické fázi [9].

K většině pokusů vyřešení změn izotopové chemie savců byla použita sklovina a dentin. Zubní sklovina a dentin rostou akrecí a zanechávají vrstvy, které se tvoří v různých časových intervalech (dny až roky). Takže zub může obsahovat úplný záznam rané fáze růstu života zvířete [14]. Kosti a dentin mají i přes použití různých čistících technik tak zdeformované původní složení, že jsou pro analýzu téměř nepoužitelné. Nejdůležitějším kostním fragmentem používaným pro chemické analýzy je proto sklovina, která je fyzikálně i chemicky stabilní [4].

---

<sup>1</sup> Diagenéze je proces definovaný jako soubor pochodů, které mění minerální složení, strukturu a texturu sedimentu v období od jeho uložení po jeho metamorfózu nebo zvětrávání v povrchových podmínkách. Mezi diagenetické pochody patří zhutňování, rozpouštění, cementování, výměna nebo rekrystalizace. Jedná se o prostředky, díky kterým se volný sediment přeměňuje na sedimentární horninu, např. písek do pískovce, rašelina do uhlí, atd. [17]

### 2.2.1.1 Sklovina

Sklovina je pro chemickou analýzu velmi vhodná, protože téměř nepodléhá diagenetickým změnám, pokud není tedy vystavena neobvykle krutým podmínkám jako je pohřbívání těl v hlubinném hrobu nebo dlouhodobé ponoření do mořské vody. V případě moderních a poměrně nedávných vzorků hodnoty stabilního izotopu kyslíku vázaného na uhlíčitán v bioapatitu netrpí žádnými diagenetickými změnami. Věc, které je třeba věnovat pozornost, je typ zubu vhodný pro analýzu izotopů [10]. Různé typy zubů odhalují totiž různé ontogenetické periody [9].

S výjimkou druhých a třetích stoliček, které se formují po narození a vylézají do dutiny ústní mezi 7. a 16. rokem života, jsou všechny zuby v době narození již zformovány. Jejich izotopový podpis tak obsahuje časově zprůměrovaný záznam o příjmu potravy a vody během tvorby korunky v době těhotenství, ale také zaznamenává proces odstavení a změny ve fyziologii a metabolismu v raném dětství. Za účelem zjištění informací o geografickém původu osoby v dětství a dospívání by měly být použity pozdní stoličky [10].

### 2.2.1.2 Kost

Jestliže nejsou k dispozici pro analýzu zuby, jedinou další tkání s „pamětí“ lidské historie je lidská kost. U kosti se nastaví růstový vzor reabsorpce staré kosti (jak kolagenu, tak bioapatitu) a začne ukládání nové kostní hmoty, které provádí specializované buňky. Starší růst je tím vymazán [14]. Tomuto procesu se říká remodelace, neboli přestavba kosti.

Míra přestavby kosti je ročně cca 10–15 %. Jedná se však o průměrnou hodnotu pro celou lidskou kostru. Ve skutečnosti se míra přestavby kosti liší kost od kosti a je variabilní v závislosti na jednotlivci, jeho pohlaví a konkrétní kosti. Trabekulární, neboli houbovitá kost, se remodeluje velmi rychle, na rozdíl od kompaktní kosti, která se remodeluje pomaleji. Například žeberní kosti jsou složeny téměř úplně z houbovité kosti a zcela se přestaví za 4–5 let, což odpovídá ročně 25 %. Na rozdíl od toho kompaktní kosti, například kost stehenní, se úplně přestaví jednou za 20–25 let, což odpovídá 5 % ročně. Přestavba kosti loketní, vřetenní a pažní se pohybuje někde mezi těmito dvěma hodnotami. Míra přestavby kosti se liší také v kostech s epifýzami (konce dlouhých kostí), které se remodelují rychleji, a diafýzami (střední části dlouhých kostí) [10].

Pro stabilnější a spolehlivější údaje by se měly vzorky odebírat z centrální části kosti. Bylo by žádoucí mít znalosti o robustních rychlostech přestavby všech kostí nebo alespoň výběru kostí, které poskytují dobré zobrazení celé lidské kostry a tím časového záznamu, který je v ní

obsažen. To by značně pomohlo k rekonstrukci celé životní historie oběti nebo geografické historie kosti. Tento přirozený archiv by poskytoval neocenitelné forenzní informace nejen pro otázky týkajících se vraždy, ale také pro identifikaci obětí katastrof, a to zejména pokud se oběti nacházejí v multietnickém prostředí, což je případ teroristických bombových útoků v oblíbených turistických destinacích. Přesto nám ale tyto přibližné hodnoty pomáhají přispět k závěrům o minulosti člověka pomocí časově zprůměrovaných informací [10].

## 2.3 Izotopická analýza a její využití

Analýzy stabilních izotopů začaly v raných letech 20. století. Stabilní izotopy byly objeveny v roce 1913, poté došlo k vylepšení přístrojové techniky a k jejich intenzivním studiím a nejvíce jich bylo identifikováno do poloviny 30. let. První komerční hmotnostní spektrometr byl použit k analýze ropy v roce 1942. Během 50. a 60. let se hmotnostní spektrometry a aplikace stabilní izotopové analýzy rozšířily do oborů chemie, biologie a geochemie. V té době úsilí směřovalo na porozumění změnám výskytu izotopů různých prvků. Například geochemici zkoumali izotopy kyslíku a jeho potenciál pro studium klimatických podmínek v minulosti. Velké pokroky v pochopení změn stabilních izotopů v biosféře a geosféře se objevily v padesátých a šedesátých letech [9].

### 2.3.1 Izotopy

Izotopy jsou atomy stejného prvku se stejným počtem protonů, ale s různými počty neutronů. Atomová hmotnost je určena počtem protonů a neutronů, a tak se hmotnosti izotopů téhož prvku liší [9].

V kostní tkáni je obsaženo velké množství prvků. Z toho jsou jen některé stabilní izotopy vhodné k analýze. Jsou to například  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^2\text{H}$ ,  $^{18}\text{O}$ ,  $^{34}\text{S}$  [14] nebo poměry izotopů  $^{10}\text{B}/^{11}\text{B}$  [18],  $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$  [19, 20]. V Tabulce 1 jsou uvedeny nejběžnější izotopy používané v analýzách lidských tkání a jejich procentuální zastoupení [9]. Některé tyto izotopy se vyskytují jak v organické, anorganické, ale také v komplexní části organického materiálu (např. bílkovinný kolagen), který je rozdělen na aminokyseliny, což přispívá k velkému množství informací [14].

Na rozdíl od nestabilních (radioaktivních) izotopů, stabilní izotopy se časem nerozpadají. Například  $^{14}\text{C}$  se v mrtvém organismu rozpadne na  $^{14}\text{N}$ , ale množství  $^{12}\text{C}$  a  $^{13}\text{C}$  v organismu se nezmění. Při chemických reakcích jako je přeměna atmosférického  $\text{CO}_2$  na glukózu u rostlin, se relativní množství  $^{12}\text{C}$  a  $^{13}\text{C}$  v rostlinné tkáni liší na základě atmosférického  $\text{CO}_2$ . To je dáno skutečností, že se izotopy liší molekulovou hmotností, a proto se mírně liší i chemické a fyzikální vlastnosti. Izotopy s vyšší hmotností (těžší izotopy), jako je  $^{13}\text{C}$  obvykle reagují o

něco pomaleji než lehčí izotopy jako je  $^{12}\text{C}$ . Fyzikální jevy, které se vyskytují během chemických reakcí v důsledku rozdílu v hmotnostech izotopů se nazývají „izotopové efekty“. Výsledný rozdíl poměru izotopů uhlíku v rostlinných tkáních v porovnání s uhlíkem v atmosférickém  $\text{CO}_2$  způsobeném izotopovými efekty se nazývá „frankcionace“. Frankcionace je základ pro variaci stabilních izotopů v biologických a geochemických systémech a získání pochopení chemických reakcí [9].

**Tabulka 1: Procentuální zastoupení stabilních izotopů používaných v analýze lidských tkání [9]**

| Prvek  | Izotop          | Zastoupení (%) | Prvek     | Izotop           | Zastoupení (%) |
|--------|-----------------|----------------|-----------|------------------|----------------|
| Vodík  | $^1\text{H}$    | 99,985         | Síra      | $^{32}\text{S}$  | 95,00          |
|        | $^2\text{H}$    | 0,015          |           | $^{33}\text{S}$  | 0,76           |
| Uhlík  | $^{12}\text{C}$ | 98,89          |           | $^{34}\text{S}$  | 4,22           |
|        | $^{13}\text{C}$ | 1,11           |           | $^{36}\text{S}$  | 0,014          |
| Dusík  | $^{14}\text{N}$ | 99,63          | Stroncium | $^{84}\text{Sr}$ | 0,56           |
|        | $^{15}\text{N}$ | 0,37           |           | $^{86}\text{Sr}$ | 9,86           |
| Kyslík | $^{16}\text{O}$ | 99,759         |           | $^{87}\text{Sr}$ | 7,02           |
|        | $^{17}\text{O}$ | 0,037          |           | $^{88}\text{Sr}$ | 82,56          |
|        | $^{18}\text{O}$ | 0,204          |           |                  |                |

### 2.3.2 Využití izotopických analýz

I přes velké pokroky v rozlišení, detekci a hmotnostních spektrometrech, ke kterým došlo ve dvacátém století, byla analýza stabilních izotopů velmi náročnou a nákladnou metodou. Příprava vzorků, izolace plynů obsahující specifické prvky a skutečná analýza byly velmi náročné procesy vyžadující neustálou pozornost pracovníků laboratoře. V posledních 15 letech došlo k velkému rozvoji izotopických analýz, protože je možné analyzovat více vzorků za mnohem nižší cenu, než tomu bylo dříve [9].

Díky chemickým změnám ve tkáních a různému stupni přestavby kosti lze studovat stravování, migraci a životní historii jednotlivce a to až 10 let před jeho smrtí. Kostí a zuby poskytují přímé informace o stravování v minulosti, a to včetně stravy kojenců. Znalosti získané z chemie kostí se vztahují k jiným zdrojům důkazů o stravě a následně zahrnují informace o výživě a nemocech. Pochopení stravovacích návyků kojenců a doba kojení se týká demografických proměnných jako je rozmezí mezi narozením a růstem populace. Chemické rozdíly v kostech a zubech mohou být spojeny také s chemickými změnami v životním prostředí, a tak odhalují informace o místě pobytu a migraci [4].



Významnými oblastmi analýz kostí a zubů jsou především stravovací návyky, migrační strategie, bioarcheologie a kriminalistika, kterými se budeme podrobněji zabývat v následujících odstavcích.

### 2.3.2.1 Stravovací návyky

V minulosti byly chemické analýzy kostních materiálů využívány především k rekonstrukci stravy člověka [4]. Izotopové složení kostí odráží přímo to, co zvíře přijímá jako potravu, podléhá změnám způsobeným procesy trávení, vylučování a syntézám tkání. Nahlédnutím do izotopového složení kostí zjistíme izotopové složení potravy [14].

Za účelem rekonstrukce stravy se používají analýzy stabilních uhlíkových a dusíkatých izotopů včetně izolace z konzervovaného kostního kolagenu (C a N) a kostního apatitu (C) a také prvky stroncium, baryum, vápník nebo fosfor [4]. Užitečnost analýz stroncia a barya vychází z toho, že tyto prvky splňují požadavky potvrzeného teoretického modelu, který je zajištěn experimentálními studiemi. Díky skutečnosti, že jejich koncentrace ve skeletu jsou úměrné koncentraci v potravinách a že jsou nahromaděny v kostním apatitu, se stroncium a baryum využívá k rekonstrukci stravy lidských populací [4]. Největší obsah Sr v kostech či zubech byl zjištěn u zvířat/lidí konzumujících mořskou stravu [21, 22].

Zjištěním množství  $^{13}\text{C}$  a  $^{15}\text{N}$  v lidských tkáních lze rozeznat poměr suchozemské a mořské stravy [19]. Rozdíly mezi suchozemskou a přímořskou stravou lze studovat také pomocí analýz poměrů Sr/Ca [4, 21, 22], Sr/Ba a Ba/Ca [4, 23, 24]. A všech těchto poměrů se využívá také k rekonstrukci doby odstavení mláděte či dítěte od mateřského mléka [4].

K rekonstrukci historie stravy se také využívá obsahu Zn a poměru Sr/Zn. Nejnížší obsah Zn v kostních tkáních mají býložravci, vyšší všežravci a nejvyšší masožravci. Vysoký obsah Zn v zubech může značit zánět kostní tkáně anebo může pocházet z okolního prostředí [25].

### 2.3.2.2 Migrační strategie

V posledních letech analýza stabilních izotopů našla uplatnění také v identifikaci migrujících jednotlivců, tedy osob z jiných oblastí, než v níž byly nalezeny pozůstatky, je vysoce významná pro odhad migračních pohybů, směšovacího poměru a dynamiku pohybu populace pravěkého člověka [4].

Byl zjištěn vztah mezi podílem stabilního izotopu kyslíku ( $\delta^{18}\text{O}$ ) získaného z kostních fosfátů savců a úrovní kyslíku ve vodě, která byla v dané oblasti konzumována. To vedlo k závěru, že izotopová koncentrace kyslíku ve tkáních se dá určit pomocí izotopové koncentrace pitné vody v dané oblasti [4]. Pro určení migrace jedinců se využívá stanovení poměru izotopů  $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$  v zubech nebo kostech. Poměr  $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$  v těchto minerálních tkáních odráží izotopické složení stroncia v okolním prostředí a může být použit k určení geografické polohy [26].

### 2.3.2.3 (Bio)archeologie

Současným trendem v bioarcheologickém výzkumu je přesné zaznamenání diagenetických změn v historickém kostním materiálu. Chemické testy v bioarcheologii se zabývají především analýzou lidských a zvířecích pozůstatků, které pocházejí z různého místa a času. Analyzují se hlavně kosti a zuby, ale třeba i měkké tkáně, pokud jsou zachovány a v místě naleziště objeveny. V posledních letech je velký rozvoj metod, které jsou založeny na analýze stabilních izotopů uhlíku, dusíku, kyslíku nebo stroncia. [4].

První analýzy stabilních izotopů uhlíku byly provedeny v 70. letech minulého století [9]. Stabilní izotopy uhlíku, které se analyzují a zkoumají ve vztahu ke stravě, byly původně izolovány z konzervovaného kostního kolagenu. V současnosti jsou alternativou k izotopům uhlíku uhličitaný spojené s anorganickou složkou kosti, tzv. kostní apatit. Kostní materiál musí být chemicky nezměněn post mortem [4].

Stroncium se nachází ve čtyřech izotopech –  $^{84}\text{Sr}$ ,  $^{86}\text{Sr}$ ,  $^{87}\text{Sr}$ ,  $^{88}\text{Sr}$ , z nichž izotopy  $^{86}\text{Sr}$  a  $^{87}\text{Sr}$  jsou radiogenní (tvořeny radiačním zářením) a právě ty se využívají v archeologii. Množství  $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$  je typické pro každou oblast a porovnáním vzorků s referenčními daty z různých regionů lze určit migraci populace. Podmínkou tohoto porovnání je předpoklad, že se většina studované lidské populace v daném regionu narodila a konzumovala místní suchozemské potraviny. V opačném případě, kdy se předpokládá mobilita populace ve sledované oblasti či konzumace mořských potravin části či celé populace, se doporučuje využít statistickou analýzu [19].

### **2.3.2.4 Kriminální analýza a izotopová forenzní analýza**

Kosti a zuby mohou být užitečným důkazem, jsou-li v místě kriminálního případu, např. vraždy nebo masového pohřebiště [27]. Izotopová forenzní analýza se od počátku 21. století velmi rozšířila a poskytla nástroje, které nám umožňují identifikovat „neidentifikovatelné“. Slovem „neidentifikovatelný“ jsou namysli např. identifikace obětí vražd nebo obětí katastrof, kde díky okolnostem nelze použít identifikaci pomocí DNA či databáze otisku prstů. Srovnáním profilu stabilního izotopu jednoho vzorku s jiným může pomoci při rekonstrukci historie života oběti získáním informací o jejím životním stylu a zeměpisném původu. Zeměpisný původ oběti se určí porovnáním obsahu stabilního izotopu kyslíku  $^{18}\text{O}$  v bioapatitu (ten se nachází v lidské kosti či zubní sklovině) a regionálním zdrojem vody. Tato informace může být potom užitečná pro zúžení výběru oblasti vyšetřování. Například informace o historii života oběti může zvýšit šance k odhalení dalšího příbuzného nebo její předsmrtné DNA, jelikož DNA z jiného zdroje by mohla poskytnout užitečné informace pro identifikaci [10].

## **2.4 Analytické metody prvkové analýzy kostí a zubů**

Mezi nejběžnější metody používané pro stopovou analýzu biologických vzorků patří AAS, ICP-OES, ICP-MS, LA-ICP-MS a XRF. AAS, ICP-OES a ICP-MS jsou destruktivní metody, které se používají pro stanovení prvků obsažených v kostech po mokřím kyselém rozkladu a metody XRF a LA-ICP-MS jsou nedestruktivní a příprava vzorku k analýze je buď minimální nebo žádná [2].

### **2.4.1 Atomová absorpční spektrometrie**

Atomová absorpční spektroskopie (dále jen AAS) se používá pro stanovení stopových koncentrací kovů v geochemických [28] i biologických vzorcích. Mezi nejpoužívanější techniky pro stanovení kovů v biologických vzorcích patří atomová absorpční spektrometrie s elektrotermickou atomizací, ET-AAS [5, 28-30].

ET-AAS je pro biologické vzorky vhodná zejména z důvodu dobrých detekčních limitů, vysoké citlivosti [5, 29, 30], použitých malých objemů vzorku a nízkých nákladů na analýzu [30]. Analýza kosti je obtížná z důvodu komplexní matrice kosti a složité přípravy vzorku [5].

Mezi nevýhody ET-AAS patří to, že se jedná o metodu jednoelementární [2] a také, že se jedná o destruktivní metodu [31]. Další nevýhodou je častý výskyt interferencí matrice [28, 32, 33] způsobených fosforečnanem vápenatým [33] a problémů s absorpčním pozadím, které způsobují problémy stanovení většiny prvků [28, 32]. Pro odstranění problémů se silným absorpčním pozadím se používá metoda AAS se Zeemanovou korekcí [34].

Jedním z řešení stanovení stopového množství prvků kovů ve složitých maticích je spojení ET-AAS s automatizovanou on-line extrakcí [28]. Tento koncept automatizace snižuje namáhavou laboratorní práci, zvyšuje průchodnost vzorků a zlepšuje kvalitu analytického výkonu. Postup je zvláště vhodný pro analýzu vzorků s vysokým obsahem soli a Fe, což jsou vzorky, které normálně nelze analyzovat bez předešlé rozsáhlé přípravy vzorku a pro prvky Cd, Cu a Pb ve vzorcích půd, sedimentu, rostlinách, živočišných tkáních a kostních materiálech [28]. Další možností minimalizace interferencí matrice u ET-AAS je přidání modifikátorů. Například pro stanovení Pb a Cd v biologických vzorcích byla doporučena např. směs modifikátorů Ni + Pd + NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Pd/Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> [29] nebo samotný NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pro stanovení Pb [5, 29, 34].

#### 2.4.2 Rentgenfluorescenční analýza

Rentgenfluorescenční analýza (dále jen XRF) je nedestruktivní [2, 5, 35, 36], neinvazivní [5, 35] metoda, která je univerzální a použitelná téměř pro všechny typy vzorků. Analýza je velmi rychlá, trvá cca 30 s až několik minut [35, 36] a identifikace může být provedena během několika hodin. Je také oproti jiným technikám levná [35, 37] a není k ní potřeba nákladně vybavených laboratoří a chemikálií [36]. Mezi další výhody XRF patří rychlá a jednoduchá příprava vzorku, simultánní stanovení prvků od sodíku po uran a rozsah měření koncentrace od 1 ppm do 100 % [37].

Navíc se vyrábí mobilní spektrometry, které se s oblibou využívají například v archeologii nebo u jiných těžko přenositelných vzorků. Jejich nevýhodou jsou horší detekční limity [35, 36]. Mezi další nevýhody XRF patří horší dostupnost certifikovaných kalibračních materiálů [2, 5]. XRF se často validuje proti ET-AAS [5, 37-39], která je známá svou přesností [37].

XRF umožňuje analýzy provádět *in vivo* [2, 33, 39] a u neznámých vzorků kostí lze forenzní analýzou identifikovat živočišný druh [35]. Nejčastěji se *in vivo* ve vzorcích zubů a kostí stanovuje olovo [33, 40]. Biologický poločas rozpadu olova v kostech je dlouhý a měření pomocí XRF odráží dlouhodobou expozici olova [41].

Vlnově disperzní XRF (WDXRF) je nejvhodnější pro analýzy těžkých kovů, protože má dobré rozlišení. Energiově disperzní XRF (EDPXRF) má podobné výsledky za nižší cenu zařízení, proto lze EDPXRF považovat za jednu z nejužitečnějších nedestruktivních metod pro analýzy těžkých kovů v půdě, potravinách či v lidských kostech [37].

### **2.4.3 Laserová ablace ve spojení s hmotnostní spektrometrií s ionizací v indukčně vázaném plazmatu**

LA-ICP-MS se s oblibou používá pro svou rychlost a jednoduchost použití. Mezi výhody patří nízké detekční limity ( $\mu\text{g g}^{-1}$ – $\text{ng g}^{-1}$ ), které jsou důležité ve stopové, ultrastopové a multielementární analýze, vysoká citlivost, minimalizace rizika kontaminace a ztráty těkavých prvků v průběhu analýzy a minimální nebo žádná příprava vzorku [42-44]. Jedná se o metodu nedestruktivní [2], není tedy potřeba komplikovaných rozkladů vzorků, protože se vzorky analyzují v pevném stavu [45, 46]. Tato technika poskytuje relativně vysoké prostorové rozlišení ve stupnici mikrometrů, umožňuje skenování povrchu vzorku a získání dvoudimenzionálních map distribuce prvků. [42-44]. Mezi nevýhody patří, podobně jako u XRF, horší dostupnost certifikovaných kalibračních vzorků [2].

Pro laserovou ablaci je třeba minimální množství vzorku, což je vhodné zejména pro vzácné vzorky (např. fosilie) [19]. LA-ICP-MS se hojně používá pro analýzu měkkých tkání [47, 48] a také pro přímé stanovení kostí [2].

Odstranit polyatomické/isobarické interference lze použitím HR-ICP-MS. Dojde tak ke zlepšení detekce stopových prvků v komplexních maticích jako jsou kosti a zuby (ve srovnání s Q spektrometry) [49].

### **2.4.4 Optická emisní spektrometrie s ionizací v indukčně vázaném plazmatu**

Optická emisní spektrometrie s ionizací v indukčně vázaném plazmatu (dále jen ICP-OES) patří mezi nejběžnější techniky používané pro elementární analýzu, které doplňují strukturální analýzu různých materiálů [50]. Jedná se o metodu destruktivní, vzorky se měří nejčastěji v podobě roztoků [51]. Mezi výhody patří možnost simultánního měření prvků [50, 52, 53], dobré detekční limity [50], přesnost [52], tolerance vysokých obsahů solí ve vzorku, průchodnost velkého množství vzorku a relativně malé množství interferencí [53].

Schopnost této metody dosáhnout nízkých detekčních limitů rozšířila možnosti analýz stopových prvků, které předtím s ET-AAS nebyly možné. Při analýzách biologických vzorků je dostupné vždy jen omezené množství [54]. Může se proto použít např. metoda elektrotermického odpařování ETV-ICP-OES [55].

### **2.4.5 Hmotnostní spektrometrie s ionizací v indukčně vázaném plazmatu**

Hmotnostní spektrometrie s ionizací v indukčně vázaném plazmatu (dále jen ICP-MS) se používá pro analýzy stabilních i radioaktivních izotopů v široké škále aplikací. Tato metoda je vysoce citlivá, má nízké detekční limity, dobrou přesnost [56] i správnost [52, 56].

Metodou ICP-MS je možné současně kvantifikovat velké množství prvků najednou (multielementární analýza) [52, 57]. Techniky ICP-MS popsané v dostupné literatuře popisují stanovení omezeného počtu prvků v kosti, a to zejména z důvodu interferencí matrice, které analýzu komplikují [2, 33]. Kvantifikace stopových prvků tkání pomocí ICP-MS musí být provedena po rozkladu. Zvolená metoda rozkladu by měla odstraňovat a minimalizovat přidání čehokoliv, co způsobuje tvorbu polyatomických iontů v plazmě a/nebo nespektrální interference. Často se používá mikrovlnný rozklad [33, 57]. Rozklady a ostatní postupy přípravy vzorku k analýze budou diskutovány v následující kapitole.

V případě, že je vzorku málo (např. forenzní nebo klinické vzorky), je možno použít dávkování velmi malých množství vzorku – tzv. mikrodávkování. Dávkováním malých hmotností vzorku může dojít ke snížení citlivosti a meze detekce [58].

## **2.5 Problematika prvkové analýzy kostí a biologických materiálů**

Během ICP-MS analýz se roztok nejprve převede na aerosol a dopraví se do plazmy, kde probíhají následující procesy: desolvatace, odpařování, atomizace, excitace a ionizace [59]. Od vzniku aerosolu až po poslední proces, který probíhá v plazmě může dojít k matricovému efektu, který způsobí snížení přesnosti měření, neboli interference. Jedním ze zanedbávaných faktorů je také množství rozpuštěného uhlíku ve vzorku [60], což může způsobovat další interference, které jsou způsoby přenosy nábojů v argonové plasmě. Ty mohou být kritické pro prvky jako As, Hg, I, P, Se a Te [61]. Přítomnost interferencí vede k systematickým chybám a proto se jim musí věnovat pozornost, pochopit je a eliminovat [62].

Interference v ICP-MS analýze mohou být obecně rozděleny na dva typy, a to na spektrální a nespektrální [63].

### **2.5.1 Spektrální interference**

Mezi spektrální interference patří izobarické a polyatomické překryvy  $m/z$  se signálem sledovaného analytu. To způsobuje zvýšení signálu a tím nadhodnocení oproti skutečné koncentraci analytu. Izobarické překrývání je způsobeno atomy, které mají stejný poměr  $m/z$  jako cílový analyt (např.  $^{58}\text{Fe}^+$  a  $^{58}\text{Ni}^+$ ). Polyatomické interference pocházejí z plazmového plynu, kyselin nebo rozpouštědel (vznikají polyatomy oxidů, hydroxidů, C, Cl, S), pufrů či solí (vznikají polyatomy obsahující S a P) obsažené v matrici vzorku. Kromě toho mohou být interference způsobeny také kombinací prvků přítomných v plazmovém plynu, kyselinách a rozpouštědlech s látkami obsaženými v matrici vzorku. Například v biologických matricích

vzorků se nachází vysoký obsah Ca, Cl, K a Na. V Tabulce 2 jsou uvedeny příklady některých izotopů a k nim jejich odpovídající formy, které ruší stanovení [64].

**Tabulka 2: Příklady izotopů a interferujících polyatomických iontů [64]**

| <b>Izotop</b>       | <b>Interference</b>   | <b>Typické pro vzorky</b>         |
|---------------------|---|-----------------------------------|
| $^{52}\text{Cr}^+$  | $^{35}\text{Cl}^{16}\text{O}^1\text{H}^+$ , $^{35}\text{Cl}^{17}\text{O}^+ / ^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}^+$ , $^{36}\text{Ar}^{16}\text{O}^+$ ,<br>$^{38}\text{Ar}^{14}\text{N}^+$    | biologické, potravin a vody       |
| $^{56}\text{Fe}^+$  | $^{40}\text{Ca}^{16}\text{O}^+ / ^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}^+$ , $^{40}\text{Ar}^{15}\text{N}^1\text{H}^+$ , $^{38}\text{Ar}^{17}\text{O}^1\text{H}^+$                               | biologické a potravin             |
| $^{75}\text{As}^+$  | $^{59}\text{Co}^{16}\text{O}^+ / ^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$ , $^{36}\text{Ar}^{38}\text{Ar}^1\text{H}^+$ , $^{38}\text{Ar}^{37}\text{Cl}^+$ ,<br>$^{36}\text{Ar}^{39}\text{K}^+$ | vody, půdy, potravin a biologické |
| $^{80}\text{Se}^+$  | $^{79}\text{Br}^1\text{H}^+$ , $^{160}\text{Gd}^{++}$ , $^{64}\text{Zn}^{16}\text{O}^+ / ^{40}\text{Ar}_2^+$ , $^{40}\text{Ar}^{40}\text{Ca}^+$ ,<br>$^{40}\text{Ar}^{40}\text{K}^+$  | potravin a biologické             |
| $^{112}\text{Cd}^+$ | $^{40}\text{Ca}_2^{16}\text{O}_2^+$ , $^{96}\text{Ru}^{16}\text{O}^+ / ^{40}\text{Ar}_2^{16}\text{O}_2^+$   | potravin a biologické             |

### 2.5.2 Nespektrální interference

V průběhu analýzy se mohou vedle spektrálních interferencí uplatňovat i nespektrální interference neboli matricové efekty. Tyto interference vedou k potlačení nebo k zesílení signálu a obecně se vyskytují, liší-li se složení vzorku od analytických kalibračních roztoků [65, 66]. K nespektrálním interferencím může docházet v průběhu zavádění vzorku, produkce iontů v plazmatu a transport z ICP do interface a z iontové optiky do spektrometru [66]. Mohou souviset i se změnami v plazmě (např. teplota excitace a ionizace, hustota atomů, iontů a elektronů) [63]. Tyto interference je obtížné rozpoznat a korigovat. Přístupy k odstranění interferencí budou diskutovány v další kapitole.

### 2.5.3 Přístupy k odstranění interferencí

Přístupy k odstranění interferencí se mohou rozdělit na neinstrumentální, alternativní metody zavádění vzorku a instrumentální metody.

#### 2.5.3.1 Neinstrumentální metody

Když je spektrální interference způsobena prvkem obsaženým v matrici, je prvním způsobem k jejímu odstranění naředění vzorku. Pokud však ředění významně zhorší intenzitu signálu sledovaného analytu, je vhodné použít volbu alternativního izotopu a/nebo matematickou korekci. Při volbě alternativního izotopu je sledován izotop, který není zatížen spektrálním překryvem s interferujícím analytem. Problém ale je, že tyto izotopy bývají v mnohem menším zastoupení (např.  $^{58}\text{Fe}$  – 0,33 %) [64]. Matematické korekce jsou obecně

přítomny v softwarovém zařízení ICP-MS a slouží pro korekci izobarických interferencí [67]. Slouží k určení koncentrace cílového analytu. Tato metoda není použitelná v případě, že je pozadí příliš vysoké v porovnání s analytem, např. vysoká koncentrace Cl a Ar při stanovení As [68, 69].

Jelikož spektrální interference vzniká díky prvkům obsaženým v matrici, může je vhodná příprava vzorku také značně minimalizovat [62, 64]. Dalším neinstrumentálním přístupem je tedy izolace cílového analytu před instrumentální analýzou. Používají se například rozklady, srážení, separace matrice nebo chromatografická separace [64]. Při zavádění dalších kroků přípravy vzorku je důležité zvážit riziko chyb a kontaminace a zejména časovou náročnost [64].

### **2.5.3.2 Alternativní metody zavádění vzorku**

Nejběžnějšími příklady této skupiny jsou elektrotermické vypařování (ETV), generování chemických výparů (GVC) a membránová desolvatace (MD). Principem je zavedení suchého aerosolu do ICP. Tyto metody mají výhodu, že dokáží eliminovat interference způsobené oxidy a hydroxidy, které ani příprava vzorku neovlivní, protože přímo matrice může produkovat tyto skupiny látek. Současně tak probíhá detekce prvků a snížení interferencí oxidů a hydroxidů [64].

ETV zahrnuje v teplotním programu kroky sušení nebo spalování, takže většina vody z aerosolu se tak odstraní. To minimalizuje vstup oxidu či hydroxidu do plazmy [70]. GVC je dalším způsobem převedení vzorku na suchý aerosol. Z mnoha metod GVC je nejčastější metodou používanou pro ICP-MS generování hydridu. Při této metodě se využívá tetrahydroboritan sodný, kterým se redukuje cílový prvek za vzniku těkavého hydridu. Těkavý hydrid se zavede do plazmy, což izoluje analyt od jeho matrice. Tato metoda je omezena na prvky vytvářející hydrid, kterými jsou např. As nebo Se. Tato metoda zlepšuje detekční limit, ale může vyvolat paměťový efekt anebo vytvořit další interferenty pocházející z nečistot činidel [71]. Principem MD je zavedení aerosolu vzorku ze zmlžovače do vyhřívané komory. Pára je poté zavedena do membránového odsávacího modulu. Poté se zavede protiproudý plyn argonu a rozpouštědlo se odstraní a projde membránou, čímž se dostane méně těkavý analyt přímo do plazmy. Metoda MD je více univerzální, protože není omezena pouze na těkavé prvky nebo prvky vytvářející hydrid, jako tomu bylo u předchozích metod [64].

Výhodou těchto metod je ve srovnání s konvenčním zmlžováním vzorku vyšší účinnost transportu vzorku. Nevýhodou je vysoká pořizovací cena [64].



### 2.5.3.3 Instrumentální modifikace ICP-MS

Tyto přístupy, na rozdíl od předchozích, kdy se odstranila interference pocházející z matrice, nám zajistí minimalizaci interferencí pocházejících z argonové plazmy. Díky těmto přídatným zařízením dochází k výraznému zlepšení detekčních limitů. Jsou však velmi nákladná a jejich pořízení je nutno pečlivě zvážit. Jde se o modifikace plazmy, kdy je v některých tocích proud argonu nahrazen jinými plyny, například methanem nebo dusíkem. Dále studené plazma, kdy se sníží výkon plazmy na 650–800 W a tím se sníží teplota plazmatu [64]. Dojde k nižší ionizaci Ar a tím s k nižší tvorbě polyatomických interferencí [72].

Dalšími instrumentálními modifikacemi jsou kolizně reakční cely. Do cely se zavede kolizní nebo reakční plyn. Srážkové (kolizní) plyny jako He, H<sub>2</sub> nebo Xe se srazí jak s interferujícími polyatomy, tak s cílovým analyty, ale protože interferující částice jsou větší než částice cílového analytu, dojde k tzv. diskriminaci kinetické energie a částice nejsou detekovány, citlivost se zlepší. V případě dynamických reakčních cel se zavádí reakční plyn, kterým může být O<sub>2</sub>, NH<sub>3</sub>, CH<sub>4</sub> nebo H<sub>2</sub>. Plyn reaguje s cílovým analytem za vzniku jiného, který není detekovatelný a nereaguje s interferenty. Vzniklý analyt se tak už nepřekrývá s interferentem [64].

Spektrometry s vysokým rozlišením (HR-ICP-MS) mají až 30ti násobně vyšší rozlišení než klasické kvadrupolové spektrometry díky čemu se vyřeší většina spektrálních interferencí. Mezi tyto spektrometry patří například SF-ICP-MS nebo MC-ICP-MS [73]. Jejich nevýhodou je, že kvůli vysokým požadavkům na rozlišovací schopnost hmoty je účinnost přenosu iontů nižší, což ovlivňuje citlivost a snižuje přesnost ultrastopové analýzy. Další nevýhodou je bezesporu vysoká pořizovací cena [64].

## 2.6 Příprava vzorku k analýze

Příprava vzorku je kritickým a nejdůležitějším krokem jakékoliv chemické analýzy a zahrnuje kroky od jednoduchého ředění až po částečné či úplné rozpuštění. Cílem přípravy vzorků je v co nejkratším čase dosáhnout nejlepšího výsledku s minimální kontaminací, s použitím co nejmenšího množství reagentů. Také je žádoucí, aby při přípravě vzorku vzniklo co nejméně odpadu [74].

Příprava vzorků kostí zahrnuje několik kroků. Prvním je odstranění ulpívajících tkání z povrchu, v případě fosilních kostí pouze čištění povrchu. Druhým krokem je lyofilizace, následovaná mletím či drcením vzorku a vhodným typem rozkladu. V literatuře jsou popsány i postupy rozkladů, kdy se mletí kosti úplně vynechá a ta se rovnou rozpustí v kyselině dusičné [5, 33], směsi kyseliny dusičné a peroxidu vodíku [75] nebo ve směsi kyseliny dusičné a chlorovodíkové v poměru 1:1 [52].

Před samotnou analýzou kostí/zubů se vzorky nechají zmrazeny při teplotě  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  [76],  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$  [77],  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  [5], nebo až  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  [78]. Nádobí používané při přípravě vzorků a následných analýzách se používá ve většině případů plastové [76], vyrobené např. z polypropylenu [75, 77]. Nádobí je vhodné před použitím loužit s 10% [79] nebo 5M  $\text{HNO}_3$  [57] po dobu minimálně 24 hod. a poté opláchnout deionizovanou vodou, aby se zamezilo riziku kontaminace [57, 79].

Tabulka 3 na konci kapitoly znázorňuje přehled metod použitých pro analýzu kostí a podobných typů biologických materiálů a jejich příprava k analýze.

### 2.6.1 Odstranění ulpívajících tkání z povrchu kostí a jejich řezání

Odstranění zbytků měkkých tkání a krve z povrchu kosti je důležité pro dosažení homogenizovaného a reprezentativního vzorku. Používají se k tomu jak různé nástroje, tak i chemické látky, které tyto tkáně rozpustí.

K mechanickému odstranění ulpívajících tkání z povrchu vzorků se používají skalpele, škrabky či jiné nástroje vyrobené z titanu [76], plastu [32, 76], tantalu [5, 78] nebo nerezové oceli [33, 77, 78]. Dále může být použit k tomuto účelu zubní vrták s karbidovým vývrtem [19].

K chemickému odstranění tkání a zbytků krve se nejčastěji používá peroxid vodíku [1, 52, 78, 80] nebo 10% roztok chlornanu sodného [33]. K odstranění lipidů a zbytků organických kontaminantů lze použít aceton [1]. K čištění zubů může být použit kartáček na zuby namočený do 1% roztoku papainu [81] a pro LA-ICP-MS postačí jako příprava vzorku k analýze opláchnutí v 2% roztoku  $\text{HNO}_3$ , v deionizované vodě a následně v isopropylalkoholu [82]. K odmaštění lze kosti namočit do diethyletheru na 1–2 hod. [78]. K dočištění se vzorky namočí

do absolutního alkoholu (95,57% roztok ethanolu) [52] nebo ponechají v UV lázni deionizované vody [32, 83].

Pro řezání a štípání kostí se používá například titanový skalpel [76], rotující nůž z nerezové oceli [83] nebo nástroje s diamantovým povrchem, např. pila Isomet s prstencovou čepelí s diamantovým povlakem [52], vrták s diamantovým kotoučem [84], vrtačka s diamantovým povlakem [1] nebo kotoučová pila s diamantovým povrchem [5].

Některá dostupná literatura uvádí i odstranění kostní dřevě a to např. pomocí tantalové škrabky [5] nebo pitevní pily [78]. Pro obroušení zubní skloviny pro izotopickou analýzu byl použit nástroj Dremel [19].

### **2.6.2 Lyofilizace**

Lyofilizace, neboli sušení vymražením, je technika vhodná k uchování biologických vzorků bez jejich poškození [85]. Cílem lyofilizace je uchování vzorku bez poškození pomocí vymražení vnitřní vody, která se jako led odstraní sublimací [85, 86]. Vzorek je nejprve zmražen a poté vystaven vysokému vakuu, čímž dojde k odpaření vody bez tání. Lyofilizace probíhá ve třech krocích: mražení, sublimace ledu a desorpce vlhkosti adsorbované v matrici. Uvolněná vodní pára kondenzuje na povrchu kondenzátoru při velmi nízké teplotě [86]. Za kritický krok se považuje krok mražení, protože ovlivňuje velikost krystalů ledu, tedy i sublimaci a desorpci. Proces lyofilizace nezahrnuje proces sterilizace [85].

### **2.6.3 Drcení a mletí vzorku**

Pro rozmělnění kostí či zubů na jemný prášek lze použít třecí misku s tloučkem [2, 19, 81, 87], kde je však obtížné dodržet potřebnou velikost částic. K mletí se mohou využít mlýny různých typů – kulový [2, 5], mlýn s noži [78, 79] nebo ultra odstředivý mlýn. U velkých kostí je možno využít dvojího mletí. První mletí pomocí mlýnu s noži, díky kterému získáme částice o velikosti 2 mm a druhé mletí pomocí ultra odstředivého mlýnu, který rozemele tyto částice na jemný homogenní prášek [78]. U drcení a mletí vzorku je třeba počítat s případnými ztrátami a použít tak více vzorku, než k analýze skutečně potřebujeme.

#### 2.6.4 Rozklady vzorku

Biologické materiály, jako jsou kosti, játra, ledviny mohou být rozkládány suchým spalováním, klasickým rozkladem na plotýnce nebo mikrovlnným rozkladem. Běžně se používají kyselé mikrovlnné rozklady v uzavřených systémech, protože jsou rychlejší, přesnější, používají malé množství reagentů a vyhýbají se ztrátám těkavých prvků, čímž snižují riziko kontaminace životního prostředí [74, 88].

Spalování je neúčinnější a nejstarší způsob rozkladu organických materiálů. Používá se zejména u hůře rozložitelných vzorků. Vzhledem k vysoké teplotě dosažené při spalování se odstraní téměř úplně organická matrice a tím se sníží možnost interferencí během analýzy. Tento způsob rozkladu je vhodný pro přípravu vzorků pro stanovení nekovů (např. v biologických matricích či polymerech), pro které je rozklad pomocí kyselin zcela nevhodný [88].

K mokrým rozkladům se používají koncentrované kyseliny. Při výběru je důležité vzít v úvahu sílu kyseliny, její oxidační a komplexní sílu, teplotu varu, rozpustnost výsledných solí, bezpečnost při manipulaci a čistotu [89]. Pro organické vzorky se používá nejčastěji kyselina dusičná [5, 29, 33, 77, 79, 90, 91], dále potom chlorovodíková, sírová, fosforečná, fluorovodíková a peroxid vodíku [74]. Nejvhodnějšími a zároveň nejpoužívanějšími reagenty je kombinace kyseliny dusičné společně s peroxidem vodíku [32, 75, 76, 87, 92].

Další možností rozkladu biologických materiálů je alkalická solubilizace. Ta se používá pro speciální analýzu nebo při malém množství vzorku. Pro tento účel se používá jako jeden z možných reagentů TMAH<sup>®</sup> (tetramethylamoniumhydroxid) [79, 93]. Příklady konkrétních rozkladů biologických vzorků včetně navážek, použitých reagentů, měřených analytů a použité metody jsou uvedeny v Tabulce 4.

**Tabulka 3: Přehled metod použitých pro analýzu kostí a podobných typů biologických materiálů a jejich příprava k analýze**

| Metoda           | Analyt   | Vzorek   | Příprava vzorku   | Limit detekce              | Lit. |
|------------------|--|--|---|----------------------------|------|
| ET-AAS           | Pb   | stehenní kosti prasat                                    | odstranění měkkých tkání pomocí nože, sušení v peci 4 hod., spálení   | 1–2 $\mu\text{g g}^{-1}$   | [31] |
| ET-AAS<br>F-AAS  | Cu, Mg, Mo,<br>Ni, Pb, Zn                                | meziobratlová ploténka a stehenní lidské kosti           | očištění od tkání, lyofilizace 24 hod., mikrovlnný rozklad s $\text{HNO}_3$   | $\mu\text{g kg}^{-1}$      | [30] |
| ET-AAS           | Pb   | holenní, stehenní kosti, žebra a lebky zasažených olovem | odstranění svalů a kůže pomocí škrabky z Ta, nařezání pomocí pily s diamantovým povrchem, dále buď rozpuštění v $\text{HNO}_3$ při pokojové teplotě 48 hod. nebo mikrovlnný rozklad | 0,6 $\mu\text{g g}^{-1}$   | [5]  |
| ET-AAS           | Pb   | vápníková výživa vyrobená z kostí                        | mikrovlnný rozklad s $\text{HNO}_3$   | <sup>b</sup>               | [91] |
| ET-AAS           | Pb, Cd   | lidské zuby  | extrakce, očištění PE škrabkou a opláchnutí v solném roztoku, přečištění v ultrazvukové lázni DV, sušení při 110 °C 24 hod., mletí pomocí třecí misky a tloučku, mikrovlnný rozklad | <sup>a</sup>               | [32] |
| ET-AAS           | Pb   | lidské kosti   | homogenizace, sušení při 110 °C, klasický kyselý rozklad, přídavek modifikátoru $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  | 0,022 $\mu\text{g g}^{-1}$ | [29] |
| ET-AAS<br>ICP-MS | Pb (AAS)<br>Izotopy Pb<br>204, 206, 207, 208<br>(ICP-MS) | kosti bělokura rousného (pták)                           | očištění pomocí skalpele z nerezové oceli, lyofilizace 48 hod., klasický kyselý rozklad   | <sup>a</sup>               | [77] |

Tabulka 3: Pokračování

| Metoda    | Analyt                                  | Vzorek   | Příprava vzorku  | Limit detekce           | Lit. |
|-----------|---|--|--|-------------------------|------|
| ET-AAS    | Pb                                      | stehenní kosti, játra, ledviny, srdce, plíce a sleziny krysy | extrakce, sušení při 70 °C, 72 hod., mletí pomocí mlýnu s noži, mikrovlnný rozklad s HNO <sub>3</sub> nebo alkalická solubilizace s TMAH (malé množství vzorku – slezina, srdce)   | <sup>a</sup>            | [79] |
| ICP-MS    | 40 prvků <sup>a</sup>                   | CRM – játra, tkáň a bílkovina ryb                            | sušení při 105 °C, rozklad a) kyselý s HCl, b) kyselý s HNO <sub>3</sub> a H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , c) mikrovlnný s HNO <sub>3</sub> a H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , d) rozklad ve vysokotlakém mikrovlnném systému s HNO <sub>3</sub> a H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , e) spalování a následný kyselý rozklad s HNO <sub>3</sub> , f) kyselý rozklad s HF | <sup>a</sup>            | [57] |
| ICP-MS    | 59 stopových prvků <sup>a</sup>         | lidská žebra   | odstranění měkkých tkání a krve pomocí nástrojů z titanu a plastu, lyofilizace, nařezání na průřezy o hmotnosti 50-100 mg titanovým skalpelem, rozklad v jednodukomorovém autoklávu s HNO <sub>3</sub> a H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .   | <sup>a</sup>            | [76] |
| ICP-MS    | Pb                                      | rybí obratle a čelisti                                       | očistění měkkých tkání pomocí nástroje z nerez. oceli a 10% chlornanu sodného, lyofilizace, mikrovlnný rozklad   | 0,11 µg g <sup>-1</sup> | [29] |
| ICP-MS    | Mg, Al, Mn, Fe, Cu, Zn, Ni, Sr, Cd a Pb | lidská zubní sklovina  | mikrovlnný rozklad   | <sup>b</sup>            | [87] |
| ICP-MS    | Pb                                      | lidské zuby  | 24 hod. loužení v deionizované vodě, očistění a zbavení měkkých tkání pomocí kartáčku namočeným v 1% roztoku papainu (3 kola), ponoření do 3% roztoku H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> na 30 s a omytí deionizovanou vodou, rozemletí pomocí třecí misky a tloučku, kyselý rozklad (HNO <sub>3</sub> + HCl + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )                            | <sup>b</sup>            | [81] |
| HR-ICP-MS | 27 prvků <sup>a</sup>                   | lidské kosti   | mikrovlnný rozklad s HNO <sub>3</sub> a H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>  | <sup>b</sup>            | [75] |

**Tabulka 3: Pokračování**

| <b>Metoda</b> | <b>Analyt</b>   | <b>Vzorek</b>         | <b>Příprava vzorku</b>   | <b>Limit detekce</b>  | <b>Lit.</b> |
|---------------|---|-----------------------|--|---|-------------|
| ICP-MS        | Al, As, Ba, Mg, Mn, Pb, Sr, V, Zn, Zr                 | lidské kosti          | nařezání pomocí vrtáku s diamantovým kotoučem, očištění v UV lázni deionizované vody, sušení v peci při 105 °C, spálení po dobu 7 hod. při 725 °C, mikrovlnný rozklad s HNO <sub>3</sub>   | <sup>b</sup>  | [84]        |
| ICP-MS        | 42 analytů <sup>a</sup> vč. izotopů Pb                | SRM 1400 Bone Ash     | rozklady s různými kyselinami, porovnání laboratoří, více viz Tabulka 4  | <sup>b</sup>  | [90]        |
| ICP-MS        | Al, Ba, Pb, Sr a Sn                                   | lidské stehenní kosti | namočení kostí do absolutního alkoholu, nařezání pomocí pily Isomet s prstencovou čepelí s diamantovým povlakem, přidání H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> na 4 hod. k odstranění měkkých tkání, umytí DV a absolutním alkoholem, rozpuštění ve směsi HCl a HNO <sub>3</sub> | <sup>a</sup>  | [52]        |
| ICP-MS        | Cu, Zn, Sr, Al, Ba, Pb, U, Ce, La, Pr a vzácné zeminy | lidské zuby           | sterilizace v autoklávu a namočení do H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> k odstranění měkkých tkání, usušení, mletí a rozpuštění v HNO <sub>3</sub>   | <sup>b</sup>  | [80]        |
| LA-ICP-MS     | 60 prvků <sup>a</sup> , vč. vzácných zemin            | kosti mořských plazů  | kyselý rozklad HF + HClO <sub>4</sub> + HNO <sub>3</sub> ; + HCl   | vzácné zeminy a U<br>0,1 mg kg <sup>-1</sup> ; pro<br>Ce a Pb 0,02<br>mg kg <sup>-1</sup> | [94]        |
| LA-ICP-MS     | vzácné zeminy, aktinoidy                              | fosilní kosti         | opláchnutí v 2% HNO <sub>3</sub> , DV a isopropylalkoholu, sušení stlačeným vzduchem   | <sup>b</sup>  | [82]        |
| LA-ICP-MS     | Hg  | fosilní kosti         | umytí vodou, sušení v sušárně při 60 °C  | <sup>b</sup>  | [95]        |

Tabulka 3: Pokračování

| Metoda    | Analyt                       | Vzorek                           | Příprava vzorku  | Limit detekce  | Lit. |
|-----------|------------------------------|----------------------------------|--|--|------|
| LA-ICP-MS | Sr, Cd, Zn, Pb               | lidské zuby                      | umytí v UV lázni DV, sušení volně na vzduchu a vložení do pryskyřice na 10 hod. při 70 °C, nařezání pomocí rotujícího nože z nerezové oceli, vyčištění v UV lázni a sušení v peci 2 hod. při 60 °C   | Zn, Sr - $\mu\text{g g}^{-1}$<br>Cd, Pb - $\text{ng g}^{-1}$ | [83] |
| HR-ICP-MS | 24 prvků <sup>a</sup>        | fosilní kosti                    | očištění v H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> k odstranění tkání, v acetonu k odstranění lipidů a zbytků organických látek, dále v HNO <sub>3</sub> k odstranění anorganických látek, sušení 24 hod. při 120 °C, mikrovlnný rozklad s HNO <sub>3</sub>        | 0,004–4 $\text{ng g}^{-1}$                                   | [1]  |
| ICP-OES   | B, Ca, Fe, Mg, P, K, Na a Zn | lidské stehenní kosti            | namočení do absolutního alkoholu, nařezání pomocí pily Isomet s prstencovou čepelí a diamantovým povlakem, ponoření na 4 hod. do H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , umytí DV a absolutním alkoholem, rozpuštění kostí ve směsi HCl a HNO <sub>3</sub> (1:1) | <sup>a</sup>   | [52] |
| ICP-OES   | Ca, Mg                       | lidské zuby                      | sterilizace v autoklávu a namočení do H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> k odstranění měkkých tkání, usušení, mletí a rozpuštění v HNO <sub>3</sub>   | <sup>b</sup>   | [80] |
| ICP-OES   | Pb                           | kosti ryby trematomus bernacchii | odstranění tkání pomocí nástroje z nerezové oceli, umytí v 10% roztoku NaClO, lyofilizace, mikrovlnný rozklad s HNO <sub>3</sub>   | 0,11 $\mu\text{g g}^{-1}$                                    | [33] |
| ICP-OES   | 19 prvků <sup>a</sup>        | kost krávy                       | očištění tkání, sušení v peci 1 hod. při 180 °C, mletí v kulovém mlýnu nebo v třecí misce s tloučkem (podle množství vzorku), rozpuštění ve směsi HNO <sub>3</sub> a H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>   | <sup>b</sup>   | [2]  |



**Tabulka 3: Pokračování**

| <b>Metoda</b> | <b>Analyt</b>  | <b>Vzorek</b>                         | <b>Příprava vzorku</b>   | <b>Limit detekce</b>   | <b>Lit.</b> |
|---------------|--|---------------------------------------|--|------------------------|-------------|
| XRF           | Pb, Cd, Hg, Zn,<br>Fe, Ni a Cu   | lidské stehenní<br>kosti              | tepelná úprava v peci s řízenou atmosférou při 600 °C  | <sup>a</sup>           | [37]        |
| XRF           | Fe, Cu, Zn, Br,<br>Sr a Pb   | lidské zuby                           | extrakce, opláchnutí DV, umístění na 48 hod. do nádoby s trymolovými krystaly (desinfekce), neřezání na tenké pásy a vyleštění povrchu | 0,5 µg g <sup>-1</sup> | [96]        |
| XRF           | Cl, V, Cr, Zr,<br>Ag, Cd, Sn, Sb,<br>P, K, Ca, Ti,<br>Mn, Fe, S, Si,<br>Zn | zvířecí parohy,<br>rohy, kosti a zuby | vzorky byly suché udržovány při pokojové teplotě a nebyly skladovány déle než 12 let po smrti zvířete                                  | <sup>b</sup>           | [35]        |

<sup>a</sup> uvedeno v literatuře

<sup>b</sup> neuvedeno

**Tabulka 4: Příklady rozkladů biologických vzorků včetně navážek, použitých činidel, měřeného analytu a použité metody**

| Typ rozkladu           | Vzorek                                       | Navážka vzorku | Min. činidlo                                     | Informace o rozkladu  | Analyt         | Metoda        | Lit. |
|------------------------|--|----------------|--|---|----------------|---------------|------|
| mikrovltný             | stehenní kost krysy                          | 250 mg         | HNO <sub>3</sub>                                 | 8 mL 7M HNO <sub>3</sub> , PTFE nádoby, 30 min. ponecháno   | Pb             | ET-AAS        | [79] |
| alkalická solubilizace | játra, ledviny, srdce, plíce a slezina krysy | 25 mg          | TMAH <sup>®</sup>                                | 1 mL 25% TMAH, ponecháno přes noc a zředěno na 25 mL  | Pb             | ET-AAS        | [79] |
| klasický               | lidské zuby                                  | 500 mg         | HNO <sub>3</sub> + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | 10 mL HNO <sub>3</sub> , 2 mL H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , PTFE kádinky, odpařit do sucha a rozpustit v 0,1M HCl, doplnit do 50 mL DV        | Cd, Pb         | ET-AAS        | [32] |
| klasický               | kosti (neuvedeno jaké)                       | 1 g            | HNO <sub>3</sub>                                 | 10 mL podvarové HNO <sub>3</sub> , přídatek modifikátoru NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 80 °C, 2 hod., doma vyrobený přístroj | Pb             | ET-AAS        | [29] |
| mikrovltný             | čelist a obratle ryby Trematomus bernacchii  | 100–300 mg     | HNO <sub>3</sub>                                 | 5 mL HNO <sub>3</sub> , 40 min. při max. tlaku 150 psi a energii, zředění na 10 mL, mikrovltný systém MDS-2000                                  | Pb             | ICP-AES       | [33] |
| klasický               | kosti bělokura rousného (pták)               | 100–400 mg     | HNO <sub>3</sub>                                 | 0,5 mL HNO <sub>3</sub> na 0,1 g sušiny vzorku, PP vialky, necháno přes noc a poté zahřívání na 100 °C, 3 hod., doplnit na známý objem          | Pb             | ET-AAS, F-AAS | [77] |
| klasický               | lidská žebra                                 | 50–100 mg      | HNO <sub>3</sub> + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | 1,5 mL HNO <sub>3</sub> , 0,3 mL H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 160–200 °C, 3 hod., jednokomorový autokláv Ancon-AT2, Ltd., Russia             | 59 stop. Prvků | ICP-MS        | [76] |

Tabulka 4: Pokračování

| Typ rozkladu | Vzorek                                  | Navážka vzorku | Min. činidlo                                     | Informace o rozkladu  | Analyt  | Metoda        | Lit. |
|--------------|---|----------------|--|---|---|---------------|------|
| mikrovlnný   | lidské kosti                            | 100 mg         | HNO <sub>3</sub> + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | 4 mL HNO <sub>3</sub> , 1 mL H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ,<br>temperování 15 min. na 200 °C a<br>poté 10 min.   | 27 prvků  | HR-ICP-<br>MS | [75] |
| klasický     | SRM 1400 Bone<br>Ash                    | 200 mg         | HF + HClO <sub>4</sub> +<br>HNO <sub>3</sub>     | 1 mL HF, 1 mL HClO <sub>4</sub> , 4 mL<br>HNO <sub>3</sub> , PTFE kádinky, 180 °C, 8<br>hod., odpaření do sucha a rozp.<br>v 200 mL HNO <sub>3</sub> obsahující 0,1 %<br>HCl          | 42 analytů<br>vč. izotopů<br>Pb                 | ICP-MS        | [90] |
| klasický     | SRM 1400 Bone<br>Ash                    | 200 mg         | HNO <sub>3</sub> + HCl                           | 4 mL HNO <sub>3</sub> -HCl (1:1), odpařeno<br>do sucha, rozp. v 2 mL HNO <sub>3</sub> -HCl<br>a doplněno na 50 mL   | 42 analytů<br>vč. izotopů<br>Pb                 | ICP-MS        | [90] |
| reflux       | SRM 1400 Bone<br>Ash                    | 200 mg         | HNO <sub>3</sub>                                 | 2 mL HNO <sub>3</sub> , 6 hod. reflux<br>v uzavřených nádobách do<br>odpaření, přidání 200 μl HCl,<br>odpaření do sucha, rozp. v 1M<br>HNO <sub>3</sub> na 800–2000násobné<br>zředění | 42 analytů<br>vč. izotopů<br>Pb                 | ICP-MS        | [90] |
| mikrovlnný   | lidská zubní<br>sklovina                | 0,009–0,735 g  | HNO <sub>3</sub> + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | 3 mL 50% HNO <sub>3</sub> , 2 mL 30% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>  | Mg, Al, Mn,<br>Fe, Cu, Zn,<br>Ni, Sr, Cd,<br>Pb | ICP-MS        | [87] |
| mikrovlnný   | kosti zvířat<br>zasažených<br>olovem    | 500 mg         | HNO <sub>3</sub>                                 | 10 mL HNO <sub>3</sub> , teplotní program:<br>8 min. na 100% výkon, 10 min. na<br>65% výkon, tlak 448 kPa, poté<br>zředit na 50 mL, Model 81D   | Pb  | ET-AAS        | [5]  |
| mikrovlnný   | vápníková<br>výživa vyrobená<br>z kostí | 500 mg         | HNO <sub>3</sub>                                 | 10 mL HNO <sub>3</sub> , teflonové nádoby   | 55 analytů                                      | ET-AAS        | [91] |

## 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1 Použité chemikálie

- Standardy prvků: Cu, K, Na, Mg, Li, B, Be, Al, Ti, V, Cr, Mn, Ni, Co, Cu, Ga, Ge, As, Se, Rb, Sr, Zr, Mo, Ru, Pd, Ag, Cd, Sn, Sb, Te, Ba, Ta, W, Re, Pt, Hg, Tl, Pb, Bi, Th, Cs, Hf a U o koncentraci  $1 \text{ g L}^{-1}$  (Analytika spol., s.r.o. ČR, nebo SCP Science Ltd., Kanada) a Zn o koncentraci  $10 \text{ g L}^{-1}$  (Analytika spol., s.r.o. ČR)
- $\text{HNO}_3$  65% (m/m), p.p. (PENTA s.r.o., Praha)
- $\text{H}_2\text{O}_2$  30% (m/m), p.p. (Sigma Aldrich, Francie)
- Aceton (PENTA s.r.o., Praha)

### 3.2 Příprava roztoků

#### 3.2.1 Příprava 2M roztoku $\text{HNO}_3$

Pro loužení chemického nádobí po dobu 24 hodin byl připraven roztok 2M  $\text{HNO}_3$ . Pro tyto účely byla použita podvarově přečištěná 65% kyselina dusičná.

#### 3.2.2 Příprava zásobních roztoků a standardů

##### 3.2.2.1 Multiprvkové zásobní roztoky

Byly připraveny tři *multiprvkové standardy* „A“, „B“ a „C“.

*Multiprvkový standard* „A“ o koncentraci  $10 \text{ mg L}^{-1}$  obsahoval prvky Ag, Al, As, B, Ba, Be, Bi, Cd, Co, Cr, Cs, Cu, Ga, Ge, Hf, Hg, Li, Mn, Mo, Ni, Pb, Pd, Pt, Rb, Re, Ru, Sb, Se, Sn, Sr, Ta, Te, Ti, Th, Tl, V, W, Zr. Pro přípravu kalibrace byl tento roztok naředěn na koncentraci  $500 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ . Za účelem stabilizace iontů bylo do 50 mL odměrné baňky k tomuto roztoku přidáno 0,5 mL podvarově přečištěné  $\text{HNO}_3$ .

*Multiprvkový standard* „B“ obsahoval  $500 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  Ce, La, Nd, Pr, U („B1“) a  $100 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  Dy, Er, Eu, Gd, Ho, Lu, Sc, Sm, Tb, Tm, Y, Yb („B2“). Ředěním byl připraven roztok o koncentraci  $50$  („B1“) +  $10$  („B2“)  $\text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ . Za účelem stabilizace iontů bylo do 50 mL odměrné baňky k tomuto roztoku přidáno 0,5 mL podvarově přečištěné  $\text{HNO}_3$ .

*Multiprvkový roztok* „C“ o koncentraci  $50 \text{ mg L}^{-1}$  Zn a Fe. Tento roztok byl naředěn na koncentraci  $5 \text{ mg L}^{-1}$  a z něj byly připraveny kalibrační roztoky.

### **3.2.2.2 Zásobní roztok porovnávacího prvku Rh**

Tento roztok byl připraven ředěním standardu o koncentraci  $1 \text{ g L}^{-1}$  Rh. Nejprve byl tento standard naředěn na koncentraci  $10 \text{ mg L}^{-1}$ , poté na  $500 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  a následně na  $50 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ . Do všech kalibračních roztoků, modelových roztoků, slepých vzorků a vzorků roztoků měřených na ICP-MS bylo přidáno rhodium tak, aby jeho výsledná koncentrace byla  $1 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ . Za účelem stabilizace iontů bylo do 50 mL odměrných baněk přidáno 0,5 mL podvarově přečištěné  $\text{HNO}_3$ .

### **3.2.3 Kalibrační roztoky**

#### **3.2.3.1 Kalibrace pro ICP-MS**

Z multiprvkových standardů „A“ ( $500 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ ), „B“ ( $50+10 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ ) a „C“ ( $5 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ ) byla připravena kalibrační řada.

Prvky multiprvkového standardu „A“ měly v kalibrační řadě koncentrace 0, 1, 2, 5, 10 a  $20 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ , prvky multiprvkového standardu „B“ měly koncentrace 0; 0,1+0,02; 0,2+0,04; 0,5+0,1; 1+0,2 a 2+0,4  $\text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  a prvky multiprvkového standardu „C“ měly koncentrace 0, 50, 75, 100, 150 a  $200 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ .

#### **3.2.3.2 Kalibrace pro ICP-OES**

Pro stanovení Ca, P a Na pomocí metody ICP-OES byla připravena ze zásobního roztoku o koncentraci  $50 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  kalibrační řada 1; 5; 10 a  $20 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ .

#### **3.2.3.3 Kalibrace pro F-AAS/F-AES**

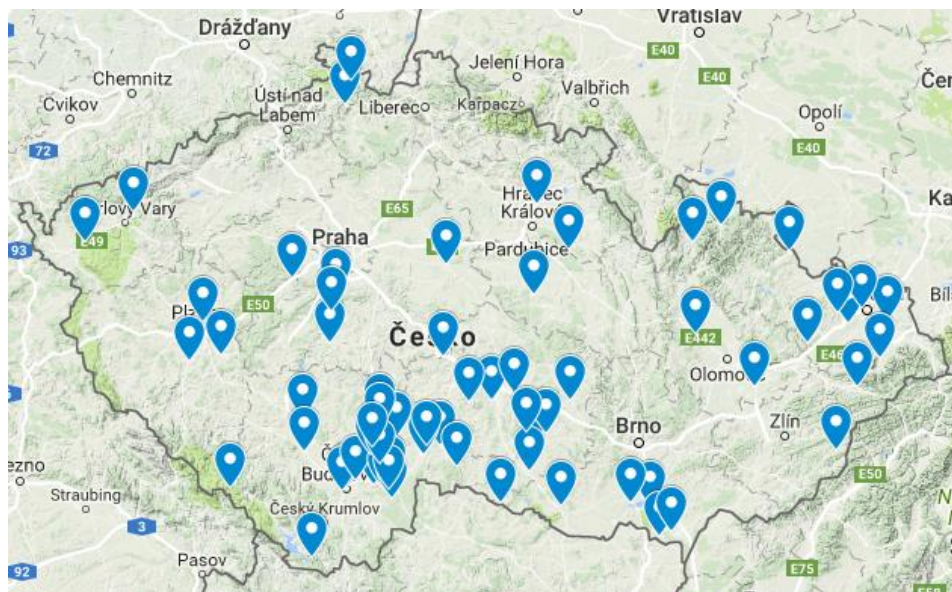
Pro stanovení Mg byla připravena kalibrační řada 0,05; 0,1; 0,2 a  $0,4 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  a pro stanovení K kalibrační řada o koncentracích 2; 5; 10 a  $20 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ .

### **3.3 Kontrola kvality analytických výsledků**

Pro ověření přesnosti a správnosti metody byl použit certifikovaný referenční materiál SRM<sup>®</sup> 1486 Bone Meal (NIST, USA).

### 3.4 Seznam, odběr a uchování vzorků vydřích tkání

Vzorky kostí ( $n = 73$ ) vyder říčních byly dodány společností ALKA Wildlife, o.p.s., která organizuje sběr uhynulých těl vyder říčních na území České republiky již od 90. let. Sběr vyder je založen na spolupráci s veřejností a celou řadou institucí [7]. Vzorky vyder použité v této diplomové práci byly posbírány v letech 2007–2015. Jednotlivá místa nálezů jsou zobrazeny na Obr. 1. O všech uhynulých jedincích byl sepsán protokol obsahující data o pohlaví, stáří, příčině úmrtí, místě nálezů, který je uveden jako Příloha 1. Tkáně odebrané pitvou (žebro, tuk a játra) byly uloženy do PE pytlíku a uchovány v mrazničce při teplotě  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ .



Obr. 1: Místa nálezů uhynulých jedinců vydry říční

### 3.5 Příprava vzorků k analýze

#### 3.5.1 Odstranění ulpívajících tkání

Jelikož na vzorcích žebber byly zbytky tkání, jak ukazuje Obr. 2a, bylo potřeba je očistit, aby byla zajištěna homogenita vzorku. Na čištění byl použit keramický nůž, viz Obr. 3a. Na Obr. 2b je pak žebro po očištění zbytků tkání.



Obr. 2: a) Vzorek žebra se zbytky ulpívajících tkání, b) Vzorek žebra po očištění keramickým nožem



Obr. 3: Nástroje k odstranění ulpívajících tkání, zbytků krve a kostní dřevě a) keramický nůž, b) škrabka na zubní kámen

### 3.5.2 Lyofilizace

Vzorky žeber ( $1000 \pm 1$  mg) byly naváženy do sterilních lyofilizačních zkumavek opatřených sterilním gumovým víčkem, viz Obr. 4. Žebra byly našťípány, aby z nich bylo později možné vyškrábnout kostní dřev. Před samotnou lyofilizací byly vzorky hluboce zmrazeny při  $-80$  °C po dobu 24 hod. Poté byly vzorky lyofilizovány podle programu: (I) 1 hodina, tlak 0 hPa; (II) 24 hodin, tlak 1 hPa; (III) 4 hodiny, tlak 0 hPa.



Obr. 4: Sterilní lyofilizační zkumavky se sterilním gumovým víčkem

### 3.5.3 Odstranění zbytků tkání a krve po lyofilizaci

Po lyofilizaci byly vzorky znovu čištěny pomocí keramického nože, Obr. 3a. Kostní dřev byla vyškrábnuta pomocí škrabky na zubní kámen vyrobené z chirurgické oceli, Obr. 3b. Vzorek žebra po lyofilizaci je na Obr. 5a a po očištění keramickým nožem a škrabkou na zubní kámen na Obr. 5b.



Obr. 5: a) Vzorek žebra po lyofilizaci, b) Vzorek žebra po lyofilizaci po očištění keramickým nožem, škrabkou na zubní kámen a acetonem

### 3.5.4 Mletí

Vzorky žeber byly mlety ve vibračním kulovém mlýnu. Mletí probíhalo v kovové patronce s kuličkou, do které bylo naváženo vždy  $\leq 200 \pm 5$  mg. Doba mletí byla 7 minut. Pomletý vzorek v porovnání s kovovou mincí je uveden na Obr. 6.





Obr. 6: Pomletý reálný vzorek - množství z kovové patronky ( $200 \leq 5$  mg) v porovnání s kovovou mincí

### 3.5.5 Mikrovlnná mineralizace

Mikrovlnná mineralizace byla provedena v rozkladných nádobách typu DAC-100S se systémem Multi-Tubes. Do jednotlivých insertů bylo naváženo  $100 \pm 5$  mg vzorku, přidán 1 mL podvarové  $\text{HNO}_3$  (65%) a 1 mL  $\text{H}_2\text{O}_2$  (30%). Do teflonových nádob DAC-100S bylo přidáno 7,5 mL podvarové  $\text{HNO}_3$  (65%) a 7,5 mL  $\text{H}_2\text{O}_2$  (30%) a do nich byly vloženy tři nádobky o objemu 10 mL se vzorkem a reakčními činidly. Nádoby byly zakryty teflonovým víčkem a vloženy do teflonového pouzdra s keramickým tlakovým obalem. Mineralizační rozklad probíhal podle programu, který je uveden v Tabulce 5. Tento teplotní program byl již dříve použit k rozkladu podobných biologických vzorků. Čirý a ochlazený mineralizát byl poté převeden do odměrné baňky o objemu 10 mL. Vzorky byly uchovány v polyethylenových nádobách a byly zamraženy.

Tabulka 5: Teplotní program mikrovlnné mineralizace

| Krok | T [°C] | p [bar] | Ramp | Hold | P [%] |
|------|--------|---------|------|------|-------|
| 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 Mikrovlnné zařízení Speedwave Xpert

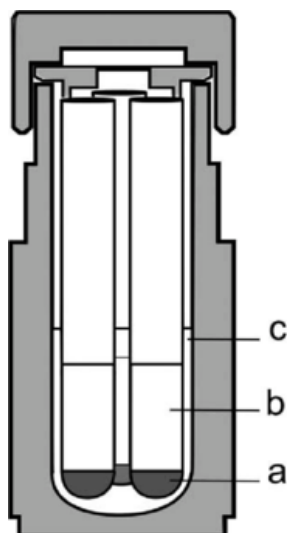
Pro mineralizaci vzorků kostí bylo použito mikrovlnné zařízení Speedwave Xpert Berghof (Německo), které je na Obr. 7. Jedná se o uzavíratelné zařízení s fokusovaným mikrovlnným polem.

V kruhové peci potažené kvalitním teflonem PFA je umístěn karusel, do kterého se jednotlivě umístí až 8 rozkladných nádob. Není třeba rozkládat vždy ve všech nádobách. K mikrovlnnému zařízení náleží externí řídicí jednotka, která je dotyková a její ovládání je intuitivní podobně jako na chytrém telefonu či tabletu. Díky tomu, že je jednotka umístěna externě je zamezeno riziku koroze. Patentovaná technologie optických senzorů zajišťuje plnou kontrolu teploty (50–300 °C) a tlaku (0–150 bar) v průběhu reakce v každé rozkladné nádobě. Rozkladné teflonové nádoby o objemu 100 mL jsou odolné tlaku až 130 barů a teplotě 260 °C [97].

Při malých množstvích vzorků lze nádoby typu DAC-100S či DAK-100X doplnit o systém Multi-Tubes, viz Obr. 8, kdy se do každé teflonové nádoby vloží až 3 PFA nádobky, tzv. inserty, o objemu 10 mL a tím se zvýší výkon mineralizace vzorků, a to až na 24 vzorků současně. Rozkladné činidlo, v našem případě to byla směs  $\text{HNO}_3 + \text{H}_2\text{O}_2$  (1:1), se přidá přímo ke vzorku do insertu a také do vnější teflonové nádoby a to tak, aby hladina ve vnější teflonové nádobě byla výš než hladina činidel v insertech.



Obr. 7: Mikrovlnné zařízení Speedwave Xpert [97]



Obr. 8: Schéma systému Multi-Tubes pro nádoby DAC-100S, a) vzorek, b) rozkladné činidlo v insertu, c) rozkladné činidlo nádobě DAC-100S [98]

### 3.6.2 Lyofilizátor CoolSafe Pro

Lyofilizace je proces, při kterém se využívá vakuové sublimace. Lyofilizátor je složen z komory, ve které dochází k sublimaci. Komora je napojena na kondenzátor ledu, kam se odvádí vznikající pára a na vývěvu. V prvním kroku se vzorek zmrazí na teplotu  $-15$  až  $-80$  °C za atmosférického tlaku. Vzniknou malé krystalky ledu, které při postupném snižování tlaku nad vzorkem sublimují. Vznikající pára je odváděna do kondenzátoru, aby nedocházelo ke snížení vakua. Odstranění zbytkové vlhkosti probíhá za postupného zvyšování teploty nad  $0$  °C při nízkém tlaku. Poté dochází k pozvolnému vyrovnání tlaků pomocí filtrovaného a inertního vzduchu. Lyofilizované vzorky si zachovávají původní objem a jsou stabilní při pokojové teplotě i několik let [99]. Pro naše účely byl použit lyofilizátor Labogene CoolSafe Pro, který je vyobrazen na Obr. 9.



Obr. 9: Lyofilizátor Labogene CoolSafe Pro [100]

### 3.6.3 Podvarové destilační zařízení

Pro ultrastopovou analýzu a loužení chemického nádobí je potřeba velmi čistá kyselina dusičná. Ta se připravuje pomocí podvarové destilace v systému BSB 93IR (Berghof GmbH, Německo), viz Obr. 10. Toto zařízení je složeno z IR lampy, PTFE nádoby s odpařovací komorou a s PFA chladičem. Kondenzát je odváděn pomocí PFA trubice a shromažďován v průhledné láhvi vyrobené také z PFA. Vznikající kondenzát přichází do styku jenom s PFA. Ohřev je bezkontaktní pomocí IR zářiče. Dosahuje se tak opravdu nízkých kontaminací [101].



Obr. 10: Podvarové destilační zařízení BSB 939IR [101]

### 3.6.4 Skenovací elektronový mikroskop VEGA3 SBU

Pomocí kompaktního skenovacího elektronového mikroskopu (SEM) VEGA3 SBU (Tescan, Brno, ČR) ve spojení s rentgenovým systémem Quantax (Bruker Nano XFlash<sup>®</sup>, detektor 410 – M, software Quantax Esprit 1.9, Bruker Nano GmbH, Berlín, Německo) byly měřeny velikosti částic mleté kosti vydry říční a králíka domácího. VEGA3 SBU, viz Obr. 11 je plně integrovaný energiově disperzním rentgenovým mikroanalyzátozem (EDX) [102]. Byly použity detektory BSE – detektor zpětně odražených elektronů a SE – detektor sekundárních elektronů. Urychlovací napětí mělo hodnotu 20 kV a měření probíhalo v režimu vysokého vakua.



Obr. 11: Skenovací elektronový mikroskop VEGA3 – SBU [102]

### 3.6.5 Analyzátor velikosti částic Mastersizer 2000MU

Velikost částic v pomletých vzorcích byla provedena pomocí analyzátoru velikosti částic Mastersizer 2000MU (Malvern Instruments, Velká Británie), který je na Obr. 12. Byla provedena analýza vzorků vyder a pro porovnání i králíka a SRM 1486. Tento přístroj pracuje na principu laserové difrakce a je možné s ním analyzovat pouze práškové materiály. Prášek se smísí s dispergující kapalinou, naředí na požadovanou koncentraci a vloží se do optické části přístroje. Vzorky musí být reprezentativní a dobře dispergované, jinak nebude měření správné. Detektory zachytí rozptýlené záření v určitém rozsahu úhlů. Pro každé měření je uděláno 2000 snímků. Rychlost tvoření snímků je 1 snímek/ms. Rozsah přístroje je 0,02–2000  $\mu\text{m}$  [103]. Dispergace vzorku byla provedena ve vodě pomocí ultrazvuku, měření bylo průtočné a vyhodnocení bylo provedeno pomocí Fraunhoferovy aproximace.



Obr. 12: Analyzátor velikosti částic Mastersizer 2000MU [104]

### 3.6.6 Analyzátor rtuti AMA 254

Stanovení rtuti bylo provedeno na jednoúčelovém atomovém absorpčním spektrometru AMA 254 (Altec, spol. s.r.o., ČR), viz Obr. 13. Stanovení rtuti se provádí v pevných nebo kapalných vzorcích a je bez nutnosti předchozí úpravy vzorku, což zamezuje riziku kontaminace nebo ztrátám rtuti během přípravy vzorku. Principem je generování par kovové

rtuti. Dochází k zachycení, zakoncentrování na zlatém amalgamátoru a následné detekci. Poté jsou páry rtuti zahřevem uvolněny z amalgamátoru do dvou sériově uspořádaných kyvet umožňujících stanovení rtuti, a to v širokém rozsahu koncentrací. Detekce spočívá v měření absorbance uvolněných par při vlnové délce 253,65 nm. Zdrojem záření je nízkotlaká rtuťová výbojka. Tato metoda má mimořádně vysokou citlivost pohybující se okolo 0,1 ng Hg a není závislá na matici vzorku [105].



Obr. 13: Analyzátor rtuti AMA 254 [106]

### 3.6.7 Atomový absorpční spektrometr GBC SensAA

Pro stanovení prvků Mg a K byla použita metoda atomové absorpční spektrometrie s atomizací v plameni. Byl použit spektrometr GBC SensAA (GBC Scientific Equipment Pty. Ltd., Austrálie) [107], viz Obr. 14. Tento dvoupraprskový spektrometr využívá deuteriuovou korekci a zdrojem záření jsou výbojky s dutou katodou. Parametry nastavení pro Mg a K jsou uvedeny v Tabulce 6.



Obr. 14: Atomový absorpční spektrometr GBC SensAA [107]

Tabulka 6: Parametry pro nastavení GBC SensAA spektrometru pro stanovení prvků Mg a K

| Analyt | Vlnová délka [nm] | Mód      | Šířka spektrální štěrbin [nm] | Žhavení výbojky [mA] | Průtok plynu v plameni [L min <sup>-1</sup> ]                 |
|--------|-------------------|----------|-------------------------------|----------------------|---|
| Mg     | 285,2             | Absorpce | 0,2                           | 5,0                  | C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> (1,5) <sup>a</sup> /vzduch (10) |
| K      | 766,5             | Emise    | 0,5                           | 6,0                  | C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> (1,5) <sup>a</sup> /vzduch (10) |

<sup>a</sup> C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> (99,6 %, Linde Gas a.s., ČR).

### 3.6.8 ICP-OES spektrometr GBC Integra XL

Stanovení matričních prvků Ca, Na a P bylo prováděno na optickém emisním spektrometru s ionizací v indukčně vázaném plazmatu GBC Integra XL (GBC Sciencelife Equipment Pty. Ltd., Austrálie), viz Obr. 15. Tento přístroj umožňuje analýzu vzorků se složitou maticí (např. taveniny, vzorky s vysokým obsahem solí,...). Atomizace a ionizace vzorků probíhá za vysoké teploty indukčně vázaného plazmatu, které je generováno volně běžícím robustním vysokofrekvenčním generátorem o frekvenci 40,69 MHz a s maximálním výkonem 1500 W. Přenos vysokofrekvenčního proudu do proudu argonu je zajištěn pomocí měděné cívky se třemi závity chlazené vodou. Optickou jednotku zde tvoří monochromátor Czerny-Turner, který je použitelný v rozsahu vlnových délek 160–800 nm a dva fotonásobiče [108]. Systém vnášení vzorku se skládá z peristaltické pumpy, cyklonické skleněné mlžné komory a zmlžovače. Parametry nastavení přístroje jsou uvedeny v Tabulce 7.



Obr. 15: Optický emisní spektrometr Integra XL[109]

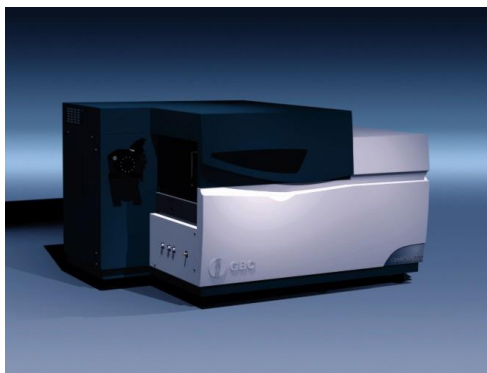
Tabulka 7: Parametry nastavení ICP-OES spektrometru GBC Integra XL

| Parametr       |                         | Parametr                |                 |
|----------------|-------------------------|-------------------------|-----------------|
| RF frequency   | 40,68 MHz               | Photomultiplier voltage | 600 V           |
| RF power       | 1100 W                  | Read                    | On-peak, 1 s    |
| View height    | 6 mm                    | Background correction   | Fixed point     |
| Gas            | Argon 99,999 %          | Number of replicates    | 3               |
| Plasma Gas     | 11 L min <sup>-1</sup>  | View                    | Radial          |
| Auxilliary gas | 0,6 L min <sup>-1</sup> | Emission lines          | P (213,618 nm)  |
| Nebulizer gas  | 0,6 L min <sup>-1</sup> |                         | Na (588,995 nm) |
|                |                         |                         | Ca (422,673 nm) |

### 3.6.9 oaTOF-ICP-MS spektrometr GBC OptiMass 9500 oaTOF

Hmotnostní spektrometr s ionizací v indukčně vázaném plazmatu s průletovým analyzátozem a ortogonální akcelerací iontů (oaTOF-ICP-MS) GBC OptiMass 9500 (GBC Scientific Equipment Pty. Ltd., Austrálie) použitý pro analýzu kostí je vyobrazen na Obr. 16.

Tento přístroj je složen ze systému vnášení vzorků, ICP zdroje, interface a hmotnostního spektrometru. Vzorek je nasáván peristaltickou pumpou a zmlžován v koncentrickém zmlžovači. Mlžná komora tvořená dvěma pláští, která je chlazená vodou slouží k odstranění velkých kapek aerosolu. Interface slouží k extrakci iontů z vysokoteplotního plazmatu do spektrometru. Plazma pracuje za atmosférického tlaku a hmotnostní spektrometr za velmi nízkého tlaku. Tento rozdíl tlaků urychluje ionty až na rychlost větší, než je rychlost zvuku. Prostředí mezi atmosférickým tlakem (plazma) a oblastí nízkého tlaku (spektrometr) zajišťuje tříkónusový systém, který snižuje tlak za pomoci rotační pumpy a tří výkonných turbomolekulárních pump. V první fokusační zóně spektrometru je instalována brána „Smart Gate“, která vyřezává všechny nežádoucí izotopy z analyzovaného spektra. Tím je výrazně sníženo pozadí hmotnostního spektra a prodloužena doba životnosti detektoru. Po průchodu filtrem prolétají ionty průletovou zónou, kde jsou otočeny iontovým reflektorem a dopadají na detektor [99, 110]. Parametry nastavení brány Smart Gate jsou uvedeny v Tabulce 8. a parametry nastavení přístroje jsou uvedeny v Tabulce 9.



Obr. 16: Hmotnostní spektrometr GBC OptiMass 9500 oaTOF [111]



**Tabulka 8: Nastavení brány Smart Gate pro analýzu lyofilizovaných vydřích kostí**

| <b>Rozsah m/z</b> | <b>Interferující ionty</b>   |
|-------------------|--|
| 11,5 – 48,2       | $^{12}\text{C}_2^+$ , $^{14}\text{N}^+$ , $^{16}\text{O}^+$ , $^{16}\text{O}^1\text{H}^+$ , $^1\text{H}_2^{16}\text{O}^+$ , $^{24-26}\text{Mg}^+$ ,<br>$^{28}\text{N}_2^+$ , $^{14}\text{N}^{16}\text{O}^+$ , $^{32-34}\text{S}$ , $^{35-37}\text{Cl}$ |
| 55,5 – 57,5       | $^{56}\text{ArO}^+$ , $^{56}\text{Fe}^+$   |
| 79,4 – 88,5       | $^{40}\text{Ar}_2^+$   |

**Tabulka 9: Parametry nastavení spektrometru ICP-oa-TOF-MS GBC OptiMass 9500**

| <b>ICP Source</b>        |                            |                       |
|--------------------------|----------------------------|-----------------------|
| Rf power                 | 1200 W                     |                       |
| Plasma gas flow rate     | 13,00 L min <sup>-1</sup>  |                       |
| Auxiliary gas flow rate  | 0,550 L min <sup>-1</sup>  |                       |
| Nebuliser gas flow rate  | 0,870 L min <sup>-1</sup>  |                       |
| <b>Mass spectrometer</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                  | -3,5 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 |

### **3.6.10 Ostatní přístroje a pomůcky**

- Plastové laboratorní nádobí (Vitrum spol., s.r.o., ČR)
- Laboratorní nádobí SIMAX (ČR)
- Sada automatických pipet (Biohit Inc., Německo)
- Pipeta Distriman (Gilson, USA)
- Analytické váhy (A&D Instruments, Japonsko)
- Zařízení pro přípravu redestilované vody Milli-Q® Reference (Merc Millipore, Německo)
- Injekční stříkačky, plastové vialky a zkumavky, PTFE patronky
- Vibrační kulový mlýn Wig-L-Bug 30 (Crescent Dental)

### **3.6.11 Použitý software**

- ADSTAT 1.25 (TriloByte Statistical Software, ČR)
- QC Expert 2.5 (TriloByte Statistical Software, ČR)
- Grafický editor Origin (OriginLab corporation, USA)
- Kancelářský balík Microsoft Office 2016 (Microsoft corporation, USA)

## 4 VÝSLEDKY A DISKUZE

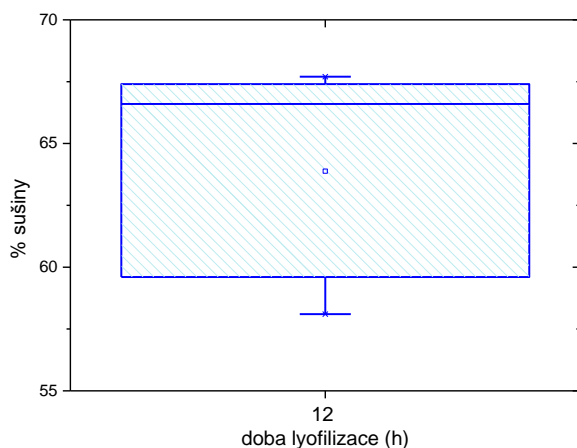
Postup při návrhu a optimalizaci metody byl volen s ohledem na nutnost uchování unikátního biologického vzorku ale také pro potřeby budoucího stanovení elementů v sušině. Pozornost byla soustředěna kromě doby lyofilizace na volbu optimálního množství navážky lyofilizovaného vzorku, optimalizace mikrovlnného rozkladu a také na vliv další úpravy (homogenizace) vzorku na výsledky stanovení.

### 4.1 Optimalizace lyofilizace

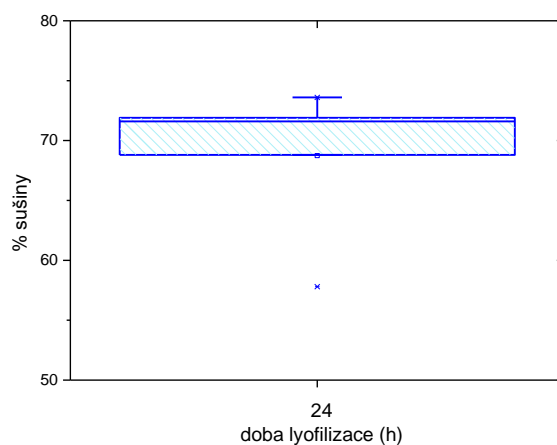
Parametry nastavení lyofilizátoru jsou uvedeny v kapitole 3.5.2. Pro optimalizaci doby lyofilizace vzorků vydřích žeber byly testovány časy 12, 24 a 48 h, viz Tabulka 10. Výsledky stanovení sušiny byly podrobeny statistické analýze. Pomocí párového *t*-testu na hladině významnosti 0.05 nebyly pozorovány rozdíly mezi výsledky stanovení sušiny pro interval 12 a 24 h ( $p = 0.0768$ ), což dokládá, že pro vzorky vydřích kostí je dostačující interval 12 h. Přesto byla z důvodu zajištění robustnosti metody použita pro lyofilizaci reálných vzorků doba 24 h. Pro tuto dobu lyofilizace a pro 24 h byly vytvořeny krabicové grafy, viz Obr. 17 a 18. Navážka 1 g vzorku byla zvolena s ohledem na potřebné množství pro následnou analýzu. Pro mineralizaci bylo potřeba  $3 \times 100$  mg a počítalo se i s případnými ztrátami během kroku mletí, během vážení či s případnou potřebou opakování analýzy.

Tabulka 10: Výsledky stanovení sušiny (%) pro vzorky vydřích kostí v závislosti na době lyofilizace

| 12h  | 24h  | 48h  |
|------|------|------|
| 58.1 | 68.8 | 65.8 |
| 59.6 | 57.8 | 58.1 |
| 67.7 | 71.6 | 59.2 |
| 66.6 | 73.6 | 59.9 |
| 67.4 | 71.9 | 57.2 |



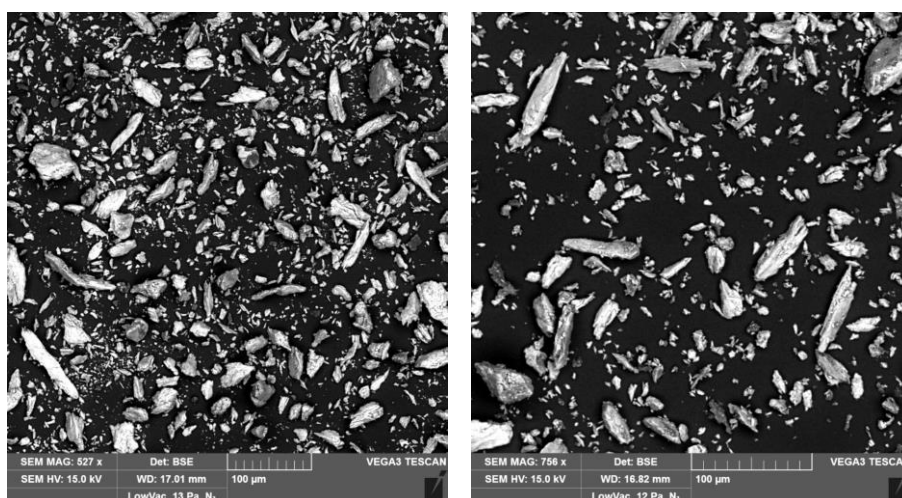
Obr. 17: Krabicový graf pro 12 h lyofilizace



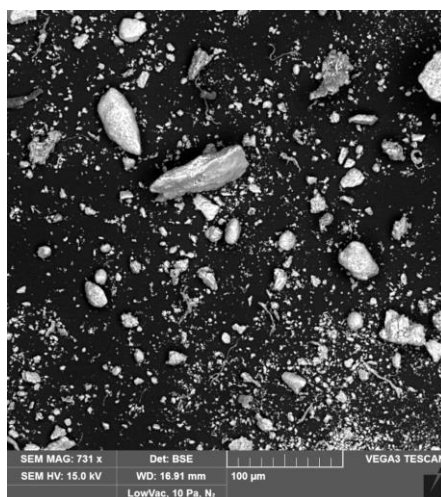
Obr. 18: Krabicový graf pro 24 h lyofilizace

## 4.2 Optimalizace mletí

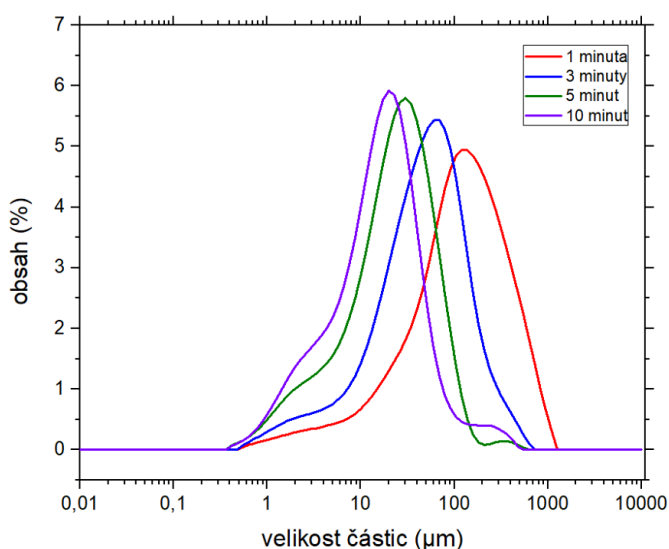
K zajištění dostatečné homogenity bylo potřeba vzorky pomlít. Sledován byl vliv doby mletí (1, 3, 5 a 10 min.) na velikosti částic, viz Obr. 22. Bylo pozorováno, že doba mletí 5 min. zajišťuje dosažení střední velikosti částic 25  $\mu\text{m}$ . Pro tuto dobu je 90 % objemu vzorku pod 74  $\mu\text{m}$ . Pro SRM je deklarována velikost 355  $\mu\text{m}$ , tudíž zvolená doba mletí by měla být postačující. SRM nebyl pomletý, ale jelikož je velikost částic 355  $\mu\text{m}$  a výsledky analýzy SRM dosahují dobré reprodukovatelnosti, lze předpokládat, že tak bude i pro reálné vzorky, jejichž výsledky jsou uvedeny v Přílohách 3 a 4. Jelikož byly vzorky variabilní, byla zvolena o něco delší doba mletí – 7 min. O dobré homogenitě svědčí hodnoty RSD analýzy SRM 1486, viz Tabulka 13 (jedná se o RSD pro tři nezávislá stanovení, tj. 3 nezávislé navážky vzorku). Na Obr. 19,20 a 21 lze vidět snímky z elektronového mikroskopu pro pomleté vzorky vyder, králíka a SRM 1486.



Obr. 19 a 20: Snímek z elektronového mikroskopu pro vzorek pomleté vydří kosti (vlevo)  
a pro vzorek pomleté králíčí kosti (vpravo)



Obr. 21: Snímek z elektronového mikroskopu pro SRM 1486



Obr. 22: Velikost částic mletých kostí vydry říční

### 4.3 Optimalizace mikrovlnné mineralizace reálných vzorků

K optimalizaci mikrovlnné mineralizace reálných vzorků bylo použito frakcionální faktorové plánování. Byly optimalizovány následující proměnné: navážka vzorku, rozkladná činidla, typ materiálu, teplota mikrovlnného rozkladu a doba, po kterou má být tato teplota držena. Pro každou studovanou proměnnou byly vybrány dvě úrovně, které jsou uvedeny v Tabulce 11. Horní hranice pro navážku a teplotu byly určeny parametry systému Multi-Tubes, který byl použit pro mikrovlnný rozklad. Maximální množství vzorku organického původu v jedné nádobce může být 250 mg a nejvyšší deklarovaná teplota, které lze tyto nádoby vystavit je 230 °C.

Optimalizace byla provedena pro vzorky jater a tuku, protože obsahovaly vyšší procento organické matrice a jejich rozklad byl náročnější a spojen s celou řadou problémů. Játra a tuk

byly analyzovány v předchozí diplomové práci [112]. Cílem bylo vytvořit univerzální program použitelný pro všechny typy analyzovaných tkání. Mineralizace kostí se v tomto ohledu jeví jako bezproblémová. V předchozí práci bylo pro rozklad použito mikrovlnné zařízení MWS3+ a v této práci byl program testován na novějším typu zařízení Xpert.

**Tabulka 11: Proměnné a jejich úrovně využité při optimalizaci MW mineralizace za využití  $2^{5-2}$  plánu**

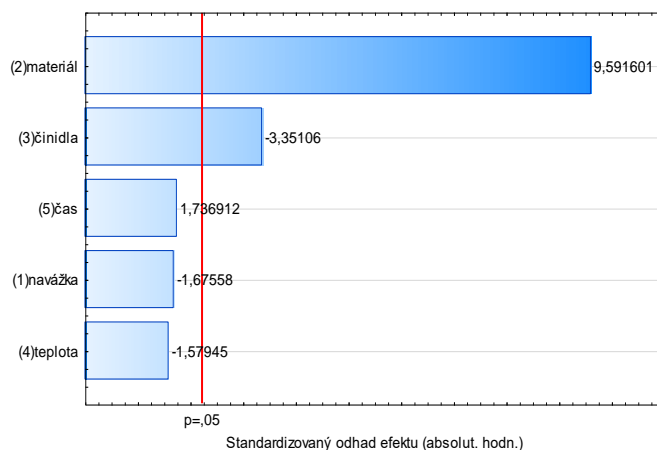
| <b>Proměnná</b> | <b>-1</b>  | <b>1</b>   |
|-----------------|--|--|
| Navážka (mg)    | 50   | 200  |
| Materiál        | Játra  | Tuk  |
| Činidla         | HNO <sub>3</sub> : H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (1 mL + 0.4 mL) | HNO <sub>3</sub> : H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (1 mL + 1 mL) |
| Teplota (°C)    | 180  | 220  |
| Doba (min)      | 5  | 20   |

Díky využití frakcionálního faktorového plánu bylo možné snížit počet provedených experimentů z 64, které by bylo jinak nutné provést při využití plného plánu ( $2^5$ ) a dvou opakování až na 16 ( $2^{5-2}$ ,  $n = 2$ ), čímž došlo k velké časové i finanční úspoře. Finální plán (včetně dvou replik pro každé stanovení), který byl navržen v programu Statistica, je uveden v Tabulce 12. V této tabulce jsou uvedeny také výsledky stanovení zbytkového uhlíku v mineralizátech pomocí ICP-OES. Na základě těchto dat byla hodnocena účinnost mikrovlnného rozkladu.

**Tabulka 12: Finální 2<sup>5-2</sup> (n =2) plán pro optimalizaci mikrovlnné mineralizace a výsledky stanovení uhlíku**

| <b>Pokus</b> | <b>Replika</b> | <b>Navážka</b> | <b>Materiál</b> | <b>Činidla</b> | <b>Teplota</b> | <b>Čas</b> | <b>C (g kg<sup>-1</sup>)</b> |
|--------------|----------------|----------------|-----------------|----------------|----------------|------------|------------------------------|
| 10           | 2              | 1.00           | -1.00           | -1.00          | -1.00          | -1.00      | 73.60                        |
| 1            | 1              | -1.00          | -1.00           | -1.00          | 1.00           | 1.00       | 60.03                        |
| 6            | 1              | 1.00           | -1.00           | 1.00           | -1.00          | 1.00       | 42.33                        |
| 13           | 2              | -1.00          | -1.00           | 1.00           | 1.00           | -1.00      | 50.11                        |
| 3            | 1              | -1.00          | 1.00            | -1.00          | -1.00          | 1.00       | 266.2                        |
| 7            | 1              | -1.00          | 1.00            | 1.00           | -1.00          | -1.00      | 144.0                        |
| 15           | 2              | -1.00          | 1.00            | 1.00           | -1.00          | -1.00      | 147.4                        |
| 9            | 2              | -1.00          | -1.00           | -1.00          | 1.00           | 1.00       | 65.25                        |
| 12           | 2              | 1.00           | 1.00            | -1.00          | 1.00           | -1.00      | 182.9                        |
| 4            | 1              | 1.00           | 1.00            | -1.00          | 1.00           | -1.00      | 149.8                        |
| 5            | 1              | -1.00          | -1.00           | 1.00           | 1.00           | -1.00      | 47.08                        |
| 2            | 1              | 1.00           | -1.00           | -1.00          | -1.00          | -1.00      | 73.8                         |
| 8            | 1              | 1.00           | 1.00            | 1.00           | 1.00           | 1.00       | 165.0                        |
| 11           | 2              | -1.00          | 1.00            | -1.00          | -1.00          | 1.00       | 275.0                        |
| 14           | 2              | 1.00           | -1.00           | 1.00           | -1.00          | 1.00       | 27.49                        |
| 16           | 2              | 1.00           | 1.00            | 1.00           | 1.00           | 1.00       | 157.1                        |

Vliv jednotlivých proměnných, viz Tabulka 11, na účinnost mikrovlnného rozkladu byl vyhodnocen pomocí Paretova diagramu, který je uveden jako Obr. 23. Červená svislá čára na hladině významnosti  $\alpha = 0.05$  představuje hranici, nad kterou je faktor kvalifikován jako významný. Jak je z Obr. 23 patrné, mezi statisticky významné faktory patří typ vzorku a množství použitých činidel. Z hlediska typu materiálu bylo vyšší množství zbytkového C naměřeno pro vzorky tuku. Nižší účinnost mikrovlnného rozkladu pro tento typ vzorku byla dána tím, že tuk má větší obsah uhlíku v původním vzorku ve srovnání s játry [113, 114]. Záporná hodnota u parametru činidel značí, že s větším množstvím rozkladných činidel byla naměřena nižší hodnota zbytkového C. Ostatní parametry jako doba rozkladu, teplota a navážka vzorku nebyly statisticky významné. Za účelem zvolení nejrobustnějších podmínek byly jako finální podmínky zvoleny navážka 100 mg vzorku a jako rozkladná činidla 1 mL HNO<sub>3</sub> (65%) a 1 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%). Pro mikrovlnný rozklad byla zvolena teplota 200 °C a doba rozkladu 15 min. Finální teplotní program mikrovlnného rozkladu je uveden v Tabulce 5 v experimentální části 3.5.5.



**Obr. 23: Paretův graf standardizovaných efektů stanovení zbytkového uhlíku v mineralizátech v závislosti na vybraných faktorech**

#### 4.4 Ověření přesnosti a správnosti stanovení

Před analýzou reálných vzorků bylo třeba ověřit správnost a přesnost námi vybraných metod. Jednalo se o metody: (I) termooxidační stanovení rtuti, (II) atomové absorpční či emisní spektrometrie s atomizací v plameni, (III) optické emisní spektrometrie a (IV) hmotnostní spektrometrie s ionizací v indukčně vázaném plazmatu se spektrometrem s průletovým analyzátozem s ortogonální akcelerací iontů. Pomocí (I) termooxidační metody byla stanovena Hg, pomocí (II) FAAS či FAES prvky K a Mg, pomocí (III) ICP-OES prvky Ca, Na a P a pomocí (IV) oaTOF-ICP-MS prvky Mn, Cu, Zn, Sr a Pb.

Pro ověření přesnosti a správnosti těchto metod byl analyzován certifikovaný referenční materiál kosti NIST SRM 1486 Bone Meal. V Tabulce 13 jsou uvedeny výsledky stanovení a deklarované hodnoty koncentrací včetně intervalů nejistot, které pochází z certifikačního listu použitého certifikovaného referenčního materiálu, který je uveden také v Příloze 2. Pro prvky, které nejsou certifikovány v referenčním materiálu, v našem případě se jedná o V, Co, Ba a Ce byla správnost vyhodnocena na základě analytických návratností. Pro tyto prvky se pohybovala v rozmezí 95–111 %. Vzorky byly pro tento účel obohaceny o prvky V, Co a Ba v koncentracích  $5 \mu\text{g kg}^{-1}$  a Ce o koncentraci  $0,5 \mu\text{g kg}^{-1}$ . Nejvyšší hodnoty analytické návratnosti R bylo dosaženo při stanovení Hg. Hodnota se nachází akceptovatelném intervalu, který je v tomto dokumentu uveden.



Tabulka 13: Výsledky stanovení koncentrací vybraných prvků v SRM Bone Meal 1486

| ICP-TOF-MS                           | Koncentrace <sup>a</sup> [mg kg <sup>-1</sup> ] |               | R <sup>b</sup> [%] | RSD <sup>c</sup> [%] |
|--------------------------------------|---|---------------|--------------------|----------------------|
|                                      | Deklarováno                                     | Nalezeno      |                    |                      |
| <sup>55</sup> Mn <sup>+</sup>        | 1 <sup>d</sup>                                  | 1,06 ± 0,47   | 106                | 6,5                  |
| <sup>63</sup> Cu <sup>+</sup>        | 0,8 <sup>d</sup>                                | 0,8094 ± 0,08 | 101                | 5                    |
| <sup>64</sup> Zn <sup>+</sup>        | 147 ± 16  | 140 ± 27      | 95                 | 9,7                  |
| <sup>88</sup> Sr <sup>+</sup>        | 264 ± 7   | 259 ± 5       | 98                 | 1                    |
| <sup>208</sup> Pb <sup>+</sup>       | 1,335 ± 0,014                                   | 1,326 ± 0,202 | 99                 | 7,6                  |
| ICP-OES                              | Koncentrace <sup>a</sup> [mg kg <sup>-1</sup> ] |               | R <sup>b</sup> [%] | RSD <sup>c</sup> [%] |
|                                      | Deklarováno                                     | Nalezeno      |                    |                      |
| Ca                                   | 26,58 ± 0,24 %                                  | 27,69 ± 1,5   | 104                | 2,7                  |
| P                                    | 12,3 ± 0,19%                                    | 12,42 ± 0,32  | 101                | 1,3                  |
| Na                                   | 0,5 <sup>d</sup> %                              | 0,507 ± 0,06  | 101                | 1,04                 |
| FAAS/FAES                            | Koncentrace <sup>a</sup> [mg kg <sup>-1</sup> ] |               | R <sup>b</sup> [%] | RSD <sup>c</sup> [%] |
|                                      | Deklarováno                                     | Nalezeno      |                    |                      |
| K                                    | 412 ± 4 mg/kg                                   | 412 ± 8,7     | 100                | 1,05                 |
| Mg                                   | 0,466 ± 0,017%                                  | 0,467 ± 0,023 | 100                | 2,4                  |
| Termooxidační metoda stanovení rtuti | Koncentrace <sup>a</sup> [μg kg <sup>-1</sup> ] |               | R <sup>b</sup> [%] | RSD <sup>c</sup> [%] |
|                                      | Deklarováno                                     | Nalezeno      |                    |                      |
| Hg                                   | 2,3 ± 1,4                                       | 2,55 ± 0,46   | 111                | 8,4                  |

<sup>a</sup> Střední hodnota ± 2 SD (n = 3).

<sup>b</sup> návratnost R (%) vyjádřená jako (poměr naměřené hodnoty ku certifikované) × 100.

<sup>c</sup> Relativní směrodatná odchylka (%) ze tří nezávislých stanovení.

<sup>d</sup> Indikovaná hodnota.

#### 4.5 Detekční limity a meze stanovitelnosti

Hodnoty detekčních limitů (LOD) a mezí stanovitelnosti (LOQ) byly vypočítány podle doporučení komise IUPAC. LOD a LOQ podle IUPAC odpovídají trojnásobku a desetinásobku směrodatné odchylky spočítané na základě opakovaného měření (n = 10) slepého vzorku. Hodnoty pro jednotlivé analyty jsou uvedeny v Tabulce 14.

Tabulka 14: LOD a LOQ vybraných prvků pro oa-TOF-ICP-MS, FAAS/FAES a pro termooxidační metodu

| <b>ICP-<i>oa</i>-TOF-MS</b>    |                             |                             |                             |                             |
|--------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| <b>Analyt</b>                  | <b>LOD<sup>a</sup></b>      | <b>LOQ<sup>a</sup></b>      | <b>LOD<sup>b</sup></b>      | <b>LOQ<sup>b</sup></b>      |
|                                | <b>[μg L<sup>-1</sup>]</b>  | <b>[μg L<sup>-1</sup>]</b>  | <b>[μg kg<sup>-1</sup>]</b> | <b>[μg kg<sup>-1</sup>]</b> |
| <sup>51</sup> V <sup>+</sup>   | 0,0073                      | 0,024                       | 7,32                        | 24,4                        |
| <sup>55</sup> Mn <sup>+</sup>  | 0,0018                      | 0,006                       | 1,79                        | 5,97                        |
| <sup>59</sup> Co <sup>+</sup>  | 0,0082                      | 0,027                       | 8,19                        | 27,3                        |
| <sup>63</sup> Cu <sup>+</sup>  | 0,0011                      | 0,004                       | 1,12                        | 3,73                        |
| <sup>64</sup> Zn <sup>+</sup>  | 0,0068                      | 0,023                       | 6,77                        | 22,6                        |
| <sup>88</sup> Sr <sup>+</sup>  | 0,0093                      | 0,031                       | 9,28                        | 30,9                        |
| <sup>138</sup> Ba <sup>+</sup> | 0,0025                      | 0,0082                      | 2,46                        | 8,20                        |
| <sup>140</sup> Ce <sup>+</sup> | 0,0012                      | 0,004                       | 1,21                        | 4,03                        |
| <sup>208</sup> Pb <sup>+</sup> | 0,0018                      | 0,006                       | 1,79                        | 5,97                        |
| <b>Termooxidační metoda</b>    |                             |                             |                             |                             |
| <b>Analyt</b>                  | <b>LOD<sup>a</sup></b>      | <b>LOQ<sup>a</sup></b>      | <b>LOD<sup>b</sup></b>      | <b>LOQ<sup>b</sup></b>      |
|                                | <b>[μg L<sup>-1</sup>]</b>  | <b>[μg L<sup>-1</sup>]</b>  | <b>[μg kg<sup>-1</sup>]</b> | <b>[μg kg<sup>-1</sup>]</b> |
| Hg                             | 0,0003                      | 0,003                       | 0,065                       | 0,218                       |
| <b>FAAS/FAES</b>               |                             |                             |                             |                             |
| <b>Analyt</b>                  | <b>LOD<sup>a</sup></b>      | <b>LOQ<sup>a</sup></b>      | <b>LOD<sup>b</sup></b>      | <b>LOQ<sup>b</sup></b>      |
|                                | <b>[mg L<sup>-1</sup>]</b>  | <b>[mg L<sup>-1</sup>]</b>  | <b>[mg kg<sup>-1</sup>]</b> | <b>[mg kg<sup>-1</sup>]</b> |
| Mg                             | 0,0082                      | 0,027                       | 0,82                        | 2,73                        |
| K                              | 0,198                       | 0,66                        | 19,8                        | 66                          |
| <b>ICP-OES</b>                 |                             |                             |                             |                             |
| <b>Analyt</b>                  | <b>LOD</b>                  | <b>LOQ</b>                  | <b>LOD</b>                  | <b>LOQ</b>                  |
|                                | <b>[mg kg<sup>-1</sup>]</b> | <b>[mg kg<sup>-1</sup>]</b> | <b>[mg kg<sup>-1</sup>]</b> | <b>[mg kg<sup>-1</sup>]</b> |
| Ca                             | 0,0077                      | 0,026                       | 0,77                        | 2,56                        |
| Na                             | 0,0067                      | 0,022                       | 0,67                        | 2,24                        |
| P                              | 0,024                       | 0,080                       | 2,4                         | 8,04                        |

<sup>a</sup>LOD, LOQ techniky.

<sup>b</sup>LOD, LOQ metody.

#### 4.6 Stanovení vybraných prvků ve vzorcích kostí vydry říční

Byly zanalyzovány vzorky kostí vydry říční. Ve vzorcích byly stanoveny analyty, pro které byla potvrzena správnost na základě srovnání s analýzou CRM. Pozornost byla soustředěována výhradně na stanovení prvků, pro které byly zajištěny zvolenými metodami dostatečné detekční limity, tzn. prvky byly ve všech případech kvantifikovatelné.

Výsledky stanovení, které jsou vypočítány jako průměr tří nezávislých analýz, jsou shrnuty v Přílohách 3 a 4.

#### 4.6.1 Ověření předpokladů o datech

Pro zajištění správných a nevychýlených odhadů klasických výběrových parametrů je potřeba, aby data splňovala požadované vlastnosti. K základním předpokladům o datech patří nezávislost, normalita a homogenita, tj. nepřítomnost vybočujících měření, odlehlých dat a hrubých chyb [115, 116].

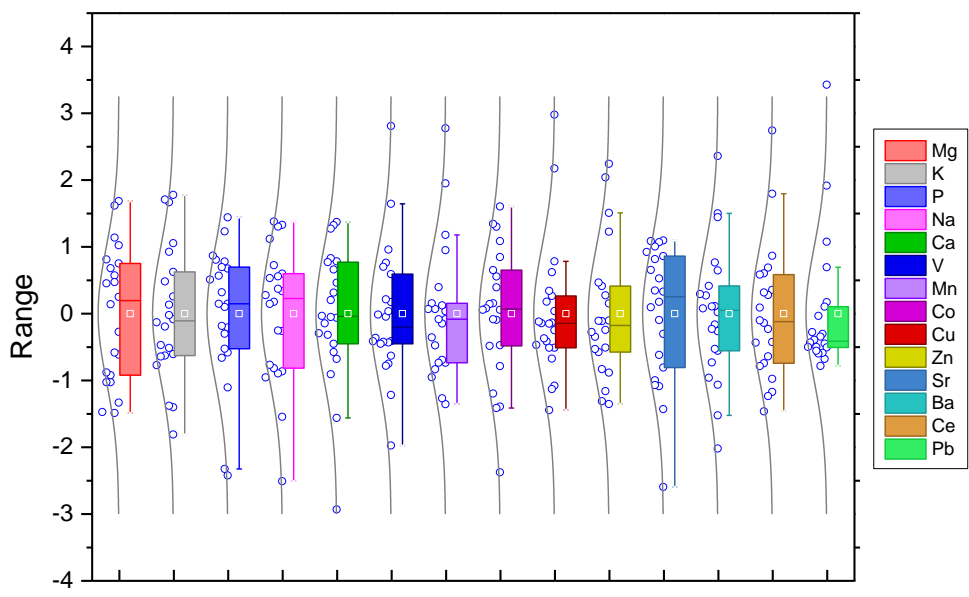
*Krabicový graf* (viz Obr. 24) – větší obdélník ohraničuje vnitřních 50 % dat, horní okraj obdélníku odpovídá 75% kvantilu, spodní okraj obdélníku odpovídá 25% kvantilu. Střed obdélníku (čára) odpovídá mediánu, šířka pruhu odpovídá intervalu spolehlivosti mediánu a body mimo horní a spodní hranbu se označují jako odlehlé. Vyšší koncentrace oproti mediánu byly nalezeny u 7 vzorků. Vše názorně shrnuje Tabulka 15.

**Tabulka 15: Nalezené odlehlé body a jejich hodnoty pro jednotlivé vzorky.**

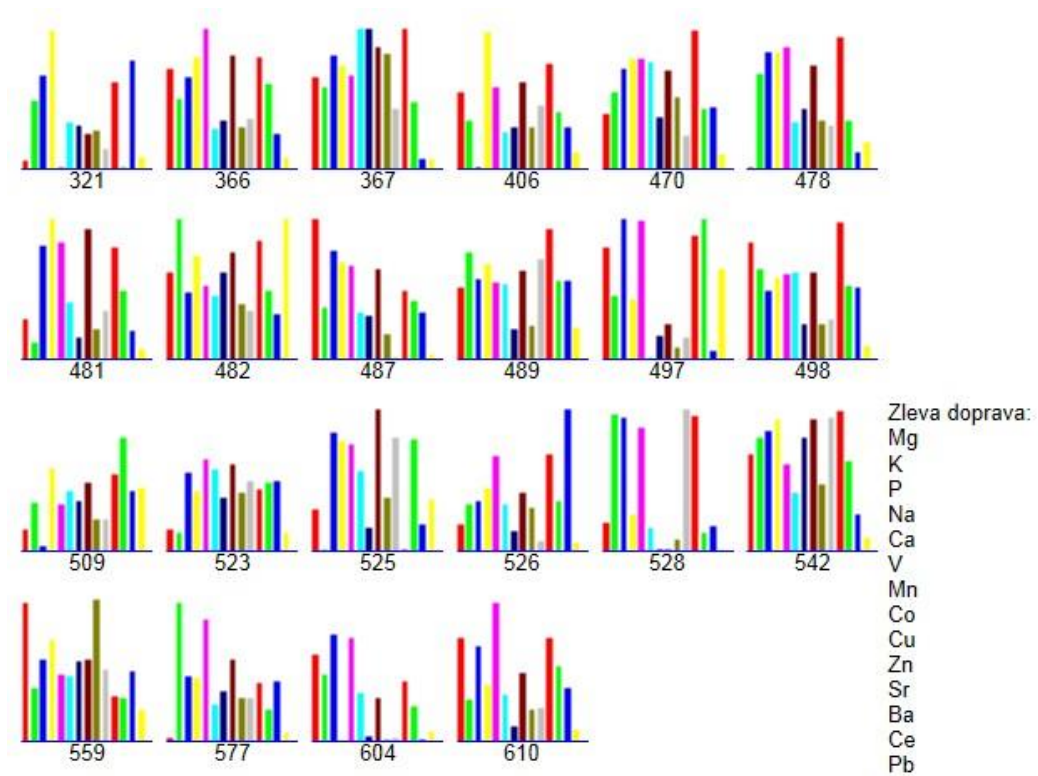
| Prvek | Poč. odlehlých bodů | Medián | 367   | 482 | 497  | 509  | 526   | 542  | 559  |
|-------|---------------------|--------|-------|-----|------|------|-------|------|------|
| V     | 1                   | 0,31   | 0,613 |     |      |      |       |      |      |
| Mn    | 2                   | 2,04   | 4,67  |     |      |      |       | 3,91 |      |
| Cu    | 2                   | 0,97   | 2,42  |     |      |      |       |      | 2,43 |
| Ce    | 1                   | 0,054  |       |     |      |      | 0,114 |      |      |
| Pb    | 3                   | 0,6    |       | 5,3 | 3,45 | 2,42 |       |      |      |

Pozn. V Tabulce jsou uvedeny průměrné hodnoty koncentrací

*Ikonový graf* (viz Obr. 25) – každý sloupec představuje jiný prvek. Pomocí ikonového grafu lze identifikovat případy stejného chování a také nalézt případy s výrazně odlišným chováním od ostatních. Dle ikonového grafu lze říci, že 367 a 542 mají podobné hodnoty koncentrací. Podobné si jsou i vzorky 470, 478, 489 a 498. Odlišné složení vzorků od ostatních má vzorek 528 a také 604.



Obr. 24: Krabicový graf koncentrací prvků Mg, K, P, Na, Ca, V, Mn, Co, Cu, Zn, Sr, Ba, Ce a Pb pro naměřená data po standardizaci



Obr. 25: Ikonový graf koncentrací prvků Mg, K, P, Na, Ca, V, Mn, Co, Cu, Zn, Sr, Ba, Ce a Pb pro naměřená data

#### **4.6.2 Mocninná transformace**

Na základě průzkumové analýzy dat bylo zjištěno, že se rozdělení některých ze studovaných výběrů odlišují od normálního rozdělení, a tak není vhodné pro jejich popis volit robustní odhady. Konkrétně se jednalo o data prvků Cu a Pb. Přestože robustní odhady do značné míry eliminují problémy, které jsou spojené s přítomností odlehlých bodů a asymetrií v datech, nemusí být tento postup vždycky správný, protože robustnost spočívá v přiblížení se k přijatému modelu měření bez ohledu na jeho platnost. Když se v datech objeví asymetrie, není možné ji eliminovat odstraněním odlehlých bodů z důvodu charakteru experimentu. Data představují cenné informace a jejich ztráta by mohla v konečném důsledku vést k chybné interpretaci výsledků. V takovém případě je vhodné provést transformaci [115, 116] dat vedoucí k zesymetričtění rozdělení a ke stabilizaci dat.

#### **4.6.3 Konfirmatorní analýza dat**

Na základě výše uvedených údajů byly zvoleny statistické parametry, které charakterizují jednotlivá výběrová rozdělení. Statistické charakteristiky stanovení vybraných prvků ve vzorcích kostí vydry říční vypočítané programem QCExpert jsou shrnuty v Tabulce 16. Tyto parametry by měly dostatečně sloužit pro charakterizaci výběru a celkovou interpretaci výsledků.

Tabulka 16: Statistické charakteristiky stanovení obsahu Mg, K, P, Na, Ca, V, Mn, Co, Cu, Zn, Sr, Ba, Ce a Pb [mg kg<sup>-1</sup>]

|                                       | Mg       | K        | P          | Na       | Ca          | V     | Mn   | Co    | Cu    | Zn    | Sr    | Ba    | Ce      | Pb    |
|---------------------------------------|----------|----------|------------|----------|-------------|-------|------|-------|-------|-------|-------|-------|---------|-------|
| <b>Počet vzorků</b>                   | 22       | 22       | 22         | 22       | 22          | 22    | 22   | 22    | 22    | 22    | 22    | 22    | 22      | 22    |
| <b>Počet odlehlých bodů</b>           | 0        | 0        | 0          | 0        | 0           | 1     | 2    | 0     | 2     | 0     | 0     | 0     | 1       | 3     |
| <b>Minimum</b>                        | 3472,0   | 2386,8   | 99346,0    | 6776,1   | 200366,6    | 0,29  | 1,71 | 4,33  | 0,79  | 105,9 | 37,7  | 6,57  | 0,047   | 0,56  |
| <b>Maximum</b>                        | 3755,7   | 2680,3   | 103520,7   | 7578,7   | 211682,1    | 0,38  | 2,52 | 5,15  | 1,34  | 123,0 | 47,6  | 9,45  | 0,066   | 1,64  |
| <b>Průměr</b>                         | 3613,9   | 2533,5   | 101433,4   | 7177,4   | 206024,3    | 0,33  | 2,16 | 4,74  | 1,06  | 114,5 | 42,6  | 8,01  | 0,06    | 1,10  |
| <b>Průměr<sup>a</sup></b>             |          |          |            |          |             |       |      |       | 0,95  |       |       |       |         | 0,66  |
| <b>Spodní mez IS<sup>a</sup></b>      |          |          |            |          |             |       |      |       | 0,74  |       |       |       |         | 0,50  |
| <b>Horní mez IS<sup>a</sup></b>       |          |          |            |          |             |       |      |       | 1,20  |       |       |       |         | 0,89  |
| <b>Rozptyl</b>                        | 102383,8 | 109496,0 | 22163618,2 | 819156,5 | 162833293,9 | 0,01  | 0,85 | 0,86  | 0,39  | 368,0 | 122,9 | 10,54 | 0,00044 | 1,50  |
| <b>Směrodatná odchylka</b>            | 319,97   | 330,9    | 4707,8     | 905,1    | 12760,6     | 0,1   | 0,92 | 0,92  | 0,62  | 19,2  | 11,1  | 3,25  | 0,021   | 1,23  |
| <b>Medián</b>                         | 3676,5   | 2498,5   | 102134,5   | 7382,5   | 205498,5    | 0,31  | 2,04 | 4,8   | 0,97  | 111,1 | 45,5  | 8,18  | 0,054   | 0,60  |
| <b>Spodní mez IS mediánu</b>          | 3392,1   | 2278,3   | 99085,1    | 6702,9   | 197233,5    | 0,25  | 1,60 | 4,24  | 0,72  | 101,0 | 35,6  | 6,57  | 0,039   | 0,20  |
| <b>Horní mez IS mediánu</b>           | 3960,9   | 2718,7   | 105184     | 8062,1   | 213763,5    | 0,37  | 2,48 | 5,36  | 1,23  | 121,1 | 55,3  | 9,85  | 0,069   | 0,99  |
| <b>Šikmost</b>                        | 0,018    | 0,24     | -1,04      | -0,64    | -1,05       | 0,85  | 1,18 | -0,49 | 1,51  | 0,84  | -0,84 | 0,29  | 0,93    | 2,28  |
| <b>Špičatost</b>                      | 1,77     | 2,37     | 3,70       | 2,99     | 4,56        | 4,47  | 4,23 | 2,84  | 5,47  | 2,98  | 3,04  | 3,28  | 3,92    | 7,71  |
| <b>p (test normality)<sup>b</sup></b> | 0,972    | 0,78     | 0,104      | 0,32     | 0,1         | 0,175 | 0,07 | 0,467 | 0,028 | 0,182 | 0,179 | 0,738 | 0,14    | 0,004 |

<sup>a</sup> Hodnota opraveného průměru po exponenciální transformaci dat.

<sup>b</sup> Kombinovaný test normality – jestliže je  $p$  větší než 0,05, rozdělení se považuje za normální. Je-li hodnota  $p$  menší než 0,05, data nevykazují normální rozdělení.

#### **4.7 Časová náročnost analytického postupu / Rychlost zpracování vzorků**

Simultánní analýza všech prvků pomocí oa-TOF-ICP-MS trvala pro jeden vzorek cca 1 minutu a to včetně 10 replik s následujícím promytím dávkovacího systému. Za 1 hodinu bylo tedy možné změřit přibližně 60 vzorků.

Plně zaplněný 8místný karusel mikrovlnného zařízení Speedwave Xpert v kombinaci se systémem Multi-Tubes umožnil rozklad 24 vzorků současně. Celkový čas pro rozklad 24 vzorků je 60 minut (rozklad včetně s chlazením rozkladných nádob).

Příprava 24 vzorků, která zahrnovala vážení, pipetování rozkladných činidel, chlazení, doplnění vzorků na požadovaný objem a přípravy vzorků k analýze (ředění a obohacení vzorků porovnávacím prvkem) trvala přibližně 90 minut. V jednoho 8hodinového pracovního dne bylo tedy možné analyzovat 64 vzorků.

## 5 ZÁVĚR

Cílem práce bylo provést multielementární analýzu kostí uhynulých vyder říčních dodaných neziskovou organizací ALKA Wildlife, o.p.s., ČR pomocí metody oa-TOF-ICP-MS, optimalizovat proces lyofilizace, mikrovlnné mineralizace a ověřit správnost a přesnost navrženého postupu. Teoretická část se zabývá složením kostí, významem chemické analýzy kostí, izotopickými analýzami, analytickými metodami prvkové analýzy kostí, interferencemi a jejich odstraněním a přípravou vzorků kostí k analýze.

Pro zajištění sušiny a konzervaci vzorku bylo nutné vzorky lyofilizovat a tento krok optimalizovat. Velikost navážky byla zvolena tak, aby vzorku bylo dostatečné množství. Doba lyofilizace byla volena z hlediska množství sušiny pro jednotlivé intervaly. Mezi jednotlivými časy byl pro srovnání použit párový *t*-test.

Mikrovlnná mineralizace byla optimalizována pro mikrovlnné zařízení MWS3+ a ověřena na Xpert. zařízení Speedwave Xpert se systémem Multi-Tubes, která díky zvýšení kapacity rozkladných nádob umožňuje výraznou úsporu času, energií a reakčních činidel oproti standardnímu postupu mikrovlnného rozkladu v nádobách DAC-100S a je tak v souladu s trendy zelené chemie [117]. Velkou výhodou je při použití systému Multi-Tubes také snížení množství vzorku, což je u biologických vzorků, které jsou často unikátní a dostupné v malém množství velmi důležité. Optimální parametry mikrovlnného rozkladu vydřích kostí byly: 100 mg vzorku, 1 mL 65% HNO<sub>3</sub> a 1 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 200 °C a teplotní program následující: (i) 10 min. při teplotě 160 °C s nárůstem 5 min., (ii) 10 min. při teplotě 160 °C s nárůstem 5 min., (iii) 15 min. při teplotě 200 °C s nárůstem 5 min. a (iv) 5 min. při teplotě 50 °C s poklesem 1 min. Bylo zjištěno, že k lepšímu rozkladu už v insertu dochází, když se jako první činidlo ke vzorku přidá peroxid vodíku a poté kyselina dusičná.

Správnost a přesnost analytického postupu pro analýzu 11 prvků (Ca, P, Na, K, Mg, Hg, Mn, Cu, Zn, Sr a Pb) byla ověřena pomocí certifikovaného referenčního materiálu SRM<sup>®</sup> 1486 Bone Meal (NIST, USA). Byla nalezena dobrá shoda a vynikající hodnoty RSD, proto bylo možné metodu použít pro analýzu reálných vzorků. Jelikož není možné s dostatečnou přesností a správností a přiměřenou časovou náročností všechny prvky dobře detekovat pomocí oa-TOF-ICP-MS, byly použity i další metody atomové spektrometrie, a to sice FAAS/FAES, termooxidační stanovení rtuti na přístroji AMA 254 a ICP-OES.

Díky poruše ICP-MS instrumentace bylo ze 73 lyofilizovaných vzorků analyzováno celkem 22. V reálných vzorcích bylo stanoveno celkem 14 prvků (kromě prvků analyzovaných v CRM se jednalo o prvky Ce, Ba a V). Výsledky stanovení prvků v těchto vzorcích byly



zpracovány za využití exploratorní analýzy jednorozměrných dat. Z ní vyplývá, že pro Cu a Pb nebyla splněna normalita, a proto bylo nutné pro tyto prvky provést exponenciální transformaci dat.

Z výsledků je zřejmé, že nejvyšší koncentrace olova (průměrná hodnota  $5,3 \text{ mg kg}^{-1}$ ) a jedna z nejvyšších koncentrací kobaltu (průměrná hodnota  $5,94 \text{ mg kg}^{-1}$ ) byla naměřena ve vzorku č. 481, jednalo se o samce nalezeného v Litvínovicích, příčina smrti není známá. Nejvyšší koncentrace kobaltu byla nalezena u vzorku č. 525 (průměrná hodnota  $6,22 \text{ mg kg}^{-1}$ ). U tohoto vzorku byla nalezena také druhá nejvyšší hodnota koncentrace barya ( $12,7 \text{ mg kg}^{-1}$ ). O tomto zvířeti víme jen místo nálezu – Přeštice (Plzeň – jih). Nejvyšší koncentrace stroncia, byla nalezena u vzorku č. 542 (průměrná hodnota  $54,7 \text{ mg kg}^{-1}$ ). Tento jedinec byl nalezen nedaleko Jindřichova Hradce. Nejvyšší hodnoty koncentrací vanadu (průměrná hodnota  $0,613 \text{ mg kg}^{-1}$ ) a manganu (průměrná hodnota  $4,67 \text{ mg kg}^{-1}$ ) byly nalezeny u jedince s číslem 367, který byl nalezen v Jistebníku blízko Nového Jičína. Jednalo se o samce, který zemřel po srážce s vozidlem. Číselné značení vzorků odpovídá kódům, které jsou uvedeny v databázi společnosti ALKA Wildlife, o.p.s., ČR [118].

## 6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] M.M. Shafer, M. Siker, J.T. Overdier, P.C. Ramsel, M. Teschler-Nicola, P.M. Farrell, Enhanced methods for assessment of the trace element composition of Iron Age bone, *Science of The Total Environment* 401(1) (2008) 144-161.
- [2] N.P. Zaksas, T.T. Sultangazieva, V.A. Gerasimov, Determination of trace elements in bone by two-jet plasma atomic emission spectrometry, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 391(2) (2008) 687-693.
- [3] V.R. Simpson, N.C. Stuart, R. Munro, A. Hunt, C.T. Livesey, Poisoning of dairy heifers by mercurous chloride, *Veterinary Record* 140(21) (1997) 549-552.
- [4] K. Szostek, Chemical signals and reconstruction of life strategies from ancient human bones and teeth - problems and perspectives, *Anthropological Review* 72(1) (2009) 3-30.
- [5] P.J.P. Yan Y. Zong, Walter Slavin, Accurate and Precise Measurements of Lead in Bone Using Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry with Zeeman-effect Background Correction, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* (1) (1996) 25-30
- [6] I.T. Horváth, P.T. Anastas, Innovations and Green Chemistry, *Chemical Reviews* 107(6) (2007) 2169-2173.
- [7] K. Poledníková, L. Poledník, V. Beran, T. Mináriková, V. Hlaváč, J. Větrovcová, L. Husáková, J. Vadlejch, E. Bártová, P. Hájková, Sběr a analýzy uhynulých vyder v České republice, in: o.p.s. ALKA Wildlife (Ed.) Lideřovice, 2017.
- [8] E.C. Ross, A.C. Simmons, *Introductory Biomechanics - From Cells to Organisms*, Cambridge University Press 2007.
- [9] M. Anne Katzenberg, S.R. Saunders, *Biological Anthropology of the Human Skeleton*, 1 ed., John Wiley & Sons, New Jersey, 2007.
- [10] W. Meier-Augenstein, H. Kemp, *Stable Isotope Analysis Bone and teeth*, Wiley Encyclopedia of Forensic Science, John Wiley & Sons, New Jersey, 2009.
- [11] M. Vašinová Galiová, M. Nývltová Fišáková, J. Kynický, L. Prokeš, H. Neff, A.Z. Mason, P. Gadas, J. Košler, V. Kanický, Elemental mapping in fossil tooth root section of *Ursus arctos* by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS), *Talanta* 105 (2013) 235-243.
- [12] J.J. Maya, T. Sabu, *Natural Polymers*, Royal Society of Chemistry, 2012.
- [13] R.M. Rosen, *Harry's Cosmeticology*, 9 ed., Chemical Publishing Company Inc., 2015.
- [14] R.E.M. Hedges, R.E. Stevens, P.L. Koch, *Isotopes in Palaeoenvironmental Research*, 1 ed., Springer Netherlands, 2006.
- [15] M.E. Hodson, E. Valsami-Jones, J.D. Cotter-Howells, W.E. Dubbin, A.J. Kemp, I. Thornton, A. Warren, Effect of bone meal (calcium phosphate) amendments on metal release from contaminated soils - a leaching column study, *Environ. Pollut.* 112(2) (2001) 233-243.
- [16] T.D. Price, C.M. Johnson, J.A. Ezzo, J. Ericson, J.H. Burton, Residential mobility in the prehistoric southwest United States - A preliminary study using strontium isotope analysis, *J. Archaeol. Sci.* 21(3) (1994) 315-330.
- [17] M. Allaby, *Dictionary of Geology and Earth Sciences*, 4 ed., Oxford University Press, 2013.
- [18] M.Y. He, Z.D. Jin, C.G. Luo, L. Deng, J. Xiao, F. Zhang, Determination of Boron Isotope Ratios in Tooth Enamel by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS) After Matrix Separation by Ion Exchange Chromatography, *Journal of the Brazilian Chemical Society* 26(5) (2015) 949-954.

- [19] N.M. Slovak, A. Paytan, Applications of Sr Isotopes In Archeology, in: M. Baskaran (Ed.), Handbook of Environmental Isotope Geochemistry: Vol I, Springer Berlin Heidelberg Berlin, Heidelberg, 2012, pp. 743-768
- [20] D.S. Urgast, J. Feldmann, Isotope ratio measurements in biological tissues using LA-ICP-MS - possibilities, limitations, and perspectives, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 28(9) (2013) 1367-1371.
- [21] M. Sponheimer, D. de Ruiter, J. Lee-Thorp, A. Späth, Sr/Ca and early hominin diets revisited: new data from modern and fossil tooth enamel, *Journal of Human Evolution* 48(2) (2005) 147-156.
- [22] A. Sillen, Strontium-calcium ratios (Sr/Ca) of Australopithecus robustus and associated fauna from Swartkrans, *Journal of Human Evolution* 23(6) (1992) 495-516.
- [23] J.H. Burton, T.D. Price, W.D. Middleton, Correlation of bone Ba Ca and Sr Ca due to biological purification of calcium, *J. Archaeol. Sci.* 26(6) (1999) 609-616.
- [24] K. Szostek, H. Głąb, A. Pudło, The use of strontium and barium analyses for the reconstruction of the diet of the early medieval coastal population of Gdańsk (Poland): A preliminary study, *HOMO - Journal of Comparative Human Biology* 60(4) (2009) 359-372.
- [25] H.M. Tvinnereim, R. Eide, T. Riise, Heavy metals in human primary teeth: some factors influencing the metal concentrations, *Science of The Total Environment* 255(1) (2000) 21-27.
- [26] R.A. Bentley, Strontium isotopes from the earth to the archaeological skeleton: A review, *Journal of Archaeological Method and Theory* 13(3) (2006) 135-187.
- [27] W. Castro, J. Hoogewerff, C. Latkoczy, J.R. Almirall, Application of laser ablation (LA-ICP-SF-MS) for the elemental analysis of bone and teeth samples for discrimination purposes, *Forensic Science International* 195(1-3) (2010) 17-27.
- [28] H. Mosbæk, P.E. Holm, J.C. Tjell, Automated on-line solvent extraction and AAS-graphite furnace determination of trace metals in difficult matrices, *J. Anal. At. Spectrom.* 18(12) (2003) 1489-1492.
- [29] H.B. Pereira, A.S. Luna, F.W. Herms, R.C.d. Campos, Determination of lead in bone by electrothermal atomic absorption spectrometry with Zeeman effect background correction, *Journal of the Brazilian Chemical Society* 15 (2004) 487-490.
- [30] Ł. Kubaszewski, A. Ziola-Frankowska, M. Frankowski, P. Rogala, Z. Gasik, J. Kaczmarczyk, A. Nowakowski, M. Dabrowski, W. Labedz, G. Miękisiak, R. Gasik, Comparison of trace element concentration in bone and intervertebral disc tissue by atomic absorption spectrometry techniques, *Journal of Orthopaedic Surgery and Research* 9(1) (2014) 99.
- [31] A.C. Todd, E.L. Moshier, S. Carroll, S.W. Casteel, Validation of X-Ray Fluorescence-Measured Swine Femur Lead against Atomic Absorption Spectrometry, *Environmental Health Perspectives* 109(11) (2001) 1115-1119.
- [32] C. Zhang, Y. Wang, X. Cheng, H. Xia, P. Liang, Determination of Cadmium and Lead in Human Teeth Samples Using Dispersive Liquid-liquid Microextraction and Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry, *Journal of the Chinese Chemical Society* 58(7) (2011) 919-924.
- [33] M. Grotti, M. Luisa Abemoschi, S. Dalla Riva, F. Soggia, R. Frache, Determination of lead in bone tissues by axially viewed inductively coupled plasma multichannel-based emission spectrometry, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 381(7) (2005) 1395-400.
- [34] P.J.P. Yan Y. Zong, Walter Slavin, Background correction errors for lead in the presence of phosphate with Zeeman graphite furnace atomic absorption spectrometry, *Spectrochimica Acta* (1998).
- [35] E. Ito, K. Buddhachat, S. Klinhom, P. Siengdee, J.L. Brown, R. Nomsiri, P. Kaewmong, C. Thitaram, P. Mahakkanukrauh, K. Nganvongpanit, Elemental Analysis of Bone, Teeth, Horn and Antler in Different Animal Species Using Non-Invasive Handheld X-Ray Fluorescence, *Plos One* 11(5) (2016).

- [36] J. Gonzalez-Rodriguez, G. Fowler, A study on the discrimination of human skeletons using X-ray fluorescence and chemometric tools in chemical anthropology, *Forensic Science International* 231(1-3) (2013).
- [37] F. Miculescu, M. Miculescu, L.T. Ciocan, A. Ernuteanu, I. Antoniac, I. Pencea, E. Matei, Comparative studies regarding heavy elements concentration in human cortical bone, *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures* 6(3) (2011) 1117-1127.
- [38] C.T. Andrew, J.P. Patrick, C. Spencer, G. Ciaran, A.K. Fuad, T. Shida, L.M. Erin, Measurements of lead in human tibiae. A comparison between K-shell x-ray fluorescence and electrothermal atomic absorption spectrometry, *Physics in Medicine & Biology* 47(4) (2002) 673.
- [39] E. Da Silva, A. Pejovic-Milic, D.V. Heyd, The use of teeth as the site for the in vivo or ex vivo quantification of skeletal strontium by energy-dispersive X-ray fluorescence spectrometry: A feasibility study, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 23(4) (2008) 527-534.
- [40] N. Ahmed, N.A. Osika, A.M. Wilson, D.E.B. Fleming, In vivo K-shell X-ray fluorescence bone lead measurements in young adults, *Journal of Environmental Monitoring* 7(5) (2005) 457-462.
- [41] C.T. Andrew, C. Spencer, G. Ciaran, A.K. Fuad, L.M. Erin, T. Shida, J.P. Patrick, L-shell x-ray fluorescence measurements of lead in bone: accuracy and precision, *Physics in Medicine & Biology* 47(8) (2002) 1399.
- [42] M. Glascock, R. Speakman, R. Popelka-Filcoff, *Archaeological Chemistry: Analytical Methods and Archaeological Interpretation*, 2007.
- [43] M. Resano, E. Garcia-Ruiz, F. Vanhaecke, Laser ablation-inductively coupled plasma mass spectrometry in archaeometric research, *Mass Spectrometry Reviews* 29(1) (2010) 55-78.
- [44] M. Galiová, J. Kaiser, F.J. Fortes, K. Novotný, R. Malina, L. Prokeš, A. Hrdlička, T. Vaculovič, M. Nývltová Fišáková, J. Svoboda, V. Kanický, J.J. Laserna, Multielemental analysis of prehistoric animal teeth by laser-induced breakdown spectroscopy and laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry, *Appl. Opt.* 49(13) (2010) C191-C199.
- [45] E. Hoffmann, H. Stephanowitz, E. Ullrich, J. Skole, C. Ludke, B. Hoffmann, Investigation of mercury migration in human teeth using spatially resolved analysis by laser ablation-ICP-MS, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 15(6) (2000) 663-667.
- [46] D. Kang, D. Amarasiriwardena, A.H. Goodman, Application of laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry (LA-ICP-MS) to investigate trace metal spatial distributions in human tooth enamel and dentine growth layers and pulp, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 378(6) (2004) 1608-1615.
- [47] F. Blaske, O. Reifschneider, G. Gosheger, C.A. Wehe, M. Sperling, U. Karst, G. Hauschild, S. Holl, Elemental Bioimaging of Nanosilver-Coated Prostheses Using X-ray Fluorescence Spectroscopy and Laser Ablation-Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry, *Anal. Chem.* 86(1) (2014) 615-620.
- [48] J.S. Becker, U. Kumtabtim, B. Wu, P. Steinacker, M. Otto, A. Matusch, Mass spectrometry imaging (MSI) of metals in mouse spinal cord by laser ablation ICP-MS, *Metallomics* 4(3) (2012) 284-288.
- [49] W. Castro, T. Trejos, B. Naes, J.R. Almirall, Comparison of high-resolution and dynamic reaction cell ICP-MS capabilities for forensic analysis of iron in glass, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 392(4) (2008) 663-672.
- [50] Z. Mitic, A. Stolic, S. Stojanovic, S. Najman, N. Ignjatovic, G. Nikolic, M. Trajanovic, Instrumental methods and techniques for structural and physicochemical characterization of biomaterials and bone tissue: A review, *Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications* 79 (2017) 930-949.

- [51] S. Dillane, M. Thompson, J. Meyer, M. Norquay, R.C. O'Brien, Inductively coupled plasma - atomic emission spectroscopy (ICP-AES) as a method of species differentiation of bone fragments, *Australian Journal of Forensic Sciences* 43(4) (2011) 297-312.
- [52] T.R. Helliwell, S.A. Kelly, H.P.J. Walsh, L. Klenerman, J. Haines, R. Clark, N.B. Roberts, Elemental analysis of femoral bone from patients with fractured neck of femur or osteoarthritis, *Bone* 18(2) (1996) 151-157.
- [53] M. De Wit, R. Blust, Determination of metals in saline and biological matrices by axial inductively coupled plasma atomic emission spectrometry using microconcentric nebulization, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 13(6) (1998) 515-520.
- [54] J.-M. Mermet, E. Poussel, ICP Emission Spectrometers: 1995 Analytical Figures of Merit, *Appl. Spectrosc.* 49(10) (1995) 12A-18A.
- [55] A. Aziz, J.A.C. Broekaert, F. Leis, Analysis of microamounts of biological samples by evaporation in a graphite furnace and inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 37(5) (1982) 369-379.
- [56] J.S. Becker, H. Sela, J. Dobrowolska, M. Zoriy, Recent applications on isotope ratio measurements by ICP-MS and LA-ICP-MS on biological samples and single particles, *Int. J. Mass Spectrom.* 270(1-2) (2008) 1-7.
- [57] S. Ashoka, B.M. Peake, G. Bremner, K.J. Hageman, M.R. Reid, Comparison of digestion methods for ICP-MS determination of trace elements in fish tissues, *Analytica Chimica Acta* 653(2) (2009) 191-199.
- [58] M. Grotti, F. Ardini, J.L. Todolì, Total introduction of microsamples in inductively coupled plasma mass spectrometry by high-temperature evaporation chamber with a sheathing gas stream, *Analytica Chimica Acta* 767 (2013) 14-20.
- [59] A. Montaser, *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*, J. Wiley, New York, 1998.
- [60] M. Würfels, E. Jackwerth, M. Stoepler, Residues from biological materials after pressure decomposition with nitric acid: Part 1. Carbon conversion during sample decomposition, *Analytica Chimica Acta* 226(1) (1989) 1-16.
- [61] G. Grindlay, L. Gras, J. Mora, M.T.C. de Loos-Vollebregt, Carbon-, sulfur-, and phosphorus-based charge transfer reactions in inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry, *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy* 115 (2016) 8-15.+
- [62] M.F. Mesko, V.C. Costa, R.S. Picoloto, C.A. Bizzi, P.A. Mello, Halogen determination in food and biological materials using plasma-based techniques: challenges and trends of sample preparation, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 31(6) (2016) 1243-1261.
- [63] Y. Cheung, G.C.Y. Chan, G.M. Hieftje, Flagging matrix effects and system drift in organic-solvent-based analysis by axial-viewing inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 28(2) (2013) 241-250.
- [64] T.S. Lum, K.S.Y. Leung, Strategies to overcome spectral interference in ICP-MS detection, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 31(5) (2016) 1078-1088.
- [65] Ebdon L., Fisher A. S., Betti M., Leroy M., *Sample preparation for trace element analysis*, Elsevier, Amsterdam, 2003.
- [66] C. Agatemor, D. Beauchemin, Matrix effects in inductively coupled plasma mass spectrometry: A review, *Analytica Chimica Acta* 706(1) (2011) 66-83.
- [67] I.J. Arnquist, T.E. Kreschollek, J.A. Holcombe, Simultaneous electrothermal vaporization and nebulizer sample introduction system for inductively coupled plasma mass spectrometry, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 66(3) (2011) 255-260.
- [68] N.M. Raut, L.S. Huang, S.K. Aggarwal, K.C. Lin, Mathematical correction for polyatomic isobaric spectral interferences in determination of lanthanides by inductively coupled plasma mass spectrometry, *Journal of the Chinese Chemical Society* 52(4) (2005) 589-597.

- [69] W. Guo, S.H. Hu, X.J. Wang, J.Y. Zhang, L.L. Jin, Z.L. Zhu, H.F. Zhang, Application of ion molecule reaction to eliminate WO interference on mercury determination in soil and sediment samples by ICP-MS, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 26(6) (2011) 1198-1203.
- [70] M. Resano, F. Vanhaecke, M.T.C. de Loos-Vollebregt, Electrothermal vaporization for sample introduction in atomic absorption, atomic emission and plasma mass spectrometry—a critical review with focus on solid sampling and slurry analysis, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 23(11) (2008) 1450-1475.
- [71] P. Wu, L.A. He, C.B. Zheng, X.D. Hou, R.E. Sturgeon, Applications of chemical vapor generation in non-tetrahydroborate media to analytical atomic spectrometry, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 25(8) (2010) 1217-1246.
- [72] L.L. Fialho, C.D. Pereira, J.A. Nóbrega, Combination of cool plasma and collision-reaction interface for correction of polyatomic interferences on copper signals in inductively coupled plasma quadrupole mass spectrometry, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 66(5) (2011) 389-393.
- [73] T. Prohaska, C. Latkoczy, G. Stinger, Precise sulfur isotope ratio measurements in trace concentration of sulfur by inductively coupled plasma double focusing sector field mass spectrometry, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 14(9) (1999) 1501-1504.
- [74] E. de Oliveira, Sample preparation for atomic spectroscopy: Evolution and future trends, *Journal of the Brazilian Chemical Society* 14(2) (2003) 174-182.
- [75] Z. Noor, S.B. Sumitro, M. Hidayat, A.H. Rahim, A. Sabarudin, T. Umemura, Atomic Mineral Characteristics of Indonesian Osteoporosis by High-Resolution Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, *Sci. World J.* (2012).
- [76] S. Zaichick, V. Zaichick, V.K. Karandashev, I.R. Moskvina, The Effect of Age and Gender on 59 Trace-Element Contents in Human Rib Bone Investigated by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, *Biological Trace Element Research* 143(1) (2011) 41-57.
- [77] V.G. Thomas, A.M. Scheuhammer, D.E. Bond, Bone lead levels and lead isotope ratios in red grouse from Scottish and Yorkshire moors, *Science of The Total Environment* 407(11) (2009) 3494-3502.
- [78] K.M. Hetter, D.J. Bellis, C. Geraghty, A.C. Todd, P.J. Parsons, Development of candidate reference materials for the measurement of lead in bone, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 391(6) (2008) 2011.
- [79] R.A.d. Sousa, C.M. Sabarese, G.L.P. Prado, K. Metzke, S. Cadore, Lead biomonitoring in different organs of lead intoxicated rats employing GF AAS and different sample preparations, *Talanta* 104 (2013) 90-96.
- [80] C.J. Brown, S.R.N. Chenery, B. Smith, C. Mason, A. Tomkins, G.J. Roberts, L. Sserunjogi, J.V. Tiberindwa, Environmental influences on the trace element content of teeth—implications for disease and nutritional status, *Archives of Oral Biology* 49(9) (2004) 705-717.
- [81] E. Webb, D. Amarasiriwardena, S. Tauch, E.F. Green, J. Jones, 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, *Microchem J.* 81(2) (2005) 201-208.
- [82] C.A. Suarez, G.L. Macpherson, L.A. González, 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* 74(10) (2010) 2970-2988.
- [83] D. Hare, C. Austin, P. Doble, M. Arora, Elemental bio-imaging of trace elements in teeth using laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry, *Journal of Dentistry* 39(5) (2011) 397-403.

- [84] R. Djingova, B. Zlateva, I. Kuleff, On the possibilities of inductively coupled plasma mass spectrometry for analysis of archaeological bones for reconstruction of paleodiet, *Talanta* 63(3) (2004) 785-789.
- [85] A.A. Leirner, V. Tattini, R.N.M. Pitombo, Prospects in Lyophilization of Bovine Pericardium, *Artificial Organs* 33(3) (2009) 221-229.
- [86] Z. Berk, Chapter 23 - Freeze drying (lyophilization) and freeze concentration, *Food Process Engineering and Technology* (Third Edition), Academic Press 2018, pp. 567-581.
- [87] M.Y. He, H. Lu, C.G. Luo, T.X. Ren, Determining trace metal elements in the tooth enamel from Hui and Han Ethnic groups in China using microwave digestion and inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS), *Microchem J.* 127 (2016) 142-144.
- [88] É.M.M. Flores, J.S. Barin, M.F. Mesko, G. Knapp, Sample preparation techniques based on combustion reactions in closed vessels — A brief overview and recent applications, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 62(9) (2007) 1051-1064.
- [89] A.E. Kaifer, *Fundamentals of Analytical Chemistry*. Sixth edition (Skoog, Douglas A.; West, Donald M.; Holler, James F.), *Journal of Chemical Education* 69(11) (1992) A305.
- [90] T.A. Hinnners, R. Hughes, P.M. Outridge, W.J. Davis, K. Simon, D.R. Woolard, Interlaboratory comparison of mass spectrometric methods for lead isotopes and trace elements in NIST SRM 1400 Bone Ash, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 13(9) (1998) 963-970.
- [91] M. Kim, C. Kim, 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* 20(2) (2003) 149-153.
- [92] C.A. Bizzi, M.F. Pedrotti, J.S. Silva, J.S. Barin, J.A. Nobrega, E.M.M. Flores, Microwave-assisted digestion methods: towards greener approaches for plasma-based analytical techniques, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 32(8) (2017) 1448-1466.
- [93] J.A. Nóbrega, M.C. Santos, R.A. de Sousa, S. Cadore, R.M. Barnes, M. Tatro, Sample preparation in alkaline media, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 61(5) (2006) 465-495.
- [94] M. Kowal-Linka, K.P. Jochum, D. Surmik, LA-ICP-MS analysis of rare earth elements in marine reptile bones from the Middle Triassic bonebed (Upper Silesia, S Poland): Impact of long-lasting diagenesis, and factors controlling the uptake, *Chemical Geology* 363 (2014) 213-228.
- [95] M. Kepa, T. Kozłowski, K. Szostek, A. Drozd, S. Walas, H. Mrowiec, B. Stepanczak, H. Głab, M. Grupa, Analysis of mercury levels in historical bone material from syphilitic subjects - pilot studies (short report), *Anthropologischer Anzeiger* 69(3) (2012) 367-377.
- [96] M.L. Carvalho, C. Casaca, J.P. Marques, T. Pinheiro, A.S. Cunha, Human teeth elemental profiles measured by synchrotron x-ray fluorescence: dietary habits and environmental influence, *X-Ray Spectrometry* 30(3) (2001) 190-193.
- [97] BERGHOF GMBH. Speedwave Xpert [online]. [vid. 2018-04-22]. Dostupné z: <http://www.berghof-instruments.com/en/products/digestion-technology/speedwave-microwave-digestion/microwave-digestion-speedwave-xpert/>.
- [98] L. Husáková, I. Urbanová, T. Sidova, T. Cahová, T. Faltys, J. Šrámková, Evaluation of ammonium fluoride for quantitative microwave-assisted extraction of silicon and boron from different solid samples, 95 (2015) 922-935.
- [99] M. Konečná, Diplomová práce, Univerzita Pardubice, 2011.
- [100] Bioon. LABOGENE Coolsafe Pro. [online]. [vid. 2018-04-22]. Dostupné z: [http://www.bioon.com.cn/product/show\\_product.asp?id=260941](http://www.bioon.com.cn/product/show_product.asp?id=260941).
- [101] RMI. Podvarová destilace v teflonu. [online]. [vid. 2018-04-22]. Dostupné z: <http://www.rmi.cz/podvarova-destilace-v-teflonu>.

- [102] Mikrolux d.o.o. Advantage technologies consulting. VEGA3 SB – EasyProbe [online]. [vid. 2018-04-22]. Dostupné z: <http://www.mikrolux.hr/index.php/proizvodi/tescan/vega/22-uncategorised/tescan/vega/18-vega3-sb-easyprobe>.
- [103] LabMakelaar Benelux B.V. Mastersizer 2000. EasyProbe [online]. [vid. 2018-05-9]. 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).
- [104] Malvern Panalytical. Mastersizer 2000. [online]. [vid. 2018-05-9]. Dostupné z: <https://www.malvernpanalytical.com/en/support/product-support/mastersizer-range/mastersizer-2000>.
- [105] Laboratorní návod Pokročilé instruentální analýzy: Termooxidační stanovení rtuti, Univerzita Pardubice (2002).
- [106] Inbox technology and services. AMA 254 [online]. [vid. 2018-05-9]. Dostupné z: <http://www.inboxsa.com/alimentos.html>.
- [107] GBC SCIENTIFIC EQUIPMENT. SensAA [online]. [vid. 2018-04-21]. Dostupné z: <http://www.gbcsoci.com/products/aas/sensaa/>.
- [108] <http://www.gbcsoci.com/brochures/01082901.pdf>.
- [109] GBC SCIENTIFIC EQUIPMENT. Integra XL [online]. [vid. 2018-04-21]. Dostupné z: <http://www.gbcsoci.com/products/icp-oes/integra-xl/>.
- [110] GBC SCIENTIFIC EQUIPMENT. OptiMass 9500 [online]. [vid. 2018-04-21]. Dostupné z: <http://www.gbcsoci.com/brochures/OptiMass9500Brochure.pdf>.
- [111] GBC SCIENTIFIC EQUIPMENT. OptiMass 9500 [online]. [vid. 2018-04-21]. Dostupné z: <http://www.gbcsoci.com/products/icp-tof-ms/optimass-9500/>.
- [112] L. Nováková, Optimalizace přípravy vzorku pro potřeby anorganické prvkové analýzy jater, kostí a tuku vyder říčních vybranými metodami atomové spektrometrie, Diplomová práce, Univerzita Pardubice, 2015.
- [113] M.H. Gonzalez, G.B. Souza, R.V. Oliveira, L.A. Forato, J.A. Nóbrega, A.R.A. Nogueira, Microwave-assisted digestion procedures for biological samples with diluted nitric acid: Identification of reaction products, *Talanta* 79(2) (2009) 396.
- [114] Encyklopedia-Britannica [online]. [vid. 2018-04-21]. Dostupné z: <http://www.britannica.com/EBchecked/topic/202365/fat/2235/Chemical-composition-of-fats>.
- [115] M. Meloun, J. Militký, Kompendium statistického zpracování dat, Karolinum, Praha, 2013.
- [116] M. Meloun, J. Militký, Interaktivní statistická analýza dat, N. Karolinum, Praha, 2012.
- [117] P.T. Anastas, L.G. Heine, T.C. Williamson, Green Chemical Syntheses and Processes, ACS Symposium Series 767(767) (2000) 374.
- [118] Větrovcová J., Poledníková K., Poledník L., Beran V., Hlavč V., Databáze údajů o uhynulých jedincích vydry říční v ČR, *Ochrana přírody* 4(4) (2011).



## 7 PŘÍLOHY

- Příloha 1 Seznam pomletých vzorků kostí vydry říční
- Příloha 2 Certifikát standardního referenčního materiálu 1486 Bone Meal
- Příloha 3 Výsledky stanovení koncentrací Ca, Na, P, Mg, K, V, Mn ve vzorcích kostí vydry říční
- Příloha 4 Výsledky stanovení koncentrací Co, Cu, Zn, Sr, Ba, Ce, Pb ve vzorcích kostí vydry říční

Příloha 1 Seznam pomletých vzorků kostí vydry říční

| č. vzorku | Lokalita              | Okres             | Kraj               | Datum nálezu | Pohlaví      | Příčina smrti     | Analýza |
|-----------|-----------------------|-------------------|--------------------|--------------|--------------|-------------------|---------|
| A05       | Novomlýnská nádrž     | Břeclav           | Jihomoravský       | 31.05.2009   | <sup>a</sup> | <sup>a</sup>      | NE      |
| A07       | Třebíč                | Třebíč            | Vysočina           | 03.04.2011   | <sup>a</sup> | <sup>a</sup>      | NE      |
| 25        | Kamenický Šenov       | Česká Lípa        | Liberecký          | 04.08.2006   | M            | srážka s vozidlem | NE      |
| 291       | Štěpánovice           | České Budějovice  | Jihočeský          | 25.02.2010   | F            | srážka s vozidlem | NE      |
| 294       | Nová Olešná           | Jindřichův Hradec | Jihočeský          | 18.06.2009   | M            | srážka s vozidlem | NE      |
| 305       | Hosov                 | Jihlava           | Vysočina           | 27.05.2010   | M            | srážka s vozidlem | NE      |
| 321       | Pondědrážka           | Jindřichův Hradec | Jihočeský          | 23.08.2010   | M            | srážka s vozidlem | ANO     |
| 341       | České Budějovice      | České Budějovice  | Jihočeský          | 28.10.2010   | M            | srážka s vozidlem | NE      |
| 343       | Davle                 | Praha - Západ     | Hlavní město Praha | 20.09.2008   | F            | <sup>a</sup>      | NE      |
| 351       | Štěpánovice           | České Budějovice  | Jihočeský          | 02.11.2010   | M            | srážka s vozidlem | NE      |
| 354       | Holičky u Staré Hlíny | Jindřichův Hradec | Jihočeský          | 21.02.2011   | M            | srážka s vozidlem | NE      |
| 355       | Veselí nad Lužnicí    | Tábor             | Jihočeský          | 24.02.2011   | M            | zástřel           | NE      |
| 358       | České Budějovice      | České Budějovice  | Jihočeský          | 18.05.2011   | M            | srážka s vozidlem | NE      |
| 360       | Křižanov              | Žďár nad Sázavou  | Vysočina           | 18.10.2008   | F            | opuštěné mládě    | NE      |
| 362       | Odry                  | Nový Jičín        | Severomoravský     | 06.05.2011   | F            | srážka s vozidlem | NE      |
| 364       | Třeboň                | Jindřichův Hradec | Jihočeský          | 08.06.2011   | M            | srážka s vozidlem | NE      |
| 366       | Kolín                 | Kolín             | Středočeský        | 20.11.2010   | M            | stáří             | ANO     |
| 367       | Jistebník             | Nový Jičín        | Severomoravský     | 26.10.2010   | M            | srážka s vozidlem | ANO     |
| 378       | Mladeč                | Olomouc           | Olomoucký          | 03.05.2011   | M            | srážka s vozidlem | NE      |
| 382       | Poteč                 | Zlín              | Zlínský            | 11.09.2011   | M            | srážka s vozidlem | NE      |
| 388       | Nový Rychnov          | Pelhřimov         | Vysočina           | 25.04.2011   | <sup>a</sup> | <sup>a</sup>      | NE      |
| 396       | Vikantice             | Šumperk           | Olomoucký          | 18.11.2011   | M            | srážka s vozidlem | NE      |
| 400       | Písek                 | Písek             | Jihočeský          | 21.10.2011   | M            | srážka s vozidlem | NE      |
| 406       | Dolní Datyně          | Karviná           | Severomoravský     | 24.01.2012   | M            | srážka s vozidlem | ANO     |
| 411       | Lukavice              | Chrudim           | Pardubický         | 19.02.2012   | <sup>a</sup> | otrava            | NE      |

## Příloha 1 Pokračování

| č. vzorku | Lokalita                   | Okres             | Kraj            | Datum nálezu | Pohlaví      | Příčina smrti     | Analýza |
|-----------|----------------------------|-------------------|-----------------|--------------|--------------|-------------------|---------|
| 416       | Rybniště                   | Děčín             | Ústecký         | 29.02.2012   | M            | kondice           | NE      |
| 417       | Břekova Lhota              | Příbram           | Středočeský     | 24.01.2012   | M            | kondice           | NE      |
| 420       | Višňová u Kardašovy Řečice | Jindřichův Hradec | Jihočeský       | 01.02.2012   | M            | kondice           | NE      |
| 421       | Třeboň                     | Jindřichův Hradec | Jihočeský       | 12.02.2012   | F            | <sup>a</sup>      | NE      |
| 422       | Otín                       | Jindřichův Hradec | Jihočeský       | 12.01.2012   | M            | srážka s vozidlem | NE      |
| 430       | Moravské Budějovice        | Třebíč            | Vysočina        | 04.04.2012   | F            | <sup>a</sup>      | NE      |
| 431       | Vratěnín                   | Znojmo            | Jihomoravský    | 31.03.2012   | F            | kondice           | NE      |
| 436       | Nová ves u Ostravy         | Ostrava - město   | Severomoravský  | <sup>a</sup> | M            | srážka s vozidlem | NE      |
| 440       | Újezd                      | Plzeň - město     | Plzeňský        | 17.04.2012   | <sup>a</sup> | zástřel           | NE      |
| 444       | Holohlavy                  | Hradec Králové    | Královehradecký | 30.07.2012   | M            | srážka s vozidlem | NE      |
| 445       | Nová Víska u Ostrova       | Karlovy Vary      | Karlovarský     | 13.08.2012   | <sup>a</sup> | <sup>a</sup>      | NE      |
| 446       | Ptáčov - Vladislav         | Třebíč            | Vysočina        | 19.09.2013   | M            | srážka s vozidlem | NE      |
| 447       | Mušov                      | Brno - venkov     | Jihomoravský    | 10.11.2012   | <sup>a</sup> | <sup>a</sup>      | NE      |
| 464       | Roudná nad Lužnicí         | Tábor             | Jihočeský       | 22.02.2013   | <sup>a</sup> | <sup>a</sup>      | NE      |
| 465       | Valtice                    | Břeclav           | Jihomoravský    | 09.02.2013   | M            | srážka s vozidlem | NE      |
| 466       | Štítov u Blovice           | Plzeň - jih       | Plzeňský        | 28.12.2012   | F            | srážka s vozidlem | NE      |
| 470       | Hořice u Humpolce          | Pelhřimov         | Vysočina        | 21.04.2013   | <sup>a</sup> | <sup>a</sup>      | ANO     |
| 477       | Dolní Radíkov              | Jindřichův Hradec | Jihočeský       | 18.04.2013   | F            | <sup>a</sup>      | NE      |
| 478       | Šabina                     | Sokolov           | Karlovarský     | 28.02.2013   | M            | srážka s vozidlem | ANO     |
| 481       | Litvínovice                | České Budějovice  | Jihočeský       | 12.10.2013   | M            | <sup>a</sup>      | ANO     |
| 482       | Rytířsko                   | Jihlava           | Vysočina        | <sup>a</sup> | M            | srážka s vozidlem | ANO     |
| 487       | Hůry                       | České Budějovice  | Jihočeský       | 04.11.2013   | <sup>a</sup> | <sup>a</sup>      | ANO     |
| 489       | Přerov                     | Přerov            | Olomoucký       | 04.12.2013   | <sup>a</sup> | <sup>a</sup>      | ANO     |
| 497       | Dolní Bečva                | Vsetín            | Zlínský         | 08.10.2013   | <sup>a</sup> | <sup>a</sup>      | ANO     |
| 498       | Frýdland nad Ostravicí     | Frýdek Místek     | Severomoravský  | 11.09.2013   | <sup>a</sup> | <sup>a</sup>      | ANO     |

| č. vzorku | Lokalita              | Okres               | Kraj            | Datum nálezu | Pohlaví | Příčina smrti | Analýza |
|-----------|-----------------------|---------------------|-----------------|--------------|---------|---------------|---------|
| 500       | Bítov u Bílovce       | Nový Jičín          | Severomoravský  | 02.03.2013   | a       | a             | NE      |
| 509       | Beroun                | Beroun              | Středočeský     | 13.12.2013   | a       | a             | ANO     |
| 520       | Lipno nad Vltavou     | Český Krumlov       | Jihočeský       | 03.04.2014   | a       | a             | NE      |
| 523       | Holičky u Staré Hlíny | Jindřichův Hradec   | Jihočeský       | 11.02.2014   | a       | a             | ANO     |
| 525       | Přeštice              | Plzeň - jih         | Plzeňský        | a            | a       | a             | ANO     |
| 526       | Přímětice             | Znojmo              | Jihomoravský    | 28.01.2013   | a       | a             | ANO     |
| 528       | Charvátská Nová Ves   | Břeclav             | Jihomoravský    | 02.08.2014   | a       | a             | ANO     |
| 541       | Domanín u Třeboně     | Jindřichův Hradec   | Jihočeský       | 02.06.2014   | a       | a             | NE      |
| 542       | Cep                   | Jindřichův Hradec   | Jihočeský       | 26.06.2014   | a       | a             | ANO     |
| 543       | Soběslav              | Tábor               | Jihočeský       | 17.05.2014   | a       | a             | NE      |
| 550       | Vodňany               | Strakonice          | Jihočeský       | 26.08.2014   | a       | a             | NE      |
| 554       | Opavské Předměstí     | Krnov               | Moravskoslezský | 16.08.2014   | a       | a             | NE      |
| 557       | Lhota u Dynína        | Jindřichův Hradec   | Jihočeský       | 12.02.2015   | a       | a             | NE      |
| 559       | Bukovice u Jeseníka   | Jeseník             | Olomoucký       | 24.02.2015   | a       | a             | ANO     |
| 563       | NP Šumava             | NP Šumava           | Jihočeský       | a            | a       | a             | NE      |
| 564       | NP Šumava             | NP Šumava           | Jihočeský       | a            | a       | a             | NE      |
| 570       | Branná                | Jindřichův Hradec   | Jihočeský       | 27.11.2014   | a       | a             | NE      |
| 572       | Lomnice nad Lužnicí   | Jindřichův Hradec   | Jihočeský       | 27.03.2015   | a       | a             | NE      |
| 577       | Mušov                 | Brno - venkov       | Jihomoravský    | 17.04.2015   | a       | a             | ANO     |
| 597       | Petrovice u Třebíče   | Třebíč              | Vysočina        | 20.10.2015   | a       | a             | NE      |
| 604       | Borohrádek            | Rychnov nad Kněžnou | Královehradecký | 22.05.2015   | a       | a             | ANO     |
| 605       | Horusice              | Jindřichův Hradec   | Jihočeský       | 30.10.2015   | a       | a             | NE      |
| 610       | Rodvínov              | Jindřichův Hradec   | Jihočeský       | 19.11.2015   | a       | a             | ANO     |

Celkem vzorků: 73, zanalyzováno: 22

<sup>a</sup> neuveden



# National Institute of Standards & Technology

## Certificate of Analysis

### Standard Reference Material<sup>®</sup> 1486

#### Bone Meal

This Standard Reference Material (SRM) is intended primarily for use in evaluating analytical methods used for the determination of selected major, minor, and trace elements in bone and in material of a similar matrix. It consists of steamed bone meal that was sieved and blended to a high degree of homogeneity. A unit of SRM 1486 consists of approximately 50 g of bone meal.

**Certified Mass Fraction Values:** Certified mass fraction values for constituent elements on a dry-mass basis, are provided in Table 1. A NIST certified value is a value for which NIST has the highest confidence in its accuracy in that all known or suspected sources of bias have been investigated or taken into account [1]. The measurands are the total concentrations of the elements reported in Table 1. Metrological traceability is to the SI unit of mass expressed as derived unit of mass fraction.

**Reference Mass Fraction Value:** A reference mass fraction value for mercury is provided in Table 2. Reference values are non-certified values that are the best estimate of the true value; however, the values do not meet NIST criteria for certification and are provided with associated uncertainties that may reflect only measurement precision, may not include all sources of uncertainty, or may reflect a lack of sufficient statistical agreement among multiple analytical methods [1]. The measurand is the concentration of mercury, as determined by the methods indicated in the text. Metrological traceability is to the SI unit of mass expressed as derived unit of mass fraction.

**Information Values:** Information values for additional constituents are provided in Table 3. An information value is considered to be a value that will be of interest and use to the SRM user, but for which insufficient information is available to assess adequately the uncertainty associated with the value, or only a limited number of analyses were performed [1]. Information values cannot be used to establish metrological traceability.

**Expiration of Certification:** The certification of **SRM 1486** is valid, within the measurement uncertainty specified, until **01 October 2025**, provided the SRM is handled and stored in accordance with the instructions given in this certificate (see "Instructions for Storage and Use"). The certification is nullified if the SRM is damaged, contaminated or otherwise modified.

**Maintenance of SRM Certification:** NIST will monitor this SRM over the period of its certification. If substantive technical changes occur that affect the certification before the expiration of this certificate, NIST will notify the purchaser. Registration (see attached sheet or register online) will facilitate notification.

Coordination of the technical measurements leading to the certification of SRM 1486 were provided by S.E. Long of the NIST Chemical Sciences Division and W.F. Koch formerly of the NIST Inorganic Analytical Research Division.

Analytical measurements at NIST were made by C.E. Bryan, B.L. Catron, S.E. Long, T.W. Vetter, R.D. Vocke, and L.J. Wood of the NIST Chemical Sciences Division, and by D.S. Braverman, R. Demilrap, J.D. Fassett, K.M. Garrity, R.R. Greenberg, J.R. Moody, P.J. Paulsen, P.A. Pella, T.A. Rush, J.M. Smeller, and S.F. Stone formerly of NIST.

Carlos A. Gonzalez, Chief  
Chemical Sciences Division

Gaithersburg, MD 20899  
Certificate Issue Date: 17 February 2017  
*Certificate Revision History on Last Page*

Steven J. Choquette, Director  
Office of Reference Materials

## Příloha 2 Pokračování

Statistical consultation was provided by S.B. Schiller, L.M. Oakley, and J.H. Yen of the NIST Statistical Engineering Division.

Additional collaborating laboratory measurements were made by A.R. Byrne (Josef Stefan Institute, Ljubljana, Slovenia); N. Miller-Ihli (Nutrient Composition Laboratory, U.S. Department of Agriculture, Beltsville, MD); J.B. Bodkin (College of Earth and Mineral Sciences, Mineral Characterization Laboratory, The Pennsylvania State University, University Park, PA); and B. Dainowski (University of Alaska Fairbanks, Fairbanks, AK).

Support aspects involved in the issuance of this SRM were coordinated through the NIST Office of Reference Materials.

### INSTRUCTIONS FOR STORAGE AND USE

**Storage:** SRM 1486 must be stored in its original bottle, tightly capped and away from sunlight or ultraviolet radiation.

**Use:** Prior to use, the contents of the bottle should be thoroughly mixed by gently rotating the bottle by hand and inverting several times. The mass fractions of constituents in SRM 1486 are reported on a dry-mass basis. A separate sub-sample should be removed from the bottle at the time of analysis and dried (see "Instructions for Drying") to determine a moisture correction factor. Correction for moisture is to be made to the data before comparison with the certified values.

**Instructions for Drying:** Samples should be dried under vacuum for 24 h, or for 2 h at 105 °C in a conventional drying oven to obtain a correction factor for moisture. The mass loss determined at NIST using this method was approximately 2.4 %. The mass loss determined by the user may be different, depending on ambient conditions when the bottle is sampled.

### SOURCE, PREPARATION AND ANALYSIS<sup>(1)</sup>

**Source and Preparation of Material:** The material for SRM 1486 was obtained from the Espoma Company (Millville, NJ). The entire material lot was sieved through a nominal 355 µm sieve (45 mesh), blended in a cone blender, and radiation sterilized.

**Homogeneity:** Samples from randomly selected bottles of SRM 1486 were tested for homogeneity using X-ray fluorescence spectrometry. No evidence of material heterogeneity was observed in any of the elements measured, which included strontium, zinc, copper, iron, phosphorus, calcium and potassium.

**Certification Analyses:** The certified mass fraction values are the weighted means of method results from a primary analytical method, or the weighted means of results from at least two independent analytical methods or laboratories. The uncertainty of the certified values is a two-sided 95 % confidence interval for the mean (coverage factor  $k = 2$ ).

The reference mass fraction value for mercury is the mean of results from a single primary method [2,3]. The uncertainty provided is an expanded uncertainty about the mean to cover the measurand with approximately 95 % confidence, consistent with the ISO/JCGM Guide [4]. The expanded uncertainty is calculated as  $U = ku_c$ , where  $u_c$  is the combined uncertainty and  $k$  is the coverage factor ( $k = 2.36$ ) corresponding to approximately 95 % confidence.

Elements other than those certified are present in this material. Those that were determined, but not certified, are provided as additional information values on the composition.

---

<sup>(1)</sup> Certain commercial equipment, instruments, or materials are identified in this certificate to adequately specify the experimental procedure. Such identification does not imply recommendation or endorsement by the National Institute of Standards and Technology, nor does it imply that the materials or equipment identified are necessarily the best available for the purpose.

Příloha 2 Pokračování

Table 1. Certified Mass Fraction Values (Dry-Mass Basis) for SRM 1486

| Constituent Element           | Mass Fraction (%) | Constituent Element           | Mass Fraction (mg/kg) |
|-------------------------------|-------------------|-------------------------------|-----------------------|
| Calcium (Ca) <sup>a,b,c</sup> | 26.58 ± 0.24      | Iron (Fe) <sup>d,e</sup>      | 99 ± 8                |
| Magnesium (Mg) <sup>b,f</sup> | 0.466 ± 0.017     | Lead (Pb) <sup>e</sup>        | 1.335 ± 0.014         |
| Phosphorus (P) <sup>a,d</sup> | 12.30 ± 0.19      | Potassium (K) <sup>e,g</sup>  | 412 ± 4               |
|                               |                   | Strontium (Sr) <sup>e,g</sup> | 264 ± 7               |
|                               |                   | Zinc (Zn) <sup>d,e</sup>      | 147 ± 16              |

(a) Gravimetry

(b) Instrumental neutron activation analysis (INAA)

(c) Titrimetry

(d) Inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES)

(e) Isotope dilution thermal ionization mass spectrometry (ID TIMS)

(f) Isotope dilution inductively coupled plasma mass spectrometry (ID ICPMS) (g) Flame atomic emission spectrometry (FAES)

Table 2. Reference Mass Fraction Value (Dry-Mass Basis) for SRM 1486

| Constituent Element | Mass Fraction (mg/kg) |
|---------------------|-----------------------|
|---------------------|-----------------------|

|                           |                 |
|---------------------------|-----------------|
| Mercury (Hg) <sup>a</sup> | 0.0023 ± 0.0014 |
|---------------------------|-----------------|

(a) Isotope dilution cold vapor inductively coupled plasma mass spectrometry (ID CVICPMS) [2,3]

Table 3. Information Values (Dry-Mass Basis) for SRM 1486

| Constituent Element         | Mass Fraction (%) | Constituent Element | Mass Fraction (mg/kg) |
|-----------------------------|-------------------|---------------------|-----------------------|
| Carbon, Total (C)           | 18.6              | Aluminum (Al)       | <1                    |
| Silicon (Si)                | <0.02             | Arsenic (As)        | 0.006                 |
| Sodium (Na)                 | 0.5               | Cadmium (Cd)        | 0.003                 |
|                             |                   | Copper (Cu)         | 0.8                   |
| Loss on Ignition at 1000 °C | 31.5              | Fluorine (F)        | 800                   |
|                             |                   | Manganese (Mn)      | 1                     |
|                             |                   | Selenium (Se)       | 0.13                  |

REFERENCES

- [1] May, W.; Parris, R.; Beck, C.; Fassett, J.; Greenberg, R.; Guenther, F.; Kramer, G.; Wise, S.; Gills, T.; Colbert, J.; Gettings, R.; MacDonald, B.; *Definitions of Terms and Modes Used at NIST for Value-Assignment of Reference Materials for Chemical Measurements*; NIST Special Publication 260-136 (2000); available at <http://www.nist.gov/srm/upload/SP260-136.pdf> (accessed Feb 2017).
- [2] Christopher, S.J.; Long, S.E.; Rearick, M.S.; Fassett, J.D.; *Development of Isotope Dilution Cold Vapor Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry and Its Application to the Certification of Mercury in NIST Standard Reference Materials*; *Anal. Chem.*, Vol. 73, pp. 2190–2199 (2001).
- [3] Long, S.E.; Kelly, W.R.; *Determination of Mercury in Coal by Isotope Dilution Cold-Vapor Generation Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*; *Anal. Chem.*, Vol. 74, pp. 1477–1483 (2002).
- [4] JCGM 100:2008; *Evaluation of Measurement Data - Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement*; (GUM 1995 with Minor Corrections), Joint Committee for Guides in Metrology (JCGM) (2008); available at [http://www.bipm.org/utis/common/documents/jcgm/JCGM\\_100\\_2008\\_E.pdf](http://www.bipm.org/utis/common/documents/jcgm/JCGM_100_2008_E.pdf) (accessed Feb 2017); see also Taylor, B.N.; Kuyatt, C.E.; *Guidelines for Evaluating and Expressing the Uncertainty of NIST Measurement Results*; NIST Technical Note 1297, U.S. Government Printing Office: Washington, DC (1994); available at <http://www.nist.gov/pml/pubs/index.cfm> (accessed Feb 2017).

|  |
|--|
| <b>Certificate Revision History:</b> 17 February 2017 (Change of expiration date, addition of a reference value for mercury, editorial changes); 18 December 1992 (Original certificate issue date). |
|--|



Príloha 3 Výsledky stanovení koncentrací Ca, Na, P, Mg, K, V, Mn ve vzorcích kostí vydry říční [mg kg<sup>-1</sup>]<sup>a</sup>

| Vzorek | Ca             | Na          | P              | Mg         | K          | V             | Mn          |
|--------|----------------|-------------|----------------|------------|------------|---------------|-------------|
| 321    | 168621 ± 24592 | 8381 ± 251  | 102131 ± 26522 | 3188 ± 154 | 2506 ± 38  | 0,289 ± 0,049 | 2,04 ± 0,76 |
| 366    | 223551 ± 5128  | 7720 ± 867  | 101913 ± 5872  | 3855 ± 40  | 2527 ± 203 | 0,267 ± 0,029 | 2,15 ± 0,48 |
| 367    | 205228 ± 2046  | 7482 ± 567  | 104613 ± 2238  | 3797 ± 626 | 2619 ± 590 | 0,613 ± 0,050 | 4,67 ± 1,60 |
| 406    | 200289 ± 24369 | 8357 ± 765  | 90028 ± 12842  | 3694 ± 631 | 2333 ± 194 | 0,255 ± 0,031 | 1,98 ± 0,30 |
| 470    | 211934 ± 4571  | 7683 ± 77   | 102939 ± 1846  | 3527 ± 26  | 2578 ± 42  | 0,496 ± 0,143 | 2,23 ± 0,49 |
| 478    | 216016 ± 11365 | 7834 ± 470  | 105109 ± 618   | 3138 ± 315 | 2741 ± 190 | 0,287 ± 0,040 | 2,48 ± 0,20 |
| 481    | 214467 ± 3749  | 8427 ± 168  | 104714 ± 604   | 3418 ± 167 | 2070 ± 177 | 0,326 ± 0,092 | 1,44 ± 0,27 |
| 482    | 197394 ± 8597  | 7514 ± 334  | 98697 ± 4988   | 3765 ± 318 | 3122 ± 199 | 0,348 ± 0,022 | 3,20 ± 0,72 |
| 487    | 205400 ± 4691  | 7337 ± 447  | 104112 ± 670   | 4153 ± 156 | 2364 ± 279 | 0,288 ± 0,089 | 2,04 ± 0,69 |
| 489    | 198700 ± 2221  | 7310 ± 211  | 100462 ± 4065  | 3659 ± 81  | 2840 ± 237 | 0,390 ± 0,054 | 1,68 ± 0,21 |
| 497    | 222923 ± 10406 | 6396 ± 649  | 108223 ± 3422  | 3942 ± 494 | 2470 ± 70  | 0,132 ± 0,039 | 1,48 ± 0,12 |
| 498    | 201978 ± 5062  | 6942 ± 322  | 98966 ± 4670   | 3978 ± 167 | 2693 ± 219 | 0,427 ± 0,066 | 1,79 ± 0,25 |
| 509    | 186111 ± 33106 | 6949 ± 1491 | 90493 ± 20148  | 3286 ± 159 | 2326 ± 153 | 0,334 ± 0,044 | 2,18 ± 0,34 |
| 523    | 204169 ± 11331 | 6367 ± 1204 | 100023 ± 6465  | 3286 ± 115 | 2077 ± 185 | 0,407 ± 0,047 | 2,26 ± 0,15 |
| 525    | 210054 ± 1592  | 7659 ± 387  | 105233 ± 5024  | 3428 ± 131 | 1935 ± 185 | 0,401 ± 0,095 | 1,44 ± 0,30 |
| 526    | 205597 ± 9932  | 6439 ± 738  | 96238 ± 3684   | 3319 ± 126 | 2321 ± 148 | 0,285 ± 0,051 | 1,35 ± 0,44 |
| 528    | 216619 ± 7551  | 5781 ± 481  | 107234 ± 1738  | 3332 ± 172 | 3086 ± 111 | 0,208 ± 0,036 | 0,87 ± 0,18 |
| 542    | 202275 ± 11163 | 8191 ± 442  | 105529 ± 4537  | 3832 ± 95  | 2883 ± 186 | 0,329 ± 0,035 | 3,91 ± 0,40 |
| 559    | 194472 ± 1932  | 7428 ± 311  | 100573 ± 3708  | 4132 ± 103 | 2378 ± 144 | 0,352 ± 0,085 | 2,99 ± 0,68 |
| 577    | 215868 ± 4472  | 6484 ± 605  | 98328 ± 1918   | 3143 ± 191 | 3099 ± 261 | 0,252 ± 0,042 | 2,18 ± 0,06 |
| 604    | 208611 ± 1233  | 4908 ± 57   | 103838 ± 4174  | 3759 ± 237 | 2491 ± 336 | 0,294 ± 0,041 | 0,95 ± 0,21 |
| 610    | 222258 ± 3230  | 6313 ± 397  | 102138 ± 4330  | 3874 ± 231 | 2279 ± 40  | 0,289 ± 0,047 | 1,24 ± 0,28 |

Příloha 4 Výsledky stanovení koncentrací Co, Cu, Zn, Sr, Ba, Ce, Pb ve vzorcích kostí vydry říční [mg kg<sup>-1</sup>]<sup>a</sup>

| Vzorek | Co          | Cu            | Zn          | Sr          | Ba           | Ce            | Pb            |
|--------|-------------|---------------|-------------|-------------|--------------|---------------|---------------|
| 321    | 3,45 ± 0,38 | 0,91 ± 0,12   | 96,0 ± 1,4  | 39,3 ± 5,5  | 1,46 ± 0,20  | 0,101 ± 0,019 | 0,55 ± 0,09   |
| 366    | 5,52 ± 0,08 | 0,98 ± 0,15   | 113 ± 5     | 46,3 ± 17,6 | 10,11 ± 0,51 | 0,047 ± 0,007 | 0,55 ± 0,04   |
| 367    | 5,74 ± 0,41 | 2,42 ± 0,51   | 117 ± 2     | 54,8 ± 0,6  | 8,08 ± 1,76  | 0,032 ± 0,006 | 0,48 ± 0,08   |
| 406    | 4,79 ± 0,49 | 1,01 ± 0,19   | 104 ± 13    | 44,6 ± 9,2  | 7,2 ± 1,3    | 0,052 ± 0,008 | 0,78 ± 0,08   |
| 470    | 5,10 ± 0,25 | 1,55 ± 0,50   | 105 ± 7     | 54,5 ± 2,1  | 7,49 ± 0,72  | 0,064 ± 0,015 | 0,74 ± 0,03   |
| 478    | 5,25 ± 0,18 | 1,09 ± 0,39   | 110 ± 8     | 52,2 ± 0,9  | 6,21 ± 0,58  | 0,036 ± 0,002 | 1,12 ± 0,01   |
| 481    | 5,94 ± 0,20 | 0,75 ± 0,21   | 100,0 ± 2,4 | 46,5 ± 1,5  | 8,38 ± 0,48  | 0,043 ± 0,004 | 0,49 ± 0,07   |
| 482    | 5,34 ± 0,27 | 1,23 ± 0,34   | 112 ± 24    | 48,5 ± 1,5  | 8,36 ± 0,90  | 0,053 ± 0,009 | 5,30 ± 0,39   |
| 487    | 4,88 ± 0,27 | 0,64 ± 0,11   | 89 ± 7      | 33,7 ± 0,1  | 7,27 ± 0,24  | 0,054 ± 0,004 | 0,275 ± 0,002 |
| 489    | 4,87 ± 0,18 | 0,81 ± 0,11   | 115 ± 15    | 51,7 ± 0,4  | 9,36 ± 1,02  | 0,075 ± 0,013 | 1,31 ± 0,19   |
| 497    | 3,43 ± 0,19 | 0,36 ± 0,05   | 99 ± 19     | 49,9 ± 0,5  | 15,7 ± 0,32  | 0,034 ± 0,003 | 3,45 ± 0,08   |
| 498    | 4,81 ± 0,02 | 0,83 ± 0,21   | 108 ± 13    | 53,8 ± 1,1  | 8,9 ± 0,58   | 0,071 ± 0,013 | 0,62 ± 0,02   |
| 509    | 3,93 ± 0,17 | 0,61 ± 0,06   | 87 ± 5      | 35,8 ± 2,6  | 11,4 ± 0,75  | 0,062 ± 0,018 | 2,42 ± 0,62   |
| 523    | 4,79 ± 0,23 | 1,28 ± 0,38   | 104 ± 13    | 31,6 ± 0,8  | 8,27 ± 0,43  | 0,069 ± 0,001 | 0,76 ± 0,19   |
| 525    | 6,22 ± 0,03 | 1,177 ± 0,039 | 143 ± 15    | 13,9 ± 0,4  | 12,7 ± 1,02  | 0,041 ± 0,006 | 1,95 ± 0,09   |
| 526    | 4,01 ± 0,44 | 0,97 ± 0,28   | 92 ± 14     | 41,6 ± 0,9  | 6,3 ± 0,47   | 0,114 ± 0,008 | 0,38 ± 0,04   |
| 528    | 2,54 ± 0,59 | 0,326 ± 0,046 | 156,0 ± 0,4 | 52,9 ± 13,7 | 3,07 ± 0,78  | 0,04 ± 0,009  | 0,14 ± 0,05   |
| 542    | 5,98 ± 0,38 | 1,45 ± 0,46   | 134 ± 3     | 54,7 ± 3,4  | 10,5 ± 1,84  | 0,047 ± 0,006 | 0,65 ± 0,11   |
| 559    | 4,65 ± 0,34 | 2,43 ± 0,62   | 123 ± 32    | 26,8 ± 0,2  | 5,64 ± 0,38  | 0,07 ± 0,01   | 1,23 ± 0,06   |
| 577    | 4,66 ± 0,09 | 0,99 ± 0,17   | 109 ± 3     | 30,6 ± 8,8  | 4,56 ± 0,45  | 0,063 ± 0,009 | 0,38 ± 0,05   |
| 604    | 3,63 ± 0,69 | 0,162 ± 0,049 | 93 ± 10     | 30,8 ± 0,6  | 4,90 ± 0,39  | 0,026 ± 0,001 | 0,42 ± 0,01   |
| 610    | 4,29 ± 0,66 | 0,77 ± 0,10   | 104 ± 13    | 43,7 ± 6,1  | 8,97 ± 0,43  | 0,058 ± 0,004 | 0,49 ± 0,04   |

<sup>a</sup> výsledky jsou uvedeny ve formě: střední hodnota ± 2 SD