

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ
ÚSTAV ENVIROMENTÁLNÍHO A CHEMICKÉHO INŽENÝRSTVÍ

**oaTOF-ICP-MS analýza vzorků
životního prostředí**

AUTOR PRÁCE: Ing. Jakub Návesník

ŠKOLITEL: doc. Ing. Tomáš Černožorský CSc.

2018

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury. Byl jsem seznámen 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 12.7.2018

Jakub Návesník

Na tomto místě bych rád poděkoval vedoucímu disertační práce doc. Ing. Tomáši Černohorskému, CSc. za odborné vedení, věnovaný čas, ochotu a pomoc při vypracování zadané práce. Dále bych rád poděkoval pracovníkům Institutu environmentálního a chemického inženýrství, kteří se buď přímo, nebo nepřímo podíleli na vzniku této práce. Velký dík patří mé rodině a blízkým, kteří mě po celou dlouhou dobu podporovali.

ANOTACE

Práce se zabývá problematikou analýzy environmentálních vzorků s využitím metody hmotnostní spektrometrie s ionizací v indukčně vázaném plazmatu. Byl použit hmotnostní spektrometr s průletovým analyzátozem a orthogonálním urychlováním iontů. Toto řešení nabízí některé unikátní parametry jako je extrémní rychlost analýzy, simultánní záznam plných hmotnostních spekter nebo zvýšená přesnost měření izotopických poměrů přes celé hmotnostní spektrum. Tyto vlastnosti je pak možné využít například pro rychlou analýzu velkého počtu vzorků, pro multiprvkovou analýzu vzorků o velmi malém objemu, nebo pro statistické analýzy větších souborů vzorků, kde se využívá komplexní izotopická informace.

Vypracované metody oaTOF-ICP-MS byly použity pro analýzu koňských žíní, různě pěstovaných mrkví a rovněž byla vyvinuta nová jednoduchá metodika pro analýzu vzorků o malém objemu.

KLÍČOVÁ SLOVA

oaTOF-ICP-MS, multiprvková analýza, environmentální vzorky, izotopová analýza, statistické zpracování dat, koňské žíně, mrkev, analýza malých vzorků.

TITLE

oaTOF-ICP-MS analysis of environmental samples

ANNOTATION

This work deals with an analysis of environmental samples by mass spectrometry using the ionization in inductively coupled plasma. Mass spectrometer with orthogonal acceleration of ions and time-of-flight analyzer was used. This spectrometer offers some unique parameters such as an ultimate fastness of the analysis, simultaneous record of full mass spectra or increased precision in measuring of isotopic ratios across whole mass spectrum. These features can be used for fast analysis of high number of samples, for multielemental analysis of low volume samples or for statistical treatment of large data sets using fully isotopic information.

Elaborated methods of oaTOF-ICP-MS were used for analysis of horse hair, differently grown carrots and new simple method for the analysis of low volume samples was developed as well.

KEYWORDS

oaTOF-ICP-MS, multielemental analysis, environmental samples, isotopic ratios determination, statistical data treatment, horse hair, carrot, low volume samples.

OBSAH

ÚVOD.....	13
1 TEORETICKÁ ČÁST.....	14
1.1 Anorganická hmotnostní spektrometrie.....	14
1.1.1 Iontové zdroje v anorganické hmotnostní spektrometrii	15
1.1.2 Hmotnostní analyzátory využívající ICP iontového zdroje.....	22
1.2 Aplikace TOF-ICP-MS pro analýzu environmentálních vzorků....	35
1.2.1 TOF-ICP-MS analýza transientních signálů	36
1.2.2 TOF-ICP-MS analýza izotopových poměrů.....	37
1.2.3 Další využití TOF-ICP-MS	38
2 CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE:	39
3 APLIKACE oaTOF-ICP-MS	41
3.1 Multielementární analýza koňských žíní.....	41
3.1.1 Úvod	41
3.1.2 Experimentální část	43
3.1.3 Výsledky a diskuze.....	56
3.1.4 Závěr.....	63
3.2 Prvková analýza různým způsobem pěstovaných mrkví.....	64
3.2.1 Úvod	64
3.2.2 Experimentální část	65
3.2.3 Výsledky a diskuze.....	73
3.2.4 Závěr.....	83
3.3 Analýza malých vzorků s využitím oaTOF-ICP-MS	86
3.3.1 Úvod	86
3.3.2 Experimentální část	100
3.3.3 Výsledky a diskuze.....	105
3.3.4 Závěr.....	126
4 ZÁVĚR.....	128
5 POUŽITÁ LITERATURA.....	132

SEZNAM OBRÁZKŮ

- Obrázek 1.:** Základní schéma hmotnostního spektrometru
- Obrázek 2.:** Schéma jiskrového iontového zdroje
- Obrázek 3.:** Princip ionizace SIMS a SNMS
- Obrázek 4.:** Ionizační proces LIMS + RIMS (a), proces LA-ICP-MS (b)
- Obrázek 5.:** Ionizace doutnavým výbojem
- Obrázek 6.:** ICP iontový zdroj
- Obrázek 7.:** Teplotní profil ICP
- Obrázek 8.:** Schematický diagram ICP-QMS
- Obrázek 9.:** Příklad konstrukce SFMS spektrometru (převrácená Nier-Johnson geometrie)
- Obrázek 10.:** Princip jednoduchého lineárního TOF přístroje
- Obrázek 11.:** Časo-prostorová trajektorie iontů v lineárním TOF-MS
- Obrázek 12a.:** Schematické uspořádání TOF-MS s reflektorem
- Obrázek 12b.:** Časo-prostorový diagram trajektorie iontů v TOF-MS s reflektorem
- Obrázek 13.:** Schematický diagram oaTOF-MS zařízení
- Obrázek 14.:** Schéma oaTOF-ICP-MS, Optimass 8000 (GBC Scientific Equipment)
- Obrázek 15.:** Mikrovlnný mineralizátor Speedwave MWS-2 (Berghof, Německo)
- Obrázek 16.:** oaTOF-ICP-MS, Optimass 8000 (GBC Scientific Equipment)
- Obrázek 17.:** Průtoková injekční analýza FIA (MLE, Drážďany, Německo)
- Obrázek 18.:** Termooxidační analyzátor rtuti AMA 254 (Altec, Praha, ČR)
- Obrázek 19.:** Optický emisní spektrometr Integra XL 2 (GBC, Dandenong, Austrálie)
- Obrázek 20a.:** Výsledky metody hlavních komponent: graf váhy komponent pro jednotlivé testované parametry
- Obrázek 20b.:** Výsledky metody hlavních komponent: projekce případů do faktorové roviny pro konvenční a organické vzorky
- Obrázek 21.:** Systémy kontinuálního vnášení kapalného vzorku do ICP
- Obrázek 22.:** Schéma pneumatického-koncentrického zmlžovače
- Obrázek 23.:** Schéma pneumatického zmlžovače, cross-flow uspořádání
- Obrázek 24.:** Schéma Oscilačního kapilárního zmlžovače
- Obrázek 25.:** Single-pass mlžná komora
- Obrázek 26.:** Schéma double-pass mlžné komory Scottova typu
- Obrázek 27.:** Cyklonická mlžná komora A – princip proudění aerosolu, B – pohled z boku
- Obrázek 28.:** Mikrokoncentrický zmlžovač a detail přecházející polyamidové kapiláry

Obrázek 29.: Multi micro-spray zmlžovač

Obrázek 30.: Schéma vysoce-účinného cross-flow mikrozmžovače (HECFMN)

Obrázek 31.: Miniaturizovaná cyklonická mlžná komora „cinnabar“ (V = 20 ml)

Obrázek 32.: Schéma systému s desolvatační jednotkou AridusTM

Obrázek 33.: Schéma zapojení DIHEN

Obrázek 34.: Systém TISIS

Obrázek 35.: Analytická sestava s upraveným dávkovacím systémem pro malé biologické vzorky

Obrázek 36.: Lineární pumpa - NE-1002X

Obrázek 37.: Konkrétní adjustace pumpy v laboratoři

SEZNAM TABULEK

- Tabulka 1.:** Optimalizovaný prací postup žíní
- Tabulka 2.:** Rozkladný program mikrovlnné mineralizace žíní
- Tabulka 3.:** Koncentrace kalibračních standardů v $\mu\text{g.L}^{-1}$
- Tabulka 4.:** Přehled vzorkovaných koní
- Tabulka 5.:** Optimalizace pracího postupu
- Tabulka 6.:** Pracovní podmínky oaTOF-ICP-MS
- Tabulka 7.:** Vybrané pracovní izotopy
- Tabulka 8.:** Validace metody (srovnání výsledků analýzy NCS ZC 8100)
- Tabulka 9.:** Detekční limity techniky a metody
- Tabulka 10.:** Mineralizační program – mrkev
- Tabulka 11.:** Vybrané emisní čáry ICP-OES
- Tabulka 12.:** Vybrané izotopy pro analýzu mrkví oaTOF-ICP-MS
- Tabulka 13.:** Hodnocení použitých technik a metod
- Tabulka 14.:** Souhrnné výsledky analýz a srovnání s legislativou (sušina %, ostatní mg.kg^{-1})
- Tabulka 15.:** Statistické zhodnocení rozdílností ve složení mrkví v závislosti na použitý pěstební systém s využitím neparametrické Kruskal-Wallis analýzy variance
- Tabulka 16.:** Optimalizované podmínky oaTOF-ICP-MS spektrometru
- Tabulka 17.:** Úrovně koncentrací jednotlivých kalibračních řad (vše v $\mu\text{g.L}^{-1}$) pro testování zapojení lineární pumpy s oaTOF-ICP-MS
- Tabulka 18.:** Charakteristiky kontinuálního dávkování pomocí lineární pumpy (izotop U^{238})
- Tabulka 19.:** Detekční limity a návratnosti na roztokové standardy pro klasické uspořádání a uspořádání s lineární pumpou v diskrétním módu ($50 \mu\text{L}$ vzorku, $800 \mu\text{L.min}^{-1}$)
- Tabulka 20.:** Validační data pro vybrané prvky - EnviroMAT – pitná voda (EP-L-2)
- Tabulka 21.:** Validační data pro vybrané prvky - GBW07601 - lidské vlasy
- Tabulka 22.:** Validační data pro vybrané prvky - IAEA-413 – řasy

SEZNAM GRAFŮ

- Graf 1.:** Rozsahy koncentrací (logaritmické měřítko) všech analyzovaných prvků ve 100 vzorcích koňských žíní
- Graf 2.:** Závislost doby ustálení signálu na rychlosti průtoku ($1\mu\text{g.L}^{-1}$, U^{238})
- Graf 3.:** Závislost objemu spotřebovaného vzorku na rychlosti průtoku
- Graf 4.:** Závislost intenzity signálu (5s integrace, $1\mu\text{g.L}^{-1}$, U^{238}) na rychlosti průtoku
- Graf 5.:** Závislost detekčního limitu na rychlosti průtoku (5s integrace, $1\mu\text{g.L}^{-1}$, U^{238})
- Graf 6.:** Závislost Intenzity signálu ($1\mu\text{g.L}^{-1}$, U^{238} , 5s akvizice) na rychlosti dávkování peristaltickou pumpou
- Graf 7.:** Závislost intenzity signálu na čase analýzy ($1\mu\text{g.L}^{-1}$, U^{238} , $75\mu\text{L.min}^{-1}$)
- Graf 8.:** Závislost intenzity signálu na čase analýzy ($100\mu\text{g.L}^{-1}$, U^{238} , $75\mu\text{L.min}^{-1}$)
- Graf 9.:** Závislost intenzity signálu na čase analýzy (proplach po koncentrační úrovni $100\mu\text{g.L}^{-1}$, U^{238} , $75\mu\text{L.min}^{-1}$)
- Graf 10.:** Závislost intenzity signálu na čase analýzy (multielementární standard $100\mu\text{g.L}^{-1}$, $75\mu\text{L.min}^{-1}$, 5s akvizice)
- Graf 11.:** Závislost intenzity signálu na čase proplachu (demineralizovaná voda po multielementárním standardu $100\mu\text{g.L}^{-1}$, $75\mu\text{L.min}^{-1}$, 5s akvizice)
- Graf 12.:** Závislost intenzity signálu na objemu vnášeného vzorku ($500\mu\text{L.min}^{-1}$, $1\mu\text{g.L}^{-1}$ U^{238} diskrétní dávkování)
- Graf 13.:** Závislost intenzity signálu na rychlosti průtoku vzorku (objem vzorku = $50\mu\text{L}$, $1\mu\text{g.L}^{-1}$ U^{238} diskrétní dávkování)
- Graf 14.:** Závislost intenzity signálu U^{238} ($1\mu\text{g.L}^{-1}$) při rychlosti dávkování $800\mu\text{L.min}^{-1}$ na dávkovaném objemu vzorku

SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ

AAS	Atomová absorpční spektrometrie
AMS	Akceleratorová hmotnostní spektrometrie
CE	Kapilární elektroforéza
CRM	Certifikovaný referenční materiál
DIHHEN	Vysoce-účinný zmlžovač s přímým vstřikem do ICP
DIN	Zmlžovač s přímým vstřikem do ICP
ETA AAS	Atomová absorpční spektrometrie s elektrotermickou atomizací
ETV	Elektrotermické odpařování vzorků
ETV-ICP-MS	Hmotnostní spektrometrie s ionizací v indukčně vázaném plazmatu a elektrotermickým odparem vzorku
FIA	Průtoková injekční analýza
FTICRMS	Hmotnostní spektrometrie s iontovou cyklotronovou resonancí a Furierovou transformací
GC-MS	Plynová chromatografie s hmotnostní detekcí
GDMS	Hmotnostní spektrometrie s ionizací v doutnavém výboji
HECFMN	Vysoce-účinný „Crossflow“ mikrozmžovač
HG	Technika generování plynných hydridů
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HPLC-MS	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí
ICP	Indukčně vázané plazma
ICP-DRC-MS	Hmotnostní spektrometrie s ionizací v indukčně vázaném plazmatu a dynamickou reakční celou
ICP-MS	Hmotnostní spektrometrie s ionizací v indukčně vázaném plazmatu
ICP-OES	Optická emisní spektrometrie s buzením v indukčně vázaném plazmatu
INAA	Instrumentální neutronová aktivační analýza
ITMS	Hmotnostní spektrometrie s iontovou pastí
LA	Laserová ablace

LA-ICP-MS	Hmotnostní spektrometrie s ionizací v indukčně vázaném plazmatu a laserovou ablací
LIMS	Hmotnostní spektrometrie s laserovou ionizací
LOD	Detekční limit
MALDI	Matricí asistovaná laserová desorpce
MC-ICP-MS	Hmotnostní spektrometrie s ionizací v indukčně vázaném plazmatu a multikolektorovým detektorem
oaTOF-ICP-MS	Hmotnostní spektrometrie s ionizací v indukčně vázaném plazmatu, ortogonálním urychlením iontů a průletovým analyzátozem
PAH	Polycyklické aromatické uhlovodíky
PCDD	Polychlorované dibenzodioxiny
PCDF	Polychlorované dibenzofurany
PCB	Polychlorované bifenyly
PIXE	Částicově indukovaná rentgenová emisní spektrometrie
QMS	Hmotnostní spektrometrie s quadrupólovým analyzátozem
RIMS	Resonanční hmotnostní spektrometrie s laserovou ionizací
SFMS	Hmotnostní spektrometrie s analyzátozem sektorového pole
SIMS	Hmotnostní spektrometrie sekundárních iontů
SNMS	Hmotnostní spektrometrie s ionizací dopadem neutrálních částic
SSMS	Hmotnostní spektrometrie s ionizací jiskrou
THC	Tetrahydrokanabinol
TIMS	Hmotnostní spektrometrie s termální ionizací
TOF-ICP-MS	Hmotnostní spektrometrie s ionizací v indukčně vázaném plazmatu a průletovým analyzátozem
TOF-MS	Hmotnostní spektrometrie s průletovým analyzátozem
XRF	Rentgen-fluorescenční spektrometrie

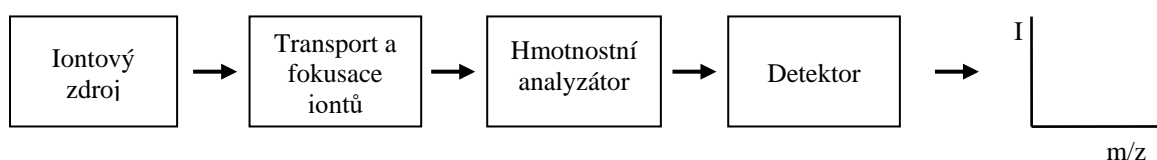
ÚVOD

Prvková analýza vzorků životního prostředí patří mezi základní ukazatele stavu životního prostředí. Nejčastějším důvodem analýzy je zjištění kontaminace a antropogenního vlivu na kvalitu prostředí. Environmentální vzorky mohou být dle skupenství rozděleny na pevné, kapalné a plynné. Tato práce se bude dále zabývat pouze pevnými a kapalnými vzorky. Pro elementární analýzu pevných a kapalných vzorků je často využíváno metod atomové spektrometrie. Mezi hojně využívané metody atomové spektrometrie patří například atomová absorpční spektrometrie (AAS), optická emisní spektrometrie s buzením v indukčně vázaném plazmatu (ICP-OES), hmotnostní spektrometrie s ionizací v indukčně vázaném plazmatu (ICP-MS), techniky rentgen fluorescenční spektrometrie (XRF) a jejich modifikace. Předložená disertační práce se věnuje zpracováním metod a analýze vzorků životního prostředí pomocí techniky oaTOF-ICP-MS. Jedná se tedy o modifikaci hmotnostní spektrometrie a to o hmotnostní spektrometrii s ionizací v indukčně vázaném plazmatu, vybavenou ortogonálním urychlením iontů a průletovým analyzátozem.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Anorganická hmotnostní spektrometrie

Anorganická hmotnostní spektrometrie je technika, která byla objevena již v první polovině dvacátého století. První práce zabývající se analýzou pomocí hmotnostní spektrometrie byla publikována v roce 1934 Dempsterem. Avšak širší uplatnění v oblasti prvkové analýzy dosáhla až mnohem později, v osmdesátých letech dvacátého století a to zejména díky zapojení indukčně vázaného plazmatu (ICP) jakožto iontového zdroje. [1] Anorganická hmotnostní spektrometrie je univerzálně a velice hojně využívána pro velmi citlivou, přesnou, správnou a rychlou analýzu stopových a ultrastopových koncentrací prvků, případně izotopových poměrů, v různorodých matricích. Tyto matrice mohou být jak kapalného, pevného tak i plynného charakteru. [2-4] Technika anorganické hmotnostní spektrometrie našla významné uplatnění v oblasti analýzy vysoce čistých materiálů (kovů [5-8], slitin [9], polovodičů [10-13], izolátorů [14-16], atd.), technických materiálů (keramiky, nitridů, karbidů [16-19]), environmentálních vzorků (různých typů vod [20-22], biologických materiálů [23-25], geologických vzorků [26-28] a dalších), v neposlední řadě také v oblasti analýzy radioaktivních materiálů [29-33]. Základní princip anorganické hmotnostní spektrometrie vychází z následujícího schématu:



Obrázek 1.: Základní schéma hmotnostního spektrometru [1]

Jakožto iontového zdroje lze využít několik prostředků, které budou blíže specifikovány v následující kapitole (1.1.1). V iontovém zdroji dochází k odpaření, atomizaci a následné ionizaci vzorku. Vzniklé ionty jsou dále vzorkovány pomocí několikastupňového interface, které odděluje část spektrometru pracujícího za normálního tlaku, od zbývajících částí pracujících ve vakuu. Iontový paprsek je dále modulován a transportován směrem k hmotnostnímu analyzátoru pomocí iontové optiky. V hmotnostním analyzátoru dochází k separaci iontů, na základě různých principů, které budou rozebírány v kapitole (1.1.2), podle jejich efektivních hmot m/z (kde m je hmotnost iontu a z , je jeho náboj). Separované ionty pokračují dále na detektor, kde jsou

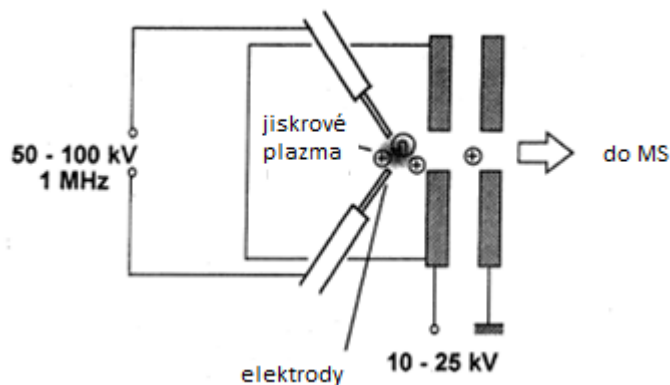
zaznamenávají. Vzniká tak hmotnostní spektrum, kde dané efektivní hmotě odpovídá příslušný izotop prvku a intenzitě píku jeho koncentrace. Jsme tak schopni určit nejenom koncentraci prakticky všech prvků periodické tabulky, ale i jejich případné izotopové zastoupení. [1]

1.1.1 Iontové zdroje v anorganické hmotnostní spektrometrii

Anorganická hmotnostní spektrometrie využívá řadu iontových zdrojů. Nejstarší technikou používanou k ionizaci vzorku ve spojení s MS je SSMS (Spark Source Mass Spectrometry). K ionizaci vzorku dochází pomocí vysokoteplotní jiskry ve vakuu. [1,34-37]. Jako další techniky MS využívající jiné iontové zdroje můžeme jmenovat SNMS (Sputtered Neutral Mass Spectrometry) [38,39], LIMS (Laser Ionization Mass Spectrometry) [40,41], RIMS (Resonance Ionization Mass Spectrometry) [42,43], GDMS (Glow Discharge Mass Spectrometry) [44,45], SIMS (Secondary Ion Mass Spectrometry) [46,47], TIMS (Thermal Ionization Mass Spectrometry) [48,49], AMS (Accelerator Mass Spectrometry) [50,51] a obecně nejvíce využívanou techniku ICP-MS (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry) [25, 52-54].

1.1.1.1 SSMS (Spark Source Mass Spectrometry)

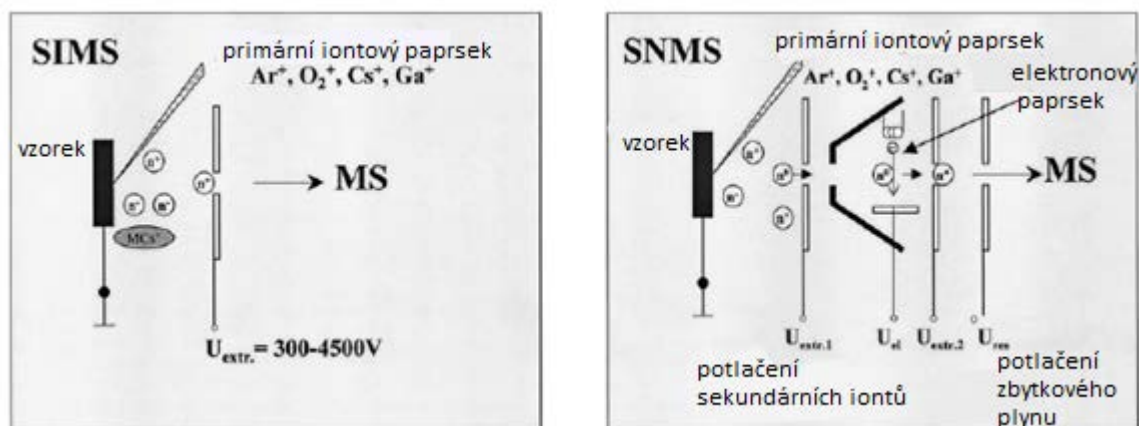
Jak již bylo dříve řečeno, hmotnostní spektrometrie s ionizací ve vysokoteplotní jiskře je jednou z nejstarších technik anorganické hmotnostní spektrometrie vůbec. Tato technika slouží k analýze pevných vodivých, ale po úpravě i nevodivých, materiálů. Vysokofrekvenční jiskrové plazma je vytvořeno mezi dvěma elektrodami tyčkovitého tvaru, které jsou připraveny z analyzovaného materiálu. V takto vzniklém plazmatu je materiál vzorku odpařen, atomizován a ionizován díky působení dopadajících elektronů. Vysokoenergetické ionty vznikající v plasmě (několik KeV) vyžadují pro svou separaci zapojení hmotnostních spektrometrů s dvojitou fokusací (geometrie Mattauch-Herzog, sektorové hmotnostní spektrometry). Spektrometry s tímto typem ionizace se už v této době nevyrábí a pouze několik málo pracovišť stále využívá techniku SSMS. [2,3] Následující obrázek uvádí schéma jiskrového iontového zdroje (Obrázek 2):



Obrázek 2.: Schéma jiskrového iontového zdroje [3]

1.1.1.2 SIMS (Secondary Ion Mass Spectrometry), SNMS (Sputtered Neutral Mass Spectrometry)

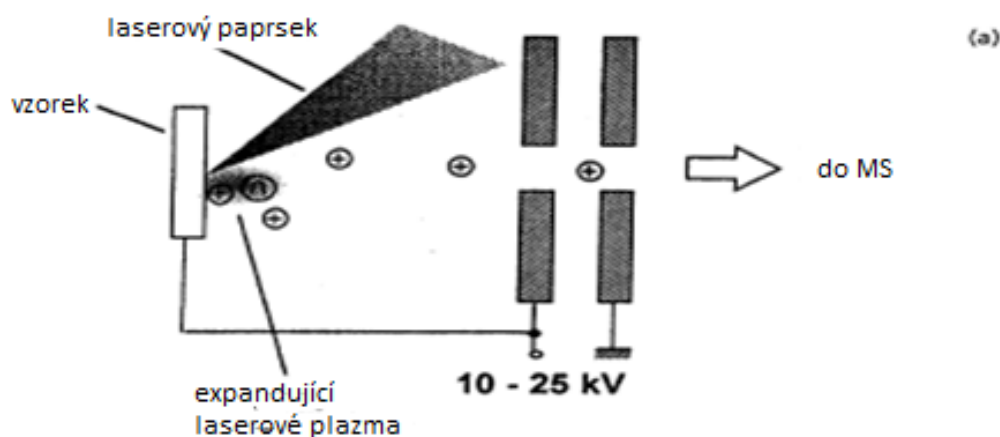
Techniky SIMS a SNMS patří mezi nejvýznamnější techniky hmotnostní spektrometrie využívané k analýze pevných materiálů, povrchů, vrstev a dalších. Ionizace je v těchto dvou případech docílena bombardováním povrchu vzorku svazkem primárních vysokoenergetických iontů (Ar^+ , Cs^+ , Ga^+ , O^- , O_2^+). Dopadající primární ionty pronikají do různé hloubky povrchu vzorku (1-10 nm) v závislosti na vlastnostech analyzovaného materiálu, energii primárních iontů a jejich hmotnosti. Část energie dopadajících částic se kaskádově vrací na povrch a indukuje rozptyl pozitivně či negativně nabitých atomárních a molekulárních iontů a neutrálů. Technika SIMS dále využívá sekundárně rozptýlených negativních nebo pozitivních iontů k samotné analýze. Oproti tomu v SNMS jsou sekundární ionty potlačeny a zbylé neutrální částice podstupují tzv. postionizaci buď dopadem svazku elektronů, nebo v jiném ionizačním zdroji. [2,3].

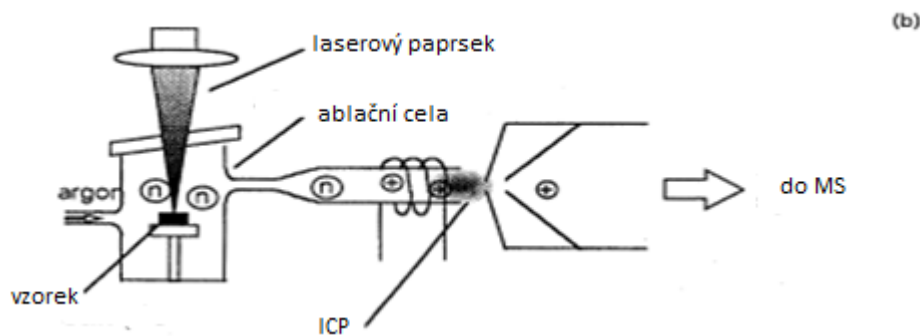


Obrázek 3.: Princip ionizace SIMS a SNMS [2]

1.1.1.3 LIMS (Laser Ionization Mass Spectrometry), RIMS (Resonance Mass Spectrometry)

Lasery jsou ve hmotnostní spektrometrii využívány jako nástroje pro odpaření analyzovaného materiálu a tvorbu iontů již od prvopočátku vývoje pevných laserů. Technika LIMS je založena na ionizaci odpařeného a atomizovaného materiálu v laserovém mikroplazmatu za vysokého vakua. K separaci takto vzniklého iontového svazku je zapotřebí hmotnostní spektrometry s rozlišením $m/\Delta m > 1000$. V případě RIMS jsou jeden nebo dva lasery nastaveny přesně na určitou vlnovou délku potřebnou k odparu, atomizaci a ionizaci zvoleného analyzovaného izotopu. Technika RIMS vykazuje vysokou citlivost a selektivitu. Třebaže vysoké vakuum využívané v těchto technikách snižuje tvorbu rušivých molekulárních iontů, jsou tyto techniky celosvětově velmi málo využívány a to hlavně kvůli finanční náročnosti. LIMS je v současné době nahrazena technikou LA-ICP-MS kde je působením laserového paprsku ablatován zkoumaný materiál za vzniku suchého aerosolu, který je následně ionizován v argonovém plazmatu, případně jiném iontovém zdroji. [2,3] Obrázek 4 uvádí schematické znázornění ionizačního procesu (a) laserových iontových zdrojů a (b) techniku LA-ICP-MS.

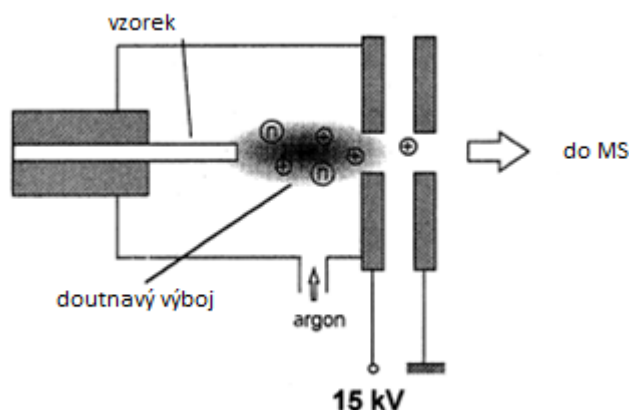




Obrázek 4.: Ionizační proces LIMS + RIMS (a), proces LA-ICP-MS (b) [2,3]

1.1.1.4 GDMS (Glow Discharge Mass Spectrometry)

Pro přímou stopovou analýzu povrchů a pevných materiálů je s výhodou využívána technika hmotnostní spektrometrie s buzením pomocí doutnavého výboje GDMS. Doutnavého výboje v plynu (Ar) při tlaku 0,1 – 10 torr se jakožto iontového zdroje využívá již více jak 60 let. [3] Ionty Ar^+ které vznikají v nízkotlakém plazmatu, jsou urychlovány směrem ke katodě tvořené analyzovaným materiálem. Materiál katody je na jejím povrchu rozptýlen a vzniklé neutrální částice jsou ionizovány v nízkotlakém plazmatu pomocí Penning ionizace, případně dopadem elektronů. [2,3] Nízká teplota a tlak vzniklého plazmatu vede k mnohem menší tvorbě polyatomických iontů. Polyatomické ionty obsahující kyslík se navíc mohou tvořit jen s kyslíkem uvolněným ze vzorku. Metoda umožňuje velmi citlivou analýzu povrchů a pevných materiálů včetně izotopového rozlišení a analýzu hloubkových profilů. Využívá se pro studium materiálů, jejich korozního chování a dále také při studiu katalytických procesů. [1]



Obrázek 5.: Ionizace doutnavým výbojem [3]

1.1.1.5 TIMS (Thermal Ionization Mass Spectrometry)

Hmotnostní spektrometrie s termální ionizací je technika pro velmi přesné měření izotopových poměrů. Malý objem vodného vzorku (1-10 μ L) s obsahem několika ng až μ g analytu je umístěn na čistý povrch vlákna (Re vysoké čistoty) a do sucha odpařen. Nejčastější konstrukční provedení techniky TIMS pracuje s dvěma vlákny umístěnými vedle sebe. První z vláken zajišťuje termický odpar vzorku, druhé vlákno slouží k ionizaci odpařených atomů a molekul. Limitujícím faktorem přesného měření izotopových poměrů technikou TIMS je úroveň frakcionace a samozřejmě zvolený typ hmotnostního analyzátoru. TIMS často vyžaduje zdlouhavou přípravu vzorku (rozklad vzorku, odstranění matrice) a proto bývá tato technika často nahrazována ICP-MS. [2,3]

1.1.1.6 AMS (Accelerator Mass Spectrometry)

Stejně jako RIMS je i AMS vysoce selektivní, ultracitlivou avšak také velice drahou technikou. AMS byla vyvinuta pro detekci extrémně nízkých koncentrací radionuklidů s dlouhým poločasem rozpadu pro výzkum v geochronologii a archeologii. V AMS je pro ionizaci podobně jako v SIMS využíváno primárního iontového paprsku Cs^+ . [3]

1.1.1.7 ICP-MS (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry)

První zapojení hmotnostního spektrometru s ICP jakožto iontovým zdrojem je připisováno anglickému vědci Grayovi v roce 1975. [2,3] V roce 1980 vzniká první publikace zabývající se ICP-MS [55] a roku 1983 je do oběhu vypuštěn první komerčně dostupný ICP-MS spektrometr kanadské společnosti Sciex. [1,56] O něco později se připojují i další výrobci s komerčně dostupnými modely ICP-MS a technika zaujímá ve velice krátké době významné postavení na poli multielementární stopové a ultrastopové analýzy všech druhů matric. Své postavení a popularitu získala metoda ICP-MS hlavně díky svým vlastnostem jako jsou například: vysoká citlivost, vysoká reprodukovatelnost a stabilita výsledků, schopnost stopové a ultrastopové multielementární analýzy, široký dynamický rozsah, vysoká průchodnost vzorků a schopnost analýzy izotopových poměrů. [56] Další výhodou využití ICP jakožto iontového zdroje je například jednoduché vnášení vzorku do plazmatu za atmosférického tlaku. Z této výhody pak vyplývá možnost jednoduchého spojení s technikami průtokové injekční analýzy (FIA), vysokotlaké

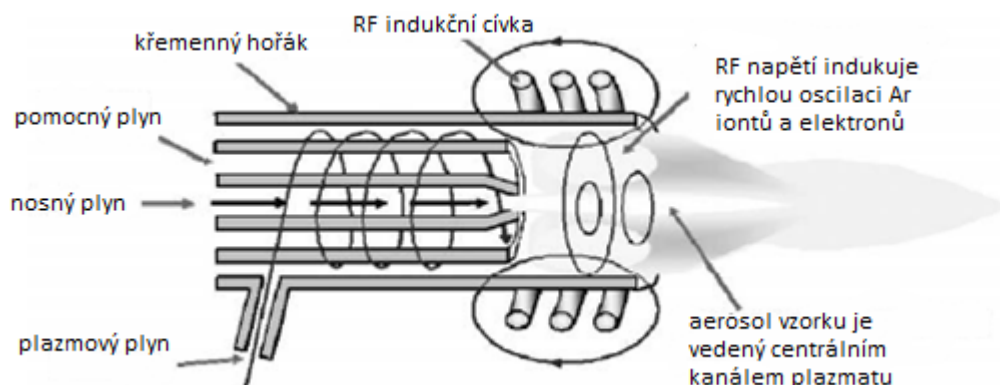
kapalinové chromatografie (HPLC), elektrotermického odparu (ETV), nebo laserové ablace (LA) a dalšími. [3] Indukčně vázané plazma využívané jakožto iontový zdroj v hmotnostní spektrometrii je prakticky identické s ICP plazmatem využívaným v technice ICP-OES. Jakožto plazmového plynu je nejčastěji využíváno Ar, kde je plazma generováno pomocí radiofrekvenčního magnetického pole. Vysokofrekvenční proud (zpravidla 27 nebo 40.68 Mhz) je přiváděn na indukční cívku, která je umístěna na konci křemenného plazmového hořáku. Zážeh plazmy je iniciován vysokonapěťovou jiskrou. Neustálý pohyb elektronů a iontů je indukován oscilujícím magnetickým polem. Dochází tak ke srážkám s atomy plazmového plynu Ar a tzv. ohmickému ohřevu plynu, který vede ke vzniku plazmatu a teplotě až 10 000 K. Plazma vzniká za atmosférického tlaku, typicky se používá výkon mezi 0,75 až 1,6 kW. Vysokofrekvenční generátory, které využívají frekvenci 27,12 MHz, dosahují vyšších výkonů (až kolem 2 kW).[56]

Ačkoliv existuje mnoho různých modifikací a designů plazmových hořáků, je v praxi nejvíce využíváno křemenných hořáků Fasselova typu. Tento typ plazmového hořáku je vyobrazen na obrázku 6. Fasselův typ se skládá ze tří koncentrických křemenných trubic. Vnější trubice slouží pro zavádění plazmového plynu, ten stabilizuje plazma, slouží rovněž k ochlazení částí hořáku a zabraňuje jeho roztavení při vysokých teplotách (používají se vysoké průtoky od 10 do 20 l/min). V prostřední trubici proudí pomocný plyn, který má vliv na pozici plazmatu a rovněž ochlazuje vnitřní částí hořáku. Vnitřní trubice, rovněž nazývaná injektor, slouží pro zavádění nosného plynu, který nese aerosol analyzovaného vzorku. Ten pak vstupuje do centrální části plazmatu, je odpařen a obsažené chemické sloučeniny jsou atomizovány a ionizovány. Argon slouží jako plyn ve všech těchto zmiňovaných případech. [56]

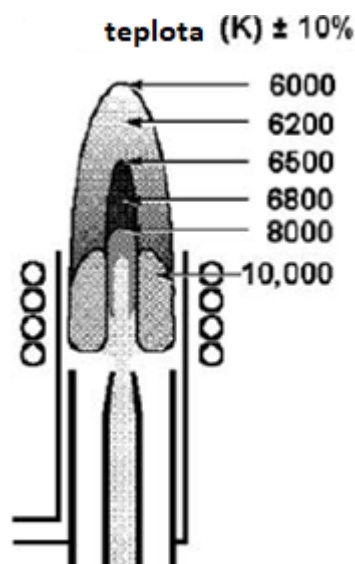
Po zážehu dostává plazma elipsoidní tvar. Až po zvýšení průtoku nosného plynu dochází k formování charakteristického toroidálního tvaru. V centrálním kanálu plazmatu je teplota nižší nežli v indukční zóně. Ionizace analytu ($M \rightarrow M^+ + e^-$) v plazmatu je dosaženo několika mechanismy, mezi které patří například ionizace dopadem elektronu, ionizace přenosem náboje a tzv. Penningova ionizace. Bylo spočítáno, že při teplotě $T = 7500$ K (hustota elektronů $= 1 \times 10^{15} \cdot \text{cm}^{-3}$) dohází z $\geq 90\%$ k ionizaci 54 prvků periodické tabulky do prvního ionizačního stupně. Všechny elementy s první ionizační energií $E_{\text{ion}} \leq 10$ eV ionizují z $\geq 50\%$. Pouze 3 prvky (He, F, Ne) mají první ionizační energii natolik vysokou, že nebudou Ar plazmatem ionizovány a není je proto možno měřit technikou ICP-MS. [56]

Dále vzniká v plazmatu také malé procento dvojnásobně nabitých a polyatomických iontů. Dvojnásobně nabité ionty v malém zastoupení tvoří hlavně prvky s nízkou druhou ionizační energií, mezi ně patří například barium a prvky vzácných zemin. ICP je tedy velmi efektivní ionizační zdroj pro následnou detekci MS. [56]

Protože argonové plazma pracuje za atmosférického tlaku a hmotnostní spektrometrie vyžaduje vysoké vakuum (10^{-6} torrů), musí být vznikající ionty z ICP plazmatu extrahovány do vakuované části MS. Tento přechod je zajištěn pomocí několikastupňového interface, ve kterém je postupně snižován tlak až na požadovanou úroveň. Interface sestává z 2-3 vodou chlazených kónusů, které mají uprostřed vzorkovací otvor zhruba 1mm, kterým prochází ionty do MS. Kónusy jsou většinou vyrobeny z kombinace Ni, Pt, nebo Cu. Rozdíl v teplotách mezi plazmatem a chlazeným interface vede ke vzniku oblasti, kde dochází k rekombinaci iontů s kyslíkem za vzniku oxidických iontů. Dále může docházet k zanášení kónusů v případech, kdy se nasávají značně zasolené matrice. Velký rozdíl mezi tlaky na straně ICP a uvnitř MS vede k prudkému nárůstu rychlosti vzorkovaného paprsku iontů v oblasti interface a dochází zde až k překročení rychlosti zvuku. Prošlý iontový paprsek je dále modulován pomocí iontové optiky a pokračuje k MS. [56] Indukčně vázané plazma poskytuje v analytické zóně stabilní proud iontů a jeho stabilita je velice dobrá i při zavádění aerosolu vzorku, což zajišťuje dobrou reprodukovatelnost výsledků. Následující obrázek ukazuje princip ICP iontového zdroje (Obrázek 6). Obrázek 7. na další straně pak přibližuje teplotní profil plazmatu.



Obrázek 6.: ICP iontový zdroj [56]



Obrázek 7.: Teplotní profil ICP [56]

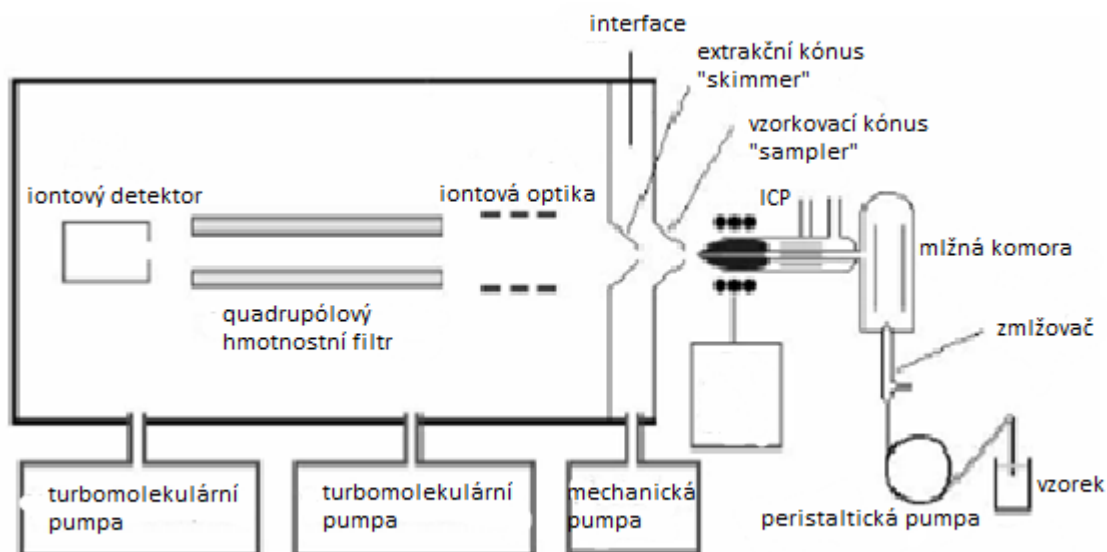
1.1.2 Hmotnostní analyzátory využívající ICP iontového zdroje

V současné době se můžeme setkat s několika typy anorganických hmotnostních analyzátorů využívajících ICP jakožto iontového zdroje. Nejdůležitější dle principu separace iontů představují quadrupólové hmotnostní analyzátory (QMS) [10,31,57,58], sektorové hmotnostní analyzátory (SFMS) [22,59-61] a průletové hmotnostní analyzátory (TOF-MS) [62,63]. Mezi další, již méně běžné analyzátory, můžeme zařadit hmotnostní spektrometry využívající pro separaci iontů iontovou pasti (ITMS) [64], případně iontovou cyklotronovou resonanci s Furierovou transformací (FTICRMS) [65]. Quadrupólové hmotnostní analyzátory fungují jako hmotnostní filtry a dovolí pouze určité efektivní hmotě m/z projít skrz quadrupólový analyzátor. Zbylé ionty jsou odpuzeny. Sektorové hmotnostní analyzátory využívají magnetické a elektrické pole k tomu aby zaostřily iontový paprsek o určité m/z do přesně definované části analyzátoru, kam je umístěna štěrbinu, za kterou je detektor iontů. Změnou parametrů magnetického a elektrického pole dopadají na štěrbinu ionty o různém m/z a postupně tak můžeme získat celé hmotnostní spektrum. Hovoříme pak o skenujících přístrojích, které se opět chovají jako hmotnostní filtr. Druhou možností, využívající k filtrování iontů elektrického a magnetického sektoru, je použití série pevně nastavitelných stěrbin a detektorů, kdy můžeme simultánně zaznamenávat více iontů. Hovoříme pak o tzv. multikolektorových analyzátoch, které se používají hlavně pro přesné měření izotopických poměrů. Hmotnostní analyzátory TOF jsou vybaveny průletovou trubicí, kde ionty dosahují různých rychlostí na základě jejich

m/z . Lehčí ionty dosahují vyšších rychlostí a dopadnout tak na detektor dříve, hmotnostní spektrum se získá měřením dopadajících iontů v čase. [56]

1.1.2.1 *Quadrupólové hmotnostní spektrometry (QMS)*

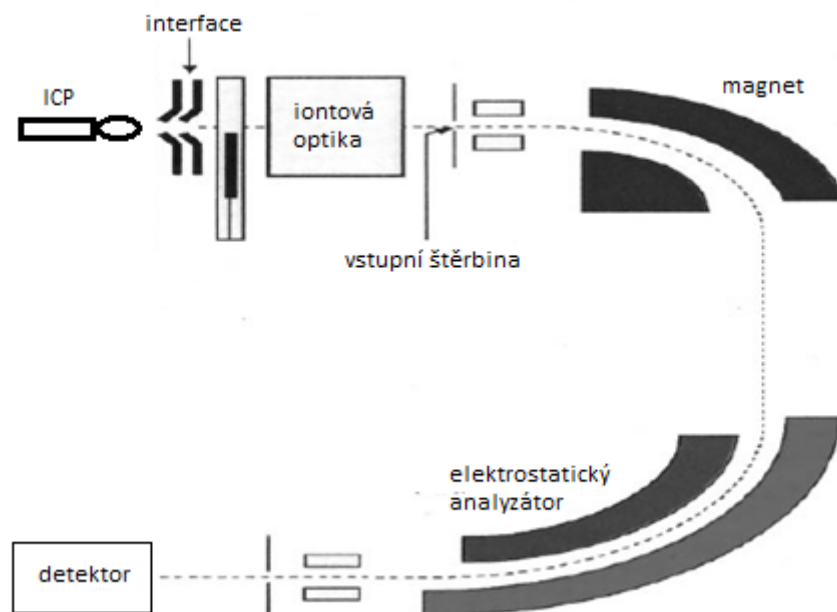
QMS jsou nejlevnějším typem hmotnostních spektrometrů. Jsou robustní a široce využitelné. V kombinaci s ICP představují QMS nejprodávanější a nejčastěji používaný typ hmotnostních spektrometrů. Mnoho rutinních laboratoří s výhodou využívá quadrupólů kvůli jejich vysoké prostupnosti vzorků. Tyto instrumenty jsou relativně jednoduché na obsluhu, mají dobrou stabilitu a jsou vlastně nejběžnějším přístrojovým vybavením stopových laboratoří. Jejich nevýhodou je, že nedosahují příliš velkého rozlišení a nejsou tedy schopny rozlišit některé spektrální interference, ty se pak musí řešit předřazením kolizní nebo reakčně kolizní cely. [1,56] Quadrupólový filtr je tvořen čtyřmi symetricky uspořádanými kovovými tyčemi kruhového, nebo hyperbolického průřezu. Dvě protilehlé tyče jsou vždy vodivě spojeny. Na jeden pár je vloženo záporné a na druhý kladné stejnosměrné napětí. Stejnosměrnou složku ještě dále doplňuje složka střídavá, která dosahuje větší intenzity. Výsledné napětí páru je tedy v určitém okamžiku součtem obou napěťových složek. Pro většinu času je jeden pár vždy kladně a druhý záporně nabitý. V ose mezi tyčemi je napětí nulové a tímto kanálem také procházejí analyzované ionty. Pro určitou kombinaci stejnosměrné a střídavé složky napětí prochází hmotnostním analyzátozem pouze daný typ iontu o určité efektivní hmotě m/z . Při postupné změně stejnosměrné a střídavé složky od nulové po limitní a při zachování stejného poměru mezi složkami propouští quadrupólový filtr postupně všechny ionty o jednotlivých efektivních hmotách. [1]. Samostatnou kategorií tvoří vícenásobné quadrupólové filtry, které se nyní začínají využívat i ve spojení s ionizací v ICP. Ty umožňují velice efektivní řešení polyatomických interferencí. Následující obrázek uvádí schematické znázornění quadrupólového hmotnostního spektrometru se zařízením pro dopravu kapalných vzorků a ICP ionizačním zdrojem (Obrázek 8)



Obrázek 8.: Schematický diagram ICP-QMS [56]

1.1.2.2 Sektorové hmotnostní spektrometry (SFMS)

Další typ hmotnostních spektrometrů využívá sektorových analyzátorů. Jsou mnohem dražší, mají větší nároky na vakuový systém a vyžadují zkušenějšího operátora. Tyto nevýhody však vyvažuje vysoká detekční schopnost a možnost využití vysokého rozlišení, které je s výhodou využíváno pro překonání některých spektrálních interferencí. Těchto vlastností je docíleno kombinací magnetického a elektrického sektoru tedy dvojitým zaostřením iontového paprsku.[56] Parametry magnetického a elektrického sektoru jsou nastavovány buď odděleně, případně současně a tímto způsobem je pak docíleno stejně jako u QMS filtrovací schopnosti iontů podle jejich efektivní hmoty m/z , avšak s daleko vyšším rozlišením než u QMS. [1] Podle geometrie magnetického a elektrického sektoru rozlišujeme dále sektorové hmotnostní spektrometry na spektrometry s geometrií Mattauch-Herzog [60,66] a spektrometry s geometrií Nier-Johnson, případně převrácenou Nier-Johnson geometrií [22,61,67]. Rozlišovací schopnost u těchto spektrometrů je nastavitelná ve více úrovních. Nízká rozlišovací schopnost se pohybuje stejně jako u QMS přístrojů kolem hodnoty 300. Maximální rozlišovací schopnost komerčně dostupných technik pak dosahuje kolem 10 000. Díky takto vysoké rozlišovací schopnosti dokážeme překonat některé velmi problémové izobarické interference, avšak za cenu ztráty citlivosti. [56]



Obrázek 9.: Příklad konstrukce SFMS spektrometru (převrácená Nier-Johnson geometrie) [2]

1.1.2.3 Průletové hmotnostní spektrometry (TOF-MS)

Hmotnostní spektrometry s TOF analyzátory jsou konstrukčně nejjednoduššími spektrometry a jsou vlastně nejmladším přírůstkem do skupiny anorganických hmotnostních analyzátorů. [56] Mnoho základních konceptů týkajících se TOF-MS bylo popsáno již v padesátých letech dvacátého století Wileym a McLarenem [68]. Významný vývoj však mnohem později (devadesátá léta dvacátého století) odstartovaly dvě události. Tou první byl vývoj techniky MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization), pro kterou je separace iontů TOF-MS velice vhodná. A druhou bylo „znovuobjevení“ techniky TOF-MS využívající ortogonální akceleraci iontů, která byla popsána roku 1989 Guilhaudem a Dodonovem. [69] Ionty vznikající v ICP jsou vzorkovány pomocí několikanásobného interface, které odděluje oblast normálního tlaku a vakuovanou oblast. Extrahované ionty jsou dále modulovány soustavou elektrod tvořící tzv. iontovou optiku. Ionty přicházející do akcelerační části jsou pomocí napěťového pulzu vystřeleny do letové trubice. Vzhledem k tomu, že všechny akcelerované ionty obdržely stejně velký napěťový puls, dosáhnou tedy i stejné kinetické energie E_k . Z rovnice pro kinetickou energii: $E_k = 0.5 \cdot mv^2$ [70] vyplývá, že ionty o různé m/z budou mít i různou rychlost a

doba za kterou dosáhnou detektoru je přímo úměrná druhé odmocnině jejich hmotnosti. Lehké ionty proto dosáhnou detektoru dříve, těžší ionty pak později. Pokud se jedná o průletovou trubici délky zhruba jeden metr, dosáhnou i ty nejtěžší ionty detektoru zhruba za 50 μ s. Což přeneseně znamená že TOF-MS je schopný naměřit 20 – 30 tisíc plných spekter za jednu vteřinu. TOF-MS je tedy o 2-3 řády rychlejší, než běžné quadropólové systémy měřící v sekvenčním skenovacím módu. Podle způsobu akcelerace iontů do letové trubice můžeme rozlišovat dva typy komerčně dostupných TOF spektrometrů, s ortogonálním (oaTOF) a axiálním urychlením iontů (lineární TOF).[56]

- **Formování iontů, akcelerace a separace v TOF-MS**

Obrázek 10 ilustruje základní principy v TOF-MS. Ionty jsou formovány a vzorkovány v „paketech“ ve velmi dobře definovaných časech (t). V počátečním čase t_0 jsou ionty s určitým nábojem q akcelerovány v elektrickém poli E napříč vzdáleností S_a , tak aby dostali určitou kinetickou energii KE . Ideálně vstupují ionty do driftové části analyzátoru o délce D s tou samou kinetickou energií. Tato energie je vztažena k hmotnosti iontu (m) a jeho rychlosti. (v). [68]

$$KE = qEs_a = \frac{1}{2}mv^2 \quad [68]$$

Rychlost iontu se liší úměrně k převrácené hodnotě druhé odmocniny poměru mezi hmotností a nábojem (m/q běžně známé jako m/z , kde z je náboj iontu). Po akceleraci vstupují ionty do driftové zóny s délkou D a dále se dělí na základě rozdílné doby letu t_D . Nakonec dopadnou na detektor v pořadí dle jejich m/z . [68]

$$t_D = D\sqrt{\frac{m}{2qEs_a}} \quad [68]$$

Rozdílné počáteční vzdálenosti od detektoru, různá počáteční rychlost, nebo doba vzorkování iontů přispívají ke vzniku několika různých letových časů pro ionty stejných m/z . Tato nesourodost je nazývána prostorová, energetická, případně časová disperze a je klíčovým faktorem ovlivňujícím tvar spektrální linie. [68]

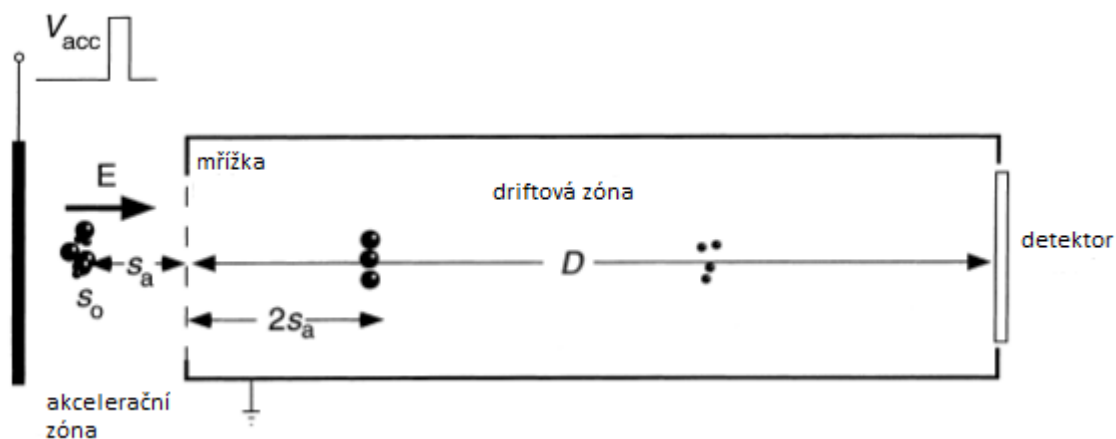
- **Rozlišení: problém plynných iontových zdrojů, počáteční disperze a doba otočení tzv. “turn-around-time“ v TOF-MS**

Počáteční prostorová disperze iontů je obzvlášť závažný problém v případě analýzy TOF-MS ve spojení s plynnými iontovými zdroji jako je ICP. Pohyb iontů je v plynných zdrojích ovlivněn nejen akcelerační energií E , ale zároveň tzv. Boltzmanovým rozdělením molekulárních rychlostí. Pokud není toto rozdělení korigováno, dochází k významnému rozptýlení doletových dob, které má za následek zásadní zhoršení rozlišení. Bez příslušné korekce je například velmi složité rozlišit 200 od 201 m/z při typické elektronové ionizaci o teplotě 500K. V případě ICP je tento problém mnohem významnější s ohledem na řádový rozdíl v teplotách. Zde se také setkáváme s fenoménem zvaným „turn-around-time“ – doba otočení. Ionty počátečně pohybující se směrem k detektoru přiletí na detektor dříve, nežli ionty stejné m/z počátečně pohybující se stejnou rychlostí ale opačným směrem. Ionty pohybující se v počátku směrem od detektoru, jsou nejdříve akceleračním impulzem zpomaleny a následně akcelerovány správným směrem (k detektoru). Čas, který je potřeba na tuto „otočku“ je tzv. „turn-around-time“ (t_{-+}). [68]

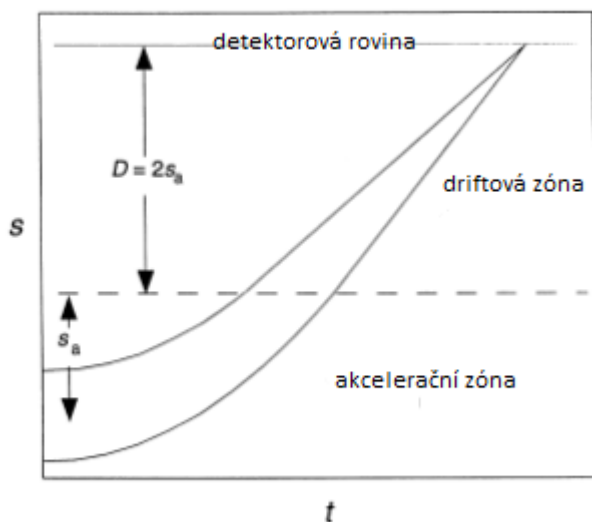
$$t_{-+} = \frac{2\sqrt{2mU_0}}{Eq} \quad [68]$$

Kde U_0 je počáteční kinetická energie, která je přičtena ke složce počáteční rychlosti ve směru k detektoru. Jediný rozdíl mezi dvěma ionty stejné m/z je čas, při kterém se z určitého počátečního místa začnou pohybovat danou rychlostí směrem k detektoru. Časový rozdíl dopadajících iontů o stejné m/z je tedy dán jejich počáteční polohou a směrem pohybu. V případě horkého plazmového zdroje využívajícího konzervativní hodnoty ($E = 30000 \text{ V}\cdot\text{m}^{-1}$, $m_{\text{izotop}} = 100$, $T = 5000\text{K}$) je spočteno že $t_{-+} = 63 \text{ ns}$. Pokud je doba letu iontu přibližně $20 \mu\text{s}$ a nepředpokládají se žádné další zdroje rozšiřování píku, je rozlišení ($t/2t_{-+}$) limitováno na 158. Tuto situaci je velmi těžké korigovat, ale je známo, že čím větší akcelerační potenciál E tím kratší t_{-+} . Bohužel zvyšování počátečního E působí negativně na tzv. fokusační bod (space focus) a je tedy nutné udělat kompromis. [68] Na obrázku 10 můžeme vidět princip jednoduchého lineárního TOF přístroje.

Paket iontů je akcelerován v akcelerační zóně a následně separován v driftové části. Lehčí ionty (menší kuličky) putují rychleji a dopadají na detektor první. E je síla elektrického pole v akcelérátoru, S_0 je průměrná počáteční pozice iontů, S_a je průměrná vzdálenost po kterou jsou ionty akcelerovány v akcelerační zóně, D je driftová vzdálenost (vakuovaná oblast prostá pole). V_{acc} je napěťový akcelerační pulz. Obrázek 11 ukazuje fokusační bod pro jednokrokovou akceleraci v lineárním TOF-MS. Fokusační bod představuje právě dvojnásobnou vzdálenost S_a .



Obrázek 10.: Princip jednoduchého lineárního TOF přístroje [68]



Obrázek 11.: Časo-prostorová trajektorie iontů v lineárním TOF-MS [68]

- **Fokusační bod „space focus“**

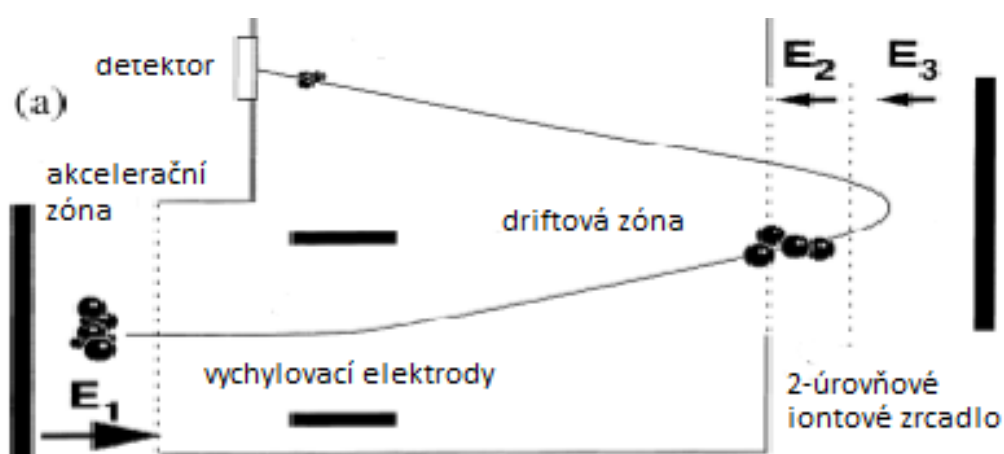
Rozdílné počáteční pozice iontů v iontovém paprsku vzhledem k ose akcelerace mohou být významným zdrojem zhoršení rozlišovací schopnosti TOF

spektrometru. Tento efekt je však možné kompenzovat. Jedno, nebo více akceleračních polí se uspořádá tak, že ionty mající stejné m/z , které jsou v počátku vzdálenější od detektoru, zůstávají delší dobu v prvním akceleračním poli a dosáhnou tak vyšší driftové rychlosti. Ionty s rozdílnou počáteční pozicí, stejné m/z se tedy díky tomuto efektu mohou setkat v tzv. fokusačním bodě (vzdálenost $2S_a$). V tomto bodě může být umístěn buď přímo detektor, nebo zařízení pro eliminaci nežádoucích iontů (viz. dále). Princip může být jednoduše vysvětlený z časoprosotorového diagramu iontového paprsku na obrázku 11. Tak abychom posunuli fokusační bod do vzdálenějších pozic od akcelerační zóny, je nezbytné použít dvou a více fázové akcelerátory. V první fázi akcelerace je výhodné využít slabé akcelerační pole, což je však bohužel v přímém konfliktu s minimalizací doby obratu „time-around-time“.

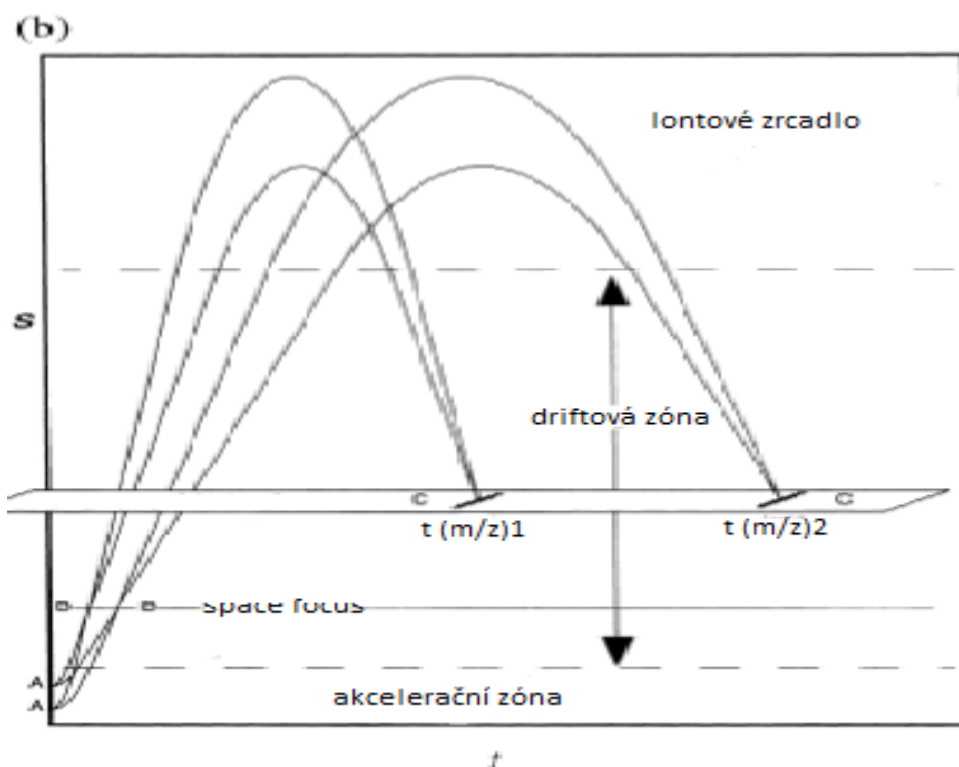
- **Simultánní fokusace energií a fokusační bod s iontovým zrcadlem a reflektorem a optikou**

Významný pokrok v TOF-MS iontové optice znamenal vývoj iontového zrcadla. Celkové uspořádání iontového zrcadla a příslušné optiky bylo vynálezci pojmenováno jako reflektrom. Klíčový prvek reflektromu je tedy elektrostatické iontové zrcadlo, které odráží pakety iontů zpátky na detektor, obvykle lokalizovaný blízko akcelerační zóny, viz. obrázek 12a. Díky zmíněnému zároveň dochází k prodloužení driftové zóny bez výraznějších změn konstrukčních rozměrů spektrometru. TOF-MS zařízení vybavené reflektrem poskytuje téměř konstantní letové časy pro ionty stejné m/z (navzdory počáteční pozici a směru pohybu iontů). Tohoto je docíleno díky tomu, že ionty mající stejné m/z avšak vyšší energii (rychlejší), penetrují hlouběji do iontového zrcadla a trvá jim pak delší dobu, než se dostanou z reflektromu ven. To dává stejným (m/z), nicméně méně energetickým (pomalejší) iontům, šanci dohnout ionty rychlejší v druhém fokusačním bodě (obvykle detektorová rovina). Díky použití jednoho reflektromu vzniká právě jeden nový fokusační bod, často zaostřený na detektorovou rovinu. Schematické uspořádání TOF-MS s reflektrem je vyobrazeno na obrázku 12a. Z obrázku je patrné zapojení malého vychylujícího pole tak, aby odražené ionty dopadaly na detektor, který je na stejné straně jako akcelerační zóna. Ionty mající v počátku určitý prostorový a rychlostní rozptyl v bodě A-A jsou zprvu akcelerovány v poli E1.

Silné akcelerační pole E1 může korigovat časovou neregularitu vzniklou díky turn-around-time. K prvnímu zaostření iontů dochází v první fokusační rovině (B-B). Ionty zaostřující se zde mají rozdílné energie, ale jsou významným způsobem časo-prostorově sjednocené. Dále ionty pokračují na dvouúrovňové iontové zrcadlo, kde jsou pomocí pole E2 a E3 odraženy. Iontové zrcadlo pak dokáže korigovat relativně velké rozdíly v energiích iontů a poskytnout vysoké rozlišení. Odražené ionty tedy dopadají jako pakety určité m/z v konkrétních časech na konečný fokusační bod detektorové roviny C-C. Obrázek 12b uvádí časo-prostorový diagram trajektorie iontů pro TOF-MS s reflektorem.



Obrázek 12a.: Schematické uspořádání TOF-MS s reflektorem [68]



Obrázek 12b.: Časo-prostorový diagram trajektorie iontů v TOF-MS s reflektorem [68]

- **Časový sled událostí, detekce a digitalizace v TOF-MS**

Hlavní výzva pro digitalizaci signálu TOF-MS spočívá z nutnosti digitalizovat velice rychlé signály a to v rámci velmi širokého dynamického rozsahu intenzit signálu. TOF-MS pracuje v daleko užším časovém intervalu nežli skenovací hmotnostní spektrometry. Představme si tedy následující modelovou situaci pro průlet jednou nabitým iontem o energii 3KeV, $m/z = 204$, napříč 0,6 m vzdáleností. Volíme akcelerační napětí $ES_a = 3000V \cdot m^{-1}$, skutečná hmotnost izotopu 204 bude $204 \times 1,66 \cdot 10^{-27} \text{ kg}$, $q = 1,6 \cdot 10^{-19} \text{ C}$. To nám dává driftový čas 11,2 μs . Iont m/z 205 bude mít dobu letu $(205/204)^{0,5} = 1,002448$ krát delší při stejné vzdálenosti a bude tedy oddělen $(1,002448 - 1) \times 11,2 \mu\text{s} = 27,4 \text{ ns}$. V analýze TOF-MS je tedy naprosto běžné získat celé hmotnostní spektrum v průběhu několika desítek mikrosekund, zatímco jednotlivé m/z přilétají na detektor řádově v nanosekundových intervalech. Toto tedy představuje velkou výzvu pro detekční elektroniku TOF-MS. Digitalizace signálu musí být provedena rychlostí 200 – 1000 Mvzorků. s^{-1} , tak aby bylo dosaženo dobrého rozlišení. V porovnání s tímto se QMS

skenující rychlostí $400 \text{ m/z}\cdot\text{s}^{-1}$ zastaví na jednom jediném píku zhruba na $1/(2 \times 400) = 1,25 \text{ ms}$. Rychlost digitalizace signálu v tomto případě je pouhých $8 \text{ Kvzorků}\cdot\text{s}^{-1}$. Jinými slovy, digitalizace v případě TOF-MS musí být zhruba 25000 – 125000 krát rychlejší nežli u rychlých skenujících přístrojů QMS. Schopnost akcelérátoru poskytovat velmi rychlé akcelerační pulzy je rovněž velmi důležitá, protože šířka napěťového pulzu a příslušné ostré časování pulzů mají podobný efekt, jako šířka kolektorové štěrbinu u skenovacích spektrometrů. Vývoj vysokorychlostní elektroniky byl tedy pro rozvoj TOF-MS zásadní. [68]

- **Ortogonalní urychlování iontů v TOF-MS**

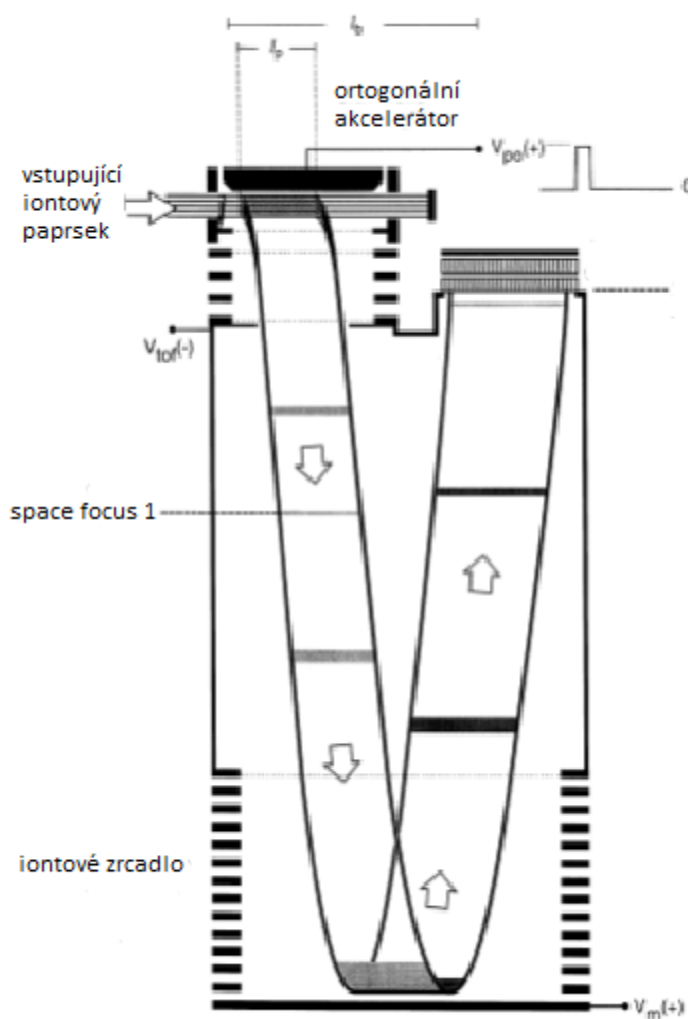
Lineární TOF-MS s reflektorem nemusí nutně poskytovat vysoké rozlišení, obzvláště pak v kombinaci s kontinuálními ionizačními zdroji (například kvůli turn-around-time). Lineární geometrie navíc sama o sobě nenabízí příliš efektivní vzorkování iontů z kontinuálních ionizačních zdrojů. Ačkoliv byl nápad spojení kontinuálních ionizačních zdrojů s TOFMS zkoumán již v 60 letech 19. století, teprve až Guilhaus a Dawson tento nápad rozvinuli do použitelné podoby. Techniku, kterou vyvinuli, nazvali oaTOF-MS tedy TOF-MS s ortogonalním urychlením iontů. Zásadním krokem byla aplikace pulzního ortogonalního akcelérátoru podél relativně pomalu putujícího iontového paprsku poskytovaného kontinuálním iontovým zdrojem. Aplikovaná ortogonalní akcelerace zvýšila energii iontů až na keV (dodání obrovské rychlosti v ortogonalním směru). Původní rychlost iontů je zachována jak ve směru, tak velikosti, ale zároveň naprosto oddělena od rychlosti ortogonalní. TOF data jsou měřena v ortogonalním směru, ačkoliv drift iontů je typicky o několik málo stupňů nakloněn ve směru spontánní osy trajektorie paprsku. Uspořádání oaTOF (zahrnující iontové zrcadlo) je vyobrazeno na obrázku 13. Prvotní použitelnou podobu oaTOF-ICP-MS představili Myers a kolektiv. [68]

Hlavní výhody ortogonalního urychlení jsou:

- ✓ Iontový paprsek ze zdroje lze vytvořit s velmi nízkou disperzí rychlostí v ortogonalním směru.
- ✓ Čas potřebný k naplnění ortogonalního akcelérátoru ionty je přibližně stejný, jako doba letu akcelerovaných iontů směrem k detektoru. Tak může

být akcelerátor plněn, zatímco předchozí paket iontů je analyzován. To přispívá k vysoké prostupnosti a efektivnímu pracovnímu cyklu.

- ✓ Detektor je optimálně mimo osu iontového paprsku, což významně snižuje množství dopadajících interferujících fotonů a neutrálních částic (z ICP). Toto je významný rozdíl od axiálního TOF-MS uspořádání. Pokud použijeme axiální zařízení s iontovým zrcadlem je detektor rovněž mimo osu. V tomto případě však může docházet k odrazu od zadní stěny iontového zrcadla.
- ✓ Díky ortogonální akceleraci nezanášejí neutrální částice proudící v iontovém paprsku driftovou zónu, reflekttron a další elektroniku.
- ✓ Ionty ze vzorkované části paprsku jsou rozprostřeny podél osy iontového paprsku, snižují tak efekt prostorového náboje, který může zhoršit rozlišovací schopnosti při velmi rychlých proudech iontů.[68]



Obrázek 13.: Schematický diagram oaTOF-MS zařízení [68]

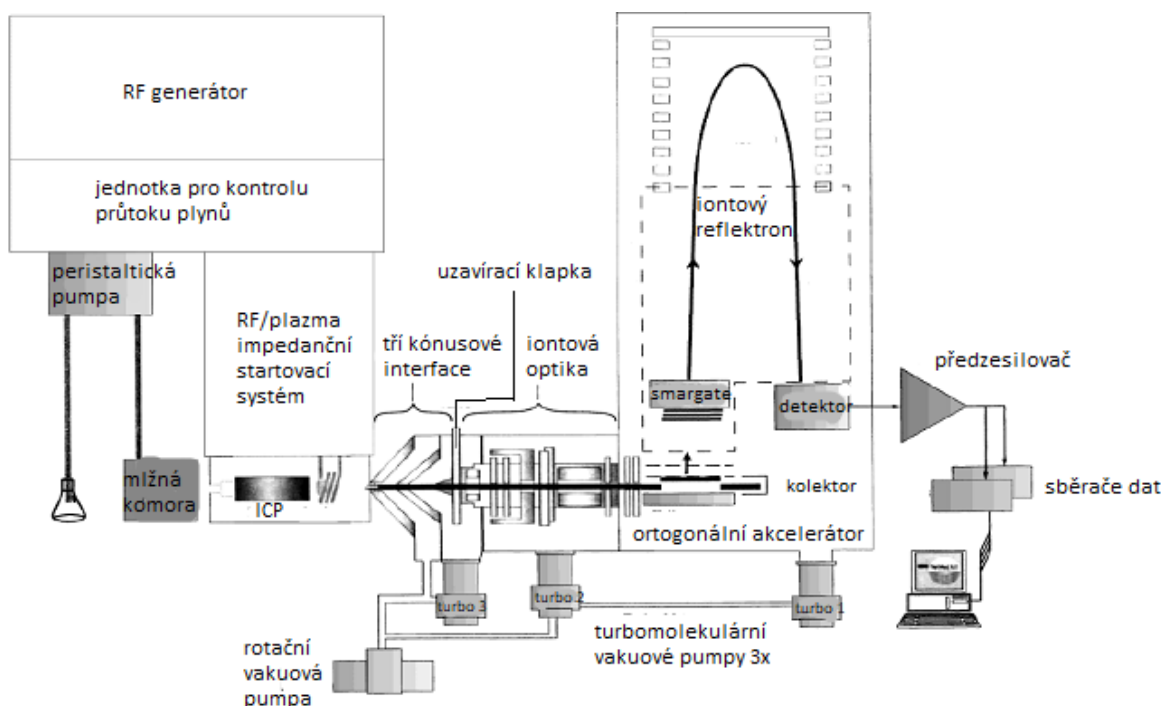
Na obrázku 13 plní kontinuální iontový paprsek ortogonální akcelerátor. Část délky iontového paprsku l_p je poté ortogonálně urychleno do driftové zóny pomocí napěťového pulzu $V_{po(+)}$. Do akcelerátoru zároveň vstupuje nový iontový paprsek. Letící paket iontů z akcelerovaného iontového paprsku je fokusována ve space focus 1 s poměrně velkou variabilitou energií. Následně jsou ionty odraženy iontovým zrcadlem a prostorově i energeticky fokusovány na detektoru. Poměr mezi délkou vzorkovaného iontového paprsku l_p a celkovou délkou iontového paprsku l_B je mírou efektivity práce ortogonálního akcelerátoru. [68]

- **„Vyřezávání“ iontů v TOF-MS**

Kvůli interferencím z hojně se vyskytujících iontů vyplývajících z iontového zdroje (Ar^+) a dalších, je více než vhodné eliminovat určité části hmotnostního spektra. Skenovací instrumenty mohou jednoduše přemostit skenovaný úsek m/z , ale v případě TOF-MS se musí inkriminovaná část spektra efektivně „vyříznout“. Běžný přístup využívá modifikovanou Bradbury-Nielsen bránu, která byla popsána již velmi dávno. Brána sestává z pole velmi tenkých vodičů, které jsou vystavené příchozím paketům iontů. Vodiče jsou střídavě zapojeny na spínatelné kladné a záporné vysoké napětí. Pokud je napětí vypnuto má brána stejný potenciál jako příchozí ionty a proto je téměř úplně propustná. Jakmile se napětí na vodičích aktivuje, všechny ionty v bráně a její těsné blízkosti jsou silně vychýleny a nedosáhnou tedy detektoru. V případě TOF-MS je poměrně jednoduché určit přesnou dobu, kdy budou ionty o konkrétní m/z procházet branou. Brána bývá umístěna v prvním fokusačním bodě. Pulzní vychýlení umožňuje vychýlit vybrané ionty v okně o jednotkové m/z , případně vychýlit větší počet různých iontů, nebo „vyříznout“ širší rozsah m/z . Tímto způsobem je možné zamezit dopadu nežádoucích iontů na detektor (ionty Ar^+ případně hlavní ionty matrice analyzovaného vzorku). [68]

Vzhledem k vysoké rychlosti analýzy a ke skutečnosti, že počet analyzovaných izotopů nemá vliv na celkovou dobu analýzy, citlivost ani na přesnost a správnost analýzy je technika oaTOF-ICP-MS obzvláště vhodná pro multielementární analýzu transientních signálů. [71,72] V praxi se pak setkáváme s následujícími technikami, které poskytují velmi rychlé transientní signály: Laserová ablace (LA) [73,74], průtoková injekční analýza (FIA) [75,76], kapilární elektroforéza (CE) [77], elektrotermické odpařování vzorku (ETV)

[69,78], hydridová technika (HG) [79] a další. Následující obrázek uvádí schematické znázornění průletového hmotnostního spektrometru s ionizací v indukčně vázaném plazmatu a ortogonálním urychlením iontů od australské firmy GBC Scientific Equipment. (Obrázek 14)



Obrázek 14.: Schéma oaTOF-ICP-MS, Optimass 8000 (GBC Scientific Equipment) [69]

1.2 Aplikace TOF-ICP-MS pro analýzu environmentálních vzorků

Díky unikátním schopnostem velmi rychlého simultánního záznamu celého spektra dokáže technika TOF-ICP-MS zpracovávat transientní signály a velmi přesně zaznamenávat izotopické poměry. TOF-ICP-MS, se mimo běžného využití pro analýzu stopových až ultrastopových koncentrací prvků v různých typech matric, používá v následujících aplikacích. Své uplatnění nachází v environmentální problematice, geologii, geochronologii, archeometrii a třeba ve forenzní analýze. Zároveň je ale nutné dodat, že TOF-ICP-MS analýza je stále ještě poměrně nová a počet publikací a odborných článků je do určité míry omezen.

1.2.1 TOF-ICP-MS analýza transientních signálů

Costa-Fernández a kolektiv využili TOF-ICP-MS ve spojení s kapilární elektroforézou (CE) pro multielementární speciaci. Elektroforeticky bylo separováno devět negativně nabitých specií vykazujících vysokou elektroforetickou mobilitu. Simultánně byla provedena separace CE a následné TOF-ICP-MS stanovení tří aniontů arsenu a dvou kyano-kobaltnatých komplexů. Tato separace byla ztížena přítomností dalších aniontů a kyano komplexů Ni^{2+} , V^{4+} , Cu^{2+} a Cr^{6+} . Čas potřebný pro analýzu nepřesáhl 70 s. Práce potvrdila vhodnost TOF-ICP-MS pro krátké transientní signály poskytované CE. Technika vykazovala vysokou citlivost (2 – 20 pg na 20 nL vstříkovaného objemu) a přesnost měření (2 – 4 % RSD). Ve studii byl využit TOF-ICP-MS spektrometr Renaissance s axiálním urychlením iontů firmy Leco Inc. [77]

Schopnost simultánního záznamu TOF-ICP-MS byla s výhodou využita pro měření transientních signálů poskytovaných průtokovou injekční analýzou (FIA). Benkheda a kolektiv hodnotili využití TOF-ICP-MS pro použití v kombinaci s on-line adsorpcí a pre-koncentrací pomocí průtokové analýzy. Sledované analyty (Ag, Cd, Co, Cu, In, Mo, Ni, Pb, Sb) byly v kyselém prostředí zakomplexovány s amonnou solí pyrrolidendithiokarbamátu (APDC) a sorbovány ve speciálním průtokovém reaktoru. Po dvou minutách pre-koncentrace bylo dosaženo obohacovacího faktoru 5-70. Analyty byly poté extrahovány malým množstvím metanolu a vznikající krátké přechodové signály byly bez problémů zaznamenány TOF-ICP-MS. Spojením ultrazvukového zmlžovače s membránovou desolvatační jednotkou bylo dosaženo velmi efektivního vnášení vzorku a minimalizován negativní efekt organického rozpouštědla na stabilitu ICP. [75]

Narukawa a kolektiv ve své práci využili laserovou ablací ve spojení s TOF-ICP-MS pro analýzu sušených preparátů biologické tkáně, které byly připraveny rozpuštěním v kyselině mravenčí a následným sušením. Pro stopové prvky obsažené ve zkoumaných tkáních byly stanoveny následující detekční limity: Mn (1 mg.kg^{-1}), Cu (2 mg.kg^{-1}), Zn (6 mg.kg^{-1}), As (1 mg.kg^{-1}), Cd ($0,2 \text{ mg.kg}^{-1}$) a Pb ($0,05 \text{ mg.kg}^{-1}$). K analýze byl využit hmotnostní spektrometr s ionizací v indukčně vázaném plazmatu, ortogonálním urychlením iontů a průletovým analyzátozem Optimass 8000 od australské firmy GBC Scientific Equipment. Samotná příprava vzorku rozpouštěním v kyselině mravenčí představovala značnou výhodu oproti přímé ablaci pevného materiálu. Do kyseliny mravenčí bylo možno přidat vnitřní, případně kalibrační standardy, čímž byla vyřešena problematická kvantifikace spojená s využitím laserové ablace. [80].

Bings a kolektiv vyvinuli metodu využívající ETV s wolframovým vláknem jakožto vzorkovacího zařízení pro analýzu vzorků lidské krve a krevního séra. Technika byla využita ve spojení s TOF-ICP-MS pro simultánní záznam rychlých transientních signálů ETV. Ve vzorcích krve a séra byl sledován obsah Cu, Cr, Li a Pb. Metodika byla validována analýzou certifikovaných referenčních materiálů. Ve studii byl využit axiální typ TOF-ICP-MS Renaissance firmy Leco Inc. Práce prokázala vhodnost TOF-ICP-MS pro analýzu transientních signálů.[81]

1.2.2 TOF-ICP-MS analýza izotopových poměrů

TOF-ICP-MS s axiálním urychlením iontů (Renaissance, Leco Inc.) byl využit pro měření izotopických poměrů olova ve dvaceti různých vzorcích vína z pěti různých kontinentů. Účelem studie bylo zjistit, zda je možné rozlišit původ vína na základě porovnání izotopických poměrů olova. Každý vzorek vína pocházel z jedné lahve a byl vždy rozdělen do tří 50 ml dílů, které byly poslány na analýzu do dalších ICP-MS laboratoří. Přesnost analýzy TOF-ICP-MS pak byla hodnocena na základě mezilaboratorního testování. Výsledky z TOF analýzy byly porovnávány s výsledky z ICP-QMS a MC-ICP-MS (ICP-MS využívající simultánní záznam pomocí multikolektorového detektoru). Metoda TOF-ICP-MS poskytovala správné a přesné výsledky za velice krátký čas analýzy. Isotopické poměry Pb^{206}/Pb^{207} , Pb^{208}/Pb^{206} , Pb^{206}/Pb^{204} měřeny TOF spektrometrem vykazovaly dobrou shodu s výsledky dosaženými MC-ICP-MS. S ohledem na malý počet vzorků nebylo na základě statistické analýzy možno zhodnotit, zda je možné určit původ vína dle rozdílných izotopických poměrů olova. [82]

Průtoková injekční analýza (FIA) ve spojení s TOF-ICP-MS byla úspěšně využita pro analýzu izotopických poměrů olova a jeho celkového obsahu v povrchových vodách. On-line FIA byla využita jako prekoncentrační jednotka, která byla schopna poskytnout až dvacetinásobný obohacovací faktor. Kombinace TOF-ICP-MS jakožto on-line specifického detektoru se zakoncentrováním pomocí FIA představuje velmi užitečnou techniku pro analýzu stopových koncentrací Pb a jejich izotopických poměrů v povrchových vodách. Selektivita a citlivost dosažená díky prekoncentraci FIA umožňuje přesnou a správnou transientní analýzu velmi nízkých koncentrací i izotopických poměrů Pb ve vzorcích vod se složitou maticí (například mořská voda) technikou TOF-ICP-MS. [83]

Hmotnostní spektrometr s ionizací v ICP, ortogonálním urychlením iontů a průletovým analyzátozem Optimass 8000 firmy GBC Scientific Equipment byl využit pro multielementární analýzu a analýzu isotopických poměrů. Ve vzorcích nápojů a potravin bylo analyzováno více jak 50 stopových a ultrastopových prvků. Metoda TOF-ICP-MS poskytla velice rychlou multielementární analýzu se zachováním přesných isotopických poměrů. Analýza osmi různých referenčních materiálů reprezentujících analyzované vzorky vykazovala velmi dobrou shodu s certifikovanými hodnotami. Odchyłka od certifikovaných hodnot nepřesáhla 15% a doba měření jednoho vzorku se pohybovala v rozmezí jedné minuty. [84]

1.2.3 Další využití TOF-ICP-MS

TOF-ICP-MS spektrometr s ortogonálním urychlením iontů byl využit pro analýzu různých vzorků bioty (ryby, hmyz, nárosty a další) pocházejících z pěti rozdílných míst na řece Labi. Ve vzorcích byly zjišťovány obsahy vzácných kovů, kovů vzácných zemin, uranu a thoria. Studie prokázala, že je TOF-ICP-MS velice citlivou a vhodnou metodou pro biomonitoringové účely. Zvláště pak ceněná je její multielementárnost a celková rychlost analýzy. Rychlost analýzy hraje také roli v celkové prostupnosti vzorků v laboratoři, případně v malé spotřebě vzorku pro analýzu. Malá spotřeba vzorku je vítána například u vzorků omezeného množství. [85]

Krejčová a kolektiv vypracovali multielementární metodu pro analýzu makro, mikro a stopových prvků v multivitaminových a potravinových doplncích. Pro kontrolu obsahu mikro a stopových prvků byl k analýze použit hmotnostní spektrometr oaTOF-ICP-MS, Optimass 8000 firmy GBC Scientific Equipment. oaTOF-ICP-MS metoda vykazovala vysokou rychlost analýzy a excelentní detekční limity. [86]

2 CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE:

Hlavním cílem předložené disertační práce byla příprava, zpracování a aplikace metod prvkové analýzy různých typů environmentálních vzorků pomocí hmotnostní spektrometrie s ionizací v indukčně vázaném plazmatu, ortogonálním urychlením iontů a průletovým analyzátozem. Tato technika představuje účinný nástroj pro velice rychlé multiprvkové analýzy se zachovanými izotopovými poměry. Tyto vlastnosti jsou obzvláště důležité při časově náročné multiprvkové analýze velkého množství vzorků, při zpracování vzorků s omezeným množstvím, nebo při provinčních a srovnávacích studiích, kde je nezbytné vycházet z dat s přesně zachovanými izotopovými poměry a v mnohých dalších případech. Dobře zpracované metody zahrnující, jak sběr, přípravu a samotnou analýzu vzorků jsou zásadní pro získání přesných a správných dat. Hlavní cíl práce je dále rozdělen na několik dílčích cílů, které jsou popsány níže.

- **Dílčí cíl 1.**

Dílčím cílem jedna byl sběr a návrh zpracování vzorků koňských žíní s následným vytvořením oaTOF-ICP-MS metody pro jejich analýzu za účelem možného využití pro statistické zpracování dat a biomonitoringové studie. Úkolem práce bylo rovněž získané vzorky následně zpracovat dle optimalizovaných postupů, zanalyzovat připravenou metodou oaTOF-ICP-MS a prokázat relevantnost této techniky pro takovýto typ analýz.

- **Dílčí cíl 2.**

Dílčím cílem dva bylo srovnání různým způsobem pěstovaných mrkví s ohledem na obsah makro a mikronutrientů, sušiny a dusičnanů. V první fázi bylo nutné získat velké množství konvenčně dostupných vzorků, vzorků s ochrannou známkou „bio“ a vzorků od drobných pěstitelů. Úkolem bylo vytvořit dostatečně velké soubory vzorků jednotlivých pěstebních systému pro následnou analýzu a statistické zhodnocení rozdílnosti složení mezi systémy. Nutné bylo rovněž vypracování metody pro zpracování vzorků a samotnou analýzu ICP-OES a oaTOF-ICP-MS. Závěrečným cílem bylo vzorky analyzovat a výsledná rozsáhlá data statisticky zpracovat. Na

základě statistické analýzy srovnat pěstební systémy a data rovněž porovnat s legislativou a dostupnou literaturou.

- **Dílčí cíl 3.**

Třetím dílčím cílem bylo sestavení techniky a vyvinutí unikátní metody dávkování malých objemů vzorků ve spojení s oaTOF-ICP-MS přístrojem. Dále bylo nutné tuto techniku odzkoušet, zjistit její charakteristické vlastnosti, optimalizovat příslušnou metodu, a validovat na různé typy environmentálních matric.

3 APLIKACE oaTOF-ICP-MS

3.1 Multielementární analýza koňských žíní

3.1.1 Úvod

Analýza vlasů, žíní, chlupů, je široce využívána ke zhodnocení dopadu životního prostředí popřípadě stravovacích návyků na zdravotní stav organismu (biomonitoring vystavení polutantů, bioakumulační studie). Z historického hlediska se s analýzou vlasů setkáváme již v 19tém století. Vlasová tkáň reprezentuje velmi specifický nástroj pro monitoring a zhodnocení intoxikace organismu různými prvky (As, Cd, atd.) Mimo prvky které mohou být v této tkáni sledovány lze dále monitorovat kupříkladu intoxikaci organickými látkami, takovými jako jsou PCDD, PCDF, PCB, PAH, THC, barbituráty a mnohé další. Během života jedince jsou do vlasové struktury zakomponovávány různé druhy látek, mezi něž patří stopové prvky, minerály, toxiny a jejich metabolity. Tato matrice pak může sloužit jako biomonitoringový materiál kde se daná intoxikace může prokázat i po velice dlouhé době. Vlasový kořínek odhaluje aktuální intoxikaci, popřípadě intoxikaci, která nastala před velice krátkou dobou. Změna vlasové struktury u kořínků tedy probíhá poměrně rychle v návaznosti na aktuální stravovací návyky, chování a expozici jedince. Oproti tomu vlasové konečky a samotné tělo vlasu obvykle retrospektivně informují o intoxikaci, která nastala před několika měsíci ba dokonce roky. [87]

Borgese a jeho kolektiv demonstrovali akumulaci olova v lidských vlasech po užívání Ájurvédských léčiv. [88] Kolacz a kol. ve své práci publikovali desetinasobný nárůst těžkých kovů ve vlně Merino ovcí spásající znečištěné oblasti pastviny, než u kontrolní skupiny pasoucí se na neznečištěných pastvinách. [89] Patkowska a kol. reportovali signifikantní rozdíly mezi obsahy prvků v ovčí vlně v závislosti na plemeni a místu původu. [90] Chojnacka a kol. ve své práci zjistili že životní styl má daleko větší vliv na prvkové složení lidských vlasů nežli pohlaví či rasa. [91]

Kontaminace vlasové tkáně může být rozdělena do dvou typů. Kontaminace exogenní a kontaminace endogenní. Endogenní kontaminace pochází ze stravy, případně z prostředí (vzduch, prach, kouř, kosmetika) Tento typ kontaminace je výsledkem dlouhodobé expozice. Endogenní kontaminanty se do organismu dostávají různými způsoby, například respiračně, s výživou, skrz kůži a následně se zabudovávají do vlasové

tkáně v průběhu růstu jedince. Naproti tomu exogenní případně povrchové kontaminanty ulpívají na povrchu kůže/srsti/vlasu a lze je jednoduše odstranit vhodným mycím postupem. [92] Pro monitoring dlouhodobé expozice kontaminace se s výhodou využívá celý vlasový profil, oproti tomu vlasový kořínek vypovídá o případné intoxikaci akutní. [93] Jedním z nejdůležitějších kroků jakékoliv analýzy je příprava vzorku. Nevhodná příprava vzorku může zásadním způsobem ovlivnit jakost výsledků. Při analýze vlasové tkáně je doporučováno velice jemné, ale dostatečné odstranění exogenní kontaminace před samotnou analýzou. Mnoho různých postupů bylo prakticky vyzkoušeno pro úpravu vlasů před analýzou. Nejčastější bylo využití surfaktantu Triton (1:200), isopropanolu a acetonu. [94] Jakožto vypíracího roztoku bylo dále využito alkalického roztoku tetrametylamonium hydroxidu [95], různě koncentrovaných roztoků Tritonu (0,1 – 2%) [96], případně kombinací kyseliny dusičné a fluorovodíkové. [87] Nejvíce rozšířenou variantou přípravy vlasové tkáně k analýze je prací postup zahrnující k. dusičnou a Triton, který následně doplňuje mikrovlnná mineralizace s různými rozkladnými činidly: kyselinou dusičnou a peroxidem vodíku, HNO₃ a HCl, nebo HNO₃ a HF [97, 98]. Volba pracího postupu a rozkladného způsobu závisí na analyzovaných látkách a volbě analytické techniky. V současné době patří mezi nejběžněji využívané techniky analýzy vlasové tkáně například ICP-OES [98, 99], ET-AAS (atomová absorpční spektrometrie s elektrotermickou atomizací) [100, 101] a ICP-MS [99, 102]. Další analytickou technikou, která byla pro tyto účely užita, je například technika PIXE (částicově-indukovaná rentgenová emisní spektrometrie), která nevyžaduje komplikovanou přípravu vzorku zahrnující mineralizaci [92], nebo INAA (instrumentální neutronová aktivační analýza) která vyžaduje taktéž minimální nakládání se vzorkem. [103] LA-ICP-MS může být využita pro rychlou identifikaci a skreening toxických i nutričních prvků ve vlasech. Výhodou je, že technika rovněž nevyžaduje zdlouhavou přípravu vzorku. Steely a kol. [104] využil LA-ICP-MS pro analýzu As⁷⁵, Zn⁶⁴ a Pb²⁰⁸ v lidských vlasech k rozlišení původu vzorku. V této studii autor demonstruje využitelnost LA-ICP-MS jakožto rychlé kvalitativní i kvantitativní techniky pro analýzu arsenu ve vlasovém snopci (vlasy jakožto bioindikátor).

Chandola a kolektiv poprvé zveřejnili studii zabývající se bioakumulací prvků v koňských žíních. Ve své práci využili prvkovou analýzu ICP-OES. [105] Skupina okolo Asana studovala vztah mezi koncentrací prvků v koňských žíních a možným výskytem fibrilace síní. Metodou PIXE sledovali významně vyšší obsah Ca, Zn a poměr Zn/Cu v žíních skupiny nemocných koní v porovnání s kontrolní skupinou. Ve studiích taktéž

poukázali na spojitost mezi zvýšeným výskytem Ca a Zn v žíních a nemocemi srdce. [92] V jiné práci byl hodnocen vliv pohlaví, plemene, barvy a věku jezdeckých koní, jakožto faktorů ovlivňujících koncentraci stopových prvků ve hřívách v porovnání se vzorky lidských vlasů. [106,107]

Rodrigues a kol. [95] využili techniku ICP-MS pro monitoring esenciálních prvků a zhodnocení expozice toxickými prvky. Skupina našla jistý vztah mezi úrovní stopových prvků v lidských vlasech a v krvi, případně v plazmě. Zároveň publikovali, že lidské vlasy nejsou vhodný biomarker ke zhodnocení nedostatku Cu, Mn a Sr jedince, případně jeho expozici Pb. V další práci Dunnet a kol. [108] hodnotili využití HPLC-MS (vysokoúčinná kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí) a GC-MS (plynová chromatografie s hmotnostní detekcí) pro analýzu vlasové tkáně jakožto potenciální techniky pro retrospektivní monitoring expozice množství přírodních a jiných toxinů.

Analýza koňských žíní je spojena se závodním jezdectvím, kde může být využita pro zhodnocení zdravotního stavu koně, nebo jako důkaz zneužití zakázané látky. [109] Informace o prvkovém složení koňské žíně může být užita v různých směrech. Lze sledovat souvislosti mezi prvkovým složením žíně a zdravím, stářím, ustájením, výživou koně a mnohé další.

Cílem této dílčí práce byl sběr, optimalizace zpracování, zpracování a samotná analýza vzorků koňských žíní. Důraz byl kladen na vypracování komplexní multielementární metody oaTOF-ICP-MS a vyzdvižení využití této techniky v případech, kdy je třeba provést multielementární analýzu velkého množství environmentálních vzorků. Získaná data mohou být, vzhledem k simultánnímu záznamu celého hmotnostního spektra, využita pro statistické zpracování a izotopové studie.

3.1.2 Experimentální část

3.1.2.1 Instrumentace

K úpravě vzorků žíní praním (nutné vzhledem k exogennímu znečištění) bylo v první fázi využito ultrazvukové lázně, *Powersonic UCC 1* (Česká republika).

Dále bylo nutné pevný vzorek žíní převést na kapalný pomocí vhodného rozkladu. Vzorky byly v přítomnosti mineralizačních činidel rozkládány v mikrovlnném rozkladném systému, *Speedwave MWS-2*. Systém *Speedwave MWS-2* [110] je vhodný pro chemickou mineralizaci za vysokého tlaku a teploty až 230 °C. V závislosti na typu použitých

rozkladných nádob lze krátkodobě rozkládat i za vyšších teplot a tlaků (260 °C/100 bar). Jako rozkladných činidel lze využít různé typy kyselin: HCL, HF, H₂SO₄, HNO₃, případně jejich směsi. Množství vzorku se volí v závislosti na použité nádobě a obsahu uhlíku v jednotlivých vzorcích. Díky užití speciální technologie výroby z teflonu (TFM) jsou nádoby DAK-60K odolnější vůči všem minerálním kyselinám, včetně HF a zachovávají si vysokou mechanickou odolnost i při užití vysokých rozkladných teplot. Rozkladná patrona se skládá z vnitřní nádoby, hliníkové diskové tlakové pojistky, víčka, pláště a šroubovacího uzávěru. Diskovitá hliníková pojistka se vkládá do víčka rozkladné nádoby, kde limituje vnitřní maximální tlak a při jeho překročení dojde k jejímu protržení. Nádoby jsou vybaveny těsnícím vývodem do sběrné nádoby uprostřed rotoru, která ústí přes PFA hadici do odtahu digestoře. Měření teploty (infračervený senzor) je založeno na principu snímání intenzity tepelného záření vydávaného vzorkem v úzkém spektrálním rozmezí, kde je dostatečná propustnost stěnou nádoby. Mikrovlnné zařízení je regulováno vestavěnou řídicí jednotkou s dotykovým displejem. Vzorek se spolu s rozkladnou směsí dává do teflonové nádoby, je utěsněn víčkem s ochrannou tlakovou pojistkou a poté i s keramickou vložkou vložen do ochranné plastové nádoby, která se po zašroubování horního uzávěru lehce dotáhne. Rotor naplněný rozkladnými nádobami se vloží do středu mineralizátoru a upevní se odpadní hadice. Po uzavření přístroje se navolí požadovaný teplotní program a spustí se mineralizace. Mikrovlnný mineralizátor Speedwave MWS-2 je zobrazen na obrázku 15.



Obrázek 15.: Mikrovlnný mineralizátor Speedwave MWS-2 (Berghof, Německo)

[110]

Samotná multielementární analýza vypraných a následně mineralizovaných vzorků probíhala na zařízení oaTOF-ICP-MS, *Optimass 8000* (GBC Scientific Equipment Pty. Ltd., Austrálie), které bylo vybaveno koncentrickým zmlžovačem *Micro Mist* napojeným na 70 ml termostatovanou (10°C) cyklonickou mlžnou komoru (obojí Glass expansion Pty. Ltd., Austrálie). Hmotnostní spektrometr s ionizací v indukčně vázaném plazmatu, ortogonálním urychlením iontů a průletovým analyzátozem „time-of-flight“ firmy GBC sestává z následujících základních částí. Jsou to systém pro vnášení vzorku a iontový zdroj ICP, interface, hmotnostní analyzátor a detektor. Úkolem systému pro vnášení vzorku a ICP iontového zdroje, jímž je argonové plazma, je přivést, upravit, kompletně zatomizovat vzorek a co nejúčinněji provést ionizaci volných atomů nejlépe do prvního ionizačního stupně. Kapalný vzorek je do přístroje nasáván pomocí peristaltické pumpy a zmlžován pomocí koncentrického zmlžovače Micromist (průtok $0,4 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$). Do dvouplášťové cyklonické mlžné komory, chlazené vnějším vodním okruhem na teplotu $10 \text{ }^\circ\text{C}$, vstupuje aerosol vznikající ve zmlžovači. Snižováním tenze vodních par chlazením v mlžné komoře jsou minimalizovány interference OH^- iontů. Do plazmového hořáku vstupují pouze kapky malé velikosti. K oddělení hrubých kapek dochází právě v mlžné komoře, díky tangenciálnímu pohybu zmlžovaného vzorku směrem k plazmovému hořáku. Ionty vznikající v plazmové hlavici jsou vzorkovány pomocí třífázového interface do hmotnostního analyzátoru. U tohoto spektrometru je tedy užít tříkónusový systém. Plazmová hlavice s Ar plazmatem pracuje za atmosférického tlaku, zatímco spektrometr za velmi nízkého tlaku. Ionty jsou díky této skutečnosti urychlovány napříč interface až na rychlost přesahující rychlost zvuku. V této části spektrometru jsou tedy ionty díky soustavě vakuovaných kónusů extrahovány z vysokoteplotního plazmatu rovnou do iontové optiky hmotnostního spektrometru. K vytvoření vakua slouží turbomolekulární pumpy, kterým je předřazena rotační olejová pumpa. Pro vytvoření tenkého plochého iontového paprsku s výškou asi 10 mm je iontový svazek za interface fokusován a formován speciálním typem iontové optiky. Po modulaci je iontový paprsek přiveden do ortogonálního akcelérátoru, který zajišťuje velmi rychlé a přesné urychlení paketů iontů ($f = 30 \text{ kHz}$). Díky ortogonálnímu způsobu urychlení iontů mají všechny ionty před vstupem do akcelérátoru prakticky nulovou rychlost ve směru urychlení. Před vstupem do průletového analyzátoru procházejí urychlené ionty zařízením umožňujícím velmi účinnou extrakci nežádoucích iontů („Smartgate“). Díky účinné iontové extrakci pak na detektor nedopadají nežádoucí ionty přítomné ve vysokých koncentracích (ionty Ar, N, O, jejich agregáty a

další) a zároveň se výrazně snižuje pozadí hmotnostního spektra a prodlužuje životnost detektoru. Po průchodu Smargate prolétají ionty silně vakuovanou průletovou zónou, kde jsou v iontovém reflektoru (též iontové zrcadlo) otočeny a dopadají na detektor (iontonásobič). Signál z detektoru je vyhodnocen elektronicky. Hmotnostní spektrometr Optimass 8000 je zobrazen na obrázku 16, jeho schéma bylo již dříve prezentováno v kapitole 1.1.2.3, Obrázek 14.



Obrázek 16.: oaTOF-ICP-MS, Optimass 8000 (GBC Scientific Equipment) [111]

Deionizovaná voda, která byla v práci využita, byla dále purifikována pomocí *SG Ultra Clear system* (Hamburg, Německo). Také použitá kyselina dusičná byla v práci podrobena čistícímu kroku pomocí zařízení pro podvarovovou destilaci *BSB 939 IR, Berghof* (Eningen, Německo).

3.1.2.2 Použité chemikálie a standardy

Všechny použité chemikálie a standardy byly v náležitě analytické čistotě. V práci bylo využito kyseliny HNO_3 (65%, Lach-Ner, Neratovice, Česká Republika). Tato látka byla dále před použitím čištěna podvarovovou destilací (viz. výše). Pro prací procesy bylo využito surfaktantu Triton X-100 (čistoty pro medicínské účely, Merck, Darmstadt, Německo) a acetonu (Lach-Ner, s.r.o., Neratovice, Česká Republika). Všechny kalibrační standardy byly připraveny z jednoprvkových a multiprvkových analytických standardů (As, Au, B, Be, Cd, Co, Cr, Ga, Ge, Li, Ni, Pb, Pd, Pt, Rb, Sb, Sc, Ta, Te, U, V, Y,) v koncentraci $1 \pm 0,002 \text{ g.L}^{-1}$, případně $100 \pm 0,02 \text{ mg.L}^{-1}$ (Ce, La, Nd, Pr) a $20 \pm 0,02 \text{ mg.L}^{-1}$ (Dy, Er, Eu, Gd, Ho, Lu, Sc, Sm, Tb, Tm, Y, Yb) (Analytika Co., Ltd., Praha, Česká Republika; SCP Science, Kanada; Merck, Německo). K validaci navrhnuté

metody bylo využito referenčního materiálu lidské vlasy NCS ZC 8100 (China National Analysis Centre for Iron & Steel 2005).

3.1.2.3 Použité laboratorní nádobí a pomůcky

- Skleněné kádinky, Petriho misky, keramické nůžky
- Plastové odměrné baňky, nálevky, kádinky, lžičky, stříčky
- Polypropylenové uzavíratelné lahvičky o objemu 50 ml a 100 ml
- Polypropylenové uzavíratelné zkumavky o objemu 12 ml
- Automatické dávkovače (Biohit Proline)

Použité plastové nádobí se před znovu- použitím nechalo 24 hodin loužit ve 2M podvarové kyselině dusičné, důkladně se opláchno redestilovanou vodou a vysušilo.

3.1.2.4 Příprava vzorků koňských žíní a standardů

Žíně

Celkový počet vzorkovaných koní činil 100 kusů. Tyto koně pocházeli z různých stájí napříč Českou Republikou. 32 koní pocházelo z farmy Siglavy (České Budějovice), 23 z farmy v Jeníkově v podkrkonoší a 45 koní bylo navzorkováno od chovatelů v blízkosti Pardubic. Byly vybrány koně různého pohlaví, barvy, věku, ustájení a krmení. Vzorky žíní byly odebrány v oblasti kohoutku (těsně u kůže stříhány prameny o šířce cca 5 cm). Zde se očekávala nejmenší akumulace exogenního znečištění. Koně byli vzorkováni Ing. Pátkovou, případně jejich majiteli, kteří byli předem proškoleni o způsobu odběru. Vzorkování probíhalo během srpna a října 2011. Přehled všech vzorkovaných koní a jejich bližší popis je uveden v tabulce 4. Žíně byly vzorkovány do polyetylenových sáčků a dále zpracovávány.

Před vlastním praním byly žíně nastříhány pomocí keramických nůžek (eliminace kontaminace kovy) na kousky o velikosti několika milimetrů. Z těchto nastříhaných kousků byl odvážen přibližně 1 g do připravené plastové lahvičky. Ke vzorku bylo přidáno 50 ml pracího roztoku a lahvička byla umístěna do ultrazvukové lázně. Optimalizovaný prací postup je popsán v tabulce 1.

Krok	Ultrazvuková lázeň
1	10 min. aceton
2	10 min. voda
3	10 min. 0,1M HNO ₃ , 1%ní Triton
4	10 min. voda

Tabulka 1.: Optimalizovaný prací postup žíní

Po vyprání byly vzorky sušeny za laboratorní teploty asi 24 hodin v digestoři, na Petriho misce přikryté filtračním papírem.

Pro mikrovlnný rozklad bylo odebráno a naváženo cca 0,2 g vypraného a usušeného vzorku. Do rozkladné nádoby bylo dále přidáno 7 ml podvarové HNO₃ a vzorek byl ponechán 20 minut v digestoři. Souběžně byly také připraveny slepé pokusy obsahující pouze 7 ml podvarové HNO₃. Rozkladný program, který byl využit pro mineralizaci vzorků i referenčního materiálu, je uveden v tabulce 2. Výsledné mineralizáty byly přelity do 50 ml odměrných baněk a doplněny na příslušný objem. Doplněné vzorky byly vpraveny do plastových lahviček a zamrazeny pro budoucí analýzu oaTOF-ICP-MS. Pro samotné měření na Optimassu 8000 byly vzorky ještě 5x zředěny a přidány interní standardy o koncentracích 5 µg · L⁻¹ pro Rh a 1 µg · L⁻¹ pro In.

Krok	1	2	3
Teplota [°C]	150	205	20
Držení teploty [min]	15	25	10
Výkon [%]	80	80	40

Tabulka 2.: Rozkladný program mikrovlnné mineralizace žíní

Referenční materiál

Referenční materiál lidských vlasů NCS ZC 8100 byl vyprán a mineralizován stejným způsobem jako vzorky žíní.

Kalibrační standardy

Z komerčně dostupných jednoprvkových a multielementárních kalibračních standardů (viz. kapitola 3.1.2.2) byl připraven do 50ml plastové odměrné baňky multielementární zásobní roztok obsahující As, Au, B, Be, Cd, Ce, Co, Cr, Dy, Er, Eu, Ga,

Gd, Ge, Ho, La, Li, Lu, Nd, Ni, Pb, Pd, Pr, Pt, Rb, Sb, Sc, Sm, Ta, Tb, Te, Tm, U, V, Y, Yb. Ze zásobního roztoku bylo do 25ml plastových odměrných baněk připraveno 13 kalibračních roztoků. Každý kalibrační roztok byl stabilizován 0,6 ml podvarové kyseliny dusičné a obohacen interními standardy na výslednou koncentraci 5 $\mu\text{g.L}^{-1}$ pro Rh a 1 $\mu\text{g.L}^{-1}$ pro In. Koncentrace kalibračních standardů uvádí tabulka 3.

Roztok/prvky	A	B	C
Zásobní roztok	100	10	2
S0	0	0	0
S1	0,01	0,001	0,0002
S2	0,05	0,005	0,001
S3	0,1	0,01	0,002
S4	0,25	0,025	0,005
S5	0,5	0,05	0,01
S6	1	0,1	0,02
S7	2	0,2	0,04
S8	3	0,3	0,06
S9	5	0,5	0,1
S10	10	1	0,2
S11	15	1,5	0,3
S12	20	2	0,4

A: As, Au, B, Be, Cd, Co, Cr, Ga, Ge, Li, Ni, Pb, Pd, Pt, Rb, Ru, Sb, Se, Ta, Te, U, V

B: Ce, La, Nd, Pr

C: Dy, Er, Eu, Gd, Ho, Lu, Sc, Sm, Tb, Tm, Y, Yb

Tabulka 3.: Koncentrace kalibračních standardů v $\mu\text{g.L}^{-1}$

Následuje tabulka 4 – Přehled vzorkovaných koní.

Tabulka 4.: Přehled vzorkovaných koní

Číslo vzorku	Jméno	Datum narození	Plemeno	Barva	Strava	Způsob ustájení	Zvláštnosti	Lokalita
1	Mac ♂	18. 6. 2008	PAINT	ryzák	seno, tráva	Pastva		S
2	Klip ♂	26. 3. 2009	ČT	plavák	seno, tráva	Pastva		S
3	Black ♂	16. 5. 2006	STKL	dark grey	seno, tráva	Pastva		S
4	Morgan ♂	8. 2. 2009	ČT	ryzák	seno, tráva	Pastva		S
5	Efram ♂	6. 6. 2005	ČT	hnědák	seno, tráva	Pastva		S
6	Sparky ♂	28. 6. 2007	QH	ryzák	seno, tráva	Pastva		S
7	Fanfán ♂	12. 6. 1990	ČT	hnědák	seno, tráva	Pastva		S
8	Barušák ♂	20. 4. 2010	STKL	dark grey	seno, tráva	Pastva		S
9	Egouš ♂	20. 5. 2010	STKL	vranka	seno, tráva	Pastva		S
10	Quentin ♂	24. 6. 2008	ČT	hnědka	seno, tráva	Pastva		S
11	Solo Madrina ♀	30. 8. 2008	STKL	vranka	seno, tráva	Pastva		S
12	Aurelie ♀	12. 5. 1994	STKL	bělka	seno, tráva	Pastva	po porodu	S
13	Panenka ♀	12. 3. 1997	ShA	bělka	seno, tráva	Pastva	po porodu	S
14	Efigia ♀	2. 7. 1994	STKL	bělka	seno, tráva	Pastva	po porodu	S
15	Eferda ♀	21. 4. 2002	STKL	bělka	seno, tráva	Pastva	po porodu	S
16	Euridika ♀	18. 3. 1989	STKL	vranka	seno, tráva	Pastva	po porodu	S
17	Sanica ♀	4. 3. 2001	STKL	Vranka	seno, tráva	Pastva	po porodu	S
18	Trevina ♀	24. 2. 2001	A 1/1	Hnědka	seno, tráva	Pastva	po porodu	S
19	Seta ♀	21. 3. 2000	STKL	bělka	seno, tráva	Pastva		S

Číslo vzorku	Jméno	Datum narození	Plemeno	Barva	Strava	Způsob ustájení	Zvláštnosti	Lokalita
20	Eurica ♀	23. 6. 2009	STKL	vranka	seno, tráva	Pastva		S
21	Aritma ♀	20. 5. 2010	ČT	ryzka	seno, tráva	Pastva		S
22	Princezna ♀	24. 3. 2004	STKL	bělka	seno, tráva	Pastva		S
23	Afrodita ♀	4. 4. 2002	NORIK	bělka	seno, tráva	Pastva		S
24	Florentia ♀	10. 5. 2007	STKL	bělka	seno, tráva	Pastva		S
25	Alhambra ♀	19. 5. 2006	STKL	bělka	seno, tráva	Pastva		S
26	Elvera ♀	25. 5. 2008	STKL	vranka	seno, tráva	Pastva		S
27	Sixtia ♀	17. 5. 2007	STKL	bělka	seno, tráva	Pastva		S
28	Etapa ♀	19. 2. 1996	STKL	bělka	seno, tráva	Pastva	po porodu	S
29	Estatua ♀	23. 7. 1993	STKL	bělka	seno, tráva	Pastva		S
30	Elpasa ♀	23. 6. 1994	STKL	bělka	seno, tráva	Pastva		S
31	Leny ♂			hnědká	seno, tráva	Pastva		S
32	Zrzka ♀			ryzka	seno, tráva	Pastva		S
33	Samba ♀	19. 5. 1995	ShA	bělka	seno, tráva	Pastva	po porodu	J
34	Sára ♀	5. 6. 1992	ShA	bělka	seno, tráva	Pastva	po porodu	J
35	Svatav ♀	27. 3. 1999	ShA	bělka	seno, tráva	Pastva	po porodu	J
36	Diava ♀	29. 3. 2004	ShA	bělka	seno, tráva	Pastva	po porodu	J
37	Dita ♀	10. 2. 1997	ShA	bělka	seno, tráva	Pastva	po porodu	J
38	Kavalerie ♀	9. 3. 2001	ShA	bělka	seno, tráva	Pastva	po porodu	J
39	Duna ♀	19. 3. 2002	ShA	hnědká	seno, tráva	Pastva	po porodu	J

Číslo vzorku	Jméno	Datum narození	Plemeno	Barva	Strava	Způsob ustájení	Zvláštnosti	Lokalita
40	Demonta ♀	3. 2.2003	ShA	bělka	seno, tráva	Pastva		J
41	Dela ♀	6. 2.1998	ShA	bělka	seno, tráva	Pastva		J
42	Dálka ♀	12. 2.2005	ShA	bělka	seno, tráva	Pastva		J
43	Samet ♂	24. 2.2003	ShA	bělouš	seno, tráva	Pastva		J
44	Valda ♂	8. 4.2006	ShA	bělouš	seno, tráva	Pastva		J
45	Kometa ♀	25. 2.2009	ShA	bělka	seno, tráva	Pastva		J
46	Varta ♀	7. 4.2009	ShA	bělka	seno, tráva	Pastva		J
47	Sagita ♀	24. 4.2010	ShA	bělka	seno, tráva	Pastva		J
48	Vodka ♀	27. 3.2008	ShA	bělka	seno, tráva	Pastva		J
49	Sandra ♀	28. 2.2008	ShA	bělka	seno, tráva	Pastva		J
50	Náhoda ♀	20. 4.2007	ShA	bělka	seno, tráva	Pastva		J
51	Dafné ♀	1. 3.2004	ShA	bělka	seno, tráva	Pastva		J
52	Sázava ♀	23. 3. 2004	ShA	bělka	seno, tráva	Pastva		J
53	Kesi ♀	23. 3. 2004	ShA	bělka	seno, tráva	Pastva		J
54	Kala ♀	6. 5. 1994	ShA	bělka	seno, tráva	Pastva		J
55	Sazka ♀	16. 4. 2005	ShA	hnědká	seno, tráva	Pastva		J
56	Wilson ♂	27. 3. 2001	ČT	ryzák	dokrmování	Stáj		P
57	Etos ♂	18. 5. 1997	HOLŠTÝN	hnědák	dokrmování	Stáj	čerstvě po kastraci	P
58	Quicksilver ♂	15. 4. 2006	CS	hnědák	dokrmování	Stáj		P
59	Atlantis ♂	23. 6. 2002	CS	tmavý hnědák	dokrmování	Stáj		P

Číslo vzorku	Jméno	Datum narození	Plemeno	Barva	Strava	Způsob ustájení	Zvláštnosti	Lokalita
60	Idea ♀	24. 3. 2005	CS	hnědka	dokrmování	Stáj		P
61	Taktica ♀	17. 5. 2007	ČT	hnědka	dokrmování	Stáj		P
62	Šimla ♀	31. 8. 2002	CS	bělka	dokrmování	Stáj		P
63	Calimba ♀	22. 4. 2006	ČT	bělka	dokrmování	Stáj		P
64	Caesar ♂	25. 5. 2007	HOLŠTÝN	bělouš	dokrmování	Stáj		P
65	Carlin ♂	22. 4. 2007	HOLŠTÝN	Tmavý hnědák	dokrmování	Stáj	čerstvě po kastraci	P
66	Beny ♂	11. 3. 1996	HOLŠTÝN	hnědák	dokrmování	Stáj	hřebec	P
67	Zarka ♀	24. 2. 1994	ČT	hnědka	dokrmování	Stáj		P
68	Collaudo ♂	31. 3. 2005	A 1/1	tmavý hnědák	dokrmování	Stáj		P
69	Linda ♀	3. 5. 2001	PONY	hnědka	seno	Pastva	po porodu	P
70	Džino ♂	20. 1. 2009	ČT/WPB	hnědák	dokrmování	Pastva		P
71	Rimi ♀	24. 4. 1997	FRÍSKÝ KŮŇ	vranka	dokrmování	Stáj		P
72	Talin ♂	6. 5. 1998	HOLŠTÝN	tmavý hnědák	dokrmování	Stáj		P
73	Hora ♀	27. 2. 2005	A 1/1	hnědka	dokrmování	Stáj		P
74	Stay With Me ♀	15. 5. 2008	QH/ČT	plavka	seno	Pastva	zanedbaný	P
75	Dománek ♂	7. 3. 2001	NJP	isabela	dokrmování	Stáj		P
76	Sylven ♂	1. 7. 2001	HAFLING	isabela	dokrmování	Stáj		P
77	Míša ♂	27. 2. 1999	HAFLING	isabela	dokrmování	Stáj		P
78	Venessa ♀	2. 9. 2005	HAFLING	isabela	dokrmování	Stáj		P

Číslo vzorku	Jméno	Datum narození	Plemeno	Barva	Strava	Způsob ustájení	Zvláštnosti	Lokalita
79	Čenda ♂	29. 3. 2006	CS	bělouš	dokrmování	Stáj	biotin	P
80	Granna ♀	6. 3. 1991	OLDENBURSKÝ KŮŇ	tmavá hnědka	dokrmování	Stáj	břeží	P
81	Edmond ♂	28. 4. 1999	ČT	hnědák	dokrmování	Stáj		P
82	Violka ♀	8. 6. 1995	NJP	ryzka	dokrmování	Stáj		P
83	Klif ♂	18. 9. 1993	CS	hnědák	dokrmování	Stáj	bonharen	P
84	Inteligent ♂	17. 1. 1999	A 1/1	ryzák	dokrmování	Stáj		P
85	Charlie ♂	20. 1. 2005	A 1/1	ryzák	Seno	Stáj		P
86	Soderáno ♂	10. 6. 2003	CS	hnědák	dokrmování	Stáj		P
87	Šohaj ♂	20. 4. 1998	ČT	hnědák	dokrmování	Stáj		P
88	Entík ♂	20. 5. 2009	KWPN	hnědák	dokrmování	Pastva	Vitamíny(PAV O EXPLOSIV)	P
89	Costly Friend ♂	11. 5. 2004	CS	hnědák	dokrmování	Stáj		P
90	Vivod ♂	3. 4. 1993	ČT	vraník	dokrmování	Stáj		P
91	Kairo ♂	27. 2. 1997	HANNOVERSKÝ KŮŇ	hnědák	dokrmování	Stáj		P
92	Briliant ♂	29. 4. 2000	ČT	tmavý hnědák	dokrmování	Stáj		P
93	Sany ♀	29. 30. 2002	A 1/1	tmavá hnědka	dokrmování	Stáj		P
94	Ivy ♀	23. 5. 2008	PONY	vranka	dokrmování	Stáj		P
95	Verny ♂	14. 4. 2002	A 1/1	tmavý hnědák	dokrmování	Stáj		P
96	Sid ♂	10. 5. 2008	PONY	ryzák	dokrmování	Stáj		P

Číslo vzorku	Jméno	Datum narození	Plemeno	Barva	Strava	Způsob ustájení	Zvláštnosti	Lokalita
97	Pery ♂	25. 7. 2006	AMERICKÝ KLUSÁK	tmavý hnědák	dokrmování	Stáj		P
98	Mia ♀	15. 10. 2009	PONY	ryzka	dokrmování	Stáj		P
99	Kokča ♀	15. 9. 2005	AMERICKÝ KLUSÁK	tmavá hnědka	dokrmování	Stáj		P
100	Celeste ♀	1. 7. 2011	ČT	vranka	dokrmování	Stáj		P

A 1/1-Anglický plnokrevník, **CS**-Slovenský teplokrevník, **ČT**-Český teplokrevník, **KWPN**-Holandský plnokrevník, **QH**-Quater horse, **NJP**-Německý jezdecký pony, **ShA**-Shagya arab, **STKL**-Starokladrubský kůň, **WPB**-Welsch part bred, lomítko označuje křížence QH/ČT, ČT/WPB

Pastva – koně chování celoročně na pastvě, **Stáj** – koně chování v boxech

J – koně pocházející z hřebčína Jeníkov, **S** – koně pocházející z hřebčína Siglavy, **P** – koně pocházející ze soukromých stájí v okolí Pardubic
pohlaví koně je rozlišeno pomocí znaků: ♀ - klisna, ♂ - valach, hřebec

Tabulka 4.: Přehled vzorkovaných koní

3.1.3 Výsledky a diskuze

Práce byla zaměřena na využití oaTOF-ICP-MS jakožto techniky vhodné pro analýzu velkého množství vzorků s velkým množstvím sledovaných stopových prvků. Jak již bylo řečeno, technika je velice rychlá, simultánní a v důsledku toho je možno sledovat celé hmotnostní spektrum naráz. Významným způsobem se tedy může zkrátit čas potřebný k analýze rozsáhlého souboru vzorků, kde je třeba stanovit velké množství izotopů. Zároveň se minimalizuje spotřeba vzorku a navíc poskytuje simultánní záznam zachované izotopické poměry pro případnou statistickou analýzu. V naší studii jsme se zabývali analýzou velkého počtu prvků ve velké počáteční matici vzorků koňských žíní. Získané výsledky, s neovlivněnými izotopovými poměry, byly použity pro následné statistické zpracování dat k vyhodnocení možného vlivu pohlaví, věku, barvy, plemene, ustájení a dalších možných faktorů na prvkové složení žíně. Statistické šetření není součástí této práce.

3.1.3.1 Příprava vzorků

Před samotnou analýzou vzorků koňských žíní bylo nezbytné tyto vzorky náležitě pro analýzu připravit. Příprava vzorku k analýze je zásadním krokem jakékoliv analýzy a může se významným způsobem podílet na fatální chybě výsledku. Proces úpravy získaných vzorků koňských žíní sestával ze stříhání, praní a mineralizace.

Praní a mineralizace vzorků

Nastříhané žíně bylo nutné zbavit exogenního znečištění (zbytky podestýlky, prach, hlína, výkaly, apod.). K odstranění tohoto typu znečištění je možno využít vhodného pracího postupu. Prací proces musí být efektivní ve smyslu zbavení se povrchových nečistot a zároveň by měl být dostatečně jemný, aby nebyla narušena vnitřní struktura vlasu a nedošlo tak k vymývání endogenních prvků. V naší práci jsme využili již dříve optimalizovanou techniku praní vzorků koňských žíní [112], která byla ještě dále upravována k dosažení co nejefektivnějšího zbavení se nečistot bez porušení vnitřní struktury. Byly testovány 3 různé procedury skládající se z pracích kroků zahrnující ultrazvukovou lázeň a prací činidla. Jakožto pracích činidel bylo využito surfactantu Triton X-100, acetonu, zředěné kyseliny dusičné, demineralizované vody a jejich kombinací. Souhrn testovaných pracích postupů naleznete v tabulce 5. Pro optimalizaci tohoto kroku bylo využito testovacího vzorku nebarvených černých lidských vlasů. Objem přidávaných pracích činidel činil vždy 50 ml. Výběr vhodné prací metody byl založen na analýze

pracích roztoků a mineralizovaných pracovních vzorků černých vlasů. V pracích roztocích bylo sledováno množství vyluhovaných stopových prvků a některých biogenních prvků, aby bylo možné rozpoznat, zda už nedochází k narušení struktury vlasu a tím k vymývání endogenně zakomponovaných elementů. V návaznosti na to byl v mineralizátech praného testovacího vzorku analyzován obsah téhož. Při porovnání výsledků všech analýz pracích roztoků a mineralizovaných testovacích vzorků bylo zjištěno, že nejlepší prací postup zahrnuje prací krok ve směsi 0,1M HNO₃ a Tritonu X-100. Vývoj vhodné vypírací strategie těchto vzorků se ukázal jako velmi problematický. Ačkoliv bylo naměřeno poměrně velké množství dat, statistické zhodnocení pracího procesu neukázalo jasné výsledky. Zvolená zmiňovaná sekvence pro praní vlasů / žíní byla nakonec vybrána díky nejlepší návratnosti pro všechny analyzované prvky. Pět paralelních vzorků týž vlasové tkáně vykazovalo, pro analyzované prvky, návratnost v rozmezí 93 – 105%. Tento vybraný způsob prací předúpravy nemusí nutně přinášet stoprocentně přesné výsledky. Vzhledem však k velmi dobré návratnosti, očekáváme při nejhorsím výsledky postižené stejnou chybou. Předpokládáme tedy, že zvolená předúprava neměla významnější vliv na zachování izotopových poměrů. Před samotnou analýzou vypraných a usušených vzorků bylo samozřejmě nutné začlenit ještě krok mineralizační. Byla zvolena mikrovlnná mineralizace s kyselinou dusičnou. Mineralizační postup je uveden v kapitole 3.1.2.4, tabulce 2.

Krok/Prací procedura	Čas v US lázni a použité prací činidla		
	1	2	3
1	10 min	10 min	10 min
	aceton	aceton	Aceton
2	10 min	10 min	10 min
	voda	voda	Voda
3	10 min	10 min	10 min
	1% Triton	0,1M HNO ₃	0,1M HNO₃ in 1% Triton
4	10 min	10 min	10 min
	voda	voda	Voda

US.... Ultrazvuk, postup č. 3 byl zvolen jako optimální

Tabulka 5.: Optimalizace pracího postupu

3.1.3.2 Optimalizace parametrů oaTOF-ICP-MS

Pracovní podmínky hmotnostního spektrometru byly nastaveny tak, aby bylo dosaženo maximální citlivosti a dostatečného rozlišení techniky. Podmínky byly laděny na maximální intenzitu a rozlišení izotopu U^{238} , zároveň byl sledován poměr LaO^+/La^+ a UO^+/U^+ , aby bylo docíleno co nejmenšího zastoupení oxidických iontů. Průtok vzorku systémem byl $0,4 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ (v závislosti na použitém zmlžovači), výkon na plazmovém hořáku byl nastaven na 1250 W. Průtok plazmového plynu činil $11 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$, průtok pomocného plynu $0,6 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ a průtok zmlžovacího plynu $0,98 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$. Napětí na ionto-násobiči bylo nastaveno na 2850 V. Průměrné hodnoty nastavení iontové optiky a detektorové části jsou uvedeny v tabulce 6. Bylo dosaženo citlivosti $60\,000 \text{ counts}\cdot\text{s}^{-1}$ pro $1 \mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1} U^{238}$ (tato hodnota se týká integrační hodnoty píku) a rozlišení 2100. Tří bodové kalibrace hmotnostního spektra vycházela z následujících izotopů: Li^7 , In^{114} a U^{238} . Pro samotnou kvantifikaci vzorků žíní byla užita multiprvková kalibrační sada třinácti kalibračních roztoků obsahujících navíc interní standardy In a Rh. K měření bylo užito integračního módu měření píků, akviziční doba spektra byla $3 \times 5 \text{ s}$. Zařízení pro vyřezávání nechtěných iontů „Smartgate“ bylo nastaveno pro následující intervaly hmot: 10 – 44.5, 55 – 57 a 78 – 81. Pro eliminace nespektrálních interferencí byly ke vzorkům přidány interní standardy In a Rh.

Iontová optika		Modulace iontového paprsku	
Parametr	Hodnota	Parametr	Hodnota
Skimmer	- 1000 V	Fill	- 31 V
Extraction	- 900 V	Fill bias	0.50 V
Z1	- 900 V	Fill grid	0 V
Y mean	- 150 V	Pushout grid	- 580 V
Y deflection	0 V	Pushout plate	455 V
Z lens mean	- 1150 V	Blanker	200 V
Z lens deflection	0 V	Spectral frequency	33 kHz
Lens body	- 180 V	Reflectron	690 V
Multiplier gain	2850 V	Measurement mode	Pulse counting/analog
Integration window	Auto		

Tabulka 6.: Pracovní podmínky oaTOF-ICP-MS

Díky rozdílnosti vzorkové matrice byla velice důležitým krokem této analýzy volba vhodných izotopů, které budou využity k měření. Pracovní izotopy byly vybrány s ohledem na možné isobarické interference. Jejich výběr byl proveden za pomoci spektrální knihovny hmotnostního spektrometru a na základě analýzy jednotlivých spekter vzorků. Vybrané izotopy uvádí tabulka 7.

Prvek	Izotop [hmota]	Prvek	Izotop [hmota]	Prvek	Izotop [hmota]	Prvek	Izotop [hmota]
As	75	Er	166	Ni	60	Ta	181
Au	197	Eu	151	Pb	206 + 207 + 208	Tb	159
B	11	Ga	71	Pd	106	Te	130
Be	9	Gd	158	Pr	141	Tm	169
Cd	114	Ge	74	Pt	194	U	238
Ce	140	Ho	165	Rb	85	V	51
Co	59	La	139	Sb	123	Yb	174
Cr	52	Lu	175	Sc	45	Y	89
Dy	162	Li	7	Sm	152	Nd	142

Pb – Σ 206, 207, 208 izotopů

Tabulka 7.: Vybrané pracovní izotopy

3.1.3.3 Validace metody

Validace navržené metody byla provedena na základě analýzy certifikovaného referenčního materiálu Human Hair NCS ZC 8100 a pomocí metody standardního přídatku. Referenční materiál byl připraven a měřen stejným způsobem jako vzorky žíní. Výsledky analýzy certifikovaného referenčního materiálu vykazovaly dobrou shodu s certifikovanými hodnotami (viz. tabulka 8.) Metoda standardního přídatku byla využita pro prvky, které nebyly certifikovány v referenčním materiálu. Rozdíl mezi směnicemi kalibračních křivek a křivek sestavených pomocí metody standardního přídatku byl v rozsahu 10% pro všechny stanovované prvky vyjma Au.

Prvek	Izotop [hmota]	Certifikováno [mg kg ⁻¹]	Naměřeno [mg kg ⁻¹]	
			IS Rh	IS In
As	75	0.198 ±0.023	0.186 ±0.006	0.191 ±0.006
Cd	114	0.072 ±0.010	0.085 ±0.007	0.089 ±0.009
Co	59	0.153 ±0.015	0.146 ±0.042	0.146 ±0.041
Cr	52	8.74 ±0.97	8.700 ±3.10	8.974 ±3.00
Pb	206+207+208	3.83 ±0.18	3.684 ±0.33	3.790 ±0.31
Sb	123	0.12 ±0.002	0.118 ±0.026	0.123 ±0.025

IS Rh, IS In – Rh a In jako interní standardy.

Tabulka 8.: Validace metody (srovnání výsledků analýzy NCS ZC 8100)

Detekční limity použité techniky (LOD) a vypracované metody (LODm) analýzy koňských žíní byly stanoveny jako trojnásobek směrodatné odchylky šumu pozadí pro slepý vzorek. Detekční limity metody byly spočteny z detekčních limitů techniky a to násobením příslušného ředění vzorků a přepočtem na danou navážku. Detekční limity navržené metody se pohybovaly v rozsahu 0,13 µg.kg⁻¹ (Eu, Gd, Tm) až po 27.9 µg.kg⁻¹ (Au), vyjma Ni (48,5 µg.kg⁻¹). Takto vysoký detekční limit pro Nikl byl s největší pravděpodobností způsoben kontaminací, vycházející z niklových kónusů. Detekční limity techniky a metody jsou shrnuty v tabulce 9.

Prvek	LOD [µg.L ⁻¹]	LODm [µg.kg ⁻¹]	Prvek	LOD [µg.L ⁻¹]	LODm [µg.kg ⁻¹]	Prvek	LOD [µg.L ⁻¹]	LODm [µg.kg ⁻¹]	Prvek	LOD [µg.L ⁻¹]	LODm [µg.kg ⁻¹]
As	0.0212	26.6	Eu	0.0001	0.13	Pd	0.0137	17.1	Te	0.0133	16.6
Au	0.0223	27.9	Ga	0.0024	3.02	Pr	0.0008	1.02	Tm	0.0001	0.13
B	0.0022	2.76	Gd	0.0001	0.13	Pt	0.0015	1.94	U	0.0008	0.97
Be	0.0042	5.25	Ge	0.0033	4.10	Rb	0.0010	1.22	V	0.0029	3.58
Cd	0.0090	11.3	Ho	0.0001	0.16	Sb	0.0051	6.39	Er	0.0003	0.35
Ce	0.0006	0.74	La	0.0009	1.13	Sc	0.0069	8.62	Y	0.0095	11.9
Co	0.0019	2.40	Lu	0.0003	0.32	Sm	0.0004	0.50	Yb	0.0011	1.35
Cr	0.0038	4.72	Nd	0.0006	0.75	Tb	0.0001	0.17	Li	0.0045	5.67
Dy	0.0002	0.21	Ni	0.0388	48.5	Ta	0.0027	3.43	Pb	0.0028	3.55

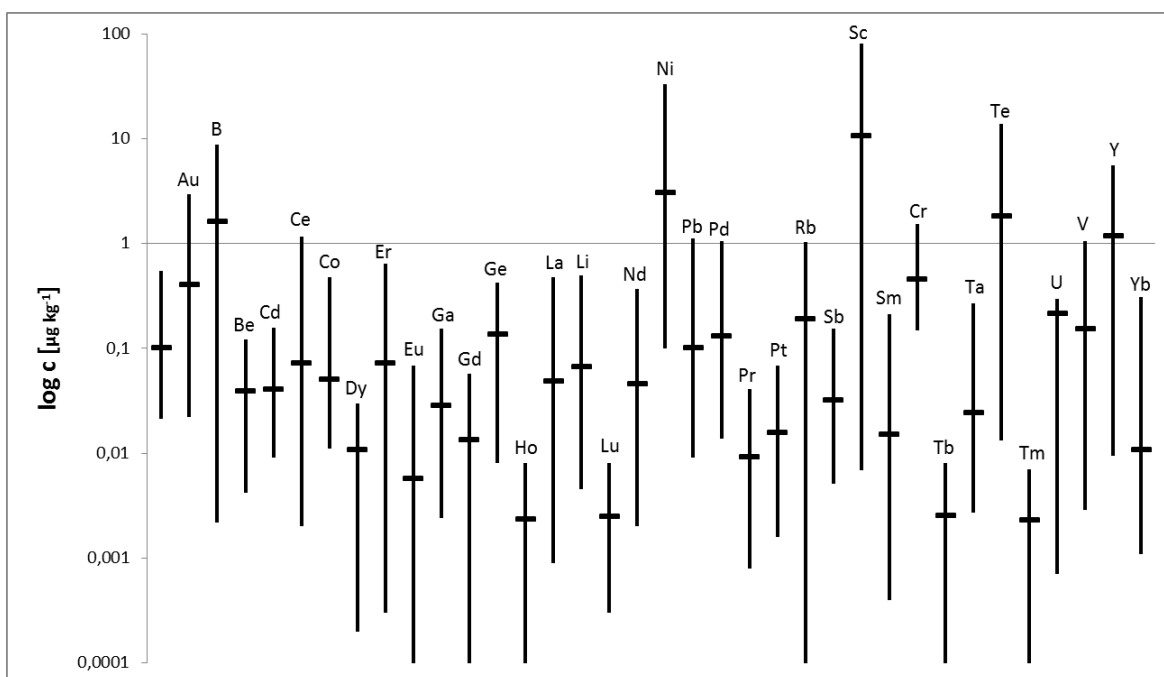
LOD – detekční limit techniky o aTOF-ICP-MS, LODm – detekční limit celé metody

Tabulka 9.: Detekční limity techniky a metody

3.1.3.4 Prostupnost vzorků a zhodnocení metody

Jedno sto vzorků koňských žíní bylo navzorkováno a připraveno pro analýzu oaTOF-ICP-MS dle výše zmíněných postupů, podmínek a parametrů. Důležitým krokem v analýze žíní byl výběr vhodného pracího procesu pro úpravu surových vzorků žíní. Jako nejlepší prací procedura byl vybrán postup zahrnující detergent Triton (viz. výše). Analýza pěti replik téhož modelového vzorku nebarvených černých vlasů vykazovala nejvyšší shodu a návratnost (93 – 105%). Na základě tohoto zjištění se dá předpokládat, že izotopové poměry budou touto úpravou nejméně ovlivněny. Bylo dosaženo prostupnosti pracího kroku, 20 vzorků za hodinu. Vyprané vzorky byly sušeny 24 hodin při laboratorní teplotě. Prostupnost vzorků následujícím mineralizačním krokem byla 24 vzorků za hodinu (23 vzorků a jeden slepý vzorek). Jakožto koncové analytické techniky pro analýzu koňských žíní bylo využito hmotnostní spektrometrie s ionizací v indukčně vázaném plazmatu, ortogonálním urychlením iontů a průletovým analyzátozem. Ve srovnání s jinými technikami, oaTOF-ICP-MS vyniká dobrými detekčními limity a simultánním záznamem, který poskytuje vysoce přesné izotopové poměry neovlivněné fluktuací signálu. Tyto vlastnosti jsou velmi užitečné v případě analýzy velkého množství vzorků, vzorků malého objemu s rozáhlým počtem stanovovaných prvků a dalších. Velmi přesný záznam izotopových poměrů je, jak již bylo řečeno, rovněž poměrně ceněná schopnost této techniky. Pro prvkovou analýzu žíní může být dále využita například technika ICP-OES. Optická emisní spektrometrie může být velmi rychlým pomocníkem pro prvkovou analýzu žíní, jejíž omezením však bude nedostatečná detekční schopnost pro stopové prvky a neschopnost získání izotopové informace. Rentgenová fluorescence XRF je technikou, která přináší téměř nulovou potřebu přípravy vzorku, bohužel však taktéž nedosahuje příliš dobrých detekčních limitů a není schopna podat informaci o izotopových poměrech. Elektrochemické metody ani AAS nejsou rychlé a proto zůstává jedinou možnou volbou pro tento typ analýzy hmotnostní spektrometrie. Hmotnostní spektrometrie je dobře známou metodou s velmi dobrými detekčními schopnostmi a schopností měřit izotopové poměry. Qudrupólové spektrometry a spektrometry se sektorovým polem jsou velmi citlivé a dosahují velmi nízkých detekčních limitů, nejsou však příliš rychlé a toto se pak může projevit v nepříliš přesných izotopových poměrech ovlivněných fluktuací signálu v průběhu analýzy. Další nevýhodou je spotřeba vzorku a celkový čas rozsáhlých analýz. Sekvenční QMS a SFMS spotřebují daleko větší množství vzorku pro dosažení plnoizotopové informace a proto jsou nevhodné pro měření malých vzorků. Zvolená technika

oaTOF-ICP-MS je velice citlivou a rychlou multielementární analýzou s možností naměření přesných izotopových poměrů. Všechny vzorky byly měřeny jako duplikáty a výsledek byl průměrován. Rozsahy analyzovaných prvků pro všechny měřené vzorky jsou uvedeny v grafu 1. Relativní směrodatná odchylka pro všechny vzorky a stanovované prvky nepřesáhla hodnotu 10%. Naměřená extenzivní data byla využita pro následnou statistickou analýzu vlivu různých faktorů (ustájení, barva, pohlaví, věk,...) [113] na prvkové složení žíně. Tato statistická analýza není součástí této práce. Spotřeba vzorku pro nelimitovaný počet měřených izotopů nepřesáhla 0,7 ml. Jedna vzorková sekvence sestávala z 30 vzorků žíní (15 duplikátů), kalibrace, rekalibračního standardu po každém desátém vzorku a z kontrolního vzorku po každém dvacátém měření. Doba akvizice spektra byla 3 x 5s. Byla vypracována velmi rychlá metoda pro analýzu koňských žíní. Samotná technika oaTOF-ICP-MS byla schopna zanalyzovat 100 vzorků během šesti hodin měření (pouze analýza, bez přípravy). Velká prostupnost je zvláště vhodná pro rozsáhlé sety vzorků, které jsou součástí biomonitoringových a statistických studií.



Graf 1.: Rozsahy koncentrací (logaritmické měřítko) všech analyzovaných prvků ve 100 vzorcích koňských žíní

3.1.4 Závěr

Cílem této dílčí práce bylo vyvinout velice rychlou multiprvkovou analýzu oaTOF-ICP-MS s vysokou prostupností vzorků a zachovanými izotopovými poměry. Optimalizace metody analýzy vzorků koňských žíní zahrnovala také optimalizaci předúpravy a zpracování. Prakticky bylo vyzkoušeno, že technika oaTOF-ICP-MS je velmi vhodnou pro takovýto typ analýz, kde je potřeba za krátkou dobu zanalyzovat velké množství prvků v rozsáhlé matici vzorků a zároveň zachovat co možná nejvíce jejich izotopové poměry. Navržená multielementární metoda byla schopna zanalyzovat 100 (50 duplikátů), zmineralizovaných vzorků koňských žíní během 6 hodin a to bez ohledu na stanovovaný počet izotopů. Přesnost a správnost metody byla ověřena na základě analýzy certifikovaného referenčního materiálu lidské vlasy NCS ZC 8100 a metodou standardního přídatku. Detekční limity metody byly v rozsahu $0,13 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (Eu, Gd, Tm) – $27,9 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (Au) vyjma Ni ($48,5 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$), který byl ovlivněn kontaminací. Opakovatelnost měření vzorku vyjádřená relativní směrodatnou odchylkou, nepřesáhla v žádném případě 10%. oaTOF-ICP-MS byla potvrzena jako velice rychlá a výkonná simultánní technika, která umožňuje velmi přesné měření izotopových poměrů napříč celým hmotnostním spektrem. Tyto vlastnosti jsou velmi ceněné pro rychlé screeningové metody, provinční studie a pro multikriteriální statistické analýzy.

3.2 Prvková analýza různým způsobem pěstovaných mrkví

3.2.1 Úvod

Stále se zvyšující spotřeba organicky pěstovaných (označení „bio“) potravin je v posledních letech spojována s větším zájmem spotřebitelů o kvalitu nakupovaných výrobků. Obecně jsou organicky pěstované „bio“ potraviny vnímány jako zdravější a bezpečnější, nežli výrobky konvenční. Navíc je na organickou produkci nahlíženo jako na produkci šetrnější k životnímu prostředí. Mimo agronomických benefitů by tedy měla organická produkce šetřit přírodními zdroji a snižovat jejich znečištění. [114] Obdobně se uvažuje o větším přísunu fenolických látek a vitamínů obsažených v „bio“ potravinách a zároveň o nižším zatížení organismu dusičnany a pesticidy při jejich konzumaci. [115] Dále jsou organické potraviny prezentovány jako potraviny s vyšším obsahem nutričně důležitých stopových kovů a nižším obsahem zdraví škodlivých těžkých kovů. [116] Kvalita konvenčně a organicky pěstovaných produktů však zůstává často diskutována s nejasnými závěry. Otázkou tedy je, zda je organická produkce, s ohledem na nutriční hodnoty, lepší či horší než konvenční pěstování. Naneštěstí existuje jen malé množství studií zabývajících se porovnáváním množství nutričních látek konvenčně a organicky pěstovaných plodin. [117, 118]

Chemické složení organicky pěstované zeleniny je často porovnáváno s konvenčně pěstovanou v souvislosti se složením půdy [119, 120] Maqueda a kol., se ve své práci zaměřili na nutriční senzorké a zemědělské aspekty v souvislosti s kontaminací pocházející ze zavlažování, nebo z aplikace hnojiv. [121] V jiné práci Warman a kol. publikovali tvrzení, že pesticidy, vápenec a hnojiva typu NPK žádným způsobem neovlivnily obsah minerálů a vitamínů jak v organicky, tak v konvenčně pěstovaných plodinách testovaných ve studii. Toto tvrzení však neplatilo pro N, S, Mn, a B. [122] V další práci byl sestaven šesti letý experiment organického a konvenčního pěstování s cyklizací plodin na testovaných polích. Závěrem studie bylo konstatováno, že organicky pěstované mrkve, zelí, cibule, hrášek a brambory dosahovaly nižší produkce nežli kontrolní konvenčně pěstované plodiny. V práci nebyla sledována žádná rezidua pesticidů, či výraznější změny v obsazích glykoalkaloidů, chuti, vůni, nebo významné změny v prvkovém složení organicky a konvenčně pěstovaných plodin. Jediný významnější pozorovatelný rozdíl byl sledován v obsahu některých prvků (Mo, Si, Rb) v obsahu NO_3^- a sušiny. Organicky pěstované plodiny vykazovaly větší podíl sušiny avšak paradoxně i

vyšší podíl NO_3^- . [123] Domagała-Świątkiewicz a kol. ve své práci publikovali vyšší akumulaci NO_3^- (v mrkvových džusech) a významně vyšší množství NH_4^+ , Mg a Na, v konvenčních nežli v organických šťávách. Obsah Ca v testovaných organických džusech (mrkev, červená řepa a celer) byl naopak vyšší nežli u jejich konvenčních protějšků. V práci nebyly zjištěny žádné významné rozdíly v obsahu těžkých kovů, Sr, nebo Zn. [114] Další studie Kelly a kol., odhalila možné systematické rozdíly v koncentracích Mn, Ca a Zn mezi organicky a konvenčně pěstovanými plodinami. Vysvětlení těchto rozdílů může vycházet z rozdílného způsobu pěstování organických plodin, kde se očekává vyšší aktivita hub podporujících arbuskulární mykorhizu. Takovéto systematické rozdíly by mohly být použity jakožto indikátor autentičnosti původu. [124]

Prvkový fingerprint (otisk prstu) může sloužit jakožto indikátor místa původu a má nejlepší předpoklady být použit pro autentifikaci organicky pěstovaných plodin. [124] Tohoto bylo využito pro klasifikaci ozimé pšenice, jarního ječmene, bobu a brambor [125], medu [126], panenského olivového oleje, dýňového oleje, vína a čínského zelí [127 - 130]. Dále také k autentifikaci kultivarů cibule dle obsahu minerálů [131, 132], ovoce a zeleniny [133].

Cílem této dílčí práce byl sběr, příprava a analýza vzorků různým způsobem pěstovaných mrkví (organicky, konvenčně, privátně pěstovaných). Účelem analýzy bylo následné statistické zhodnocení jednotlivých pěstebních systémů v závislosti na obsahu makro a mikro prvků, kontaminantů, sušiny a dusičnanů. Pro tuto práci bylo rovněž nutné vypracovat a následně aplikovat metody pro prvkovou analýzu ICP-OES a oaTOF-ICP-MS. Vzorky mrkví byly kolektovány v průběhu podzimu 2012 a jara 2013.

3.2.2 Experimentální část

3.2.2.1 Instrumentace

Obsah sušiny analyzovaných vzorků mrkví byl zjištěn na základě poměru vysušeného a čerstvého vzorku. K sušení vzorku byla použita teplota 105°C po dobu 48 hodin v laboratorní sušárně (UM 400, Memmert, Schwabach, Německo). Pro analýzu NO_3^- bylo 10 g nastrouhané mrkve vylouženo ve 100 ml demineralizované vody za pomoci ultrazvukové lázně (UCC1, Powersonic, Vrable, Slovensko). Samotná analýza NO_3^- pak probíhala na průtokovém injekčním analyzátoru FIA (MLE, Drážďany, Německo) dle normy pro analýzu dusičnanů DIN EN ISO 13395 (1996, Determination of nitrite-nitrogen,

nitrate-nitrogen and the total of both through flow analysis and spectrometric detection.). Analýza využívá následujícího chemického procesu. Nejdříve se v kadmiovém reduktoru dusičnany převedou na dusitany za přítomnosti imidazolového pufru (pH = 7,5) a následně jsou vzniklé dusitany diazotovány pomocí 2-sulfanilamidu. Poté je diazoniová sůl kopulována na N-(1-Naftyl)-etylendiamin a reakcí vzniká azo barvivo (546 nm) jehož intenzita je přímo úměrná koncentraci dusičnanů.



Obrázek 17.: Průtoková injekční analýza FIA (MLE, Drážďany, Německo) [134]

Analýza rtuti probíhala na jednoúčelovém termo-oxidačním analyzátoru AMA 254 (Altec, Praha, Česká Republika). Analýza probíhala dle TNV 75 7440 (1998, Kvalita vody – Analýza celkové rtuti pomocí jednoúčelového atomového absorpčního spektrometru)



Obrázek 18.: Termooxidační analyzátor rtuti AMA 254 (Altec, Praha, ČR) [135]

Pro prvkovou analýzu byly vzorky mrkví nejdříve nastrohány pomocí plastového struhadla a předloženy k mikrovlnnému rozkladu pomocí již dříve zmiňovaného mineralizačního zařízení (viz. kapitola 3.1.2.1: Mikrovlnný mineralizátor Speedwave MWS-2). Zhruba 0,2 g mrkve, ve třech replikách pro každý vzorek, bylo mineralizováno s pomocí rozkladných činidel: 6 ml podvarové k. HNO₃ a 1 ml 35% H₂O₂. Rozkladný program je uveden v následující tabulce (Tabulka 10.: Mineralizační program – mrkev)

Krok	1	2	3
Teplota [°C]	160	200	20
Držení teploty [min]	5	10	10
Výkon [%]	80	80	40

Tabulka 10.: Mineralizační program – mrkev

Rozložené vzorky byly přelity do 50 ml odměrných baněk a doplněny po rysku. Z odměrných baněk byly přelity do předem vyloužených plastových vzorkovnic a zmrazeny pro následnou analýzu ICP-OES a oaTOF-ICP-MS.

Analýza ICP-OES byla provedena na zařízení ICP-OES Integra XL 2 (GBC, Dandenong, Austrálie). Přístroj je vybaven radiálním pozorováním emise, koncentrickým zmlžovačem a cyklonickou mlžnou komorou pro úpravu a vnášení vzorku (obojí Glass Expansion, West Melbourne, Australia). ICP-OES sloužila ke stanovení následujících prvků: Na, K, Ca, Mg, P, S, B, Al, Fe, Mn a Zn. Podmínky měření byly optimalizovány na základě odstupu signálu od šumu pro nejméně koncentrované prvky (B, Al a Zn). Vybrané emisní čáry jsou uvedeny v tabulce 11. Pracovní podmínky přístroje byly zvoleny následující: výkon plazmatu: 1000 W, průtok vzorku: 1,5 mL.min⁻¹, průtok plazmového plynu: 10 mL.min⁻¹, průtok pomocného plynu: 0,6 mL.min⁻¹, průtok zmlžovacího plynu: 0,65 mL.min⁻¹. Dále bylo zvoleno napětí na fotonásobiči: 600 V, pozorovací výška 6,5 mm, deset opakování 3s akvizice na píku a korekce pozadí s fixním bodem. V případě intenzivních prvků Mg a Ca bylo napětí na fotonásobiči sníženo pro zmírnění jejich signálu. Tato úprava vedla k daleko lepším detekčním schopnostem metody pro tyto prvky.

Prvek	Emisní čára λ , [nm]
Na I	589.592
K I	769.896
Ca II	317.933
Mg II	279.553
P I	177.495
S I	180.731
B I	208.959
Mn II	247.610
Al II	167.081
Fe II	259.940
Zn I	213.856

Tabulka 11.: Vybrané emisní čáry ICP-OES



Obrázek 19.: Optický emisní spektrometr Integra XL 2 (GBC, Dandenong, Austrálie)

[136]

Pro analýzu prvků As, Cr, Cd, Cu, Ni a Pb byla využita technika oaTOF-ICP-MS již dříve zmiňovaná v kapitole 3.1.2.1. Operační podmínky byly nastaveny, tak aby bylo dosaženo maximální citlivosti a zároveň bylo zachováno dobré rozlišení techniky. Podmínky byly laděny na izotop uranu U^{238} . Společně s intenzitou a rozlišením pro tento izotop byly taktéž sledovány poměry oxidických iontů LaO^+/La a UO^+/U , které byly drženy na minimálních hodnotách. Průtok plazmového plynu činil 10, průtok pomocného 0,8 a průtok zmlžovacího plynu $0,75 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$, výkon na plazmatu byl nastaven na 1200 W a napětí na detektoru 2200V. Byla zvolena integrace plochy píku a 5s akvizice signálu. Každá replika vzorku byla proměřena desetkrát. Vybrané izotopy pro analýzu oaTOF-ICP-MS uvádí tabulka 12.

Izotop	Hmota
As	75
Cd	114
Cr	52
Cu	63
Ni	62
Pb	$\Sigma 206 + 207 + 208$
$\Sigma\dots$	suma izotopů

Tabulka 12.: Vybrané izotopy pro analýzu mrkví oaTOF-ICP-MS

3.2.2.2 Použité chemikálie a standardy

Všechny použité chemikálie a standardy byly v náležitě analytické čistotě. V práci bylo využito kyseliny HNO_3 (65%, Lach-Ner, Neratovice, Česká Republika). Tato látka byla dále před použitím čištěna podvarovou destilací (viz. kapitola 3.1.2.1). Mimo HNO_3 bylo v práci jakožto rozkladného činidla užito 30%ního H_2O_2 , (TraceSelectUltra, pro stopovou analýzu, Sigma Aldrich Chemie Gmb, Mnichov, Německo). Dusičnan sodný (čistoty p.a., LachNer, Neratovice, Česká Republika) byl použit jakožto základní látka pro přípravu analytických standardů dusičnanového dusíku. Kalibrační standardy pro dusičnanový dusík byly připraveny v následujících koncentracích: 0,2; 0,5; 2; 5 a $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Pro analýzu dusičnanového dusíku byly dále využity následující chemikálie: Imidazol, N-(1-Naftyl)-etylendiamin (ACS reagent, Sigma Aldrich Chemie Gmb, Mnichov, Německo) a 2-sulfanilamid (čistoty p.a., Penta, Chrudim, Česká Republika). Všechny kalibrační standardy byly připraveny z jednoprvkových analytických standardů o

koncentraci 1, případně 10 g.L⁻¹ (Analytika Co., Ltd., Praha, Česká Republika; SCP Science, Kanada). Nejvyšší kalibrační standard pro metodu ICP-OES obsahoval 50 K; 10 Na, Ca, S, P; 2 Mg, Al; 1 B, Fe, Zn a 0,2 mg.L⁻¹ Mn. Stejně prvky a ve stejném poměru obsahoval kalibrační standard 4, který byl oproti nejvyššímu standardu 2x zředěn. Kalibrační standard 3. byl ředěn 5x, kal. standard 2. ředěn desetkrát a první kalibrační standard byl zředěn 20x oproti nejvyššímu kal. standardu. Všechny kalibrační standardy a slepý vzorek pro analýzu ICP-OES obsahovaly 12 ml podvarové HNO₃ ve 100 ml celkového objemu standardu. Pro metodu oaTOF-ICP-MS byla připravena kalibrační řada obsahující 0,5 – 1 – 2 – 5 – 10 µg.L⁻¹ As, Cr, Cd, Cu, Ni a Pb. Všechny kalibrační roztoky a slepý vzorek pro analýzu oaTOF-ICP-MS obsahovaly 1 ml podvarové HNO₃ a vnitřní standard In o koncentraci 2 µg.L⁻¹. Celkový objem kalibračních standardů pro tuto analýzu činil 100 ml. Kalibrační řada pro analýzu Hg sestávala z 50 – 100 – 200 – 300 – 400 µg.L⁻¹ kalibračních standardů o objemu 100 ml, které byly upraveny přidavkem 1 ml HNO₃.

3.2.2.3 Použité laboratorní nádobí a pomůcky

- Skleněné kádinky, Petriho misky, keramické struhadlo, keramická škrabka
- Plastové odměrné baňky, nálevky, kádinky, lžičky, stříčky
- Polypropylenové uzavíratelné lahvičky o objemu 50 ml a 100 ml
- Polypropylenové uzavíratelné zkumavky o objemu 12 ml
- Automatické dávkovače (Biohit Proline)

Použité plastové nádobí se před znovu- použitím nechalo 24 hodin loužit ve 2M podvarové kyselině dusičné, důkladně se opláchlo redestilovanou vodou a vysušilo.

3.2.2.4 Reálné vzorky mrkví

Vzorky mrkví byly shromažďovány v průběhu podzimu 2012 a jara 2013. 76 vzorků mrkví pocházelo od drobných pěstitelů napříč Českou republikou (domácí produkce). 71 vzorků bylo zakoupeno v různých obchodech a supermarketech. Tato skupina vzorků byla označena jako konvenční, běžně dostupná. Dále bylo zakoupeno 71 vzorků mrkví s ochrannou známkou „bio“. Po kolekci vzorků nadcházela jejich základní úprava. Mrkve byly nejprve upraveny běžným kuchyňským způsobem (oplach, škrábání). Následovalo strouhání pomocí keramického struhadla. Nastrouhané vzorky byly přímo

využity pro analýzu rtuti (technika AMA, viz. kapitola 3.2.2.1), pro zjištění množství sušiny a po vyloužení pro vyhodnocení obsahu NO_3^- pomocí normalizované spektrofotometrické metody průtokové analýzy. Pro prvkovou analýzu ICP-OES a oaTOF-ICP-MS byly vzorky podrobeny mikrovlnnému rozkladu, který je uveden v kapitole (3.2.2.1.)

3.2.2.5 Validace a zhodnocení metod

Analytické charakteristiky všech použitých technik a metod jsou uvedeny v tabulce 13. Detekční limit techniky ICP-OES je vztažen k trojnásobku směrodatné odchylky v místě korekce pozadí pro nejnižší kalibrační standard. Detekční limity oaTOF-ICP-MS jsou počítány z trojnásobné směrodatné odchylky šumu pozadí pro nejnižší kalibrační standard. Detekční limit pro stanovení NO_3^- průtokovou metodou FIA je dán nejnižším kalibračním standardem ($0,2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{ NO}_3^- \text{-N}$). Detekční limit pro rtuť = $0,02 \text{ ng}$ vycházel z trojnásobné směrodatné odchylky výšky píku pro slepý pokus, což odpovídalo $0,0002 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ pro navážku vzorku 100 mg . U stopové analýzy oaTOF-ICP-MS byly koncentrace prvků ve slepých pokusech vyšší, nežli detekční limity techniky, proto byly tyto detekční limity nahrazeny detekčními limity vztahujícími se ke slepému pokusu. Prezentované detekční limity metody představují detekční limity celého analytického procesu zahrnující přípravu vzorků a následné ředění. Validace metody byla docílena pomocí návratnosti analýzy pro 3 vzorky s přidavkem určitého množství konkrétních analytů aplikovaným dle dané metody. V rámci analýzy rtuti termooxidační metodou byl přidavek známého množství Hg aplikován ve formě roztoku jedno-prvkového standardu do čerstvého vzorku těsně před samotnou analýzou. Dále byly očkované čerstvé vzorky před extrakcí NO_3^- . Pro analýzu ICP-OES a oaTOF-ICP-MS byly nastrohané vzorky mrkve obohaceny příslušnými prvky před mikrovlnným rozkladem. Jeden konvenční vzorek mrkve byl obohacen roztokem analytů v koncentrační úrovni nejnižšího kalibračního standardu. Jeden vzorek organického hospodářství byl obohacen roztokem analytů v koncentrační úrovni středního kalibračního standardu. A jeden vzorek získaný od domácích pěstitelů byl obohacen roztokem analytů o koncentraci odpovídající druhé nejvyšší kalibrační úrovni. Návratnosti reprezentující relativní směrodatné odchylky pro deset obohacených vzorků uvádí tabulka 13. Metoda ICP-MS dosahovala návratnosti v rozsahu $89 \pm 5,0$ až $109 \pm 5,7$ %, metoda ICP-OES v rozsahu $91 \pm 7,9$ až $106 \pm 8,1$ %, FIA: $92 \pm 3,8$ až $99 \pm 4,8$ % a metoda pro analýzu rtuti dosahovala návratnosti v rozsahu $92 \pm 3,6$ až $102 \pm 3,4$ %. Vliv matrice na

výsledek stanovení byl hodnocen metodou standardního přídávku. Směrnice přímky vytvořené metodou standardního přídávku se nelišily o více jak 9,5% od směrnic kalibračních řad. Pro kontrolu kvality získaných dat byl vždy mezi skupinu deseti vzorků zařazen i kontrolní vzorek odpovídající střední koncentraci kalibračních standardů.

ICP OES	λ [nm]	DL [$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$]	DL _B [$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$]	DL _M [$\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$]	R _{1A} [%]	R _{2B} [%]	R _{3C} [%]
Na I	589,592	21	*	5,3	105 ±4,8	95 ±3,0	97 ±3,4
K I	769,896	320	*	80	103 ±5,9	93 ±5,3	95 ±6,0
Ca II	317,933	3,3 ^a	*	0,83	99 ±7,9	102 ±4,0	92 ±5,0
Mg II	279,553	4,2 ^a	*	1,1	95 ±6,2	101 ±4,5	94 ±5,9
P I	177,495	23	*	5,8	97 ±7,2	95 ±8,1	106 ±8,1
S I	180,731	22	*	5,5	104 ±6,5	101 ±5,3	93 ±5,0
B I	208,959	9,2	*	2,3	92 ±6,1	94 ±5,5	102 ±6,0
Mn II	247,610	2,1	*	0,53	93 ±5,9	102 ±3,7	104 ±4,7
Al II	167,081	22	*	5,5	97 ±6,6	98 ±4,6	103 ±3,9
Fe II	259,940	2,3	*	0,58	91 ±7,9	100 ±6,0	95 ±4,8
Zn I	213,856	1,7	*	0,43	101 ±6,2	99 ±5,7	93 ±4,2
ICP MS	AMU						
As	75	0,019	0,032	0,080	90 ±10	92 ±11	93 ±8,9
Cd	114	0,028	0,052	0,13	90 ±9,9	95 ±9,5	103 ±5,3
Cr	52	0,030	0,035	0,088	91 ±6,3	89 ±5,0	97 ±6,3
Cu	63	0,020	0,030	0,075	105 ±7,9	103 ±4,9	93 ±5,0
Ni	62	0,029	0,035	0,088	108 ±6,2	109 ±5,7	99 ±5,2
Pb	Σ^b	0,014	0,025	0,063	95 ±8,1	98 ±7,3	104 ±4,3
FIA NO ₃ ⁻ -N		20	*	2	99 ±4,8	98 ±3,4	92 ±3,8
AMA254 Hg		0,02 ^c	*	0,0002 ^d	95 ±5,2	102 ±3,4	92 ±3,6

DL, detekční limit; **DL_B**, detekční limit vypočtený z dat pro procesní slepé vzorky; **DL_M**, detekční limit celé metody

R, návratnosti pro obohacené vzorky (10 replik); **R_{1A}**, konvenční vzorek mrkve s přídávkem sledovaných prvků na koncentrační úrovni nejnižšího kalibračního standardu; **R_{2B}**, vzorek mrkve organického pěstování s přídávkem prvků na koncentrační úrovni středního kalibračního standardu; **R_{3C}**, vzorek mrkve domácích pěstitelů dopovaný prvky na koncentrační úrovni druhého nejvyššího kalibračního standardu.

* procesní slepé pokusy o vyšší koncentraci nežli DL

^a napětí na fotonásobiči bylo 360 V pro Ca a 420 V pro Mg

^b Σ měřeno společně na izotopech ²⁰⁶Pb, ²⁰⁷Pb, ²⁰⁸Pb

^c minimální detekovatelné množství Hg, měřeno na přístroji AMA254 v ng

^d minimální detekovatelné množství Hg, měřeno ve 100 mg vzorku

Tabulka 13.: Hodnocení použitých technik a metod

3.2.3 Výsledky a diskuze

Výsledky následujících parametrů byly podrobeny statistickému hodnocení: Na, K, Mg, Ca, P, S, B, Al, Mn, Zn, Fe, Cu, Cr, Ni, Pb, Cd, As, Hg, dusičnany a sušina. Nedetekované koncentrace byly nahrazeny hodnotou detekčního limitu metody DL_M . Byl proveden Shapiro-Wilkův test normality (hladina významnosti $\alpha = 0,05$). Tento test odhalil, že většina dat zahrnující DL_M nespĺňuje předpoklad normality. Soubor vykazoval významný posun směrem k nižším hodnotám. Pro sledované parametry a jednotlivé pěstební systémy byl vypočítán průměr, medián, směrodatná odchylka a minimální a maximální hodnoty (viz. Tabulka 14, Statistika 10, Statsoft ČR, Praha, Česká republika). Výsledky analýz byly porovnány s hodnotami dostupnými v literatuře, s limity pro kontaminanty v potravinách a s doporučenou denní dávkou nutrientů.

	A – konvenční / n = 71								B – bio / n = 71				C – domácí produkce / n = 76			
	DDD	Limit	A/B/C	DL _M	Min.	Max.	\bar{x}	$\bar{x} \pm s$	Min.	Max.	\bar{x}	$\bar{x} \pm s$	Min.	Max.	\bar{x}	$\bar{x} \pm s$
Na	200			5.3	57.3	1150	355	413±250	98.5	651	261	280±130	58.1	1950	266	417±380
K	375			80	1460	6780	2710	2970±1100	2020	7610	3230	3460±1000	1500	11400	5880	6150±2000
Mg	800			0.83	49.1	213	104	114±37	52.4	195	106	110±32	58.7	306	182	179±49
Ca	700			1.1	220	870	406	425±150	220	687	456	450±98	248	970	581	590±160
P				5.8	156	701	304	315±96	219	915	320	347±130	205	1230	666	679±190
S				5.5	23.5	327	182	189±68	74.0	255	153	157±42	73.2	405	218	228±79
B				2.3	Nd	4.76	2.50	2.86±0.61	Nd	6.66	2.51	2.84±0.79	Nd	5.73	2.50	3.18±1.0
Al	14			5.5	Nd	38.4	8.69	12.3±7.0	Nd	201	13.3	18.5±24	Nd	93.7	16.9	20.3±14
Fe	2	50	0/0/1	0.58	1.25	15.8	3.95	5.24±3.4	Nd	31.0	4.20	4.96±4.2	2.54	71.2	10.1	13.1±11
Mn	10			0.53	Nd	9.39	0.774	1.69±1.8	Nd	2.45	0.529	0.835±0.47	Nd	8.38	1.04	1.26±1.1
Zn	4	25	0/0/0	0.43	Nd	18.9	5.69	6.10±3.5	Nd	22.3	6.79	6.74±3.7	Nd	19.8	6.36	6.91±4.3
Cu		10	0/0/0	0.075	Nd	5.35	0.443	0.858±1.1	Nd	3.52	0.376	0.568±0.69	Nd	5.31	0.721	1.01±1.1
Ni		2.5	3/2/3	0.088	Nd	6.86	1.44	1.58±0.90	Nd	2.69	0.598	0.786±0.64	Nd	46.0	0.369	1.23±5.3
Cr		0.2	2/1/3	0.088	Nd	0.355	0.0459	0.0591±0.053	Nd	0.219	0.0441	0.0463±0.26	Nd	39.8	0.0100	0.548±4.6
Pb		0.1	3/0/4	0.0063	Nd	1.01	0.0452	0.0641±0.12	Nd	0.0990	0.0431	0.0429±0.016	Nd	1.61	0.0152	0.0693±0.26
As		0.5	2/1/3	0.080	Nd	1.68	0.0837	0.160±0.27	Nd	0.777	0.0638	0.0774±0.11	Nd	1.72	0.0270	0.163±0.26
Cd		0.1	1/1/2	0.013	Nd	0.126	0.0682	0.0661±0.025	Nd	0.104	0.0562	0.0600±0.022	Nd	0.388	0.0244	0.0403±0.053
NO ₃ ⁻		700	1/2/3	8.9	Nd	4110	8.00	97.8±490	Nd	2180	1.0000	52.7±270	Nd	6030	99.2	243±710
Sušina		---	---		7.15	13.6	9.59	9.88±1.5	6.74	15.6	10.1	10.2±1.6	6.60	20.3	11.3	11.7±2.4

DDD, doporučená denní dávka, (ČR 2008), **Limit**, limity kontaminantů v potravinách (ČR 2004)

A/B/C, počet vzorků překračující limit pro daný parametr a pěstební systém (A – konvenční, B – bio, C – domácí produkce)

DL_M, detekční limit metody, **Nd**, nedetekováno, **Min**, **Max**, minimální a maximální hodnoty koncentrace

\bar{x} , medián, $\bar{x} \pm s$, střední hodnota se směrodatnou odchylkou

Tabulka 14.: Souhrnné výsledky analýz a srovnání s legislativou (sušina %, ostatní mg.kg⁻¹)

3.2.3.1 Výsledky jednotlivých parametrů

Námi zpracované výsledky stanovovaných parametrů byly porovnávány s daty dostupnými v literatuře. Hodnoty koncentrací nutrientů/ kontaminantů byly v odborných článcích místy hodnoceny s ohledem na pěstební způsoby, avšak zřídka byly hodnoceny s ohledem na skladbu půdy, nebo místní znečištění.

Obsah sušiny je poměrně významný parametr (závisí na odrůdě, zavlažování, způsobu a délce uskladnění, atd.), který může při špatné interpretaci dat značně překroutit analytické výsledky a jejich návaznost na nutriční hodnoty a bezpečnost potravin. Proto je také velmi důležité jasně naznačit, zda jsou výsledky vztaženy k sušině, nebo k čerstvému vzorku. V některých publikacích toto není příliš zřetelné, či není řečeno vůbec [122]. Všechny naše výsledky uvedené v této práci jsou vztaženy na čerstvý vzorek. Obsah sušiny se pohyboval v rozmezí 7,15 – 13,6 % pro vzorky konvenčního pěstování, 6,74 – 15,6 % pro bio a 6,6 – 20,3 % pro vzorky mrkví od domácích pěstitelů. Naše výsledky pro obsah sušiny jsou v souladu s daty uveřejněnými ve vědeckých publikacích. Silva a kol. 12,17 – 13,63 % pro různé odrůdy mrkví [137]. Masamba a Nguyen 10,7 – 11,0% sušiny [138].

Dusičnany (NO_3^-) v úrodě bývají často spojovány s hnojením a rozdílnými podmínkami teplo/světlo. Pro konvenční vzorky se dusičnany pohybovaly v rozmezí od nedetekovatelného po 4110 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, od nedetekovatelného až po 2180 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ pro bio a od nedetekovatelného až po 6030 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ pro domácí pěstitele. Dle meta-analýzy provedené Hoefkenssem bylo zjištěno, že dusičnany se vyskytují ve významně nižších koncentracích u vzorků mrkví pěstovaných organickým způsobem nežli u vzorků pěstovaných konvenčně [117].

Mrkev je brána jako potravina s nízkým obsahem **sodíku (Na)**. V našem případě jsme zjistili následující rozpětí koncentrací pro jednotlivé pěstební systémy: 57,3 – 1150 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ pro konvenčně pěstované, 98,5 – 651 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ pro bio a 58,1 – 1950 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ pro domácí pěstitele. V práci Warmana byly publikovány následující výsledky: 1170 – 4640 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$; sodíku pro konvenčně pěstované a 1170 – 4980 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ pro mrkve organického původu. [122]. „Databáze složení potravin ČR“ uvádí 80 mg Na na 100g jedlého podílu [139].

Ve vzorcích mrkve jsme dále zjistili následující obsahy **draslíku (K)**, (vše v $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$): 1460 – 6780 pro konvenční, 2020 – 7610 pro bio a 1500 – 11400 pro domácí pěstitele. Hoefkens a kol. (ve své publikaci uvádí, vše v $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$): 2070 pro bio a

2730 pro konvenčně pěstované mrkve. [117] Masamba uvádí následující: 3027 pro konvenčně pěstované a 3268 mg.kg⁻¹ K pro bio mrkve [138]. Poměrně pak velké obsahy udává Warman: 22900 – 24700 pro konvenční a 24600 – 41700 mg.kg⁻¹ K pro bio mrkve. [122] „Databáze složení potravin ČR“ uvádí 276 mg K ve 100g jedlého podílu mrkve (2016) [139].

Vápník byl v našich vzorcích přítomen v následujících koncentracích (vše v mg.kg⁻¹): 220 – 870 pro konvenční, 220 – 678 pro bio a 248 – 970 pro domácí pěstitele. Literatura uvádí: 230 pro bio a 260 mg.kg⁻¹ pro konvenčně pěstované mrkve [117], Masamba ve své práci uvádí 363 pro bio a 317 mg.kg⁻¹ pro konvenční [138]. Koncentrace o řád vyšší (v mg.kg⁻¹): 3250 – 3790 pro bio a 3110 – 3890 pro konvenčně pěstované mrkve prezentuje Warman [122]. „Databáze složení potravin ČR“ uvádí 41 mg Ca ve 100 g jedlého podílu (2016) [139].

Koncentrace **hořčíku** byla následující (vše v mg. kg⁻¹): 49,1 – 213 pro konvenční pěstování, 52,4 – 195 pro organické a 58,7 – 306 pro domácí pěstitele. Oproti tomu Warman [122] uvádí následující koncentrace 1000 – 1470 pro konvenční a 1050 – 1570 pro organické. Databáze složení potravin ČR deklaruje 18 mg Mg na 100 g jedlého podílu [139]

V naší studii byl dále sledován **fosfor**, jehož koncentrace jsou pro jednotlivé typy pěstování následující (vše v mg. kg⁻¹): 156 – 701 pro konvenční, 219 – 915 pro organické a 205 – 1230 pro domácí pěstění. Warman a kol. [122] uvádí 2230 – 3280 pro organické a 2330 – 3260 pro konvenční. Databáze složení potravin ČR uvádí 35 mg P na 100 g jedlého podílu (2016) [139].

Obsah **síry** uvádí literatura následovně (vše v mg. kg⁻¹). Pro organické pěstování: 2960 – 5200, pro konvenční: 2340 – 4100, Warman [122]. V naší práci jsme našli následující rozsahy koncentrací (mg. kg⁻¹). Konvenční mrkve: 23,5 – 701, organické: 74,0 – 255 a pro mrkve z domácího pěstování: 73,2 – 405. Což je řádový rozdíl oproti údajům, které uvádí Warman [122].

V případě **boru**, se koncentrace citované v literatuře pohybovaly takto (mg. kg⁻¹). Konvenční mrkve: 16,8 – 19,4 a 18,6 – 219 pro organické, Warman [122]. Naše studie vykazovala koncentrace o něco nižší (mg. kg⁻¹). Konvenční mrkve: od nedetekovatelného (2,3) až po 4,76, pro organické až po 6,66 a pro domácí pěstování po 5,73.

Z naší práce dále vyplívají koncentrace pro **mangan** (vše v mg. kg⁻¹). Konvenční mrkve: od nedetekovatelného (0,53) až po 9,39, pro organické: (0,53) – 2,45 a pro domácí

pěstitele: (0,53) – 8,38. Warman [122] ve své studii publikoval následující koncentrace. Konvenční: 14,8 – 24,6 a 12,0 – 22,2 pro organické mrkve.

Následující prvky jsou v literatuře zmiňovány, jak jakožto důležité nutriety, tak potenciální kontaminanty (**Fe, Zn, Cu**).

Železo bylo v naší studii pozorováno v následujících koncentracích (mg. kg⁻¹). 1,25 – 15,8 pro konvenčně pěstované, od nedetekovatelného (0,58) až po 31,0 pro organické a 2,54 – 71,2 pro domácí pěstitele. Literatura udává tyto údaje (mg. kg⁻¹). 20,0 – 36,0 pro konvenční a 24,0 – 29,2 pro organické mrkve, Warman [122]. Databáze složení potravin ČR uvádí 1,1 mg Fe na 100 g jedlého podílu (2016) [139].

Zinek jsme v naší práci prezentovali v těchto koncentracích (mg. kg⁻¹). Od nedetekovatelného (0,43) až po 18,9 pro konvenčně pěstované mrkve, (0,43) – 22,3 pro organicky pěstované a (0,43) – 19,8 pro domácí pěstitele. Warman a kolektiv [122] prezentoval následující údaje. 24,0 – 26,0 pro konvenční a 21,0 – 24,8 pro organické mrkve. Kawada [120] prezentoval rozsah koncentrací 2,4 – 4,0 pro mrkve z Japonska.

Z naší práce dále vyplývají následující rozsahy koncentrací pro **měď** (mg. kg⁻¹). Konvenční mrkve: od nedetekovatelného (0,075) až po 5,35, pro organické: (0,075) – 3,52 a (0,075) – 5,31 pro domácí pěstitele. Literatura uvádí 7,4 – 8,4 pro konvenční a 6,2 – 7,0 pro organické mrkve, Warman [122] a 0,7 – 1,0 v mrkvích pěstovaných v Japonsku, Kawada [120].

Další prvky, které jsme v naší studii měřily, jsou toxické těžké kovy. Výsledky pro **kadmium** jsou tyto (mg. kg⁻¹). Rozsah od nedetekovatelného (0,013) až po 0,126 vykazovaly konvenční vzorky mrkví, (0,013) – 0,104 organické a (0,013) – 0,388 pěstitelské mrkve. Hoefkens [117] ve své práci uvádí 0,022 pro konvenční a 0,026 (mg. kg⁻¹) pro organické mrkve. Kawada [120] publikuje následující údaje pro japonské mrkve: 0,002 – 0,2 mg. kg⁻¹.

Olovo vycházelo v naší studii následovně (vše v mg. kg⁻¹): od nedetekovatelného (0,0063) až po 1,01 pro konvenční vzorky, (0,0063) – 0,0990 pro organické a (0,0063) – 0,388 pro domácí pěstitele. Dle meta-analýzy, kterou zpracoval Hoefkens [117] vycházely průměrné koncentrace Pb pro konvenční vzorky mrkví 0,105 mg. kg⁻¹ a pro organické 0,263 mg. kg⁻¹.

Koncentrace **arsenu** vycházely v naší práci následovně (mg. kg⁻¹): od nedetekovatelného (0,080) po 1,68 pro konvenční vzorky, (0,080) – 0,777 pro organické a

(0,080) – 1,72 pro domácí pěstitele. Ve vzorcích španělských mrkví byla publikována koncentrace 0,241 mg. kg⁻¹, Matos-Reyes, [140].

Pro následující prvky nebyly v literatuře nalezeny relevantní údaje.

Nikl se v našich vzorcích vyskytoval v následujících rozsazích koncentrací (mg. kg⁻¹). Od nedetekovatelného (0,088) až po 6,86 pro konvenční, (0,088) – 2,69 pro organické a (0,088) – 46,0 pro domácí pěstitele.

Obsah **chromu** vycházel následovně. Konvenční vzorky mrkví: nedetekováno (0,088) – 0,355, organické: (0,088) – 0,219 a domácí pěstění: (0,088) – 39,8.

Pro **hliník** jsme našli tyto koncentrace (mg. kg⁻¹): nedetekováno (5,5) – 38,4 pro konvenční, (5,5) – 201 organické, (5,5) – 93,7 pro domácí pěstitele.

Rtuť byla v našich vzorcích zaznamenána ve velmi nízkých koncentracích a ve většině případů nebyla detekována vůbec. Proto byla ze statistického hodnocení vyřazena úplně.

3.2.3.2 *Zhodnocení příspěvku mrkve do doporučeného denního přísunu*

nutrietu

Zelenina je velmi důležitým zdrojem minerálů obecně. V případě že známe průměrnou denní spotřebu mrkve na osobu, může být přísun nutrientů z tohoto zdroje jednoduše spočítán. Soltoft a kol. [118] odhadují přibližný přísun mrkve na 173 g za den. Doporučená denní dávka **draslíku** dle vyhlášky 225/2008 [141] České republiky byla stanovena na 200 mg/den. Pokud bychom vzali v úvahu nejnižší obsahy draslíku v našich testovaných vzorcích (hodnota kolem 1500 mg. kg⁻¹) a průměrný denní přísun mrkve zhruba 170 g, tak se dostaneme na hodnotu 130% doporučené denní dávky DDD. Tato hodnota představuje mrkev jakožto perfektní zdroj draslíku. Pro další nutriční prvky byly rozsahy hodnot procentuálního dosažení DDD spočítány takto (vše v % DDD). **Mg**: 2 – 14, **Ca**: 5 – 20, **P**: 4 – 30, **Mn**: 4 – 76, **Zn**: 0,9 – 30 a **Cu**: 0,3 – 20% DDD. V případě **železa** byla vynechána extrémní hodnota, která přesahovala limit pro kontaminanty v potravinách. S druhou nejvyšší hodnotou Fe v našich vzorcích jsme obdrželi následující procentické rozpětí DDD při konzumaci 170 g mrkve: 0,6 – 12%. Z tohoto úhlu pohledu je mrkev vnímána jako významný a nenahraditelný zdroj nutričních prvků.

3.2.3.3 Extrémně kontaminované vzorky

Při procházení dat byly zaznamenány extrémní hodnoty některých sledovaných parametrů, které převyšovaly limity pro kontaminanty v potravinách stanovených vyhláškou České republiky 306/2004 [142]. 12 konvenčně, 7 organickým způsobem pěstovaných a 18 vzorků pěstovaných zahrádkáři překročilo limitní hodnoty pro obsah kontaminantu v jednom či více případech. Tabulka 14 uvádí počet vzorků a přehled konkrétních kontaminantů pro jednotlivé pěstební systémy. Limit pro obsah **dušičnanů** 700 mg. kg^{-1} byl překročen celkově v 6ti případech. Jedenkrát pro konvenčně pěstované, dvakrát pro organicky-pěstované a třikrát pro vzorky poskytnuté od domácích pěstitelů. Limit pro obsah **železa** 50 mg. kg^{-1} byl překročen pouze v jednom případě a to pro vzorek z domácího pěstebního systému. Limit pro **zinek** 50 mg. kg^{-1} nebyl překročen v žádném případě. Žádný ze vzorků taktéž nepřekročil hranici 10 mg. kg^{-1} pro limitní obsah **mědi** v potravinách. Limit **kadmia** $0,1 \text{ mg. kg}^{-1}$ byl překročen jedenkrát v případě konvenčních vzorků, jedenkrát v případě vzorků organických a dvakrát u vzorků pěstovaných soukromými zahrádkáři. Limitní obsah **olova** $0,1 \text{ mg. kg}^{-1}$ byl překročen u třech konvenčních a čtyřech zahrádkářských vzorků mrkví. Limitní hodnota pro **chrom** $0,2 \text{ mg. kg}^{-1}$ byla překročena celkem šestkrát. Dvakrát byla tato hodnota překročena u konvenčních vzorků, jedenkrát u organických vzorků a třikrát u vzorků v systému domácího pěstování. Obsah **arsenu**, jehož limitní koncentrace pro potraviny činí $0,5 \text{ mg. kg}^{-1}$, byl překročen ve dvou případech u konvenčních vzorků, v jednom případě u organických a ve třech případech u vzorků z domácího pěstění. Limitní obsah **niklu** $2,5 \text{ mg. kg}^{-1}$ byl překročen ve třech konvenčních, dvou organických a třech vzorcích domácího pěstění. Limit pro obsah **rtuti** v potravinách $0,03 \text{ mg. kg}^{-1}$ nebyl překročen ani v jediném případě.

Z tohoto úhlu pohledu se zdá být nejlepší organický systém pěstění, protože vykazuje nejmenší počet překročení limitních hodnot pro koncentraci nutrientů v potravinách. Navzdory tomuto tvrzení byly nalezeny hodnoty překračující limitní koncentrace ve všech třech typech pěstebního systému. Alarmující hodnoty koncentrací těžkých kovů pak byly zjištěny v jednom případě domácího pěstění ze severo-Moravské oblasti. Bylo zjištěno, že políčko domácího pěstitele bylo provozováno na remediované někdejší skládce. Toto jsou výsledky některých kovů (vše v mg. kg^{-1}). Fe: 71,2; Zn: 19,8; Ni: 46,0; Cr: 39,8 a As: 1,72. Z tohoto by se mohlo zdát, že někteří drobní pěstitelé mohou podceňovat kvalitu půdy, ve které pěstují svoji úrodu.

3.2.3.4 Rozdíly v jednotlivých pěstebních systémech

Největších koncentračních rozpětí bylo sledováno u systému domácího pěstění, které překrývá i zbývající dva pěstební systémy. Tato skutečnost může skrýt rozdíly mezi konvenčním a organickým systémem. Proto bylo pro potřeby naší studie rozhodnuto statisticky zhodnotit za prvé (i) všechny tři systémy pěstění dohromady, za druhé (ii) vyjmout z hodnocení drobné zahrádkáře a posuzovat jen konvenční a organický pěstební systém. Pro zjištění rozdílů mezi různými pěstebními systémy bylo využito neparametrické Kruskal-Wallis analýzy variance (Tabulka:15.). Následující prvky vykazovaly statisticky významné rozdíly v případě srovnání pouze konvenčního a organického systému pěstování: Na, K, S, Al, Mn, Ni, As a Cd. Pokud se však posuzovaly všechny tři pěstební systémy dohromady, byly nalezeny další statisticky významné rozdíly pro konkrétní parametry: Na, K, Mg, Ca, P, S, B, Al, Fe, Mn, Cu, As, Cd, a sušina. Ze statistického zhodnocení obsahu sušiny pro všechny naše testované systémy pěstování vychází, že se systémy statisticky významně liší. Pokud jsme však posuzovali pouze konvenční a organický systém, nebyl statisticky významný rozdíl zjištěn. Ve studii Herencia a kol. [143], zjistili vyšší obsah sušiny u vzorků z organického systému pěstování nežli u vzorků konvenčních. Asociace z Velké Británie zabývající se půdou uvádí 19 studií zabývajících se sušinou v konvenčně a organicky pěstovaném ovoci a zelenině [144]. Deset případů vykazovalo větší množství sušiny v organicky-pěstovaných produktech, osm studií zjistilo nekonzistentní, nebo statisticky nevýznamné rozdíly mezi konvenčními a organickými produkty a pouze jediný případ uvádí vyšší obsah sušiny u konvenčně pěstovaných produktů. Dle meta-analýzy vedené Hoefkensem [117] byl zjištěn významně nižší obsah dusičnanů u organických, nežli konvenčně pěstovaných vzorků mrkví (45 oproti 171 mg. kg⁻¹), salátu a brambor. U špenátu tomu bylo naopak. Vyšší obsah dusičnanů u konvenční zeleniny byl taktéž reportován ve studii Lima a kol [115]. V naší studii nebyly pozorovány žádné statisticky významné rozdíly v obsazích dusičnanů pro jednotlivé pěstební systémy. Herencia a kol., [143] publikovali vyšší obsah fosforu v organicky pěstovaných produktech nežli v konvenčních, ačkoliv některé kultivační cykly vykazovaly rozdílné trendy. V našem případě se všechny naše testované systémy statisticky významně liší v obsazích fosforu a síry. Dále Herencia uvádí, že nenalezli žádný jasný trend v obsahu draslíku v testovaných kultivarech v závislosti na pěstebním systému. Naše studie však uvádí významné rozdíly mezi jednotlivými systémy pěstování. Kelly a kolektiv [124] ve své studii diskutují systematické rozdíly v koncentracích manganu, vápníku, mědi a zinku

mezi sklizněmi kultivovanými organickým a konvenčním způsobem. Vysvětlení těchto rozdílů může vycházet z rozdílného způsobu pěstování organických plodin, kde se očekává vyšší aktivita hub podporujících arbuskulární mykorhizu. Takovéto systematické rozdíly by mohly být použity jakožto indikátor autentičnosti původu. Studie poukazuje na vyšší hodnoty koncentrací pro konvenční produkty u Ca, Zn a Cu a vyšší hodnotu koncentrace Mn u vzorků organického pěstování. V našem případě vycházel obsah vápníku o něco málo nižší pro konvenční mrkve (425 mg. kg^{-1}), nežli pro organické (450 mg. kg^{-1}), stejný trend byl zjištěn i pro zinek ($6,10$ pro konvenční a $6,74 \text{ mg. kg}^{-1}$ pro organické produkty). Úplně opačný trend nežli demonstrovala studie [124] byl zjištěn pro obsah manganu v našich vzorcích (Mn: $1,69$ konvenční a $0,835 \text{ mg. kg}^{-1}$ organické mrkve).

systém		A-B		A-B-C		systém		A-B		A-B-C		
parametr	p-hodnota	rozdílnota	p-hodnota	rozdílnota	parameter	p-hodnota	rozdílnota	p-hodnota	rozdílnota	parameter	p-hodnota	rozdílnota
Na	0,000136	ANO	0,004347	ANO	Zn	0,287726	NE	0,413659	NE			
K	0,007477	ANO	$2,01 \cdot 10^{-32}$	ANO	Cu	0,062848	NE	0,02457	ANO			
Mg	0,53391	NE	$5,95 \cdot 10^{-24}$	ANO	Ni	$1,25 \cdot 10^{-8}$	ANO	0,329222	NE			
Ca	0,248083	NE	$2,04 \cdot 10^{-12}$	ANO	Cr	0,076377	NE	0,434588	NE			
P	0,100064	NE	$7,46 \cdot 10^{-40}$	ANO	Pb	0,139915	NE	0,597023	NE			
S	0,000985	ANO	$2,88 \cdot 10^{-9}$	ANO	As	0,019414	ANO	0,038883	ANO			
B	0,874702	NE	0,021866	ANO	Cd	0,11877	ANO	$9,22 \cdot 10^{-5}$	ANO			
Al	0,040846	ANO	0,010945	ANO	NO_3^-	0,497644	NE	0,072758	NE			
Fe	0,659979	NE	$2,63 \cdot 10^{-13}$	ANO	sušina	0,254267	NE	$6,91 \cdot 10^{-9}$	ANO			
Mn	0,000232	ANO	0,000345	ANO								

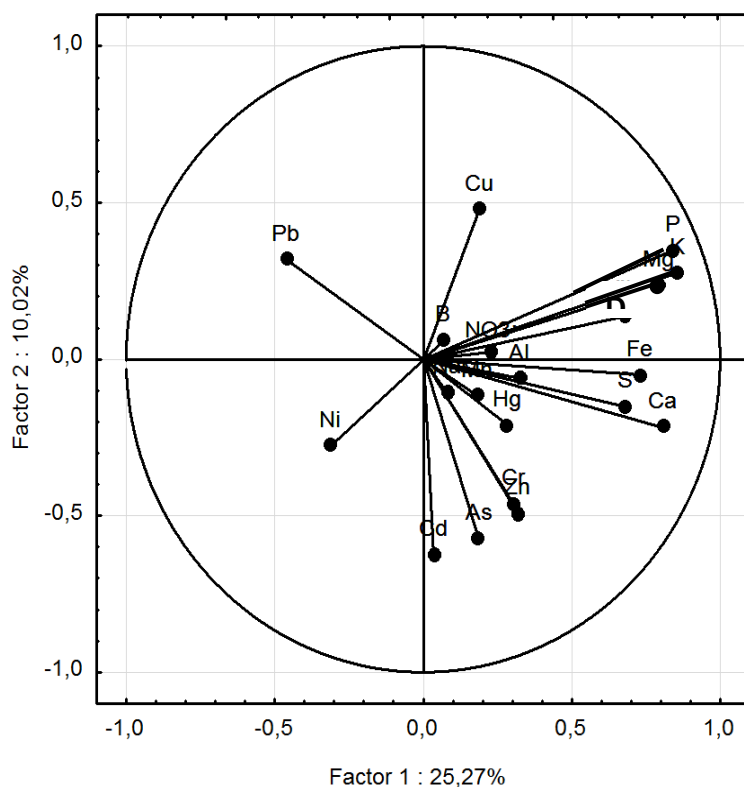
A- konvenčně pěstováno; B – organicky pěstováno; C – domácí pěstitelé

Tabulka 15.: Statistické zhodnocení rozdílností ve složení mrkví v závislosti na použitý pěstební systém s využitím neparametrické Kruskal-Wallis analýzy variance

3.2.3.5 Multivarietní statistická analýza – klasifikační metoda

Jiný způsob jak potvrdit nebo vyvrátit hypotézu o rozdílnosti v pěstebních systémech poskytuje využití metody hlavních komponent (PCA – Statistika 10; Statsoft ČR, Praha, Česká republika). Pro potřeby tohoto statistického zpracování byly nedetekované hodnoty koncentrací nahrazeny DL_M . S ohledem na deformaci rozdělení pravděpodobnosti byla veškerá data transformována pomocí exponenciální transformace (QC Expert 3.2, Trilobyte, Pardubice, Česká republika). Takto transformovaná data (218 vzorků, 19 parametrů vyjma Hg) byla statisticky zhodnocena a byla zvažována významnost jednotlivých proměnných. Z grafu váhy jednotlivých komponent (obrázek 20a.) byly postupně odebrány nadbytečné proměnné, tzn. nevýznamné proměnné s krátkým vektorem

ležícími blízko centra grafu (NO_3^- , B, Na, atd.) Taktéž byly odebrány korelující proměnné (S, Ca, P a K). Byly vytvořeny smysluplné skupiny parametrů: těžké kovy, kontaminanty, nutriety. Žádný ze zmiňovaných kroků nevedl k významnému zlepšení vysvětlujícímu variabilitu a závislosti v datech. Ze získaných dat bylo možno vyčlenit skupinu mrkví domácích pěstitelů, která vykazovala extrémní variabilitu. Na konci procesu zpracování dat vyplynulo, že 76% variability těchto dat může být vysvětleno třemi faktory hlavních komponent, které tvoří sedm proměnných (Ca, K, Zn, Cu, Pb, Cd a Cr). Po redukcí dat pouze na konvenční a organické mrkve zůstal v projekci případů do faktorové roviny opět jeden nerozdělený klastr (obrázek 20b.). Tato situace vede nutně k závěru, že mezi sledovanými skupinami, není žádná významná diference. Nelze tedy říci, že by některé parametry jasně definovaly rozhraní mezi organickým a konvenčním pěstěním mrkví. Krom systému pěstování mrkví se v analýze mohl projevit některý další významný faktor, který nebyl zvážen a díky němuž nemohla být závislost prvkového složení na způsobu pěstování mrkví dokázána. Dle Laursena a jeho spolupracovníků [125] mohla být úroda pěstovaná ve dvou systémech (konvenční a organické zemědělství) jasně rozdělena na základě obsahů 14ti prvků.



Obrázek 20a.: Výsledky metody hlavních komponent: graf váhy komponent pro jednotlivé testované parametry

fosforu, mědi, manganu a zinku. Při porovnání s DDD bylo u těchto nutrientů zjištěno, že při konzumaci průměrného denního množství mrkve dosahují desítky procent DDD. Vyjma zmiňovaných prvků je mrkev excelentním zdrojem draslíku. Nejvyšší koncentrace toxických těžkých kovů, překračujících limitní koncentrace, byly nalezeny ve skupině vzorků z domácího pěstování. Vzorky organického systému tyto hodnoty překračovaly v nejnižší míře. Z tohoto úhlu pohledu se zdá být skupina organického pěstování nejlepší možnou volbou. Musíme mít však na paměti, že i v této skupině byly nalezeny nadlimitní hodnoty koncentrací některých ukazatelů. Ze získaných dat je možné indikovat, že největší nebezpečí může plynout drobným zahrádkářům. Domácí pěstitelé mohou lehce podcenit kvalitu obdělávané půdy, která může být značně kontaminována a to se poté projeví i na kvalitě výsledné úrody. Všechny sledované parametry byly porovnány jak individuálně, tak všechny najednou (PCA analýza), tak aby bylo možné rozkrýt meziprvkové interakce s ohledem na využitý pěstební systém. Rozdíly v obsazích Na, K, Mg, Ca, S, B, Al, Fe, Mn, Cu, As, Cd a sušiny byly nalezeny při porovnání všech třech pěstebních systémů dohromady. Následující parametry byly vyhodnoceny jakožto statisticky významné v případě, že byly porovnávány pouze dva ze tří systémů (konvenční a organické pěstování): Na, K, S, Al, Mn, Ni, As a Cd. Z našich dat dále vyplývá, že využitý pěstební systém nebyl vyhodnocen jakožto statisticky významný faktor pro obsah sušiny a fosforu. Nejednoznačnost získaných výsledků, i v porovnání s literaturou, poukazuje na další velmi důležité faktory, které nebyly v práci hodnoceny a mohou zásadním způsobem ovlivnit složení pěstovaných mrkví. Mezi tyto faktory patří různá lokální kvalita půdy, zavlažovací systém a kvalita zavlažované vody, lokální klimatické podmínky, místní znečištění, sezónní změny, způsob hnojení, způsob skladování a zpracování finálního produktu. Použitá PCA analýza hodnotící veškerá data nevedla k jasnému rozdělení do skupin podle pěstebního systému. Multielementární složení mrkví nebylo vyhodnoceno jako vhodný indikátor původu. Ačkoliv nebyly v našem případě nalezeny významné rozdíly mezi konvenčně a organicky pěstovanými mrkvemi, vedla tato studie k získání velmi hodnotných informací ohledně složení mrkví na českém trhu. Cílem práce bylo potvrdit, nebo vyvrátit tvrzení, že organické rovná se lepší. V našem případě tedy nemůžeme tuto otázku zodpovědět. Můžeme však komentovat jinou velice zajímavou skutečnost, která vyplynula z analýzy výsledných dat složení mrkví. Touto skutečností je zjištění velmi vysokých koncentrací těžkých kovů v produktech některých malých zahrádkářů. Tento jev může být spojen s nekvalitní půdou, která je obhospodařována. Na výběr lokality pro

pěstování ovoce/zeleniny by tedy měl být brán významný důraz. Dále lze také říci, že mrkev na českém trhu je více méně v souladu s českou legislativou a nepřekračuje limitní hodnoty pro testované parametry. Otázku co koupit na váš stůl tedy zůstává na osobních preferencích. Na závěr je ale nutné zdůraznit, že velkým benefitem organického hospodářství je šetrný přístup k životnímu prostředí směřující k trvale udržitelnému rozvoji.

3.3 Analýza malých vzorků s využitím oaTOF-ICP-MS

3.3.1 Úvod

Prvková analýza malých vzorků je velice komplexní problematikou zahrnující pečlivé odebrání vzorku, jeho zpracování, předúpravu a následnou citlivou analýzu. Práce s omezeným množstvím vzorku je nedílnou součástí mnoha oblastí a je předmětem neustálého výzkumu, mezi tyto oblasti patří například klinická, biologická environmentální a forenzní analýza [145 – 147].

Samotná předúprava malých vzorků před následnou analýzou je velmi zásadní bod celého procesu a může být značnou výzvou. Malé množství testovaného materiálu zvyšuje riziko ztráty a kontaminace v průběhu jednotlivých analytických operací. Ze základních skupenství testovaných vzorků, se nejčastěji setkáváme se vzorky kapalnými, případně pevnými, které se mohou převádět na kapalné různými laboratorními postupy. Vzorky malých objemů pak kladou zásadní nároky na čistotu prostředí, laboratorního nádobí, použitých chemikálií a pečlivost analytického postupu obecně [148].

Objem vzorku a velikost koncentrací analyzovaných prvků má zásadní vliv na výběr analytické koncovky. Vybraná analytická technika musí většinou vykazovat schopnost adaptace zaváděcího systému na vzorky malých objemů. Nezbytností těchto technik je také jejich vysoká citlivost a výhodou pak může být rychlost, multielementárnost případně simultánní analýza izotopů pro získání izotopického „otisku prstu“ (významné například ve forenzní analýze).

Mezi vysoce citlivé techniky, které lze využít pro analýzu malých vzorků řadíme například atomovou absorpční spektrometrii s elektrotermickou atomizací ETA-AAS, nebo hmotnostní spektrometrii s ionizací v indukčně vázaném plazmatu ICP-MS. Těmito technikami se běžně analyzují vzorky kapalného skupenství. V této práci se budeme dále zabývat analýzou malých vzorků pomocí ICP-MS

V závislosti na počtu analyzovaných prvků a zvoleném systému MS detekce se doba analýzy pohybuje mezi 1 – 5 minutami (platí pro klasické uspořádání peristaltika – zmlžovač – mlžná komora – ICP). Objem spotřebovaného vzorku se tak může pohybovat v rozmezí 1 – 10 ml na analýzu [146,147].

Jedním z možných a nejjednodušších způsobů, kterým lze snížit množství vzorku potřebného k analýze ($\text{ml} \rightarrow \mu\text{L}$), je snížení průtoku vzorku dávkovacím systémem. Při

průtocích vzorku nižších než $100 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ je však třeba, s ohledem na množství vstupujícího vzorku, použít efektivnější dávkovací systém. Zde je několik hybatelů, které přispěly k vývoji takovýchto dávkovacích systémů [145,146,148].

- K analýze je k dispozici vzorek o objemu menším než 1 ml
- Využití kapilární elektroforézy CE ve spojení s ICP
- Snížení interferencí plynoucích z velkého množství vnášeného rozpouštědla
- Velmi malé biologické, environmentální, klinické a forenzní vzorky
- Snížení vznikajícího odpadu, speciálně u radioaktivních materiálů

Pokud však využijeme některý ze systémů, který snižuje množství dávkovaného vzorku, vstupuje do hry několik dalších faktorů, na které je nutné brát ohled a které u klasického „velkoobjemového“ dávkování nejsou tak patrné [146].

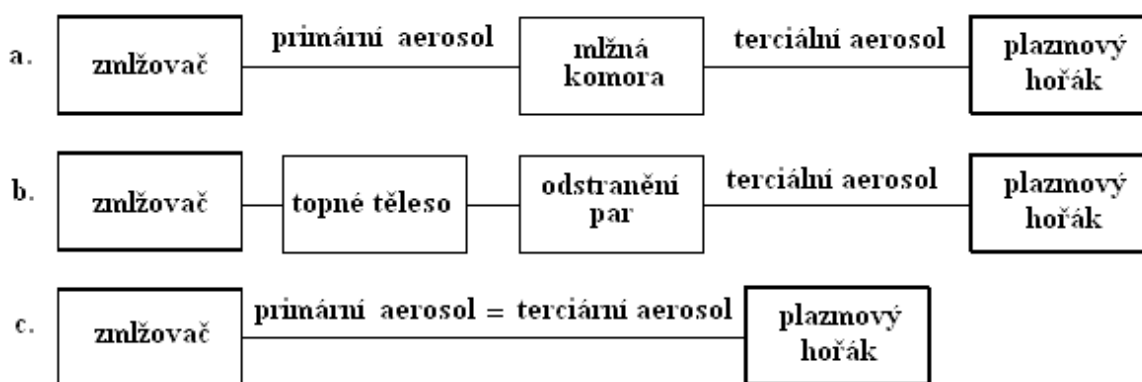
- Při využití technik ICP, souvisí analytický signál s množstvím analytu přímo vstupujícího do plazmové hlavice. Z tohoto vyplývá, že se snížením množství dávkovaného vzorku musí nutně dojít ke snížení citlivosti metody.
- Se snížením rychlosti průtoku vzorku systémem, je nutno počítat s daleko delšími promývacími časy. Toto je obzvlášť závažný problém pro střídání vzorků s rozdílnými matricemi.
- Při průtocích vzorku pod $100 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, se významně snižuje účinnost přepravy analytu do plazmatu.

Z těchto bodů tedy vyplývá, že pokud budu snižovat množství vzorku proudícího systémem je naprosto nezbytné, pro zachování dostatečné kvality výsledků, využít nějaký pokročilejší systém adaptovaný pro práci s malými objemy. Výhodou takového systému pak může být vyšší stabilita signálu, zlepšení citlivosti metody, vyšší rychlost analýzy, snížení paměťových efektů a zmenšení mrtvých objemů a především tedy snížení celkové spotřeby vzorku.

Tato dílčí práce je zaměřena na techniky ICP-MS adaptované pro práci s malými objemy vzorku. Cílem této pasáže bylo sestavit techniku pro analýzu malých vzorků pomocí oaTOF-ICP-MS. Dále bylo nezbytné daný systém charakterizovat, vyvinout metodu pro analýzu malých objemů, optimalizovat a validovat pro vzorky životního prostředí.

3.3.1.1 Zavádění kapalných vzorků do ICP

Kapalné vzorky jsou nejčastěji zaváděny do ICP v nepřetržitém, tzv. kontinuálním módu. Nejčastěji jsou v kontinuálním módu zavádění využívány následující tři přístupy, využívající různé technické prostředky. Nejběžnější a nejjednodušší postup zavádění vzorku je na obrázku 21a. Toto uspořádání bylo již principiálně zmíněno dříve, jednotlivé části systému budou blíže popsány později. Na obrázku 21b. se můžeme setkat s přístupem zapojujícím desolvatační jednotku, která snižuje množství vstupujícího rozpouštědla do ICP. A konečně na obrázku 21c. je naznačen systém, který kompletně opomíjí mlžnou komoru a primární aerosol je tedy na tolik jemný, že může být vstříkován přímo do ICP.

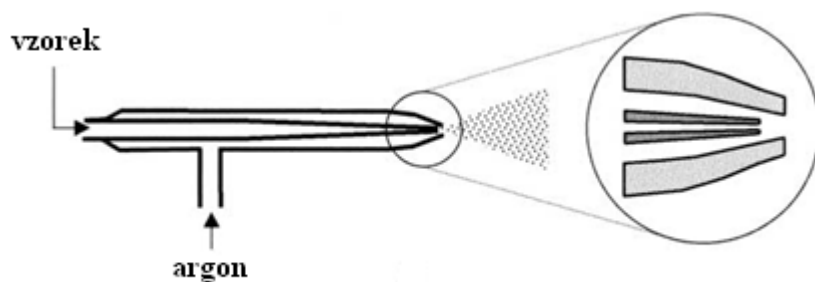


Obrázek 21.: Systémy kontinuálního vnášení kapalného vzorku do ICP

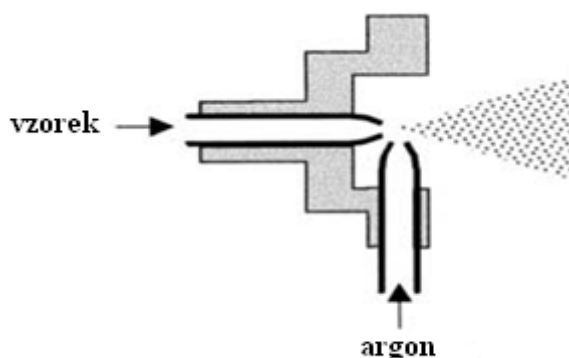
Pro standardní objemy vzorku se tedy nejčastěji využije **peristaltická pumpa**, která uvádí, za pomoci peristaltických pohybů hadiček, vzorek do pohybu. Výhodou tohoto hnacího prostředku je absolutní oddělení vzorku od pumpy a tudíž zamezení jakékoliv kontaminace pumpa x vzorek. Pokud se však pracuje s malými objemy v kontinuálním módu vnášení, dochází při snížení rychlosti průtoku vzorku systémem k fluktuacím signálu, které jsou způsobeny právě peristaltickým pohybem.

Další částí klasického uspořádání jsou **zmlžovače**, které slouží pro úpravu kapalného vzorku do formy primárního aerosolu. Mezi nejběžnější patří tzv. pneumatické zmlžovače, které pomocí přisávaného zmlžovacího plynu vytváří primární aerosol. Nevýhodou těchto zmlžovačů je poměrně vysoká spotřeba vzorku a velmi nízká účinnost (1 – 2%) [149]. U pneumatických zmlžovačů se tedy využívá kinetická energie proudícího zmlžovacího plynu, u hydraulických zmlžovačů se využívá energie samotné proudící kapaliny. Mechanická energie, která je zevně aplikována rotačním nebo vibračním

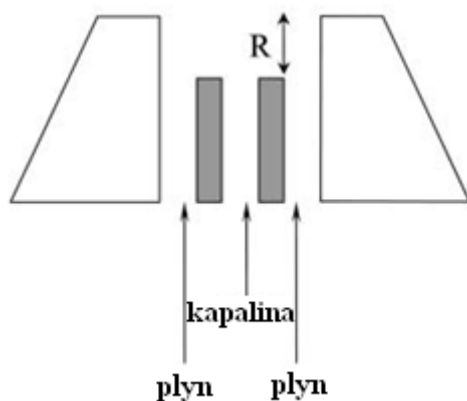
pohybem je základem funkce rotačních či vibračních zmlžovačů. Elektrostatické zmlžovače zas k tvorbě primárního aerosolu využívají nahromadění elektrostatického náboje. [150,151]. Existuje velké množství zmlžovačů z různých materiálů pracujících na základě uvedených principů. Následující obrázky znázorňují některé vybrané exempláře.



Obrázek 22.: Schéma pneumatického-koncentrického zmlžovače [150]



Obrázek 23.: Schéma pneumatického zmlžovače, cross-flow uspořádání [150]

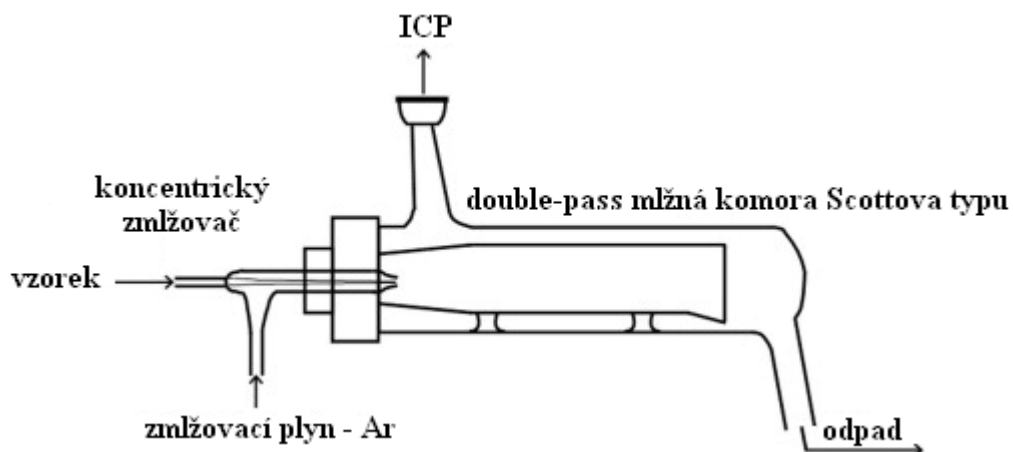


Obrázek 24.: Schéma oscilačního kapilárního zmlžovače [152]

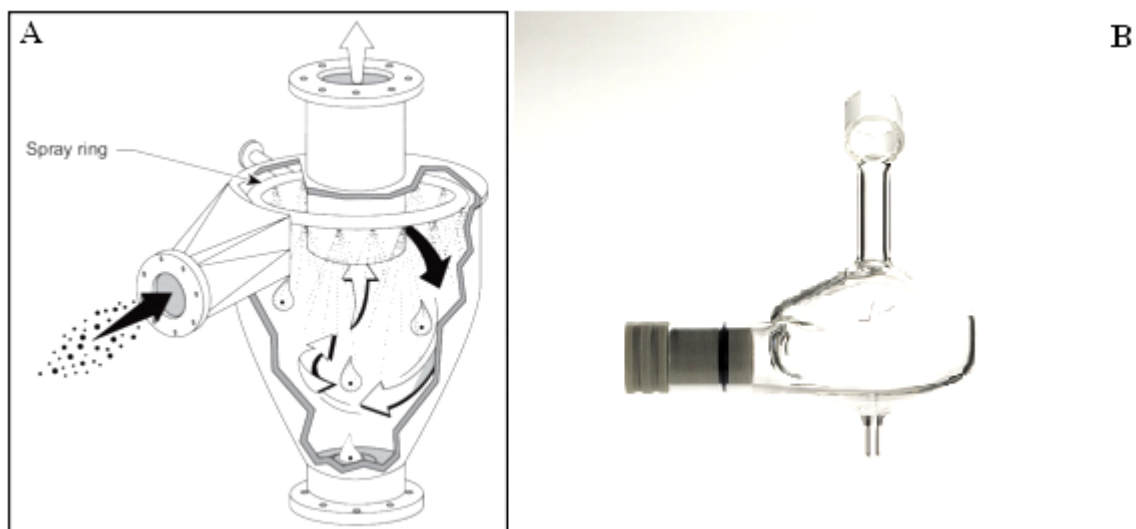
Poslední částí dávkovacího systému, před vstupem vzorku do plazmové hlavice, jsou **mlžné komory**. Mlžné komory bývají umístěny těsně za zmlžovačem a jejich úkolem je z primárního aerosolu odloučit hrubé částice a vytvořit tak jemný tzv. terciární aerosol. Mohou být termostatovány až na teplotu 10°C, což vede k větší termické stabilitě aerosolu, větší kondenzaci rozpouštědla a tím pádem i redukci vzniku oxidických a hydroxidických interferujících iontů. Mlžné komory lze rozdělit do tří skupin: nejjednodušší, jednorůchodové komory „single-pass“, mlžné komory Scottova typu s dvojitým průchodem „double-pass“ a cyklonické mlžné komory. Komory typu „single pass“ mají nízkou odlučovací schopnost (prostý průchod válcovým profilem, kondenzace a gravitační odloučení) a proto významná část aerosolu postupuje dále do ICP. Velké množství rozpouštědla, které by zvyšovalo pozadí signálu a způsobovalo různé interference, je velmi často nutné odpařit v následné desolvatační jednotce. Double-pass mlžná komora je v praxi jednou z nejvyužívanějších. Odloučení hrubých kapiček aerosolu je, krom gravitační sedimentace a kondenzace na stěnách komory, docíleno prudkou 180° změnou směru proudění. Nevýhodou této komory je však vznik větších mrtvých objemů než u single-pass, což vede k delším promývacím časům. Do cyklonické mlžné komory vstupuje separovaný aerosol v tangenciální směru. K odloučení větších kapek dochází inerčním záchytem (vliv odstředivé síly) na stěnách vlastní mlžné komory. Tyto komory poskytují vysokou účinnost, při malém objemu komory. Zároveň se povrch komory aktivně čistí a je zajištěn rychlý a účinný proplach mezi analyzovanými vzorky. Na následujících obrázcích jsou zobrazeny všechny tři typy mlžných komor [1,150].



Obrázek 25.: Single-pass mlžná komora [153]



Obrázek 26.: Schéma double-pass mlžné komory Scottova typu [154]



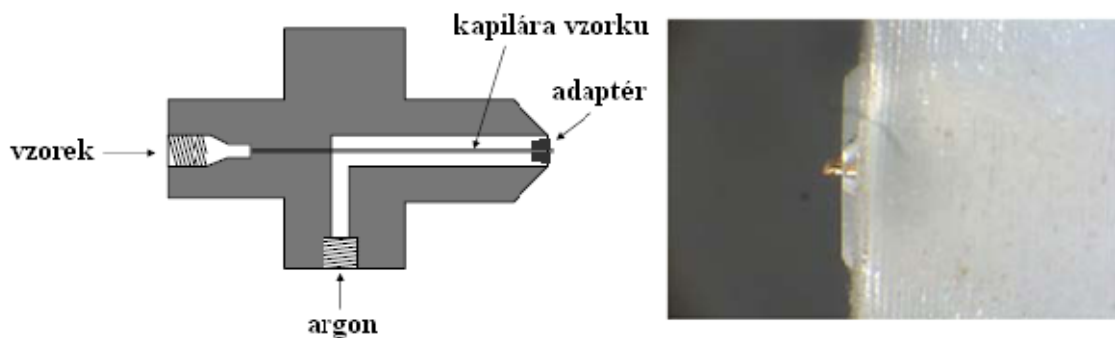
Obrázek 27.: Cyklonická mlžná komora A – princip proudění aerosolu, B – pohled z boku [155]

3.3.1.2 Zavádění malých objemů vzorků do ICP

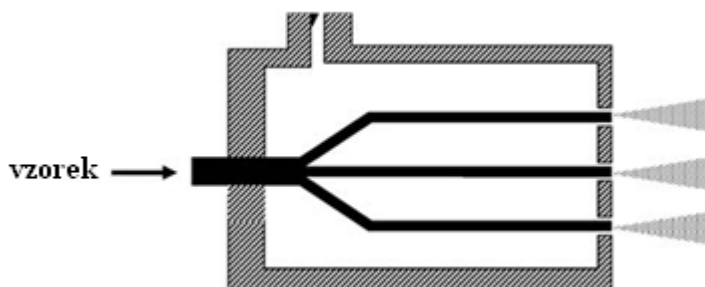
Systemy, které nejčastěji pracují s malými objemy a tedy s malými průtoky (pod $100 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$) vzorků, jsou následující.

- Systemy s mikrozmžovači a vysoceúčinnými zmlžovači v tandemu s mikronizovanými mlžnými komorami
- Systemy s desolvatačními jednotkami
- Systemy umožňující přímé vstříkování vzorku do ICP

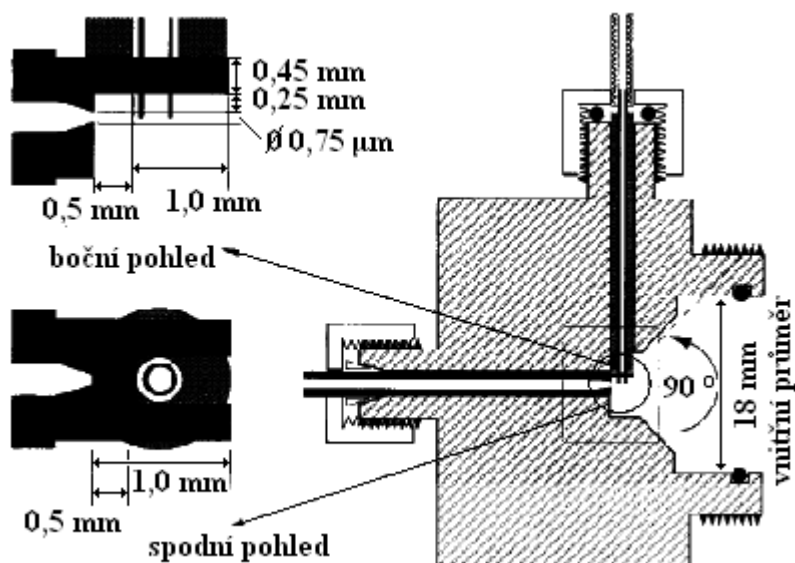
První jmenované systémy jsou v podstatě konstrukčními obdobami klasických dávkovacích sestav, pouze s drobnými konstrukčními úpravami a zásadní miniaturizací vnitřních částí. Tato miniaturizace na jedné straně vede k větší efektivitě zmlžování, menším mrtvým objemům a kratším promývacím časům a na straně druhé k větší křehkosti a náchylnosti k ucpávání systému. Následující obrázky uvádí příklady částí těchto dávkovacích sestav.



Obrázek 28.: Mikrokoncentrický zmlžovač a detail přechínající polyamidové kapiláry [147]

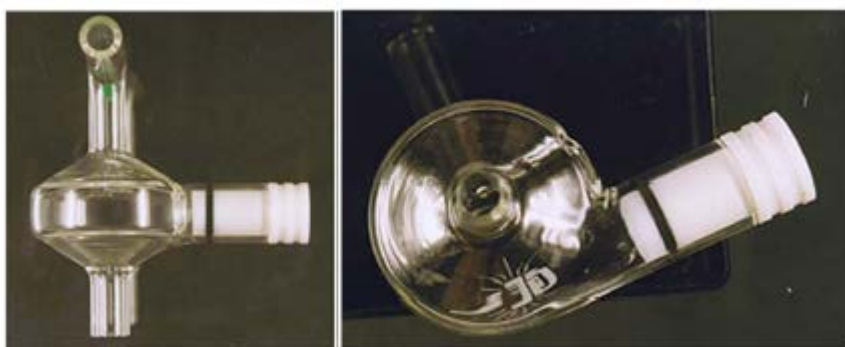


Obrázek 29.: Multi micro-spray zmlžovač [147]



Obrázek 30.: Schéma vysoce-účinného cross-flow mikrozmžovače (HECFMN)

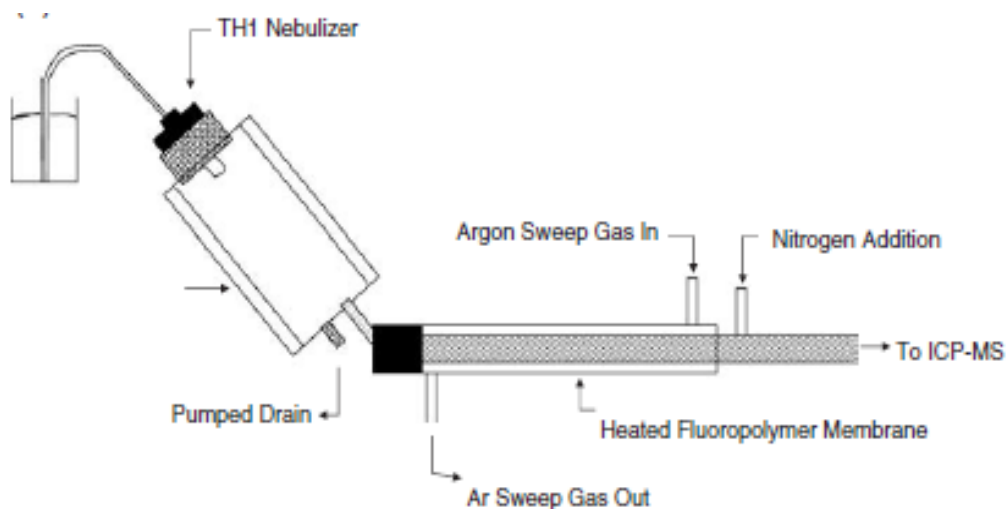
[149]



Obrázek 31.: Miniaturizovaná cyklonická mlžná komora „cinnabar“ (V = 20 ml)

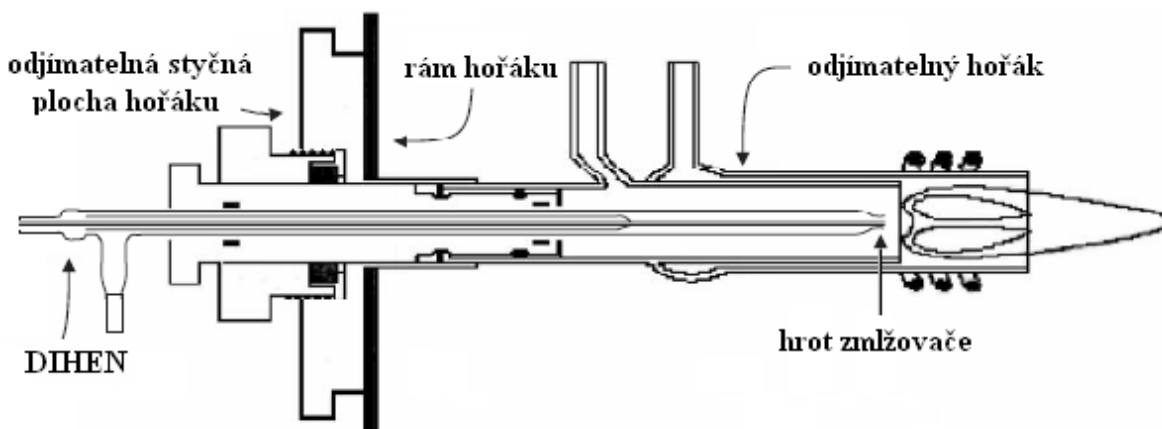
[156]

Zásadním problémem při vysoce-účinném zmlžování je množství rozpouštědla, které se dostává do ICP a zvyšuje tak pozadí a množství interferentů. Této skutečnosti lze předejít využitím desolvatačních jednotek zakomponovaných v systému vnášení. V desolvatačních jednotkách je primární aerosol zahříván, čímž dochází k odparu rozpouštědla. Rozpouštědlo je dále odváděno pryč porézními membránami, za kterými je situován prostor s kontinuálním tokem sušícího plynu. Při rychlostech průtoku vzorku pod $100 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ vykazovaly desolvatační systémy vynikající účinnost [147].



Obrázek 32.: Schéma systému s desolvatační jednotkou Aridus™ [147]

Poslední jmenované systémy, pro práci s malými objemy vzorků, jsou založeny na přímém vstřikování aerosolu do ICP. Greenfield a kolektiv jako první popsali v roce 1960 způsob přímého vstřikování vzorku do plazmatu [147]. Tyto systémy jsou spojeny s téměř 100%ní účinností přenosu materiálu do ICP. Je tedy možno dosáhnout daleko větších citlivostí než u dříve jmenovaných. Tento způsob zavádění vyžaduje vysoce-sofistikované zařízení pro tvorbu velmi jemného aerosolu. Nejznámější je tzv. zmlžovač s přímým vstřikem (direct injection nebulizer, DIN) a vysoce-účinný zmlžovač s přímým vstřikem (direct injection high efficiency nebulizer, DIHEN). Oba zmiňované vynikají rychlou odezvou, malými mrtvými objemy, nízkými paměťovými efekty a samozřejmě nízkou spotřebou vzorku při rychlostech průtoku kapaliny od 1 do 100 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. Mezi další přednosti patří nulová tvorba odpadů. Ve srovnání s klasickými systémy, vykazují lepší nebo srovnatelné detekční limity, citlivost i přesnost. [147,157,158].



Obrázek 33.: Schéma zapojení DIHEN [147]

3.3.1.3 *Zavádění pevných vzorků do ICP*

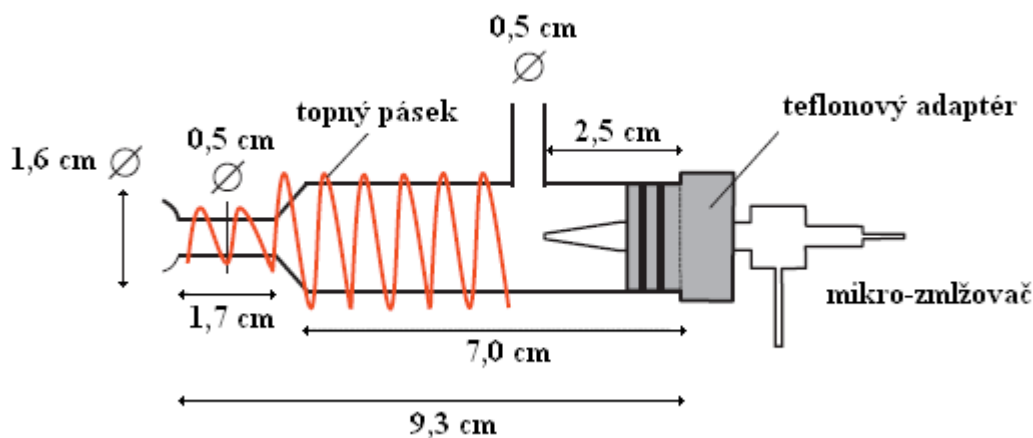
Pokud mluvíme o analýze vzorků v omezeném množství, je potřeba se taktéž zmínit o systémech umožňujících dávkování pevných materiálů přímo do indukčně vázaného plazmatu.

Asi nejdůležitějšími technikami v této oblasti jsou ICP-MS v kombinaci s elektrotermickým odparem (ETV), případně laserovou ablací (LA). Princip elektrotermického vnášení je v podstatě obdobnou elektrotermické atomizace v ETA AAS. Pevný či kapalný vzorek ve velmi malém množství (μg , μL) je elektrotermicky odpařen a vzniká tak suchý aerosol, ten je spojovacími hadičkami veden do plazmové hlavice, kde dochází k jeho ionizaci. Výhodou je, že není vyžadována úplná atomizace, jako u AAS, ale pouze dokonalé odpaření vzorku. Nevýhodou je zisk velice rychlých, transientních signálů, které musí být rychle zpracovány a velmi náročná optimalizace podmínek měření [1,159]. ETV-ICP-MS bylo využito pro analýzu olejů, tělních tekutin, suspenzí, roztoků s vysokým obsahem rozpuštěných solí, zrn minerálů a dalších [160]. Další ze zmiňovaných technik vnášení pevných materiálů je laserová ablace. LA se začala objevovat kolem roku 1985, díky potřebě charakterizovat pevné odpady, geochemické materiály, polovodiče a další. [161]. Podstatou laserové ablace je vyslání vysoce-energetických laserových pulzů o vlnové délce od IČ až po UV oblast ($\lambda = 1064, 532, 355, 266, 213, 193 \text{ nm}$), které při dopadu na pevný vzorek způsobí odprášení materiálu vzorku. Takto vytvořený suchý aerosol je pomocí inertního plynu transportován do plazmové hlavice k samotné ionizaci. ETV i LA umožňují velice rychlé zavádění pevných vzorků do ICP a nevyžadující komplikovanou přípravu. Příprava vzorků a obzvláště těch malých je spojována s velkým rizikem kontaminace a ztrát. Tyto přístupy představují možnost, jak se rozkladu pevného vzorku a dalším analytickým procedurám s tím spojeným vyhnout. Na druhou stranu kalibrace a optimalizace takovýchto metod bývá velmi složitým úkolem.

3.3.1.4 *Praktické aplikace analýzy malých vzorků*

Systém TISIS (Torch Integrated Sample Introduction System) ve spojení s ICP-MS ve své práci popsali Marco Grotti a kol. [162]. Speciálně upravený vnášecí systém byl použit k dávkování mikrovzorků do plazmatu (méně než $200 \mu\text{L}$). Práce se zabývala stanovením ultrastopových koncentrací Cd, Cr, Co, Fe, Mn, Pb, V a Zn ve sněhu z Antarktidy. Sestava TISIS se skládala z následujících částí. Mikrozmlžovač byl upevněn

do teflonového adaptéru, který byl přímo spojen se single-pass odpařovací mlžnou komorou s bočním vstupem pro dávkování plynu.



Obrázek 34.: Systém TISIS [162]

Byly optimalizovány následující parametry. Teplota opláštění, teplota uvnitř komory a rychlost průtoku vzorku. Dále se sledovaly výkonnostní charakteristiky metody, jako jsou citlivost, mez detekce, stabilita a paměťové efekty. Pro srovnání byla použita referenční cinnabar mlžná komora o vnitřním objemu 20 ml. Validace metody byla provedena za použití následujících certifikovaných referenčních materiálů CRM: SRM 1486 (kostní moučka), SRM 1570a (špenát) a BCR 635 (lidská krev). CRM o hmotnosti 50 mg pro pevné vzorky a 250 mg pro původní neředěnou krev byly mineralizovány a připraveny k analýze (výsledný objem po ředění = 5 ml) ICP-DRC-MS (ICP-MS s dynamickou reakční celou; reakční plyny: amoniak a methan). Za optimalizovaných podmínek bylo dosaženo průtoku vzorku kolem $20 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. Citlivost metody se systémem TISIS byla, v porovnání s klasickými metodami využívajícími dávkovací systémy - mikrozmlžovač / cinnabar komora, 2 – 8krát vyšší. RSD byly v krátkodobém i dlouhodobém časovém úseku menší než 5 %. S využitím TISIS bylo dosaženo nižších limitů detekce nežli u konvenčního uspořádání a to u následujících izotopů ($\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$): ${}^7\text{Li}$ – 2,0; ${}^{52}\text{Cr}$ – 2,1; ${}^{63}\text{Cu}$ – 4,6; ${}^{115}\text{In}$ – 0,3; ${}^{208}\text{Pb}$ – 2,5. Vyšší detekční limity ($\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$), byly získány jen pro některé izotopy ${}^{55}\text{Mn}$ – 30; ${}^{56}\text{Fe}$ – 68; ${}^{80}\text{Se}$ – 127, což bylo zapříčiněno zvýšením pozadí a zhoršením stability signálu. Systém TISIS ve spojení s ICP-MS prokázal velmi dobré charakteristiky pro práci se vzorky v omezeném množství. Ve studii byly použity mikro vzorky environmentálního, klinického a biologického původu.

Mikrovzorky lidských tkání byly analyzovány v práci Björna a kol. [163]. Vzorky izolované DNA, exosomy z vaječníků a melanom byly testovány na přítomnost platiny pomocí ICP-MS. Rakovinové buňky vaječníků a melanomu byly pěstovány v růstovém médiu a následně vystaveny hodinovému kontaktu s cisplatinou. Po inkubaci byly buňky zpracovány dle standardních postupů a připraveny k analýze ICP-MS. Pro dávkování vzorku byla použita peristaltická pumpa RS 422 a průtokový injekční dávkovací systém ve spojení s parallel-path zmlžovačem a cyklonickou mlžnou komorou (spotřeba vzorku kolem 10 μL). Systém se ukázal jako vhodný pro rutinní analýzu větších sérií mikrovzorků tohoto charakteru.

V jiné práci se Becker a kol. zabývali použitím ICP-MS a LA-ICP-MS pro stanovení stopových a ultrastopových koncentrací radionuklidů s dlouhou dobou života (^{90}Se ; ^{129}I ; ^{226}Ra ; ^{230}Th ; ^{237}Np ; ^{238}U ; ^{239}Pu ; ^{241}Am) [164]. Stopová a ultrastopová radionuklidová analýza je naprostou součástí jaderného, environmentálního, geologického, biologického a lékařského výzkumu. ICP-MS a LA-ICP-MS umožňuje velmi citlivé měření ($\text{pg}\cdot\text{g}^{-1}$) radionuklidů s dlouhou dobou života. Ve spojení s mikrozmlžovači a miniaturizovanými mlžnými komorami bylo zapotřebí velmi malé množství vzorku v řádech μL .

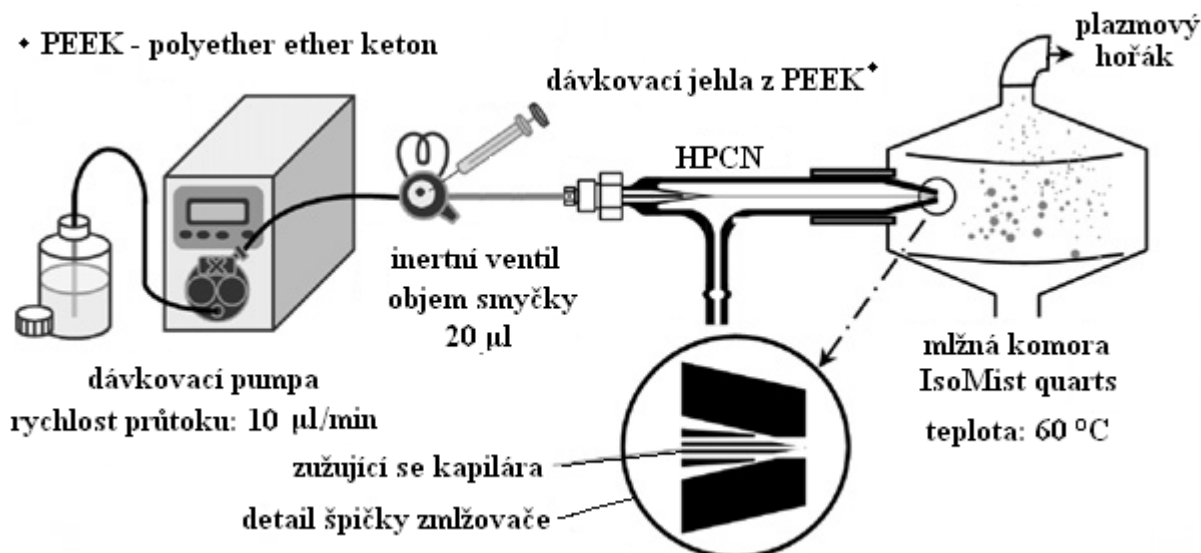
Kapilární elektroforéza poskytuje vysokou separační účinnost při použití velmi malého množství vzorku (nanolitry). Vzhledem k malému objemu vzorku vyžaduje spojení kapilární elektroforézy a hmotnostní spektrometrie s ionizací v indukčně vázaném plazmatu CE-ICP-MS vysokou efektivitu transportu aerosolu. Janes a kol. se ve své práci zaměřili na charakterizaci mikrozmlžovačů a jejich budoucí využití v CE-ICP-MS [165]. Zmlžovač uzpůsobený k přímému vstřiku do plazmatu (DIN), se ukázal v nižších rychlostech ($< 15 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$) jako nevyhovující. Detekční limity při použití CE-DIN-ICP-MS byly až 600 krát horší, než při zapojení klasického dávkovacího systému. Tato studie se tedy zabývala charakterizací tří MicroMist zmlžovačů stejného modelu (AR30-01-FM01). Při rychlosti průtoku zmlžovacího plynu $1 \text{ l}\cdot\text{min}^{-1}$ je specifická rychlost průtoku vzorku těmito zmlžovači $100 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. Sériová čísla mikrozmlžovačů byla následující: 48274, 64016 a 64041. Samonasávací schopnost mikrozmlžovačů se měnila v závislosti na jejich geometrii a rychlosti průtoku zmlžovacího plynu. Celý systém sestával ze zásobní nádoby testovaného vzorku, spojovací hadičky o vnitřním průměru $250 \mu\text{m}$ a délce 22 cm spojující vzorek a zmlžovač, zmlžovače a cinnabar mlžné komory ($V = 20\text{ml}$). Kritický

bod testování bylo zaplnění hadičky před samotným měřením (eliminace mrtvých objemů) Samonasávací schopnost zmlžovačů, vlivem proudícího nosného plynu, byla měřena nasátím vody z předem zvážené nádoby. Byly zjištěny samonasávací schopnosti testovaných zmlžovačů v $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. Tyto hodnoty se pro sledované mikrozmžovače podstatně lišily. Studie uzavírá konstatováním, že samonasávací schopnost je silně závislá na rychlosti průtoku nosného plynu, na geometrii zmlžovače a na rozměrech (průměr, délka) hadičky spojující nasávaný vzorek a zmlžovač.

Ve studii Maestre a kol. [166] bylo testováno pět odlišných pneumatických zmlžovačů ve spojení s ICP-OES a ICP-MS. Jako porovnávací byly využity následující zmlžovače: HEN (high efficiency nebulizer) – Meinhard Glass Products, Santa Ana, CA, USA a MMN (MicroMist nebulizer) – Glass Expansion, Australia, model AR30-1- FM005. Vlastnosti těchto zmlžovačů byly srovnány s komerčně dostupným teflonovým (PFA) zmlžovačem (CPI International, Nizozemsko), dvěma prototypy HSN (high solid nebulizer) - Microglass of Colorado Quality Scientific Glassware a PMN (polymerním mikrokoncentrickým zmlžovačem) - Sci-Tek Instruments, UK. Všechny jmenované zmlžovače jsou schopny generovat stabilní aerosol i při nízkých rychlostech průtoku kapaliny ($\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$). Oproti klasickým zmlžovačům mají podstatně menší mrtvé objemy, což přispívá ke snížení paměťových efektů. Zmlžovače byly testovány v uspořádání s cyklonickou (50 ml) a jednorůchodovou (30 ml) mlžnou komorou. U každého zmlžovače byl ocharakterizován terciární aerosol, který vycházel z mlžné komory. Byla měřena velikost a distribuce generovaných částic aerosolu a dále například rychlost dopravy analytu. Studie prokázala, že HEN vytváří mnohem jemnější primární aerosoly než MMN a konvenční zmlžovače. Tento závěr může být podpořen skutečností, že plocha příčného řezu na výstupu plynu tohoto zmlžovače je menší, a tím je vyšší protitlak nosného plynu. Na tvorbě aerosolu vystupujícího z HEN se tedy podílí daleko větší množství kinetické energie. Dále ze studie vyplývá, že oproti MMN poskytuje PFA zmlžovač jemnější aerosoly a to díky účinnějšímu přenosu energie z plynu do proudícího kapalného vzorku. Vzhledem ke své konstrukci se PFAN také osvědčil k analýze roztoků s vyšším obsahem solí. Zmiňovaný zmlžovač HSN byl navržen pro analýzu roztoků s vyšším obsahem solí nebo kalů. HSN poskytuje poměrně nízkou citlivost a vysoké limity detekce, ale mezi testovanými zmlžovači vyniká právě při analýzách vzorků s vyšším obsahem solí. Práce poukazuje na poměrně malou rozdílnost mezi testovanými zmlžovači a zároveň

dodává, že nejdůležitějším parametrem je kvalita terciárního aerosolu, který je poměrně významně ovlivněn volbou mlžné komory.

Takasaki a kol. ve své práci sestavili vysoceúčinný dávkovací systémem pro zavádění malých objemů vzorků biologického původu [145]. Typický dávkovací systém sestávající z běžného pneumatického zmlžovače a mlžné komory není pro analýzu malých biologických vzorků vhodný. Nevhodnost klasického systému je opodstatněna velkou spotřebou vzorku, nízkou efektivitou (pouze 1 – 10% aerosolu do plazmatu) a neschopností práce při velmi malých průtocích. Pro analýzu těchto vzorků bylo využito i přímého zavádění aerosolu do ICP pomocí DIN a DIHEN. Vzhledem k intoleranci DIN a DIHEN k přítomnosti pevných nerozpuštěných částic, docházelo k jejich ucpávání a byly tedy označeny jako nevhodné. Pro dané potřeby byl tedy vyvinut vysoce výkonný koncentrický zmlžovač (high performance concentric nebulizer, HPCN), který bez problémů pracoval ve velmi nízkých rychlostech průtoku vzorku ($< 10 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$), disponoval tolerancí k nerozpuštěným pevným částicám a generoval velmi jemné aerosoli. Nízká účinnost transportu analytu do plazmatu byla způsobována nárazem aerosolu na vnitřní stěnu mlžné komory a proto byla klasická mlžná komora nahrazena mlžnou komorou s regulovatelnou teplotou. Teplota pláště mlžné komory byla nastavitelná v rozsahu teplot 20 - 60 °C. Před samotným HPCN zmlžovačem byla včleněna smyčka, do které se injekční stříkačkou dával vzorek. Smyčka před zmlžovačem snižovala množství spotřebovaného vzorku a zajišťovala vysokou propustnost analýzy. Bylo zjištěno, že mlžná komora s regulovatelnou teplotou výrazně přispěla ke zvýšení efektivity přepravy aerosolu do ICP. Navržený dávkovací systém byl testován na základě prvkové analýzy referenčního materiálu obsahujícího bakterii *Escherichia Coli*. Detekční limity pro analyzované prvky (Na, Mg, P, S, Ca, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Y, Mo, Cd, Ba a Pb) byly v následujícím intervalu hodnot: 0,004 - 0,3 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Navržený vysoceúčinný dávkovací systém v kombinaci s ICP-MS představuje univerzální a citlivou techniku pro multielementární analýzu malých biologických vzorků (spotřeba vzorku cca 20 μL).



Obrázek 35.: Analytická sestava s upraveným dávkovacím systémem pro malé biologické vzorky [145]

3.3.2 Experimentální část

3.3.2.1 Instrumentace

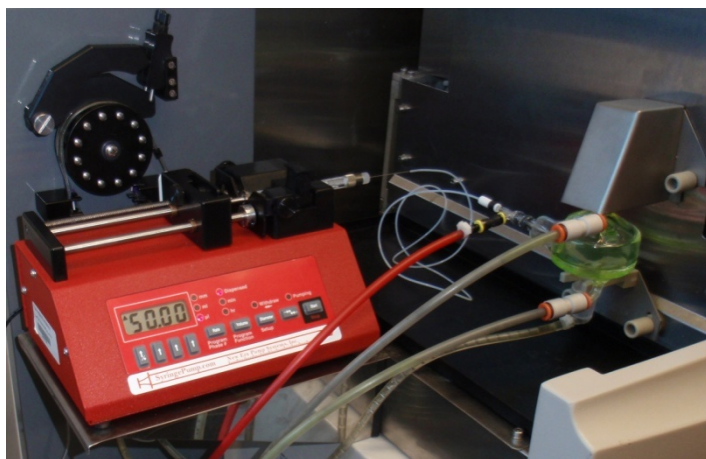
Práce se zabývala návrhem spojení a ocharakterizováním lineární pumpy a oaTOF-ICP-MS. Lineární pumpa je alternativou pumpy peristaltické a umožňuje práci s daleko menšími objemy vzorků a disponuje větší kontrolou nad dávkovacím mechanismem. Pevné certifikované referenční materiály (CRM), které sloužily k validaci navrženého spojení, byly předem zpracovány pomocí mikrovlnného rozkladu na zařízení Speedway MWS-2 (Berghof, Německo) již dříve zmiňovaném v kapitole (3.1.2.1). Jako lineární pumpa byla využita NE-1002X Programable microfluidics Syringe pump (Toledo, USA).

Lineární pumpa NE-1002X (Obrázek: 36.) [167] je určena pro plynulé dávkování kapalných vzorků s možností velmi jemné regulace vstřikování. Ve vrchní části přístroje je pevně uchycena stříkačka, (různé materiály, nejčastěji sklo, ocel) jejíž píst je poháněn pohybem mikrometrického šroubu. Rychlost otáček šroubu závisí na zvolené rychlosti průtoku. Stříkačka je zakončena úzkou jehlou, na kterou se dá nasadit kapilára spojující ji se zbytkem dávkovacího systému (zmlžovač – MicroMist, 400 µL.min⁻¹; temperovaná (10°C) cyklonická mlžná komora). Nětěsnost v tomto spojení může způsobit nestabilitu dávkování vzorku. Aby byla spotřeba vzorku co nejmenší, zvolila se délka spojovací kapiláry tak, aby výsledný vnitřní objem kapiláry činil zhruba 100 µL. Pro co největší

komfort a stabilitu byla lineární pumpa umístěna na nerezový stojánek pevně spojený s hmotnostním spektrometrem v blízkosti konvenční peristaltické pumpy.



Obrázek 36.: Lineární pumpa - NE-1002X



Obrázek 37.: Konkrétní adjustace pumpy v laboratoři

Dávkovací systém byl napojen na simultánní hmotnostní spektrometr s ionizací v indukčně vázaném plazmatu, ortogonálním urychlením iontů a průletovým analyzátozem, oaTOF-ICP-MS Optimass 8000 (GBC Scientific Equipment, Australia), již dříve zmiňovaný v kapitole (3.1.2.1). Podmínky analýzy oaTOF-ICP-MS byly optimalizovány pro dosažení maximální citlivosti a uspokojivého rozlišení pro jednoprvkový standard uranu o koncentraci $1\mu\text{g.L}^{-1}$. Tabulka 16 uvádí optimalizované nastavení hmotnostního spektrometru.

Iontová optika		Modulace iontového paprsku	
Parametr	Hodnota	Parametr	Hodnota
Skimmer	- 1200 V	Fill	- 35 V
Extraction	- 1300 V	Fill bias	0.1 V
Z1	- 450 V	Fill grid	-2 V
Y mean	- 490 V	Pushout grid	- 470 V
Y deflection	-2 V	Pushout plate	569 V
Z lens mean	- 940 V	Blanker	200 V
Z lens deflection	-50 V	Spectral frequency	33 kHz
Lens body	- 145 V	Reflectron	600 V
Multiplier gain	2660 V	Measurement mode	Pulse counting/analog
Integration window	Auto		

Tabulka 16.: Optimalizované podmínky oaTOF-ICP-MS spektrometru

3.3.2.2 Použité chemikálie a standardy

- Kyselina dusičná 65% p.p. (PENTA, Česká republika)
- Jednoprvkový standard In, ($1,000 \pm 0,002 \text{ g.l}^{-1}$); SCP Science, Kanada
- Jednoprvkové standardy U, Bi, Pb, Pt, Ta, Nd, In, Mo, Y, Sr, Cu, Co, Cr, La, Li, B, Ba, ($1,000 \pm 0,002 \text{ g.l}^{-1}$); Analytika, Česká republika)
- Multielementární kalibrační standard M008 (Analytika, Česká republika): La, Ce, Pr, Nd o koncentraci $100 \pm 0,2 \text{ mg.l}^{-1}$; Dy, Er, Eu, Gd, Ho, Lu, Se, Sm, Tb, Tm, Y, Yb o koncentraci $20 \pm 0,04 \text{ mg.l}^{-1}$ (Analytika, Česká republika)

Použité Certifikované referenční materiály

- CRM EnviroMat – Drinking Water (EP-L-2) (SCP Science, Kanada)
- CRM GBW07601 – Human hair (National Analysis Centre for Iron and Steel, Čína)
- CRM IAEA-413 – Algae (IAEA Terrestrial Environment Laboratory, Rakousko)

3.3.2.3 Použité laboratorní nádobí a pomůcky

V práci bylo použito plastového laboratorního nádobí. Plastových odměrných baněk, nálevek a odm. válců. Dále byly použity automatické pipety různých objemů. Pro

dávkování vzorků lineární pumpou byla použita 1 ml skleněná stříkačka s ocelovou jehlou napojenou na teflonovou kapiláru.

3.3.2.4 *Příprava kalibračních roztoků a certifikovaných referenčních materiálů*

Pro testování navrženého dávkování pomocí lineární pumpy byly připraveny různé kalibrační roztoky o různých koncentracích přítomných prvků. Souhrnná tabulka 17 uvádí jaké prvky a jaké koncentrační úrovně obsahovaly jednotlivé kalibrační roztoky. Jakožto interního standardu bylo využito india o výsledné koncentraci $5 \mu\text{g.L}^{-1}$ v kalibračních řadách. Na přípravu každého kalibračního standardu byla využita demineralizovaná voda a podvarová kyselina dusičná (0,2 ml). Dále bylo potřeba připravit referenční materiály. Referenční materiály sloužily pro validaci metody pro různé typy matric. Referenční materiál **Environmat** je představitelem **matrice pitné vody** a byl připraven tisíci-násobným ředěním původního zásobního roztoku. Další referenční materiály byly pevného charakteru a představovaly následující matrice: GBW07601 – lidské vlasy a IAEA-413 – řasa. Každý vzorek referenčního materiálu byl připraven ve třech replikách. Pro přípravu pevných materiálů bylo odváženo vždy kolem 0,2 g, ke kterým bylo v rozkladné nádobě přidáno 6 ml podvarové kyseliny dusičné. Tato směs byla nechána 20 minut zreagovat a po této době byla předložena k mikrovlnné mineralizaci. Mineralizační program sestával ze tří kroků.

Mineralizace GBW07601, lidské vlasy: V prvním kroku byla teplota nastavena na $150 \text{ }^\circ\text{C}$. Krok 1 trval 15 minut, při 80% výkonu. Ve druhém kroku byla teplota $205 \text{ }^\circ\text{C}$ držena po dobu 25 minut na 80 % výkonu. Třetí krok byl ponechán opět volnému chladnutí rozkládaných vzorků v mineralizátoru po dobu cca 10 minut. Po skončení mineralizace a po vychladnutí rozkladných nádob byly roztoky kvantitativně převedeny do odměrných baněk o objemu 50 ml. Ty byly doplněny demineralizovanou vodou po rysku. Z takto připravených roztoků bylo odpipetováno 5 ml do 10ml odměrných baněk. K takto připraveným vzorkům již nebylo třeba přidávat 65 % kyselinu dusičnou. Ke všem třem replikám bylo přidáno takové množství vnitřního standardu, aby jeho výsledná koncentrace ve vzorku činila $5 \mu\text{g.L}^{-1}$. Stejným způsobem byl připraven slepý pokus, který místo CRM obsahoval pouze demineralizovanou vodu.

Mineralizace IAEA-413, řasy: Mineralizační program pro rozklad tohoto materiálu byl totožný s rozkladným programem pro CRM lidské vlasy. Po skončení mineralizace a po vychladnutí rozkladných nádob byly roztoky kvantitativně převedeny do odměrných baněk o objemu 50 ml a doplněny demineralizovanou vodou po rysku. Z takto připravených roztoků bylo odpipetováno 0,1 ml do 10ml odměrných baněk. K připraveným vzorkům se dále přidávalo 0,5 ml 65 % kyseliny dusičné. Ke všem třem replikám bylo opět přidáno takové množství vnitřního standardu, aby jeho výsledná koncentrace ve vzorku byla 5 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Stejným způsobem byl připraven slepý pokus, který místo CRM obsahoval pouze demineralizovanou vodu.

Kalibrační standard / skupina prvků	A	B	C
S0	0	0	0
S1	0,5	0,1	0,5
S2	1	0,2	1
S3	2,5	0,5	2,5
S4	5	1	5
S5	10	2	10
Kalibrační standard / skupina prvků	D	E	F
S0	0		0
S1	0,1	1	0,1
S2	0,3		0,3
S3	0,5		0,5
S4	1		1
S5	3		3
S6	5		5
S7	10		10
Kalibrační standard / skupina prvků	G	H	
S0	0	0	
S1	0,1	0,1	
S2	0,3	0,3	
S3	0,5	0,5	
S4	1	1	
S5	3	3	
S6	5	5	
S7	10	10	

A (Lanthanoidy I): La, Ce, Pr, Nd

B (Lanthanoidy II): Dy, Er, Eu, Gd, Ho, Lu, Se, Sm, Tb, Tm, Y, Yb

C (multiprvkový standard – 17 prvků): U, Bi, Pb, Pt, Ta, Nd, In, Mo, Y, Sr, Cu, Co, Cr, La, Li, B, Ba

D (multiprvkový standard – 39 prvků): Ag, Al, As, Au, B, 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, Th, Ti, Tl, V, W, Zn, Zr

E (testovací standard uranu): U

F (standard pro CRM EnviroMat): As, Be, Cd, Co, Cr, Cu, Mn, Mo, Ni, Pb, Sb, Se, Sr, Tl, V, Zn

G (standard pro CRM GBW07601): Ag, As, Be, Bi, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Li, Mn, Mo, Ni, Pb, Sb, Se, Sr, Ti

H (standard pro CRM IAEA-413): As, Cd, Co, Cr, Mn, Ni, Pb, Zn

Tabulka 17.: Úrovně koncentrací jednotlivých kalibračních řad (vše v $\mu\text{g.L}^{-1}$) pro testování zapojení lineární pumpy s oaTOF-ICP-MS

3.3.3 Výsledky a diskuze

V této práci jsme se zabývali návrhem vhodného uspořádání hmotnostního spektrometru oaTOF-ICP-MS a lineární dávkovací pumpy pro analýzu malých vzorků. Následně bylo toto uspořádání charakterizováno s ohledem na různé způsoby vnášení, spotřebu vzorku a další parametry. Dávkovací systém sestával z programovatelné lineární pumpy již dříve popsané v kapitole 3.3.2.1, skleněné mililitrové stříkačky, zakončené teflonovou kapilárou o objemu 100 μL , zmlžovače Micromist (400 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$) a dvouplášťové, termostátované, cyklonické mlžné komory. Celý dávkovací systém byl napojen na konvenční plazmový hořák a oaTOF-ICP-MS hmotnostní spektrometr. Toto uspořádání bylo testováno jak v kontinuálním módu průtoku vzorku, tak v módu diskrétním, kdy bylo do systému rázem vpraveno malé množství vzorku. S ohledem na výsledky testování obou módů bylo zjištěno, že diskrétní mód vnášení vzorku pomocí lineární pumpy přináší lepší výsledky. V závěru se tedy tato práce zaměřuje právě na tento způsob vnášení. Validace diskrétní metody vnášení vzorku do plazmatu pomocí lineární pumpy byla provedena na základě analýzy různých typů CRM.

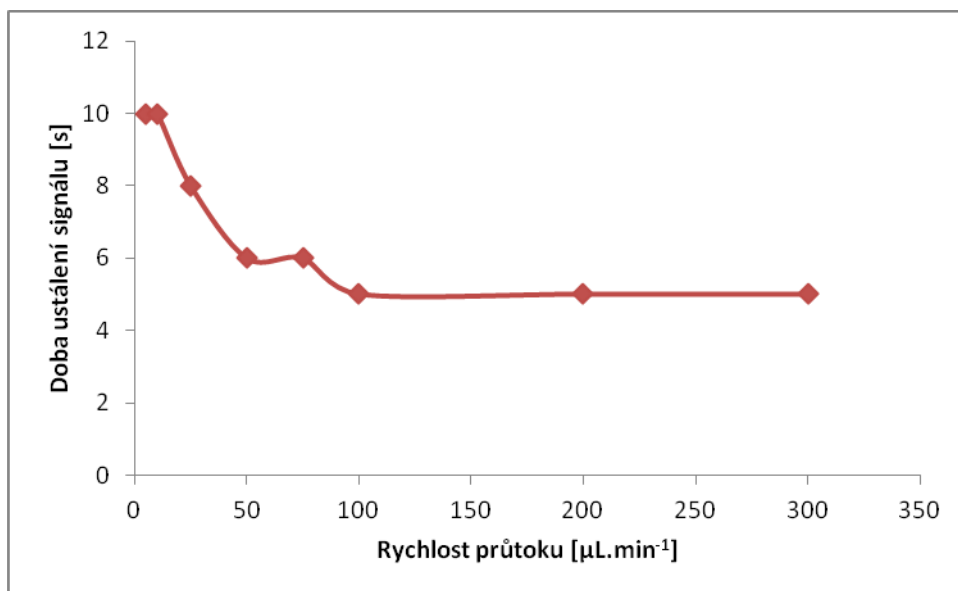
3.3.3.1 Kontinuální vnášení vzorku do plazmatu

Prvním z experimentů provedených v této práci bylo zjištění charakteristik spojení lineární pumpy s oaTOF-ICP-MS v kontinuálním módu dávkování vzorku. Pro tyto účely byl připraven standard uranu o koncentraci 1 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Standard uranu byl postupně dávkován do hmotnostního spektrometru při různě zvolených rychlostech průtoku (5, 10, 25, 50, 75, 100, 200 a 300 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$). Měření bylo provedeno ve třech opakováních, kdy celková doba integrace signálu činila 5s. Doba, která byla nutná pro ustálení intenzity signálu, byla zjištěna za použití softwarového nástroje „Time Scan“. Celková doba nutná k analýze se skládala z dopravního času a času potřebného na ustálení a integraci signálu. Pro jednotlivé rychlosti průtoku byly zaznamenány intenzity signálu, rozlišení, doby ustálení signálu a celkové doby analýzy, celkový objem spotřebovaného vzorku, RSD a byly počítány detekční limity dle konceptu 3 σ pro první kalibrační standard.

Rychlost průtoku [$\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$]	Doba ustálení signálu [s]	Celková doba analýzy [s]	Objem spotřebovaného vzorku [μL]	Intenzita signálu [counts]	Rozlišení	RSD [%]	Detekční limit [$\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$]
5	10	25	2	750	930	11,8	205
10	10	25	4	1750	1000	0,79	86,7
25	8	23	11	4500	1200	0,76	32,6
50	6	21	20	9000	1300	3,41	16,3
75	6	21	30	15000	1500	1,37	10,6
100	5	20	47	22500	1800	1,57	9,1
200	5	20	78	37500	1750	1,34	4,55
300	5	20	119	55350	2050	3,82	3,83

Tabulka 18.: Charakteristiky kontinuálního dávkování pomocí lineární pumpy (izotop U^{238})

Z naměřených hodnot a z následujících grafů je zcela zřejmé, že rychlost průtoku je zásadním parametrem ovlivňujícím analytický výkon techniky.

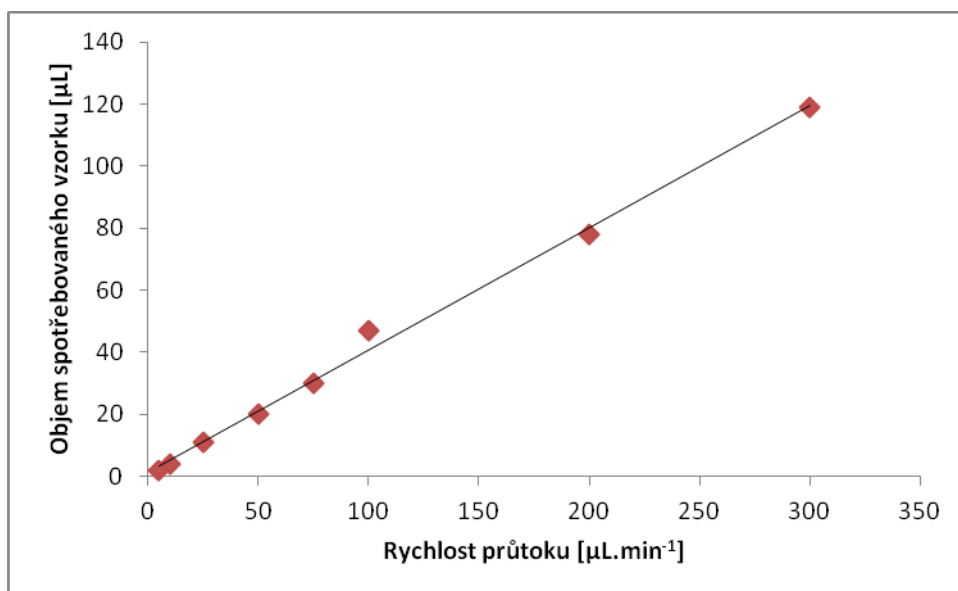


Graf 2.: Závislost doby ustálení signálu na rychlosti průtoku ($1\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, U^{238})

Doba ustálení signálu je velice důležitým parametrem, který může významným způsobem prodloužit dobu analýzy a tím navýšit minimální množství vzorku potřebného k analýze. Do doby ustálení signálu se započítává doba, za kterou testovaný vzorek projde celým systémem a způsobí stabilní odezvu přístroje. Při vnášení vzorku do ICP dochází

obecně k fluktuacím signálu, což je samozřejmě výsledkem náhlé změny koncentrace analytu a podmínek v plazmatu. V případě spojení lineární pumpy v kontinuálním módu dávkování a MS byla fluktuace zpočátku vysoká, ale poměrně záhy se ustalovala v závislosti na množství a koncentraci vnášeného vzorku. Z grafu je patrné, že při velmi nízkých rychlostech dávkování (pod $50 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$) docházelo k velmi pomalé stabilizaci signálu. Dále je možné zaznamenat, že se zvyšující se rychlostí průtoku testovaného standardu uranu se snižovala i doba nutná pro stabilizaci signálu. Tento jev byl nejmarkantnější v rozsahu rychlostí průtoku od 5 do $100 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. Dalším zvyšováním rychlosti průtoku po $100 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ již nebylo dosaženo rychlejší stabilizace. Celková doba nutná pro analýzu byla součtem doby ustálení signálu (flexibilní část dle rychlosti průtoku) a doby nutné pro integraci signálu ($3 \times 5\text{s}$ – konstantní část). Doba analýzy pro průtok $5 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ byla 25s, pro průtok $100 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ už jen 20s. V rámci úspory času a větší citlivosti, spíše než v rámci úspory zkoumaného vzorku by tedy v tomto šetření dopadl nejlépe průtok $100 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$.

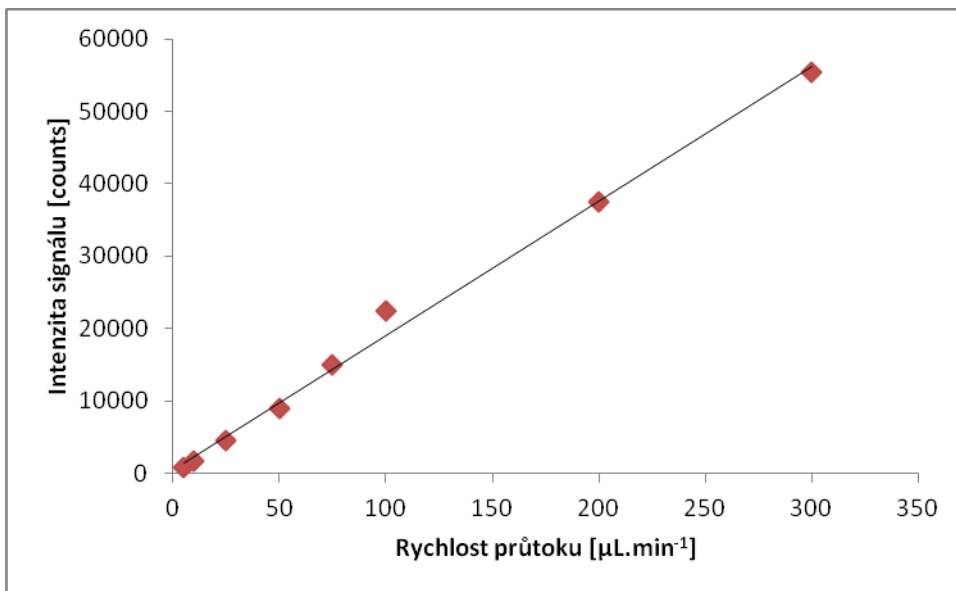
Abychom mohli kriticky zhodnotit který průtok je ten nejvhodnější pro kontinuální mód vnášení vzorků pomocí lineární pumpy, je zde nutné uvést ještě několik dalších parametrů v závislosti na rychlosti průtoku vzorku. Následující graf 3. uvádí závislost celkového množství spotřebovaného vzorku na rychlosti průtoku.



Graf 3.: Závislost objemu spotřebovaného vzorku na rychlosti průtoku

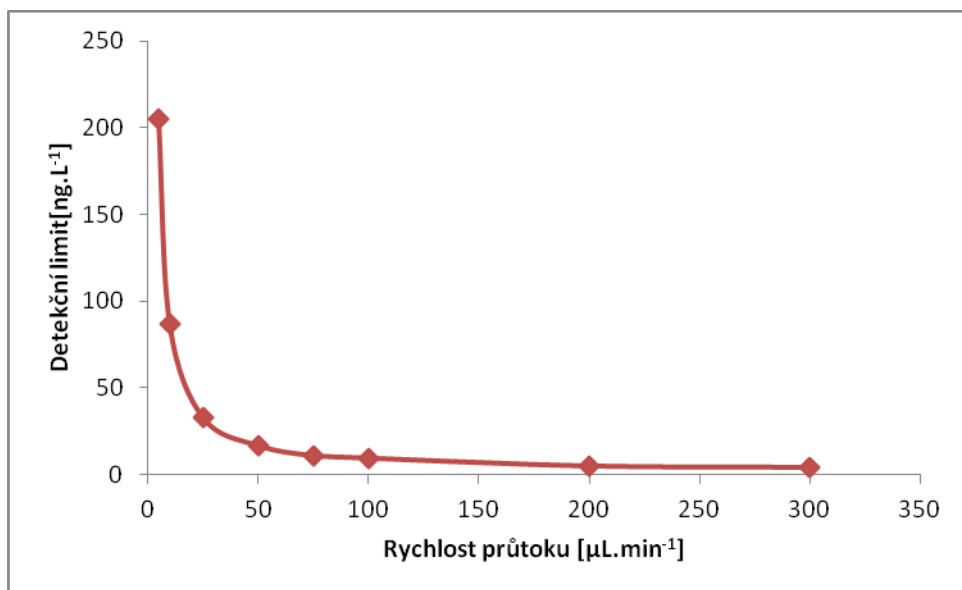
Vyobrazená závislost vykazuje lineární průběh, tedy se vzrůstající rychlostí průtoku roste i spotřeba vzorku pro analýzu. Pokud bychom tedy preferovali co nejnižší spotřebu

vzorku z důvodů omezeného množství, nebo snížení vznikajícího odpadu (např. analýza radioaktivních a toxických vzorků), volili bychom tedy nízké průtoky vzorků i za cenu delšího času celkové analýzy. Velice důležitým pohledem pak bude závislost intenzity analytického signálu a detekčního limitu na rychlosti průtoku vzorku.



Graf 4.: Závislost intenzity signálu (5s integrace, $1\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, U^{238}) na rychlosti průtoku

Zde se opět jedná o lineární závislost, tedy se vzrůstající rychlostí průtoku roste i intenzita analytického signálu. Vzhledem k tomu že poměr signál/šum se taktéž neustále zvyšoval v závislosti na rychlosti průtoku, zvyšovala se tak i citlivost metody. Pro vzorky o velmi nízkých koncentracích by tedy bylo nutné volit co nejvyšší rychlost průtoku. Citlivost metody je tedy přímo závislá na množství vzorku, které ionizuje v ICP. Dalším grafem, který tato tvrzení podporuje, je závislost detekčního limitu na rychlosti průtoku.



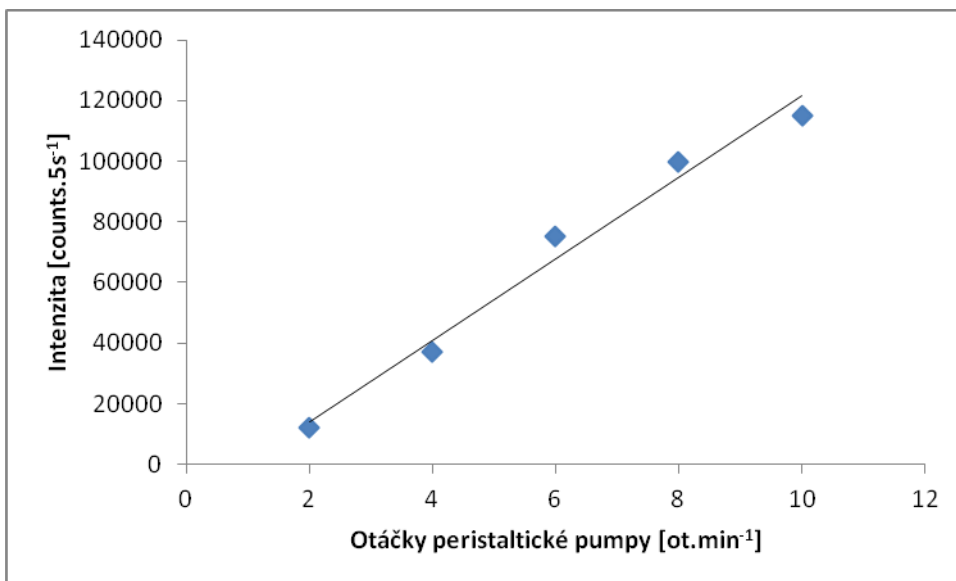
Graf 5.: Závislost detekčního limitu na rychlosti průtoku (5s integrace, $1\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, U^{238})

Tato závislost již není lineární, a ačkoliv detekční limit neustále klesá se vzrůstající rychlostí průtoku, není tento pokles, obzvláště pak v oblasti od $75\ \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ příliš strmý. Vysoký nárůst detekčního limitu v oblasti průtoku pod $25\ \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ je způsoben nízkou účinností transportu vzorku do plazmatu. Z tohoto grafu tedy vyplývá, že ideální rychlost průtoku bude někde v rozmezí mezi $25 - 75\ \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$.

Po zhodnocení všech výsledků pro kontinuální způsob dávkování pomocí lineární pumpy bylo zjištěno, že nejideálnější rychlost průtoku pro dosažení minimální spotřeby vzorku a relativně vysoké citlivosti metody se bude pohybovat v rozmezí $50 - 75\ \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. Oblast těchto dávkovacích rychlostí vykazovala krátkou dobu stabilizace signálu (6 s), nízkou spotřebu vzorku ($18\ \mu\text{L}$ pro rychlost $50\ \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ a $30\ \mu\text{L}$ pro rychlost $75\ \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$) a nízké detekční limity ($16,3\ \text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$ pro rychlost $50\ \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ a $10,6\ \text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$ pro rychlost $75\ \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$), (5s integrace, $1\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, U^{238}).

Pro srovnání charakteristik spojení lineární dávkovací pumpy a hmotnostního spektrometru byla v práci dále testována klasická metoda dávkování vzorku pomocí peristaltické pumpy. Peristaltická pumpa byla napojena do totožného systému jako pumpa lineární. Na hadičky peristaltické pumpy navazovala teflonová kapilára, která byla zapojena do Micromist zmlžovače ($400\ \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$) a následovala již zmiňovaná cyklonická mlžná komora a ICP. Minimální objem vzorku, kterého se pomocí této sestavy dalo dosáhnout byl $314\ \mu\text{L}$ (rychlost pumpy = $10\ \text{ot}\cdot\text{min}^{-1}$, optimalizace nasávacích časů, zkrácení dopravních vzdáleností). Na grafu číslo 6. je sestavena závislost intenzity signálu

($1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, U^{238}) na rychlosti dávkování vzorku (2, 4, 6, 8 a 10 otáček za minutu). Deset otáček peristaltické pumpy za minutu představovalo průtok vzorku $550 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$.

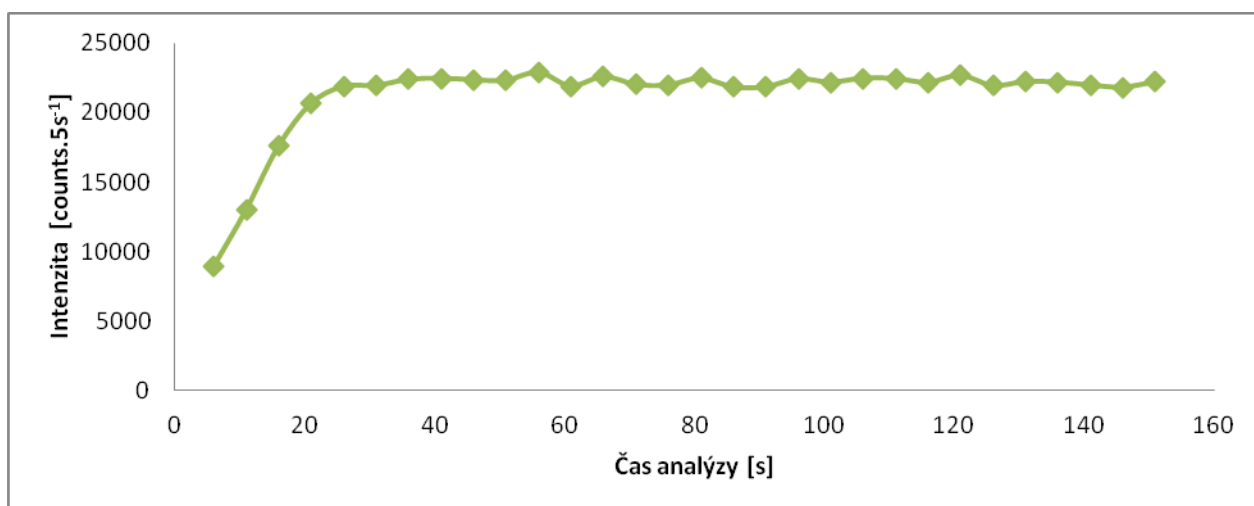


Graf 6.: Závislost Intenzity signálu ($1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, U^{238} , 5s akvizice) na rychlosti dávkování peristaltickou pumpou

Z grafu je patrné, že se vzrůstající rychlostí průtoku lineárně roste i příslušná odezva signálu. V tomto bodě je nutno podotknout, že použitý zmlžovač je od výrobce testován pro rychlost průtoku $400 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ a rychlost otáček peristaltické pumpy $10 \text{ ot}\cdot\text{min}^{-1}$ odpovídala spotřebě $550 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. Dlouhodobé zatěžování zmlžovače velkými průtoky může vést k ucpávání a následnému defektu zmlžovače. Pokud bychom přepočítali rychlost průtoku v $\text{ot}\cdot\text{min}^{-1}$ na $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ a porovnali následně stejnou závislost intenzity signálu na rychlost průtoku pro systém s peristaltickou a lineární pumpou došli bychom k poměrně podobným závislostem. Citlivost metod s peristaltickou pumpou a pumpou lineární bude tedy velmi podobná. Klíčovým faktorem v tomto případě je tedy spotřeba vzorku a stabilita signálu. Spotřeba vzorku se pro peristaltiku pohybovala řádově ve stovkách mikrolitrů, kdežto v případě dávkování s lineární pumpou se pohybujeme v řádech desítek mikrolitrů. Navíc při nízkých otáčkách peristaltické pumpy dochází k pulzaci signálu, která je způsobena peristaltickým pohybem dávkovacího systému. Tato skutečnost vede ke značné nestabilitě signálu a nárůstu RSD.

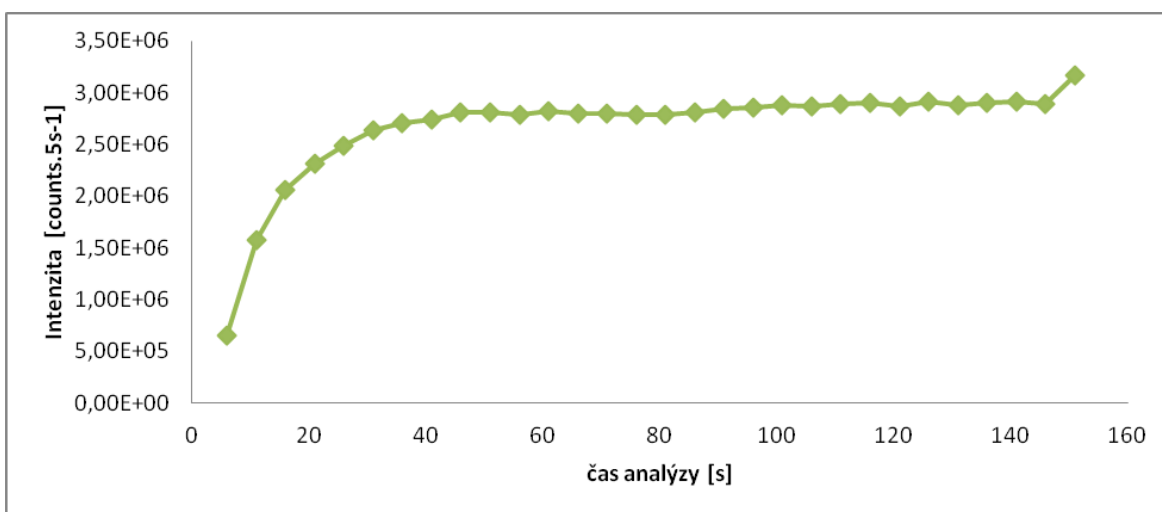
3.3.3.2 Testování paměťového efektu

Paměťový neboli memory efekt, může významným způsobem negativně ovlivnit analýzu. Vzniká ulpíváním dávkovaného vzorku v různých částech dávkovacího systému a je úzce spjat s tzv. mrtvými objemy. Čím větší a rozměrnější dávkovací systém je, tím větší mrtvé objemy většinou představuje. Velikost těchto velmi špatně vymývatelných míst je samozřejmě rovněž odvislá od celkového designu zařízení. Pokud je memory efekt silný, dochází v průběhu analýzy k postupnému spoluvymývání mrtvých objemů a konečný výsledek je poměrně významně zkreslen. Abychom předešli takové situaci, je třeba v průběhu analýzy začlenit dostatečně dlouhý promývací čas a případně i speciální promývací médium. V této části práce jsme se zaměřili na sledování promývacích časů a charakterizaci dávkovacího systému z pohledu mrtvých objemů. Důležitou informací, kterou bylo třeba zjistit, byla informace za jak dlouho a jakým objemem je systém třeba propláchnout po nadávkování určitého objemu modelového vzorku s jednoprvkovým standardem uranu ($1, 100 \mu\text{g.L}^{-1}$), případně multielementárním standardem ($100 \mu\text{g.L}^{-1}$). Testovaný modelový vzorek byl dávkován pomocí lineární dávkovací pumpy, která tlačila písteček skleněné stříkačky a vzorek dále putoval přes teflonovou kapiláru do Micromist zmlžovače ($400 \mu\text{L.min}^{-1}$) a cyklonické mlžné komory. Jako první byla testována odezva na modelový vzorek uranu o koncentraci $1 \mu\text{g.L}^{-1}$. Na grafu číslo 7 je možno vidět závislost intenzity signálu měnící se v čase dávkování.



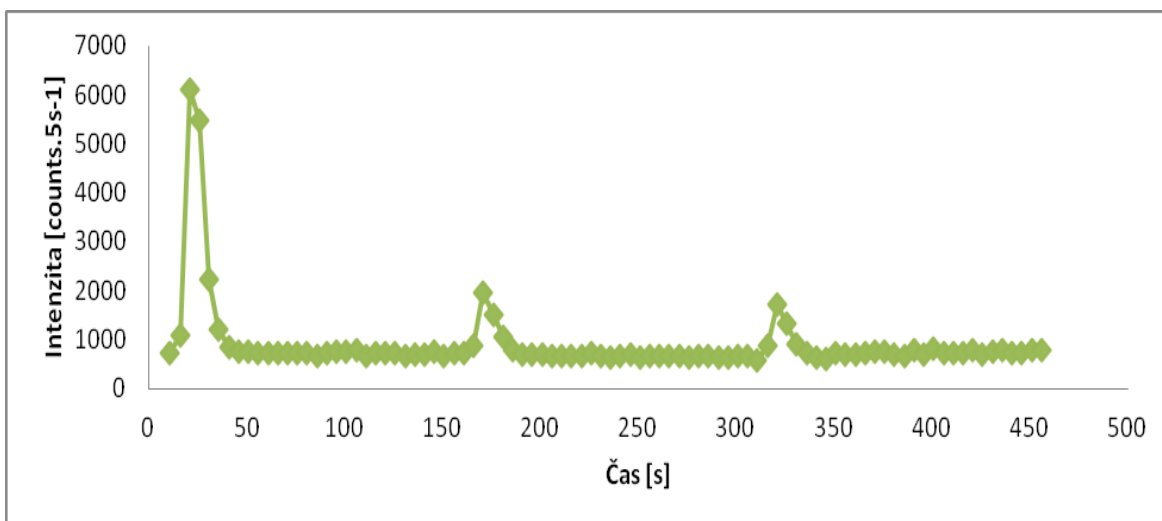
Graf 7.: Závislost intenzity signálu na čase analýzy ($1 \mu\text{g.L}^{-1}$, U^{238} , $75 \mu\text{L.min}^{-1}$)

Celý systém byl vždy před dávkováním standardu důkladně propláchnut demineralizovanou vodou. Doba stabilizace signálu před samotným měřením byla experimentálně určena na 6s. Bylo měřeno 30 replik po 5s akvizici signálu. Z grafu je patrné že celková doba na stabilizaci signálu leží mezi 20 – 30s. Pokud budeme počítat 5s akvizici signálu ve třech opakováních plus 25s na stabilizaci, dostáváme se na celkovou dobu analýzy 40s. Při rychlosti dávkování $75 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ se tak pohybujeme na spotřebě 50 μL pro analýzu. Obdobným způsobem byl dávkován modelový vzorek o koncentraci U $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.



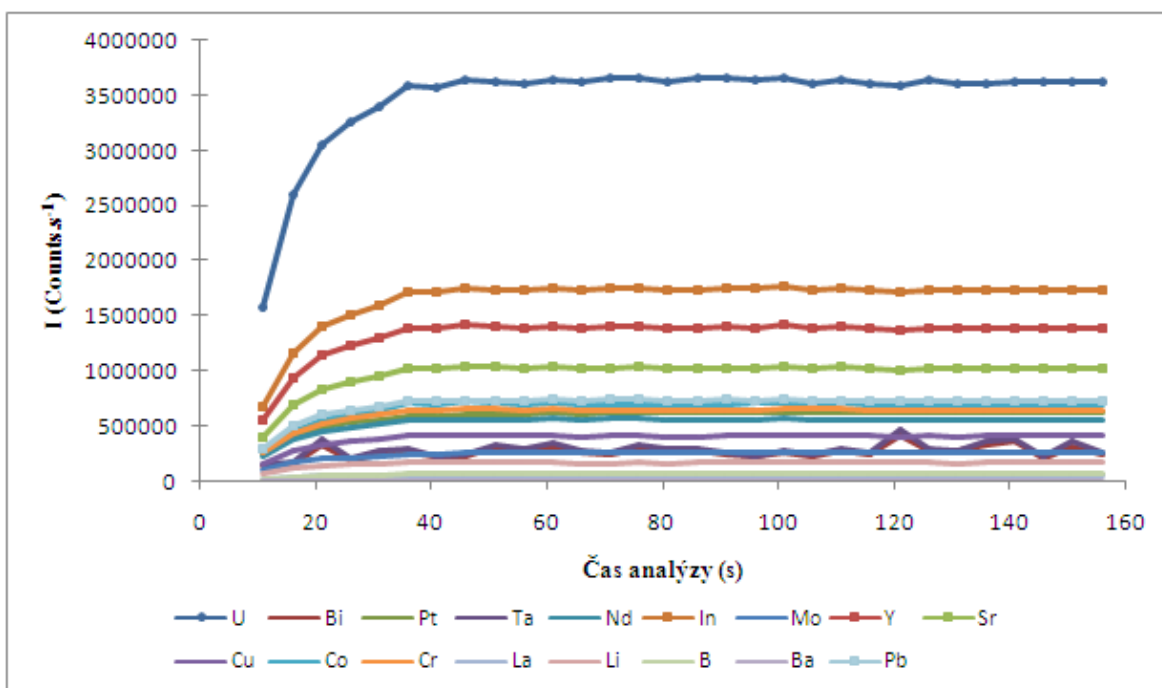
Graf 8.: Závislost intenzity signálu na čase analýzy ($100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, U^{238} , $75 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$)

K ustálení signálu dochází v tomto případě asi o 20 vteřin později. Tento nárůst je způsoben větší koncentrací vzorku. Celková doba analýzy tedy byla pro 3 x 5s akvizici 60s, což odpovídalo spotřebě 75 μL . Po nadávkování standardu uranu byl systém proplachován demineralizovanou vodou. Úroveň signálu uranu byla sledována i v průběhu proplachu. Proplach sestával ze tří po sobě jdoucích, avšak oddělených, 150s fází. V každé fázi bylo provedeno 30 měření po 5s akvizici signálu, následně bylo měření i dávkování zastaveno, vyměněn promývací roztok a proces se takto opakoval.



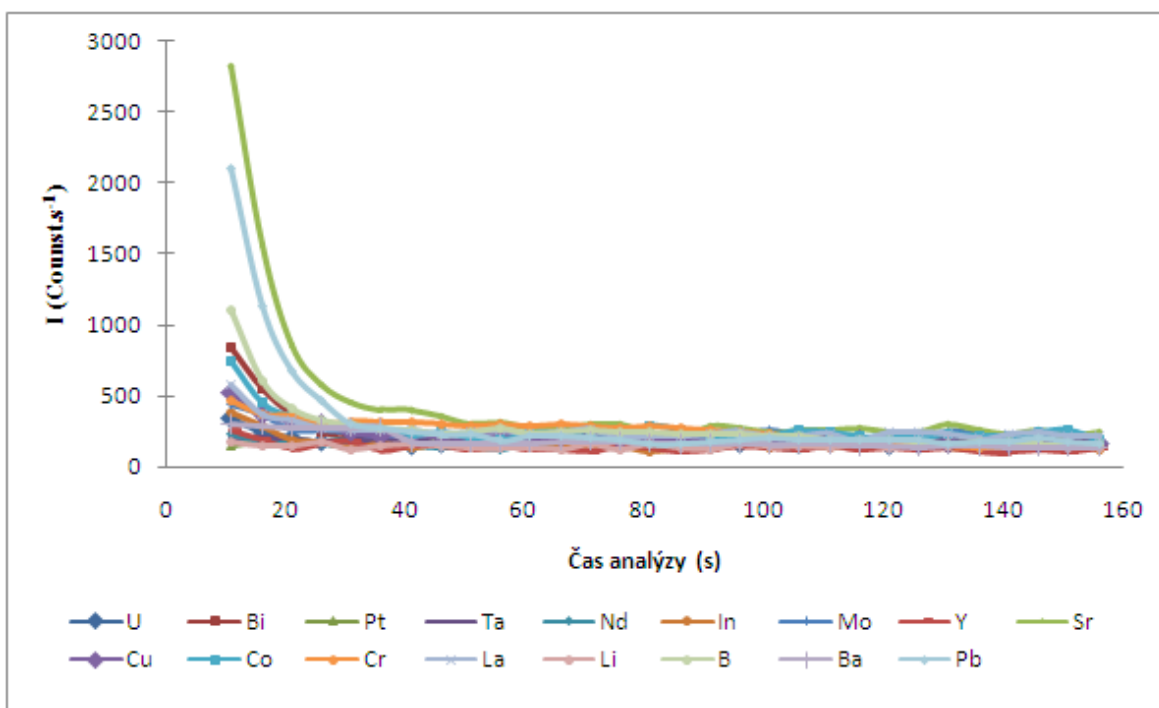
Graf 9.: Závislost intenzity signálu na čase analýzy (proplach po koncentrační úrovni $100 \mu\text{g.L}^{-1}$, U^{238} , $75 \mu\text{L.min}^{-1}$)

Z grafu je patrné, že na začátku každé poplachové fáze dochází k prudké změně intenzity signálu, která se zhruba po 40 vteřinách ustaluje. Tento jev je pravděpodobně spojen s náhlou změnou podmínek uvnitř dávkovacího systému, která vede k proplachu i méně dostupných mrtvých objemů. V první poplachové fázi je vidět nejvyšší nárůst intenzity signálu, což je samozřejmě spojeno s vymýváním těsně po dávkování vysoké koncentrace uranu $100 \mu\text{g.L}^{-1}$. Za proplachový čas lze tedy určit dobu 40s. S ohledem na to že se memory efekt může pro různé prvky projevovat různě, byl v naší práci dále použit modelový roztok obsahující 17 různých prvků o koncentraci $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ (U, Bi, Pb, Pt, Ta, Nd, In, Mo, Y, Sr, Co, Cu, Cr, La, Li, B a Ba). I v tomto případě byla zvolena doba stabilizace signálu 6s při rychlosti průtoku vzorku $75 \mu\text{L.min}^{-1}$. Opět bylo měřeno 30 replik po 5s akvizici signálu.



Graf 10.: Závislost intenzity signálu na čase analýzy (multielementární standard 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$, 75 $\mu\text{L.min}^{-1}$, 5s akvizice)

Cílem tohoto experimentu bylo zjistit rozdílné způsoby chování signálu pro jednotlivé prvky obsažené v multielementárním standardu. Doba stabilizace signálu pro všechny testované prvky byla 40s, což odpovídá při dané rychlosti průtoku vzorku spotřebě 50 μL . Po nadávkování takto koncentrovaného multielementárního standardu a zjištění času pro stabilizaci signálu byl veden další experiment, který měl za úkol odhalit chování systému při proplachu po tomto standardu. V následujícím grafu je možno vidět průběh závislosti intenzity signálu (17 prvků) na čase promývání systému demineralizovanou vodou při rychlosti průtoku 75 $\mu\text{L.min}^{-1}$ a 5s akvizici signálu.



Graf 11.: Závislost intenzity signálu na čase proplachu (demineralizovaná voda po multielementárním standardu $100 \mu\text{g.L}^{-1}$, $75 \mu\text{L.min}^{-1}$, 5s akvizice)

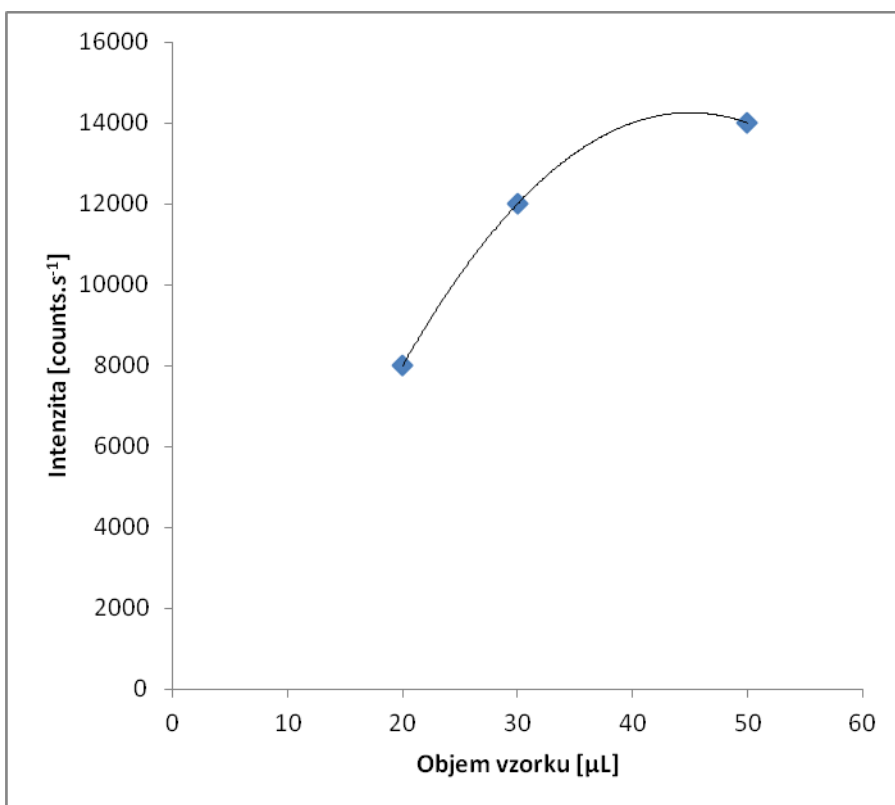
Na základě rozboru grafu můžeme vysledovat, že nejhůře se ze systému vymývalo Sr. Při dané rychlosti průtoku demineralizované vody systémem ($75 \mu\text{L.min}^{-1}$) se úroveň signálu pro Sr stabilizovala (na původní nulovou úroveň) až po 60s. Tato doba představuje $75 \mu\text{L}$ poplachové vody. Zbylé prvky, včetně problematicky vymyvatelného boru, byly ze systému vymyty na původní úroveň signálu do 50s ($63 \mu\text{L}$ poplachové vody).

3.3.3.3 Diskrétní vnášení vzorku do plazmatu

Mimo kontinuálního módu nasávání vzorku pomocí lineární pumpy byl dále v této práci využit mód jednorázového vstříknutí vzorku do zmlžovacího systému tzv. diskrétní mód. Principem tohoto dávkování bylo v první fázi nasátí určitého množství vzduchu do teflonové kapiláry, pomocí zpětného chodu lineární pumpy. Dále byl za tuto vzduchovou „zátku“ nasán vzorek o požadovaném objemu a nakonec byla opět vytvořena vzduchová „zátku“. V předem dobře ocharakterizované teflonové kapiláře (s ohledem na vnitřní objem) vznikla dobře oddělená zóna o přesně definovaném objemu vzorku. Takto připravená zóna zamezila, aby byl dávkovaný vzorek příliš brzy nasán díky samonasávacímu efektu zmlžovače. Objem obou vzduchových „zátek“ se obvykle pohyboval kolem $100 \mu\text{L}$. Pro dávkování bylo opět využito lineární dávkovací pumpy,

teflonové kapiláry, zmlžovače Micromist a cyklonické mlžné komory. Výhodou tohoto dávkování je velmi přesně definovaný objem, který je v krátké době jednorázově nastříknut do systému. Další výhodou je, v případě dobré těsnosti systému a nasátí vzduchových „zátek“, zamezení samonasátí vzorku. Jako nevýhoda tohoto způsobu dávkování může být brána nutnost velice krátkého a velmi dobře načasovaného záznamu spektra.

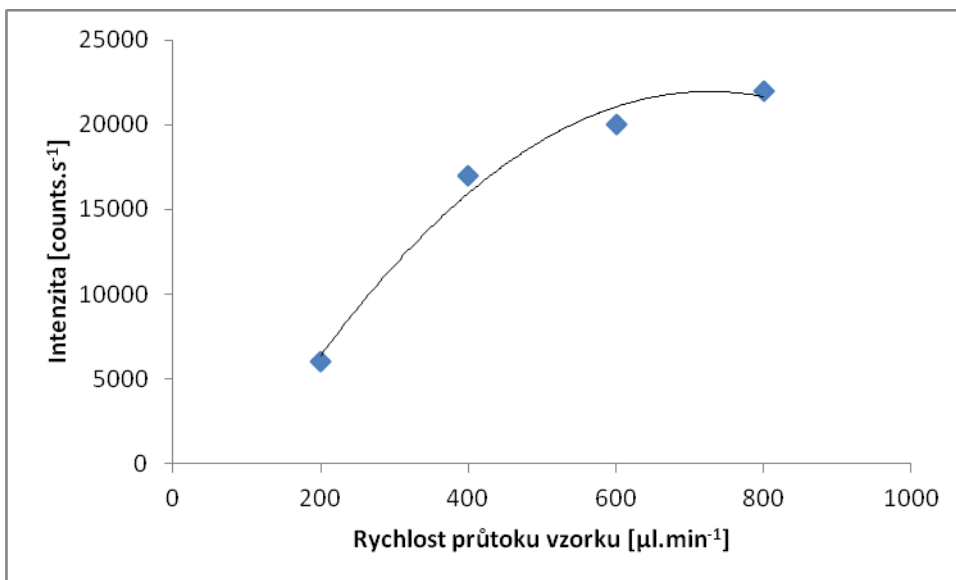
Při prvním testování diskrétního dávkování jsme simulovali přibližně stejnou rychlost průtoku, jaké by bylo dosaženo při rychlosti peristaltické pumpy 10 ot.min^{-1} , tedy zhruba $500 \text{ }\mu\text{L.min}^{-1}$. Tato rychlost odpovídá běžně zvolenému průtoku vzorku pro klasické uspořádání s peristaltickou pumpou. Při rychlosti průtoku $500 \text{ }\mu\text{L.min}^{-1}$ byly postupně vnášeny objemy 20, 30 a 50 μL (jednoprvkový standard U^{238} o koncentraci $1 \text{ }\mu\text{g.L}^{-1}$). Byla sledována závislost objemu vzorku na maximální intenzitě signálu při fixně zvolené rychlosti průtoku $500 \text{ }\mu\text{L.min}^{-1}$.



Graf 12.: Závislost intenzity signálu na objemu vnášeného vzorku ($500 \text{ }\mu\text{L.min}^{-1}$, $1 \text{ }\mu\text{g.L}^{-1}$ U^{238} diskrétní dávkování)

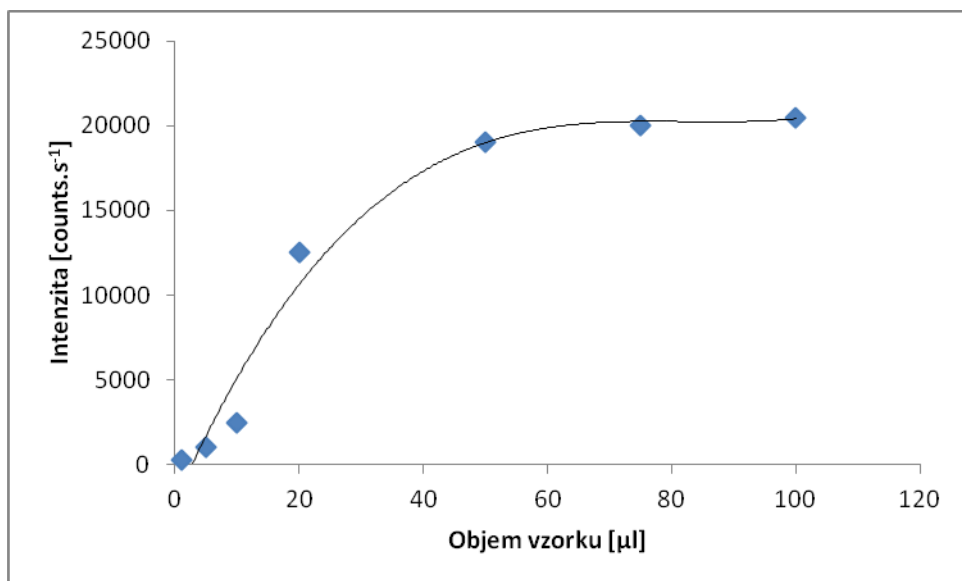
Z grafu je patrné, že se vzrůstajícím objemem vzorku dávkovaným do systému roste i příslušná odezva signálu. Tato odezva již ve větších objemech není lineární a signál

dále stoupá pomaleji. Dále bylo diskretní dávkování testováno při různých rychlostech nástřiku při konstantním dávkovaném objemu. Objem vzorku činil 50 μL , dávkovací rychlosti byly 200, 400, 600 a 800 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. Vzniklá závislost intenzity signálu na měnící se rychlosti průtoku je znázorněna na následujícím grafu.



Graf 13.: Závislost intenzity signálu na rychlosti průtoku vzorku (objem vzorku = 50 μL , 1 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ U^{238} diskretní dávkování)

Z grafu je opět patrné, že se vzrůstajícím průtokem roste i intenzita signálu. Nárůst intenzity však ve vyšších rychlostech průtoku již není příliš strmý. Ačkoliv je při vysokých rychlostech vnášení vzorku jen velmi malý nárůst v intenzitě signálu a navíc při dlouhodobějším dávkování při těchto rychlostech může dojít k poškození systému (zmlžovač Micromist s optimální rychlostí průtoku 400 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$), byla nejvyšší rychlost zvolena i v dalším testování (800 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$). Tato volba byla učiněna s ohledem na maximální detekční schopnosti metody. Protože byl touto rychlostí systém zatížen jen velice krátkou dobu byla zanedbána i možnost poškození zmlžovače při tomto průtoku. Následující graf znázorňuje závislost maximální intenzity signálu U^{238} při rychlosti dávkování 800 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ na měnícím se objemu dávkovaného vzorku U^{238} , 1 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (1, 5, 10, 20, 50, 75, 100 μL).



Graf 14.: Závislost intenzity signálu U^{238} ($1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) při rychlosti dávkování $800 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ na dávkovaném objemu vzorku

Na základě tohoto pozorování bylo zjištěno, že se vzrůstajícím dávkovaným objemem roste i příslušná intenzita signálu. V oblasti nad $50 \mu\text{L}$ ale dochází ke stabilizaci a další zvýšení objemu dávkovaného vzorku nevede k velkému navýšení intenzity a tím detekčním schopnostem metody.

Z celkového pozorování chování systému v diskretním módu dávkování bylo zjištěno, že nejlepších výsledků je dosaženo při dávkování $50 \mu\text{L}$ vzorku při maximální rychlosti průtoku $800 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$.

3.3.3.4 Porovnání analytických charakteristik lineární x peristaltická pumpa

V předešlé části práce jsme se zabývali srovnáním klasického uspořádání dávkovacího systému a systému dávkování s lineární pumpou co do rychlosti, intenzity signálu, spotřeby vzorku a dalších parametrů. Z naměřených dat rovněž vyplynulo, že nejvhodnější systém dávkování vzorku z pohledu spotřeby je systém s lineární pumpou v diskretním módu měření. Pro tento dávkovací postup byly tedy nalezeny a spočteny detekční limity a návratnosti pro standardní roztoky.

Detekční limity byly spočteny dle konceptu 3σ pro nejméně koncentrovaný kalibrační standard pro všechny prvky v multielementárním standardu obsahujícím 39 prvků (dál jen ME 39) Detekční limity byly vyhodnoceny jak pro systém s lineární pumpou v diskretním módu, tak pro klasické uspořádání s pumpou peristaltickou.

Výsledky detekčních limitů a návratností (%) na dvě různé koncentrační úrovně (1 a 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$) jsou uvedeny v následující tabulce 19.

Izotop	PP	LP	Návratnost na standardy PP		Návratnost na standardy LP	
	DL [ng.L^{-1}]		c = 1 $\mu\text{g.L}^{-1}$ [%]	c = 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ [%]	c = 1 $\mu\text{g.L}^{-1}$ [%]	c = 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ [%]
¹⁰⁹ Ag	3,70	6,95	157,1	71,93	0,00	0,00
⁷⁵ As	5,33	13,2	108,9	101,8	38,17	100,2
⁹ Be	5,22	13,9	108,9	104,2	41,10	105,9
²⁰⁹ Bi	2,14	3,80	79,44	102,2	87,80	99,89
¹¹⁴ Cd	5,61	7,55	99,98	101,1	55,00	99,89
⁵⁹ Co	0,09	1,53	92,21	103,6	83,37	104,7
⁵² Cr	0,19	0,26	97,77	102,7	83,37	104,7
¹³³ Cs	1,64	1,62	87,37	102,1	94,90	101,0
⁶³ Cu	1,90	2,46	97,38	104,4	0,00	97,53
⁶⁹ Ga	0,10	0,21	92,10	102,4	0,00	101,8
⁷⁴ Ge	0,36	0,49	99,62	101,3	47,52	103,1
¹⁸⁰ Hf	0,11	0,25	85,32	102,3	82,23	103,2
²⁰² Hg	0,05	1,36	16,06	104,3	126,9	94,41
⁷ Li	0,09	0,30	104,9	104,0	78,48	105,2
⁵⁵ Mn	53,6	67,8	94,61	102,5	78,48	105,2
⁹⁸ Mo	0,06	0,22	97,98	101,1	49,52	102,2
⁵⁸ Ni	0,43	0,43	110,6	101,7	0,00	112,4
^{206,207,208} Pb	0,07	0,40	87,91	102,1	80,19	100,1
¹⁰⁶ Pd	0,33	0,53	87,91	102,1	3,30	104,5
¹⁹⁴ Pt	0,06	0,38	92,96	100,3	67,13	97,38
¹⁸⁵ Re	0,15	0,16	87,62	102,2	91,64	99,98
¹⁸¹ Ta	0,09	0,14	76,15	103,9	113,5	104,7
²³² Th	0,13	0,10	95,74	99,77	52,58	99,73
⁴⁸ Ti	29,3	37,9	95,74	99,77	52,58	99,73
²⁰³ Tl	0,16	0,35	90,15	101,2	86,07	99,26
⁵¹ V	0,13	0,15	95,03	103,3	85,04	104,9
⁶⁴ Zn	0,16	0,59	89,17	101,0	73,62	100,3
⁹⁰ Zr	0,17	0,25	91,33	102,2	81,97	107,4
¹⁰² Ru	0,10	0,21	97,00	101,5	93,08	101,8
¹²¹ Sb	0,27	0,48	114,1	104,2	75,28	98,83

Izotop	PP	LP	Návratnost na standardy PP		Návratnost na standardy LP	
	DL [ng.L ⁻¹]		c = 1 µg.L ⁻¹ [%]	c = 10 µg.L ⁻¹ [%]	c = 1 µg.L ⁻¹ [%]	c = 10 µg.L ⁻¹ [%]
⁷⁸ Se	37,7	41,7	179,2	103,2	398,3	92,60
⁸⁸ Sr	0,10	0,16	94,88	103,7	100,6	101,9

PP..... klasické uspořádání s peristaltickou pumpou

LP.... uspořádání s lineární pumpou

DL.... detekční limit

Tabulka 19.: Detekční limity a návratnosti na roztokové standardy pro klasické uspořádání a uspořádání s lineární pumpou v diskretním módu (50 µL vzorku, 800 µL.min⁻¹)

3.3.3.5 Validace metody oaTOF-ICP-MS ve spojení s lineární dávkovací pumpou v diskretním módu dávkování

Validace navržené metody probíhala na různé biologické a environmentální certifikované referenční materiály (CRM). **EnviroMAT – pitná voda (EP-L-2)**, tento CRM obsahoval 27 prvků s certifikovanou hodnotou obsahu: Al, As, B, Ba, Be, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Li, Mg, Mo, Mn, Na Ni, P, Pb, Sb, Se, Sr, Tl, U, V, Zn. Dále byl použit CRM **GBW07601 – lidské vlasy**, 18 prvků s certifikovaným obsahem: Ag, As, Be, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Li, Mn, Mo, Ni, Pb, Sb, Se, Sr, a Ti. Jako poslední byl pro validaci využit CRM **IAEA-413 – řasy**, 8 prvků s certifikovaným obsahem: As, Cd, Co, Cr, Mn, Ni, Pb, Zn.

CRM byly vždy vhodně připraveny k analýze a v podobě ředěného roztoku dávkovány v objemu 50 µL do teflonové kapiláry. Za vzorek v teflonové kapiláře byla vždy nasáta 100 µL zóna vzduchu pro eliminaci samonasávacího efektu a vzorek byl diskretním způsobem vstříknut do zmlžovacího systému rychlostí 800 µL.min⁻¹. Měření každého vzorku bylo provedeno vždy ve třech opakováních pro jednu repliku a 15s dobu integrace signálu. Signál byl zaznamenáván ve speciálním módu pro transientní měření. Pro maximální eliminaci nespektrálních interferencí bylo využito vnitřního standardu india (5 µg.L⁻¹). Výsledné koncentrace prvků byly průměrovány, byl spočten medián, směrodatná odchylka a interval spolehlivosti. V případě **GBW07601 - lidské vlasy** a **IAEA-413 - řasy** byla dále spočtena hodnota zeta skóre. „Zeta score“ je podíl, kde číselník udává absolutní rozdíl mezi naměřeným výsledkem a konkrétní hodnotou. Směrodatné odchylky ve jmenovateli představují kombinovanou standardní nejistotu rozdílu čitatele.

To znamená, že skutečný rozdíl mezi naměřenou a konkrétní vztažnou hodnotou je porovnáván s ohledem přijatelného rozptylu výsledků. Pokud je hodnota zeta score v intervalu od 0 do 2, lze výslednou hodnotu koncentrace analytu považovat za uspokojivou s ohledem na certifikované hodnoty. Vyhodnocení validačních výsledků pomocí zeta score obvykle vychází oproti certifikovanému intervalu příznivěji.

$$zeta = \frac{|x_{lab} - x_{ass}|}{\sqrt{u_{ass}^2 + u_{lab}^2}}$$

Následující tabulky 20, 21 a 22 shrnují veškerá validační data.

Izotop	Naměřeno				Certifikováno			
	Průměr	Medián	SD	Interval	Hodnota	Spolehlivost	Tolerance	
	µg.L ⁻¹				µg.L ⁻¹			
⁷⁵ As	8,955	8,996	0,835	6,339	11,65	10,00	9 – 10	6 – 13
⁹ Be	2,135	1,908	0,464	0,523	3,293	2,000	1,6 – 2	1 – 3
¹¹⁴ Cd	1,951	1,945	0,113	1,585	2,304	2,000	1,9 – 2	1,7 – 2,2
⁵⁹ Co	9,528	9,437	0,202	8,829	10,05	10,00	9 – 10	8 – 12
⁵² Cr	13,88	13,63	0,644	11,65	15,60	13,00	13 – 14	11 – 16
⁶³ Cu	15,70	15,64	0,568	13,83	17,44	16,00	16 – 17	14 – 19
⁵⁵ Mn	5,425	5,394	0,092	5,110	5,678	6,000	5,8 – 6,2	5 – 7
⁹⁸ Mo	22,81	22,58	0,533	20,96	24,19	23,00	22 – 24	17 – 30
^{206, 207, 208} Pb	3,501	3,478	0,050	3,327	3,629	4,000	3,5 – 5,4	0 – 10
¹²¹ Sb	11,29	11,61	0,713	9,448	13,76	12,00	11 – 13	7 – 17
²⁰⁵ Tl	5,215	5,223	0,013	5,187	5,260	6,000	5,7 – 6,2	4 – 7
⁵¹ V	13,30	13,13	0,232	12,49	13,78	14,00	13 – 14	10 – 17

SD – Směrodatná odchylka,

Naměřené hodnoty ve shodě s tolerančním intervalem CRM,

Naměřené hodnoty ve shodě se spolehlivostním intervalem CRM.

Tabulka 20.: Validační data pro vybrané prvky - EnviroMAT – pitná voda (EP-L-2)

Izotop	Naměřeno					Certifikováno			
	Průměr	Medián	SD	Interval	Zeta score	Hodnota	Interval		
	µg.L ⁻¹					µg.L ⁻¹			
⁷⁵ As	0,230	0,229	0,009	0,199	0,259	0,976	0,280	0,230	0,330
⁹ Be	0,037	0,040	0,004	0,029	0,052	1,253	0,063	0,043	0,083
¹¹⁴ Cd	0,100	0,100	0,003	0,091	0,109	0,326	0,110	0,080	0,140
⁵⁹ Co	0,059	0,058	0,001	0,055	0,061	1,034	0,071	0,059	0,083
⁵³ Cr	0,388	0,372	0,065	0,170	0,574	0,210	0,370	0,310	0,430
⁶³ Cu	10,43	10,44	0,021	10,37	10,51	0,139	10,60	9,400	11,80
⁷ Li	1,938	1,945	0,016	1,932	1,957	0,612	2,000	1,900	2,100
⁵⁵ Mn	5,302	5,297	0,018	5,240	5,353	1,247	6,300	5,500	7,100
⁹⁸ Mo	0,075	0,072	0,014	0,028	0,116	0,108	0,073	0,059	0,087
^{206, 207, 208} Pb	7,919	7,942	0,091	7,655	8,228	0,799	8,800	7,700	9,900
¹²¹ Sb	0,071	0,065	0,010	0,035	0,095	1,268	0,095	0,079	0,111
⁸⁶ Sr	25,02	24,99	0,177	24,43	25,55	1,006	24,00	23,00	25,00

SD – Směrodatná odchylka,

Hodnota Zeta score v rozsahu 0 – 2 (uspokojivý výsledek validace)

Tabulka 21.: Validační data pro vybrané prvky - GBW07601 - lidské vlasy

Izotop	Naměřeno					Certifikováno			
	Průměr	Medián	SD	Interval	Zeta score	Hodnota	Interval		
	µg.L ⁻¹					µg.L ⁻¹			
⁷⁵ As	106,4	105,7	1,249	102,0	109,4	3,073	120,4	133,6	127,0
¹¹⁴ Cd	175,3	175,5	1,039	172,3	178,8	3,354	195,5	212,5	204,0
⁵⁹ Co	4,165	4,146	0,121	3,764	4,528	0,269	3,990	4,490	4,240
⁵² Cr	382,9	387,8	12,22	350,5	425,1	0,315	363,0	391,0	377,0
⁵⁵ Mn	157,1	160,2	4,525	147,5	172,8	0,155	154,6	161,4	158,0
⁶⁰ Ni	108,6	111,8	37,94	-8,82	232,4	0,115	108,1	117,9	113,0
^{206, 207, 208} Pb	203,9	206,4	5,587	189,5	223,2	4,259	235,0	249,0	242,0
⁶⁴ Zn	108,8	104,9	12,24	66,94	142,9	4,752	165,7	172,3	169,0

SD – Směrodatná odchylka,

Hodnota Zeta score v rozsahu 0 – 2 (uspokojivý výsledek validace)

Hodnota Zeta score vyšší než 2 – (neuspokojivý výsledek validace)

Tabulka 22.: Validační data pro vybrané prvky - IAEA-413 - řasy

Analýza certifikovaných referenčních materiálů byla provedena metodou rychlého vstříknutí ($800 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$) 50 μL vzorku pomocí lineární dávkovací pumpy v diskretním režimu dávkování.

Validace navržené metody pomocí CRM **EnviroMAT – pitná voda (EP-L-2)** přinesla velmi dobré výsledky. Bylo vybráno 12 elementů relevantních pro analýzu MS. Koncentrace Cd, Co, Cr, Mo, Pb, Sb, V, naměřené navrženou metodou byly ve shodě se spolehlivostním intervalem pro daný referenční materiál. Naměřené koncentrace dalších 5 prvků, As, Be, Cu, Mn, Tl se pohybovala v rozmezí intervalu tolerance. Takto pozitivních validačních výsledků bylo dosaženo hlavně díky velmi jednoduché matici referenčního materiálu (pitná voda). Pitná voda je jednoduchou maticí bez nutnosti složité přípravy pro analýzu.

Dalším materiálem využitým pro validaci metody byl **GBW07601 - lidské vlasy**. Zde bylo vybráno taktéž 12 elementů, As, Be, Cd, Co, Cr, Cu, Li, Mn, Mo, Pb, Sb, Sr. Ačkoliv je tato matrice o mnoho složitější a problematičtější na přípravu (mineralizace), nežli CRM pitné vody, bylo dosaženo velmi dobrých výsledků. Je třeba podotknout, že pro zhodnocení validačních dat bylo využito ukazatele Zeta score. Ukazatel Zeta score je mírnější přístup zhodnocení validačních dat nežli intervalové porovnání výsledků. Pokud se Zeta score pohybuje v rozmezí hodnot 0 – 2, je dosaženo uspokojivého výsledku validace. Všech 12 prvků analyzovaných MS dosáhlo Zeta score nižšího nežli 2. Metoda byla tedy validována pro biologické materiály typu vlasy, chlupy, žíně a podobné.

Posledním materiálem použitým pro validaci analýzy oaTOF-ICP-MS ve spojení s lineární dávkovací pumpou v diskretním módu dávkování vzorku byl CRM **.IAEA-413 – řasy**. U osmi analyzovaných prvků (As, Cd, Co, Cr, Mn, Ni, Pb, Zn) byl opět využit ukazatel Zeta score. Pro Co, Cr, Mn, Ni byla metoda validována s ohledem na Zeta score nižší nežli 2. Pro As, Cd, Pb, Zn však nebyla metoda validována (Zeta score > 2). Nepříliš příznivé validační výsledky CRM řasy mohou být výsledkem unifikace mineralizačního postupu společně s CRM vlasy. Optimalizovaný rozkladný program a mineralizační činidla pro přípravu CRM vlasy byly využity pro rozklad řas. Tento krok by bylo vhodné optimalizovat na míru danému materiálu.

3.3.4 Závěr

Cílem této práce bylo sestavit a otestovat systém pro vnášení malých objemů vzorků ve spojení s oaTOF-ICP-MS. Dále bylo nutné vypracovat a validovat metody pro analýzu malých environmentálních vzorků. V první části práce jsme se zabývali různými možnostmi spojení speciálního dávkovacího systému a ICP-MS. Existuje celá řada postupů a laboratorního vybavení pro prvkovou analýzu malých vzorků. Naše navrhované řešení je svým způsobem ojedinělé a vzhledem k dosaženým výsledkům je zároveň vhodné pro zpracování malých vzorků. Podařilo se nám propojit lineární dávkovací pumpu (častěji používanou v separačních technikách jako je například kapilární elektroforéza) s oaTOF-ICP-MS spektrometrem. Toto spojení nahradilo klasické uspořádání s peristaltickou pumpou. V práci byly porovnány analytické charakteristiky klasického uspořádání s peristaltickou pumpou a uspořádání s lineární pumpou v kontinuálním a diskrétním módu vnášení vzorku. I když ze studie vyplývá, že klasické uspořádání dosáhlo obdobných výsledků, není možné těchto hodnot dosáhnout i pro vzorky o maximálním objemu 50 μL . Objem nutný pro multiprvkovou analýzu pomocí klasického uspořádání s peristaltickou pumpou a analytickou koncovkou oaTOF-ICP-MS se pohyboval až kolem hodnoty 0,5 mL. S ohledem na práci s velice malými vzorky je tedy klasická metoda nevhodná. Spojení lineární pumpy s ICP-MS bylo testováno pro různé operační módy (kontinuální a diskrétní dávkování), různé dávkované objemy, dávkovací rychlosti a případné memory efekty. Z našich testů vyšel nejlépe systém využívající velice rychlé, krátké a intenzivní vstříknutí malého objemu vzorku pomocí lineární pumpy v diskrétním módu dávkování. K optimalizované analýze bylo vždy předloženo 50 μL vzorku a ten byl rychlostí 800 $\mu\text{L}/\text{min}$ vstříknut do mlžné komory a ICP-MS. Pro měření takovýchto krátkých, rychlých signálů byl využit software přístroje, který díky své simultánnosti umožňuje měření transienčních signálů. Navržená metoda analýzy malých vzorků byla úspěšně validována analýzou certifikovaných referenčních materiálů různých environmentálních matric. Nejlépe vycházela validace metody na pitnou vodu, což je samozřejmě důsledkem poměrně jednoduché matrice. Vzorky pitné vody není nutné ve většině případů zdlouhavě připravovat a díky tomu minimalizujeme možné chyby, vnesené do analýzy právě úpravou vzorku. Navržené a optimalizované spojení lineární dávkovací pumpy a oaTOF-ICP-MS pro zpracování malých vzorků je možným řešením právě pro práci se vzorky v omezeném množství. Na tomto místě je ale potřeba zmínit, že ještě mnohem důležitějším krokem pro

kvalitní výsledky analýzy malých objemů vzorků, je právě optimalizace jejich předúpravy a zpracování před samotnou analýzou.

4 ZÁVĚR

Předložená disertační práce se zabývá analýzou environmentálních vzorků s využitím hmotnostního spektrometru s ionizací v indukčně vázaném plazmatu, ortogonálním urychlením iontů a průletovým analyzátozem oaTOF-ICP-MS. V úvodu práce je podán přehled technik hmotnostní spektrometrie využívaných pro prvkovou analýzu vzorků se speciálním zaměřením na techniky využívající indukčně vázané plazma, jakožto iontového zdroje. Technika oaTOF-ICP-MS je specifickým typem hmotnostní spektrometrie, kdy je pro samotnou separaci jednotlivých izotopů o rozdílném poměru m/z využito jejich rozdílné rychlosti letu v driftovém regionu hmotnostního analyzátoru. Po udělení ortogonálního napěťového pulsu putují lehčí ionty rychleji, nežli ionty těžší a dosáhnou tak detektoru dříve. Použitý hmotnostní spektrometr firmy GBC dosahuje rychlosti 30 000 změřených plných spekter za 1s. Vysoké rychlosti měření se dá s výhodou využít například v případě, kdy je nutno analyzovat velké množství izotopů ve vzorcích s malým objemem. Celé hmotnostní spektrum je velmi rychle naskenováno bez ztráty citlivosti a bez ohledu na počet stanovovaných prvků a jejich izotopů. Spotřeba vzorku je tedy velice nízká jak pro jeden, tak pro libovolný počet stanovovaných izotopů. Malá spotřeba vzorku je rovněž výhodou v případech, kdy je nutno eliminovat vznikající odpad (analýza radioaktivních a toxických látek). Díky vysoké rychlosti měření umožňuje technika také řádově vyšší rychlost načítání spekter než je rychlost fluktuace signálu ICP iontového zdroje, tím je možné zajistit vysokou přesnost měření izotopových poměrů. V případě, kdy jsou pro měření izotopových poměrů využity hmotnostní spektrometry typu QMS, může v průběhu měření docházet k fluktuacím signálu, které jsou spojeny s nestabilitou plazmatu, vnášecího systému či dalšími nestabilitami systému (nespektrální interference). Tyto fluktuace pak zapříčiňují chyby při stanovení izotopových poměrů. Přesné měření širokého spektra izotopových poměrů (izotopový otisk prstu) je nezbytné pro provinční a biomonitoringové analýzy, kde se dále využívá statistického zpracování dat. Vysoké rychlosti záznamu plných hmotnostních spekter se rovněž s velkou výhodou využívá v případě transientních signálů (LA, ETV, atd.). V neposlední řadě se samozřejmě rychlost analýzy projeví v úspoře času. V této práci jsou diskutovány tři případy využití oaTOF-ICP-MS pro analýzu vzorků životního prostředí.

V první aplikační části se práce zabývá využitím průletového hmotnostního spektrometru pro multiprvkovou analýzu koňských žíní. V tomto oddílu byla úspěšně navržena metoda pro sběr, zpracování a analýzu těchto vzorků. Mnoho autorů se zabývalo prvkovým složením žíní v závislosti na barvě, chorobách a dalších vlastnostech koní. Rozsáhlé množství vzorků koňských žíní pocházejících napříč Českou Republikou bylo analyzováno a výsledky multiprvkové analýzy byly předloženy ke statistickému zpracování dat, které není součástí této práce. Způsob ustájení, barva koně, pohlaví a další byly využity jakožto faktory, které by mohly ovlivnit prvkové složení žíní. Korelace těchto faktorů s prvkovým složením vzorků však nebyla prokázána. Navrhnutá metoda oaTOF-ICP-MS dosahovala vynikajících analytických charakteristik a poskytovala velmi kvalitní a rychlou multiprvkovou analýzu se zachovanými izotopovými poměry pro statistické šetření. Velkou výzvou se však ukázal způsob předúpravy vzorků žíní. Tak aby byla získána analytická informace týkající se skutečného složení žíňové tkáně bylo nezbytné oddělit endogenní a exogenní kontaminaci. Exogenní kontaminaci, způsobenou ulpíváním podestýlky, prachových částic atd. na povrchu žíňě, bylo nutno odstranit vhodným pracím postupem. Tento prací postup však nesmí narušit vnitřní strukturu žíňě, aby tak nedocházelo k vymývání a znehodnocování informace o skutečném složení. I samotné prokázání vhodnosti daného pracího postupu se ukázalo jako problematické. Nejlepší prací postup byl nakonec vybrán na základě analýzy vypíracích roztoků a vypraných modelových vzorků. Vybraný prací postup vykazoval nejvyšší návratnost na pět replik modelového vzorku. Toto zjištění vedlo k hypotéze o zachování izotopových poměrů. Takto vyprané vzorky žíní poskytují zachované izotopové poměry a tak jsou i nadále vhodné pro statistické zpracování a zjištění, zda některé ze sledovaných proměnných korelují s prvkovým složením žíňě.

Druhou problematikou rozebíranou v této disertační práci byla analýza mrkví pěstovaných různým způsobem. Cílem této dílčí práce bylo srovnat tři různé pěstební systémy s ohledem na chemické složení mrkví (konvenční produkce, „bio“ produkce a produkce domácích pěstitelů). V první fázi bylo postupně získáno velké množství vzorků mrkví. 76 vzorků mrkví pocházelo od drobných pěstitelů napříč Českou republikou (domácí produkce). 71 vzorků bylo zakoupeno v různých obchodech a supermarketech. Tato skupina vzorků byla označena jako konvenční, běžně dostupná. Dále bylo zakoupeno 71 vzorků mrkví s ochrannou známkou „bio“. Těchto 218 vzorků bylo podrobena vypracované a optimalizované analýze ICP-OES a oaTOF-ICP-MS. Získané výsledky byly

porovnány s dostupnou literaturou, platnou legislativou a využity pro multikriteriální statistické zhodnocení kvality jednotlivých pěstebních systémů s ohledem na prvkové složení (18 prvků), obsah dusičnanů a sušinu. Průletová hmotnostní spektrometrie se potvrdila jako velmi cenný pomocník s ohledem na úsporu času, rychlost multielementární analýzy, citlivost a zachování izotopových poměrů. V rámci statistického zhodnocení dat se bohužel nepodařilo jasně rozdělit jednotlivé pěstební systémy na základě prvkového složení a obsahu dusičnanů, případně sušiny. Z tohoto úhlu pohledu se nedá říci, zda je „bio“ produkce lepší než ostatní způsoby pěstování. Získané výsledky byly porovnány s platnou legislativou. Ve všech typech pěstebních systémů bylo nalezeno několik vzorků s překročenými limitními hodnotami pro různé kontaminanty. Nejhůře v tomto srovnání dopadli domácí pěstitelé. Více jak způsob pěstování, hrálo v tomto případě roli umístění políčka s pěstovanými mrkvemi. U vzorku s nejvyšší kontaminací bylo zjištěno, že pocházel z pole, jehož umístění bylo na bývalé remediované skládce. Domácí pěstitelé mohou lehce podcenit kvalitu obdělávané půdy, která může být značně kontaminována a to se poté projeví i na kvalitě výsledné úrody. Bez ohledu na použitý pěstební systém se mrkev, jakožto potravina, jeví velmi dobrým nutričním zdrojem draslíku, hořčíku, vápníku, fosforu, mědi, manganu a zinku. Při porovnání s DDD bylo u těchto nutrientů zjištěno, že při konzumaci průměrného denního množství mrkve dosahují desítky procent DDD.

Poslední část této disertační práce se zabývá systémy pro vnášení malých vzorků do ICP technik a následným návrhem a optimalizací takového systému ve spojení s hmotnostním spektrometrem oaTOF-ICP-MS. Vysoká efektivita převodu vzorku do ICP, nízká spotřeba vzorku a eliminace odpadu jsou tři hlavní výhody systémů pro vnášení malých vzorků. Spotřeba vzorku může být zásadní problém, pokud je třeba zajistit multiprvkovou analýzu vzorku o omezeném množství. Spojení efektivního dávkovacího zařízení a velmi rychlého simultánního spektrometru dělá z oaTOF-ICP-MS unikátní nástroj pro práci se vzorky v omezeném množství. Peristaltická pumpa dávkovacího systému byla v našem případě nahrazena programovatelnou lineární dávkovací pumpou, která i při malých rychlostech představuje kontinuální průtok, na rozdíl od peristaltické pumpy, kde se objevují výraznější fluktuace dávkovaného vzorku. Navrhnutý systém s lineární pumpou byl porovnán s klasickým způsobem dávkování peristaltickou pumpou. Lineární pumpa byla testována jak v kontinuálním módu dávkování, tak v módu diskretním, kdy bylo do ICP nastříknuto vždy definované množství vzorku. Byly sledovány detekční limity, paměťové efekty, spotřeba vzorku a další. Jako nejvhodnější se jeví uspořádání

s lineární dávkovací pumpou v diskrétním módu dávkování. Nejlepších výsledků bylo dosaženo pro krátkou rychlou injekci zkoumaného vzorku o objemu 50 μL , rychlostí 800 $\mu\text{L}/\text{min}$ do dávkovacího systému klasicky navázaného standardním Micromist zmlžovačem a koncentrickou mlžnou komorou ve spojení s plazmovým hořákem. Při porovnání s klasickým uspořádáním s peristaltickou pumpou byla navržená technika daleko úspěšnější pro práci s malými vzorky. Klasické uspořádání vyžadovalo za standardních podmínek objem vzorku kolem 0,5 ml. Uspořádání s lineární pumpou dokázalo poměrně efektivně pracovat se vzorky v objemu několika desítek mikrolitrů. Navržený unikátní systém spojení lineární dávkovací pumpy a oaTOF-ICP-MS byl validován analýzou environmentálních referenčních materiálů vody, řas a vlasů. Nadstandardní multielementární detekční schopnosti průletové hmotnostní spektrometrie v kombinaci s lineární dávkovací pumpou se prokázaly jako velice silný nástroj pro analýzu vzorků o malém, omezeném množství. oaTOF-ICP-MS je velmi dobrou technikou pro svoji multiementárnost, rychlost a simultánnost. U vzorků životního prostředí jsou tyto vlastnosti velkou devizou. Velice přesné izotopové poměry získané touto analýzou mohou sloužit pro rozsáhlé statistické studie. Počet stanovovaných prvků a jejich izotopů nehraje roli v přesnosti, citlivosti ani v době potřebné k analýze. Rozsáhlé soubory vzorků, kde je třeba určit větší množství izotopů, mohou být velice rychle zpracovány. S upravenou technikou průletové hmotnostní spektrometrie lze analyzovat vzorky o mikrolitrových množstvích bez ohledu na počet stanovovaných prvků a jejich izotopů.

5 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] T. Černohorský, P. Jandera.: *Atomová spektroskopie*, Univerzita Pardubice, Pardubice **1995**, 200-209.
- [2] J. S. Becker, H. -J. Dietze, *Int. J. Mass. Spectrom.*, 197, **2000**, 1-35.
- [3] J. S. Becker, H. -J. Dietze, *Spectrochim. Acta Part B*, **1998**, 1475-1506.
- [4] F. Adams, R. Gijbels, R. Van Grieken (Eds.), *Inorganic Mass Spectrometry, Chemical Analysis*, vol. 95, Wiley, New York, **1988**.
- [5] S. Pattberg, R. Matschat, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 364, **1999**, 410.
- [6] V. K. Panday, J. S. Becker, H. -J. Dietze, *Anal. Chim. Acta*, 329, **1996**, 153.
- [7] A. P. Mykytiuk, P. Semeniuk, S. Berman, *Spectrochim. Acta. Rev.*, 13, **1990**, 1.
- [8] V. K. Panday, J. S. Becker, H. -J. Dietze, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 352, **1995**, 327–334.
- [9] R. Maibusch, a kol., *Anal. At. Spectrom.*, 14, **1999**, 1155.
- [10] J. S. Becker, a kol., *J. Anal. At. Spectrom.*, 13, **1998**, 983.
- [11] Y. Homma, S. Kurosawa, a kol., *Anal. Chem.*, 57, **1995**, 2928.
- [12] R. Jäger, A. I. Saprykin, a kol., *Mikrochim. Acta*, 125, **1997**, 44.
- [13] M. Grasserbauer, *Pure and Appl. Chem.*, 60, **1988**, 437–444.
- [14] A. B. E. Rocholl, K. Simon, a kol., *Geostand. Newslett.*, 18, **1994**, 101.
- [15] A. Raith, R. C. Hutton, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 350, **1994**, 242–246.
- [16] F. Kohl, N. Jakubowski, a kol., *Fresenius J. Anal. Chem.*, 359, **1997**, 317–325.
- [17] J. Th. Westheide, J. S. Becker, a kol., *J. Anal. At. Spectrom.*, 11, **1996**, 661.
- [18] S. S. Alimpiev, M. E. Belov, S. M. Nikiforov, *Anal. Chem.*, 65, **1993**, 3194.
- [19] W. Eiser, H. P. Beck, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 364, **1999**, 417.
- [20] A. E. Eroglu, C. W. McLeod, a kol., *J. Anal. At. Spectrom.*, 13, **1998**, 875.
- [21] A. E. Eroglu, C. W. McLeod, a kol., *Spectrochim. Acta B*, 53, **1998**, 1221.
- [22] S. Yamasaki, A. Tsumura, Y. Takaku, *Microchemical J.*, 49, **1994**, 305.
- [23] R. M. Barnes, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 355, **1996**, 433.
- [24] V. K. Panday, K. Hoppstock, a kol., *At. Spectrosc.*, 17, **1996**, 98.
- [25] L. Moens, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 359, **1997**, 309
- [26] K. P. Jochum, M. Rehkämper, H. M. Seufert, *Geostand. Newslett.*, 18, **1994**, 43.
- [27] S. E. Jackson, H. P. Longerich, a kol., *Can. Mineral.*, 30, **1992**, 1049.

- [28] J. A. Pfänder, K. P. Jochum, a kol., *Fresenius J. Anal. Chem.*, 364, **1999**, 376.
- [29] J. S. Crain, *At. Spectrosc. Perspectives*, 11, **1996**, 30.
- [30] J. S. Becker, H. -J. Dietze, *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, Wiley, New York, **2000**.
- [31] I. T. Platzner, J. S. Becker, H. -J. Dietze, *At. Spectrosc.*, 20, **1999**, 6.
- [32] X. Luo, M. Rehkämper, a kol., *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes*, 171, **1997**, 105.
- [33] J. M. Barrero Morena, M. Betti, G. Nicolaou, *J. Anal. At. Spectrom.*, 14, **1999**, 875.
- [34] H. -J. Dietze, *Massenspektrometrische Spurenanalyse*, **1975**, 1–224.
- [35] H. -J. Dietze, *Massenspektrometrische Spurenanalyse mit Funken- und Laserionisation*, *Analytikertaschenbuch*, 10, **1991**, 249–295.
- [36] R. Gijbels, *Talanta*, 37, **1990**, 363–376.
- [37] K. P. Jochum, M. Seufert, H. -J. Knab, *Fresenius Z. Anal. Chem.*, 309, **1981**, 285–290.
- [38] M. Gastel, U. Breuer, a kol., *Fresenius J. Anal. Chem.*, 353, **1995**, 478.
- [39] U. Breuer, H. Holzbrecher, a kol., *SIMS X, Proceedings of the 10th International Conference on Secondary Ion Mass Spectrometry*, Wiley, New York, **1997**, 391.
- [40] H. M. Seufert, K. P. Jochum, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 359, **1997**, 454–457.
- [41] H. -J. Dietze, J. S. Becker, *Laser Ionization Mass Analysis, Chemical Analysis Series*, vol. 124, Wiley, New York, **1993**, 453–503.
- [42] D. L. Donohue, J. P. Young, *Anal. Chem.*, 55, **1983**, 378–379.
- [43] H. -J. Kluge, B. A. Bushaw, a kol., *Fresenius J. Anal. Chem.*, 350, **1994**, 323–329.
- [44] R. K. Marcus, *Glow Discharge Spectroscopies*, Plenum Press, New York, London, **1993**, 1–514.
- [45] R. Gijbels, M. Van Straaten, A. Bogaerts, *Adv. Mass. Spectrom.*, 13, **1995**, 241–256.
- [46] H. M. Ortner, P. Wilhartitz, M. Grasserbauer, *Key Eng. Mater.*, 29-31, **1989**, 21–46.
- [47] Schnieders, a kol., *Proceedings of the 10th International Conference on Secondary Ion Mass Spectrometry*, Wiley, New York, **1997**, 649–652.
- [48] K. G. Heumann, *Mass Spectrom. Rev.*, 11, **1992**, 41–67.
- [49] K. Habfast, *Int. J. Mass. Spectrom. Ion Processes*, 161, **1997**, 217.

- [50] K. H. Purser, A. E. Litherland, H. E. Gove, *Nucl. Instrum. Meth.*, 162, **1979**, 637–656.
- [51] Y. Nagashima, a kol., *Nucl. Instrum. Meth. Phys. Res. A*, 382, **1996**, 321–326.
- [52] A. Montaser, a kol., *Inductively Coupled Plasma Source Mass Spectrometry*, VCH, New York, **1998**, 1–950.
- [53] A. R. Date, A. L. Gray, *Analyst*, 106, **1981**, 1255–1267.
- [54] G. M. Hieftje, a kol., *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.*, 118/119, **1992**, 519–573.
- [55] R. S. Houk, V. A. Fassel, a kol., *Anal. Chem.*, 52, **1980**, 2283.
- [56] F. Cubadda, *Food Toxicants Analysis; Chapter 19 – ICP-MS*, **2007**, 697-751.
- [57] R. E. Valiga, a kol., *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 10, **1996**, 305.
- [58] Z. Du, D. J. Douglas, N. Konenko, *J. Anal. At. Spectrom.*, 14, **1999**, 1111.
- [59] S. Richter, M. Berglund, C. Hennessy, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 364, **1999**, 478.
- [60] J. S. Becker, H. -J. Dietze, *J. Anal. At. Spectrom.*, 10, **1995**, 637.
- [61] C. Fourre, J. Clerc, P. Fragu, *J. Anal. At. Spectrom.*, 12, **1997**, 1105.
- [62] D. P. Myers, a kol., *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 5, **1997**, 1008.
- [63] J. P. Guzowski, a kol., *J. Anal. At. Spectrom.*, 14, **1999**, 1121.
- [64] D. C. Duckworth, C. M. Barshik, a kol., *Anal. Chem.*, 66, **1994**, 92.
- [65] C. M. Barshik, J. R. Eyler, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 3, **1992**, 122.
- [66] D. A. Solyom, a kol., *J. Anal. At. Spectrom.*, 14, **1999**, 1101.
- [67] Y. Takaku, K. Masuda, a kol., *J. Anal. At. Spectrom.*, 9, **1993**, 687.
- [68] M. Guilhaus, *Spectrochim. Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 55, **2000**, 1511-1525
- [69] M. Guilhaus, D. Selby, V. Mlynski, *Mass Spectrom. Rev.*, 19, **2000**, 65-107.
- [70] P. P. Mahoney, S. J. Ray, G. M. Hieftje, *Appl. Spectrosc.*, vol. 51, 1, **1997**, 16-28.
- [71] N. H. Bings, *Anal. Bioanal. Chem.*, 382, **2005**, 887–890.
- [72] S. J. Ray, G. M. Hieftje, *J. Anal. At. Spectrom.*, 16, **2001**, 1206–1216.
- [73] P. P. Mahoney, G. Li, G. M. Hieftje, *J. Anal. At. Spectrom.*, 11, **1996**, 401.
- [74] L. Allen, a kol., *Phys. Stat. Sol. (A)*, 167, **1998**, 357.
- [75] K. Benkhedda, H. Goenaga Infante, a kol., *J. Anal. At. Spectrom.*, 15, **2000**, 1349.
- [76] R. E. Sturgeon, J. W. H. Lam, A. Saint, *J. Anal. At. Spectrom.*, 15, **2000**, 607.
- [77] J. M. Costa-Fernández, N. H. Bings, a kol., *J. Anal. At. Spectrom.*, 15, **2000**, 1063.
- [78] P. P. Mahoney, S. J. Ray, G. Li, G. M. Hieftje, *Anal. Chem.*, 71, **1999**, 1378.
- [79] W. C. Wetzel, a kol., *J. Anal. At. Spectrom.*, 16, **2001**, 987.

- [80] T. Narukawa, *J. Anal. At. Spectrom.*, 25, **2010**, 1145-1148.
- [81] H. Bings, *J. Anal. At. Spectrom.*, 18, **2003**, 1088-1096.
- [82] X. Tian, *J. Anal. At. Spectrom.*, 15, **2000**, 829-835.
- [83] K. Benkhedda, *Anal. Chim. Acta*, 506, **2004**, 137-144.
- [84] L. Husáková, *Food Chem.*, 129, **2011**, 1287-1296.
- [85] A. Krejčová, *Intern. J. Environ. Anal. Chem.*, **2011**, 1-16.
- [86] A. Krejčová, *Food Chem.*, 132, **2012**, 588-596.
- [87] Dunnett M., Lees P., *Res. Vet. Sci.*, 75, **2003**, 89 – 101.
- [88] Borgese L., a kol., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 52, **2010**, 787 – 790.
- [89] Kolacz R., a kol., *J. Anim. Sci.*, 44, **1999**, 509 – 514.
- [90] Patkowska-Sokola B., a kol., *Arch. Anim. Breeding*, 52, **2009**, 410 – 418.
- [91] Chojnacka K. a kol., *Sci. Tot. Env.*, 366, **2006**, 6112 – 620.
- [92] Asano K., Suzuki K., *J. Vet. Med. Sci.*, 68, **2006**, 769 – 771.
- [93] Esteban M., Castano A., *Env. Int.*, 35, **2009**, 438 – 449.
- [94] Asano K. a kol. *J. Vet. Med. Sci.*, 64, **2002**, 607 – 610.
- [95] Rodrigues J. a kol., *J. Anal. At. Spectrom.*, 23, **2008**, 992 – 996.
- [96] Sobanska M. A., *Sci. Tot. Env.*, 339, **2005**, 81 – 88.
- [97] Rodushkin I., Axelsson M. D., *Sci. Tot. Env.*, 250, **2000**, 83 – 100.
- [98] Rao K. S., a kol., *Spectrochim. Acta*, 57, **2002**, 1333 – 1338.
- [99] Chojnacka K., kol., *Environ. Toxicol. Phar.*, 20, **2005**, 368–374.
- [100] Ribeiro a kol., *Microchem. J.*, 64, **2000**, 105 - 110.
- [101] Baysal A., Akman S., *Spectrochim. Acta*, 65, **2010**, 340 – 344.
- [102] Madejón P., a kol., *Ecotoxicology*, 18, **2009**, 417–428.
- [103] Armelin M. J. a kol., *J. Radioanal. Nucl. Ch.*, 249, **2001**, 417–419.
- [104] Steely S., a kol., *Microchem. J.*, 86, **2007**, 235 - 240.
- [105] Chandola L. C., Lordello A. R., *Microchem. j.*, 28, **1983**, 87 – 90.
- [106] Asano K., a kol., *Biol. Trace Elem. Res.*, 107, **2005**, 135 – 140.
- [107] Asano K., a kol., *Biol. Trace Elem. Res.*, 103, **2005**, 169 – 176.
- [108] Dunnett M., *Pferdeheilkunde*, 21, **2005**, 457 – 467.
- [109] Anielski P., a kol., *Anal Bioanal Chem.*, 383, **2005**, 903 – 908.
- [110] Somatco; [cit. 24.3.2016] Dostupné z: www.somatco.com/MWS-2_Digestion.pdf

- [111] Evisa; [cit. 24.3.2016] Dostupné z:
www.speciation.net/Database/Instruments/GBC-Scientific-EquipmentLtd/OptiMass-8000-ICP-TimeofFlight-Mass-Spectrometer-;i526
- [112] Niemczyková K., Diplomová práce, *Univerzita Pardubice*, Fakulta chemicko-technologická, vedoucí diplomové práce Ing. Anna Krejčová, PhD.
- [113] Pátková A., Diplomová práce, *Univerzita Pardubice*, Fakulta chemicko-technologická, vedoucí diplomové práce Ing. Anna Krejčová, PhD.
- [114] Domagała-S´wiatkiewicz I., a kol., *Acta Sci. Pol., Hortorum Cultus*, 11, **2012**, 173–183.
- [115] Lima G, a kol., *Int. J. Food Sci. Technol.*, 46, **2011**, 1–13.
- [116] Kelly S. D., a kol., *Food chem.*, 119, **2010**, 738 – 745.
- [117] Hoefkens C., a kol., *Brit. Food J.*, 111, **2009**, 1078 – 1097.
- [118] Soltoft M., a kol., *J. Sci. Food Agric.*, 91, **2010**, 767 – 775.
- [119] Kawada T., a kol., *J. Trace Elem. Med. Biol.*, 16, **2002**, 179 – 182.
- [120] Kawada T., a kol., *Toxicol. Environ. Chem.*, 93, **2011**, 1956 – 1959.
- [121] Maqueda C, a kol., *J. Agr. Sci.*, 149, **2010**, 461 – 472.
- [122] Warman P., a kol., *Agr. Ecosyst. Environ.*, 61, **1997**, 155 – 162.
- [123] Fjelkner-Modig S., a kol., *Acta Agr. Scand. B-S. P.*, 50, **2001**, 102 – 113.
- [124] Kelly S. D., a kol., *Food chem.*, 119, **2010**, 738 – 745.
- [125] Laursen K. H., a kol., *J. Agr. Food Chem.*, 59, **2011**, 4385 – 4396.
- [126] Chua L. S., a kol., *Food Chem.*, 135, **2012**, 880 – 887.
- [127] Benincasa C., a kol., *Anal. Chim. Acta*, 585, **2007**, 366 – 370.
- [128] Bandoniene D., a kol., *Food Chem.*, 136, **2013**, 1533 – 1542.
- [129] Geana I., a kol., *Food Chem.*, 138, **2013**, 1125 – 1134.
- [130] Bong Y. S., a kol., *Food Chem.*, 135, **2012**, 2666 – 2674.
- [131] Chope G. A., a kol., *Food Chem.*, 115, **2009**, 1108 – 1113.
- [132] Galdón B. R., a kol., *J. Sci. Food Agric.*, 88, **2008**, 1554 – 1564.
- [133] Patras A., a kol., *J. Food Compos. Anal.*, 24, **2011**, 250 – 256.
- [134] MLE GmbH [cit.: 7.4.2016] Dostupné z:
<http://www.mle-dresden.com/lang/en/Home.1.html>
- [135] Courtage Analyses Services [cit.: 7.4.2016] Dostupné z:
http://www.onlinecas.com/index.php5?page=mercure_hg_AMA254&

- [136] RMI s.r.o [cit.: 7.4.2016] Dostupné z:
<http://www.rmi.cz/integra-xl>
- [137] Silva, E.A., a kol., *J. Food Process Eng.*, 30, **2007**, 747-756.
- [138] Masamba, K.G. & Nguyen, M. *Afr. J. Biotechnol.*, 7, **2008**, 2915-2919.
- [139] Centrum pro databázi složení potravin/Databáze složení potravin ČR
[cit.: 7.6.2016] Dostupné z:
<http://www.Nutridatabase.cz>
- [140] Matos-Reyes, a kol., *Food Chemistry*, 122, **2010**, 188-194.
- [141] Vyhláška České republiky č. 225/2008, kterou se stanoví požadavky na doplňky stravy a na obohacování potravin, příloha 5.
- [142] Vyhláška České republiky č. 306/2004, kterou se stanoví chemické požadavky na zdravotní nezávadnost jednotlivých druhů potravin a potravinových surovin, podmínky použití látek přídatných, pomocných a potravních doplňků, příloha 2.
- [143] Herencia a kol., *Scientia Horticulturae*, 129, **2011**, 882-888.
- [144] Soil Association, ISBN 0 905200 80 2, **2001**. Dostupné z:
www.soilassociation.org.
- [145] Takasaki a kol., *Talanta*, 87, **2011**, 24-29.
- [146] Todolí a kol., *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 24, 2, **2005**, 107-116.
- [147] Todolí a kol., *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 61, 3, **2006**, 239-283.
- [148] Pettersson a kol., *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 13, 7, **1998**, 609-613.
- [149] Li a kol., *Analytical Chemistry*, 73, 7, **2001**, 1416-1424.
- [150] Mora a kol. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 22, 3, **2003**, 123-132.
- [151] Lefebvre a kol., *CRC Press*, **1989**, 421, 1989. ISBN 08-911-6603-3.
- [152] Hoang a kol., *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 17, 12, **2002**, 1575-1581.
- [153] Maestre a kol., *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 57, 11, **2002**, 1753-1770.
- [154] Pohl a kol., *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 29, 11, **2010**, 1376-1389.
- [155] Wikipedia: The free encyclopedia. [cit.: 8.3.2017] Dostupné z:
http://en.wikipedia.org/wiki/Cyclonic_spray_scrubber
- [156] Todolí a kol., *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 368, 8, **2000**, 773-779.
- [157] Westphal a kol., *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 59, 3, **2004**, 353-368.

- [158] Tangten a kol., *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 12, 6, **1997**, 667-670.
- [159] Nelms a kol., *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry Handbook*, **2005**, DOI: 10.1002/9781444305463.
- [160] Mihaljevič a kol., *Chemické listy*, 98, **2004**, 123-130.
- [161] Fernández a kol., *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 26, 10, **2007**, 951-966.
- [162] Grotti a kol., *Analytica Chimica Acta*, 767, **2013**, 14-20.
- [163] Björn a kol., *Analytical Biochemistry*, 363, 1, **2007**, 135-142.
- [164] Becker a kol., *International Journal of Mass Spectrometry*, 242, 2-3, **2005**, 83-195.
- [165] Yanes a kol., *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 58, 5, **2003**, 949-955.
- [166] Maestre a kol., *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 379, 5-6, **2004**, 888-889.
- [167] Labicom s.r.o., *Návod k obsluze: NE-1002X Programable microfluidics Syringe pump*, Olomouc, vyd. 1200-01.

Výsledky mé doktorandské práce byly uveřejněny v následujících publikacích.

- Jakub Návesník, Anna Krejčová, Tomáš Černohorský, Aneta Pátková, Iveta Petrovická; *High throughput method for multielemental analysis of horse hair by oaTOF-ICP-MS*; Chemical Papers- Slovak Academy of Sciences, 2016, DOI: 10.1007/s11696-016-0090-7
- Anna Krejčová, Jakub Návesník, Jaroslava Jičínská, Tomáš Černohorský; *An elemental analysis of conventionally, organically and self-grown carrots*; Food Chemistry, 2016, 192:242-9, DOI: 10.1016/j.foodchem.2015.07.008
- Anna Krejčová, Tomáš Černohorský, Jakub Návesník, Miloslav Pouzar; *The efficiency of the ICP-OES introduction systems*; Spectrochimica Acta Part B, 2013.
- Petr Knotek, Miloslav Pouzar, Matěj Buzgo, Barbora Křížková, Milan Vlček, Andrea Míčková, Jakub Návesník, Evžen Amler, Petr Bělina; *Cryogenic grinding of electrospun poly- ϵ -caprolactone mesh submerged in liquid media*, Materials Science and Engineering C, DOI: 10.1016/j.msec.2012.04.012
- Tomáš Kratochvíl, Tomáš Černohorský, Petr Knotek, Lukáš Kalina, Jakub Návesník, Miloslav Pouzar, Magdalena Zvolská; *Fast determination of the surface density of titanium in ultrathin layers using LIBS spektrometry*, Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 2014, 29(10), DOI: 10.1039/C3JA50398D
- Petr Knotek, Jakub Návesník, Tomáš Černohorský, Ladislav Tichý; *Ablation of (GeS₂)_{0.3}(Sb₂S₃)_{0.7} glass with an ultra-violet nano-second laser*, Materials Research Bulletin 64, 2015, DOI: 10.1016/j.materresbull.2014.12.027