

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Multielementární analýza mužského ejakulátu metodou TOF-ICP-MS a vliv
jeho elementárního složení na mužskou fertilitu

Bc. Magda Plachá

Diplomová práce

2019

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Magda Plachá**
Osobní číslo: **C17425**
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Analýza biologických materiálů**
Název tématu: **Multielementární analýza mužského ejakulátu metodou TOF-ICP-MS a vliv jeho elementárního složení na mužskou fertilitu**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

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

Teoretická část:

Zpracujte literární rešerši zaměřenou na problematiku prvkové analýzy ejakulátu za využití vybraných metod atomové spektrometrie. Pozornost věnujte odběru, skladování a přípravě vzorku k analýze, problematice interference matrice při vlastní analýze, ale i dosavadním poznatkům týkajícím se vlivu těžkých kovů a stopových prvků na lidské zdraví s důrazem na plodnost, příčinám poruch mužské plodnosti, atd.

Experimentální část:

1. Vyberte vhodnou skupinu mužských pacientů léčících se v centru asistované reprodukce pro sběr vzorku ejakulátu. Vypracujte otázky, které budou kladeny respondentům při odevzdání vzorku a které doplní informace o jejich životním stylu a kvalitě spermií (Spermiogramu). Vypracujte písemné informace pro účastníky studie, Písemné prohlášení jednotlivých účastníků o souhlasu s účastí ve studii, zajištění vyjádření Etické komise zasedající při PPCHC Sanus Hradec Králové.
2. Proveďte optimalizaci analytického postupu pro potřeby stanovení multiprvkového profilu uvedených vzorků a ověřte jeho správnost. Určete analytické charakteristiky stanovení vybraných elementů za využití optimalizovaných metod a aplikujte je pro analýzu reálných vzorků.
3. S využitím nástrojů statistické analýzy dat určete rozdíly v zastoupení prvků mezi vzorky z jednotlivých testovaných tříd a zhodnoťte možnost použití zjištěných rozdílů pro jejich klasifikaci.
4. Kriticky zhodnoťte dosažené výsledky.


Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**
Seznam odborné literatury:

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Lenka Husáková, Ph.D.**
Katedra analytické chemie
Konzultant diplomové práce: **RNDr. Radek Hampl, Ph.D.**
Centrum asistované reprodukce Pardubice
Datum zadání diplomové práce: **21. prosince 2018**
Termín odevzdání diplomové práce: **10. května 2019**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2019

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, 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 Pravidla pro zveřejňování závěrečných prací a jejich základní jednotnou formální úpravu, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 1. 5. 2019

.....

Magda Plachá

Největší poděkování patří vedoucí mé diplomové práce Ing. Lence Husákové, Ph.D. za její veškeré rady, věnovaný čas, trpělivost, ochotu a pomoc při realizaci experimentální části. Další velké poděkování patří RNDr. Radku Hamplovi, Ph.D. za poskytnutí vzorků pro experimentální část diplomové práce, ochotu a věnovaný čas.

Velké díky patří mé rodině, příteli a přátelům za podporu při studiu.

ANOTACE

Diplomová práce byla zaměřena na problematiku prvkové analýzy mužského ejakulátu pomocí metod TOF-ICP-MS a AAS. Pozornost byla věnována rovněž problematice mikrovlnného rozkladu uvedených typů vzorků. Data získaná analýzou 32 reálných vzorků byla statisticky zpracována za využití nástrojů jednorozměrné a vícerozměrné statistické analýzy s cílem nalezení vnitřních vazeb a možných souvislostí mezi prvkovým složením a mužskou plodností. Správnost metody byla ověřena pomocí certifikovaného referenčního materiálu moči.

KLÍČOVÁ SLOVA

Mužská neplodnost, ejakulát, multielementární analýza, ICP-MS, AAS, mikrovlnná mineralizace.

TITLE

Multielement analysis of male ejaculate by TOF-ICP-MS and the effect of elemental composition ejaculate on male fertility.

ANNOTATION

The diploma thesis was focused on elemental analysis of male ejaculate by AAS and TOF-ICP-MS methods. Microwave-assisted digestion was employed for sample decomposition. Data obtained by analyzing a total of 32 samples were processed using one-dimensional and multivariate statistical analysis tools. The effect of elemental composition on male fertility was studied. The accuracy of the method was verified by certified referenced urine sample.

KEYWORDS

Male infertility, ejaculate, multielement analysis, ICP-MS, AAS, microwave-assisted digestion.

Obsah

1	Úvod	12
2	Teoretická část	12
2.1	Mužská neplodnost	12
2.1.1	Spermatogeneze	13
2.1.2	Vyšetření spermatu	15
2.2	Vliv prvků na lidské zdraví a mužskou plodnost	16
2.3	Problematika prvkové analýzy mužského ejakulátu nebo semenné plazmy	24
2.3.1	Uchování, zpracování a příprava vzorku k analýze	24
2.3.2	Volba analytické metody	27
2.3.3	Problematika prvkové analýzy biologických vzorků metodou ICP-MS	27
3	Experimentální část	30
3.1	Chemikálie použité při experimentu	30
3.2	Příprava roztoků	30
3.2.1	Příprava zásobních roztoků	30
3.2.2	Příprava podvarové HNO ₃ pro rozklad vzorků	31
3.2.3	Kalibrační roztoky	31
3.3	Analyzované vzorky mužského ejakulátu	31
3.3.1	Přeprava a příprava vzorků mužského ejakulátu	31
3.3.2	Mikrovlnná mineralizace vzorků	32
3.4	Použitá instrumentace	34
3.4.1	Zařízení pro podvarovou destilaci HNO ₃	34
3.4.2	Mikrovlnné zařízení	35
3.4.3	Analyzátor rtuti AMA 254	36
3.4.4	Spektrometr ICP-oe-TOF-MS GBC OptiMass 9000	37
3.4.5	Atomový absorpční spektrometr SensAA	40
3.4.6	Další použité laboratorní pomůcky a přístroje	41
4	Výsledky a diskuze	41
4.1	Optimalizace parametrů ICP-MS	41
4.2	Přesnost stanovení	41
4.3	Detekční limity a meze stavitelnosti	43
4.4	Aplikace jednorozměrné a vícerozměrné analýzy dat	44
4.4.1	Exploratorní analýza	44

4.4.2	Diskriminační analýza	54
5	Závěr.....	59
6	Seznam použité literatury	61

SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK

Obrázek 1 Změny mužské plodnosti v rozvojových a průmyslových zemích.....	12
Obrázek 2 Schéma spermatogeneze	14
Obrázek 3 Příprava reálného vzorku k analýze.....	34
Obrázek 4 Přístroj na podvarovou destilaci BSB 939IR.....	35
Obrázek 5 Přístroj Speedwave Expert.....	36
Obrázek 6 Analyzátor rtuti AMA 254.....	37
Obrázek 7 Přístroj GBC OptiMass 9000.....	38
Obrázek 8 Přístroj SensAA	40
Obrázek 9 Grafické znázornění korelace	51
Obrázek 10 Krabicové grafy s označenými odlehlými body u jednotlivých analytů.....	51
Obrázek 11 Ikonové grafy - Hvězdičky.....	52
Obrázek 12 Ikonové grafy - Sluníčka.....	52
Obrázek 13 Ikonové grafy – Sloupce pro 8 proměnných u všech pacientů.....	53
Obrázek 14 Krabicový graf pro vybrané analyty v rámci sledovaných tříd.....	53
Obrázek 15 Finální zařazení do příslušných kategorií (fertilní x infertilní).....	58
Tabulka 1 Přehled klasifikace mužské neplodnosti dle kritérií a jejich stručný popis.....	13
Tabulka 2 Spermioqram - normální nález dle WHO.....	15
Tabulka 3 Možné výsledky spermioqramu.....	16
Tabulka 4 Přehled prvků v lidském organismu a jejich funkce.....	17
Tabulka 5 Přehled prvků a jejich vliv na mužskou plodnost.....	19
Tabulka 6 Přehled naměřených koncentrací jednotlivých prvků v mužském ejakulátu nebo semenné plazmě.....	25
Tabulka 7 Přehled polyatomických interferencí v ICP-MS	29
Tabulka 8 Teplotní program pro mineralizaci vzorků mužského ejakulátu.....	32
Tabulka 9 Nastavení pro bránu „Smart Gate“ při analýze neřaděných vzorků.....	39
Tabulka 10 Nastavení podmínek přístroje ICP-oa-TOF-MS (GBC OptiMass 9000).....	39
Tabulka 11 Nastavení přístroje GBC SensAA pro stanovované prvky.....	40
Tabulka 12 Výsledky stanovení koncentrací vybraných prvků v SRM Seronorm™ Trace Elements Urine L1 a L2.....	42
Tabulka 13 Hodnoty LOD a LOQ u vybraných prvků pro metody oa-TOF-ICP-MS FAAS a termooxidační metodu.....	43

Tabulka 14 Naměřené jednotlivé koncentrace prvků ve vzorcích mužského ejakulátu.	46
Tabulka 15 Statistické charakteristiky pro jednotlivé analyty - Mg, Ca, Zn, Na, K, Hg, Li, Mn, Co, As, Mo, Cd, Sb, Cs, Pb, Tl, Se a Sr.....	48
Tabulka 16 Průměry a směrodatné odchylky pro jednotlivé analyty v třídách.	49
Tabulka 17 Celková kovariance a korelace.	49
Tabulka 18 Vnitřní korelace – tučně označená korelace je významná.	50
Tabulka 19 Odhady parametrů klasifikační funkce pro jednotlivé třídy.....	54
Tabulka 20 Zařazení jednotlivých objektů do tříd.	55
Tabulka 21 Klasifikace případů.....	56
Tabulka 22 Vypočtené A posteriori pravděpodobnosti a zařazení objektů do jednotlivých tříd.	57

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

AAS	Atomová absorpční spektrometrie
ETAAS	Atomová absorpční spektrometrie s elektrotermickou atomizací
FAAS	Atomová absorpční spektrometrie s atomizací v plameni
ICP-MS	Hmotnostní spektrometrie s ionizací v indukčně vázaném plazmatu
oa-TOF	Průletový analyzátor s ortogonální akcelerací iontů
ICP-OES	Optická emisní spektrometrie s ionizací v indukčně vázaném plazmatu
FSH	Folikulostimulační hormon
LH	Luteinizační hormon
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
HOS	Hypoosmotický test
ROS	Reaktivní formy kyslíku
TZI	Index teratozoospermie
MAI	Index mnohočetných anomálií
SDI	Sperm deformity index
MTLCdBP	Protein vázajícího kadmia podobný metalothioneinu
PFA	Polyfluor
LOD	Limit detekce
WHO	Světová zdravotnická organizace
CASA	Počítačová analýza spermatu
ESHRE	Evropská společnost pro lidskou reprodukci a embryologii

1 Úvod

Je až alarmující, kolik párů v dnešní době vyhledává pomoc v centrech asistované reprodukce s problémem početí [1, 2]. Za posledních 50 let klesla koncentrace spermií u mužů v Evropě dle dat publikovaných v souhrnném odborném článku o neskutečných více než 30 % [3]. V celosvětovém měřítku došlo k masivnímu snížení koncentrace spermií u mužů o více jak 55 % za posledních 35 let. Významné snížení koncentrace spermií bylo v Evropě, Severní Americe, Asii a Africe, naopak rostoucí trend koncentrace spermií byl prokázán v Austrálii [4]. Musíme se na tento ukazatel dívat jako na kritický prognostický faktor do budoucna. V současné době mají problém s neplodností nejčastěji muži ve věku 20 – 30 let [1, 2]. Faktorů ovlivňující mužskou plodnost je hned několik, patří mezi ně – věk, strava, doplňky stravy, váha, fyzická aktivita ve volném čase, kouření cigaret, konzumace alkoholických nápojů a kávy, vystavení teplu (sauna, horké koupele, druh spodního prádla), zaměstnání, stres a mnoho dalších [5-12].

Rychlý růst ekonomické aktivity lidstva má negativní dopad na životní prostředí. Jedná se o globální problém, který má nejen demografický dopad, ale především dopad na lidské zdraví [13]. Špatné životní prostředí má negativní vliv na mužskou plodnost, a proto se lidské sperma dá použít jako časný biomarker znečištěného prostředí [14].

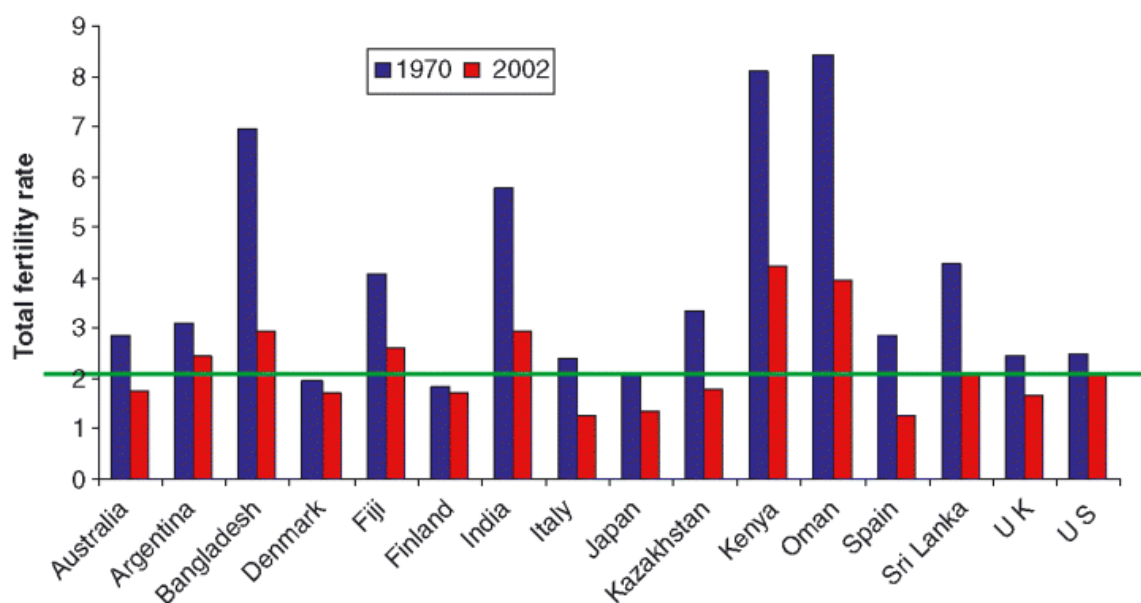
Zájem o elementární složení mužského ejakulátu se datuje do roku 1921, kdy Bertrand a Vladesco [15] objevili v ejakulátu vysoké hladiny Zn. Od té doby stoupl zájem o zkoumání především stopových prvků v ejakulátu či semenné plazmě - jejich zastoupení a především fyziologické úlohy na mužskou plodnost [16].

Cílem této diplomové práce je multielementární analýza mužského ejakulátu a zjištění zastoupení vybraných elementů v něm pomocí AAS, TOF-ICP-MS a rtuťového analyzátoru a sekundárně nastínit možný vliv prvků, jejich hladin a několika proměnných z dotazníků na mužskou plodnost. Vzorky mužského ejakulátu byly získávány z centra asistované reprodukce SANUS Pardubice spolu se spermioqramy a dotazníky. Vše bylo statisticky zpracováno pomocí jednorozměrné a vícerozměrné statistické analýze dat.

2 Teoretická část

2.1 Mužská neplodnost

Neplodnost neboli sterilita je nemožnost oplodnění oocyty ženy v její plodné dny pokud tento problém přetrvává déle než jeden rok [17-20]. Zhruba v 50 % případech neplodnosti páru je problém na straně muže [21, 22]. Za poslední dvě desetiletí po celém světě byl zaznamenán prudký pokles plodnosti, jak uvádí Obrázek 1 [23]. Dobrým ukazatelem poklesu neplodnosti je zvýšená poptávka po léčbě neplodnosti ve specializovaných centrech. Významným faktorem mužské neplodnosti jsou selhání varlat a špatná kvalita spermatu [21, 22].



Obrázek 1 Změny mužské plodnosti v rozvojových a průmyslových zemích. Zelená linka ukazuje změnu v plodnosti v rozvojových a průmyslových zemích a zároveň je ukazatelem plodnosti, která je nezbytná pro udržení populace na její současné úrovni [23].

Mužskou neplodnost můžeme klasifikovat dle několika kritérií – doba vzniku; pretestikulární příčiny; testikulární příčiny [21, 22].

V Tabulce 1 je přehledně shrnutá klasifikace mužské neplodnosti a odkaz na literaturu, kde je klasifikace podrobněji definována.

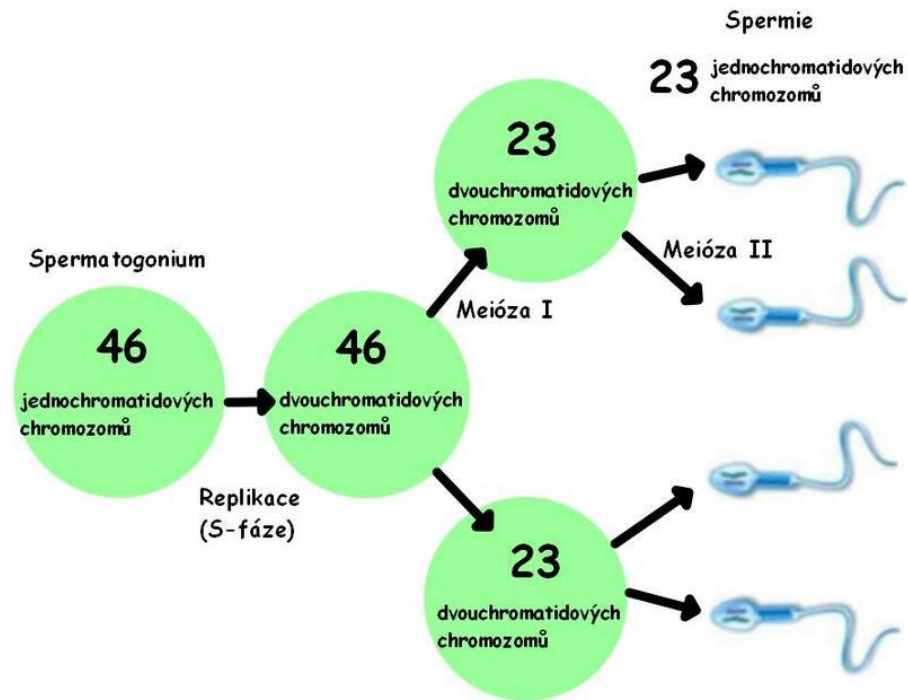
Tabulka 1 Přehled klasifikace mužské neplodnosti dle kritérií a jejich stručný popis.

Kritérium vzniku	Druh	Popis	Literatura
Doba vzniku	primární	Muž nikdy nemůže oplodnit ženu	[21, 22]
	sekundární	Dříve muž mohl oplodnit ženu, momentálně problém (zánět,...)	[21, 22]
Pretestikulární příčina	Porucha funkce hypotalamu	Kalmanův syndrom Nedostatek LH Nedostatek FSH Hypogonadotropní Hypogonadismus	[19, 21]
	Porucha funkce hypofýzy	Hypofyzární insuficience Hyperprolaktinemie	[19, 21, 22]
Testikulární příčina	Genetické odchylky	Klinefelterův syndrom Syndrom Noonanové Syndrom Praderové-Williho XX mužský syndrom a XYY syndrom	[19, 21, 22]
	Exogenní vlivy	Radiace Farmaka Chemoterapie	[21, 22]
	Systémová onemocnění	Srpkovitá anémie Cirhóza jater Selhání ledvin	[19, 21]
	Poškození varlat	Torze Dystrofie Zánět Poranění	[19, 21]

2.1.1 Spermatogeneze

Spermatogeneze (zjednodušeně na Obrázku 2) je děj tvorby spermií trvající zhruba 74 dní a je regulován hormonálně. Tento proces se skládá ze dvou typů buněčného dělení (mitóza, meióza) a probíhá po celý život muže. Spermatogeneze je lokalizována ve varlatech z důvodu nižší teploty, která je o 2 – 3 °C nižší než teplota v lidském těle a tím je splněna podmínka pro vývoj spermií. Ve varlatech jsou uloženy semenotvorné kanálky, kde se po opakovaném redukčním dělení (meióze) vytvářejí spermie [20, 22, 24]. Spermie z varlat putují do nadvarlat, kde se uskladňují a dozrávají. Na začátku spermatogeneze dochází k mitotickému dělení spermiogonie na dvě dceřiné. Jedna z dceřiných buněk zůstává v populaci kmenových buněk na bazální membráně, aby byla zachována zásoba spermatogonií. Druhá spermatogonie vputuje

mezi Sertoliho buňky, kde přes spermiocyty, spermatocyty a spermiogenezi vzniká spermie [18, 25, 26].



Obrázek 2 Schéma spermatogeneze - Ze spermatogonie vzniká primární spermatocyt jež má diploidní počet chromozomů. Po 1. meiotickým dělení vznikají sekundární spermatocyty, které mají již haploidní počet chromozomů. Přes druhé meiotické dělení vznikají spermatidy se stejným počtem chromozomů [27].

Spermie je malá, vysoce specializovaná buňka lidského organismu. V jednom mužském ejakulátu se nachází 300 – 500 miliónů spermií. V ženském pohlavním systému dokáže přetrvat asi 2 dny a pomocí bičíku se snaží dostat až k vajíčku ve vejcovodu. Mimo ženské pohlavní ústrojí brzo zahyne. Zralá spermie se skládá z těchto částí: hlavička, která nese genetický materiál; akrozom chrání hlavičku spermie; krček je energetický systém celé buňky a propojuje hlavičku s bičíkem; bičík zajišťující pohyb celé spermie [20, 25, 26].

2.1.2 Vyšetření spermatu

Spermiogram je základním vyšetření mužské plodnosti a touto analýzou dokážeme získat informace o plodnosti daného pacienta (Tabulka 2). Základními údaji při vyšetření spermatu jsou: celkový objem, pH, viskozita, motilita, koncentrace spermií a morfologie [22, 28, 29]. V Tabulce 3 je přehled možných diagnóz po provedení spermiogramu.

Tabulka 2 Spermiogram - normální nález dle WHO [27, 28].

Měřené parametry	Hodnoty pro normozoospermii
Objem ejakulátu	> 1,5 mL
pH	> 7,2
Koncentrace spermií	≥ 15 milionů/mL
Celkový počet spermií v ejakulátu	≥ 39 milionů
Celková pohyblivost	≥ 40 % pohyblivých spermií
Počet progresivně se pohybujících spermií	≥ 32 %
Morfologie	≥ 4 % s normální stavbou
Vitalita	≥ 58 % živých spermií
Leukocyty	< 1 milion/mL

Aby výsledky vyšetření byly validní, je nutné, aby celý proces od odběru až po vyhodnocení bylo provázeno za standardizovaných podmínek [22]. Od roku 1980 vydává WHO (mezinárodní zdravotnická organizace) manuál (WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction) pro standardizaci diagnostiky [29]. Po několika letech je vždy tento manuál aktualizován. Metody vyšetření můžeme rozdělit na základní (standardní) či specifické, kdy zjišťujeme speciální údaje například pro výzkum [22].

Pro přesnější výsledky a získání kvantitativních dat o kinetice spermií se využívá CASA (počítačová analýza spermatu) oproti manuálnímu odečítání. V roce 1996 vydala ESHRE (European Society for Human Reproduction and Embryology) doporučené postupy pro používání CASA. Díky CASA je vše digitalizované a možné uchovávat v této podobě [22, 28].

Tabulka 3 Možné výsledky spermogramu.

Termín	Vysvětlení	Literatura
Normospermie	Hodnota všech parametrů spermogramu v normě.	[22, 29]
Azoospermie	Ejakulát neobsahuje žádné spermie.	[22, 29]
Oligospermie	Nižší koncentrace spermií než je stanovena.	[19, 22, 29]
Astenospermie	Parametr pohyblivosti spermií pod spodní hranicí.	[22, 29]
Teratospermie	Nadměrné množství spermií s abnormálním tvarem.	[22, 29]
Oligoastenoteratozoospermie	Kombinace tří postižení - oligospermie, astenospermie a teratospermie.	[22, 29]
Aspermie	Není žádný ejakulát.	[19, 29]

2.1.2.1 Specifická vyšetření

Specifická vyšetření se běžně neprovádějí. Můžeme sem zařadit výpočet indexů mnohočetných defektů spermií (TZI, MAI, SDI), HOS (Hypoosmotický test), kultivace ejakulátu a biochemická analýza seminální plazmy [19, 22, 28].

2.1.2.2 Výzkumné vyšetření

Tento typ vyšetření se neprovádí běžně. Je to druh vyšetření, které se dají klinicky aplikovat. Funkční testy spermií se dají testovat třemi metodami - ROS (Reactive oxygen species), Human zona pellucida binding test a hodnocení akrozomální reakce [19, 22, 28].

2.2 Vliv prvků na lidské zdraví a mužskou plodnost

Pro správné fungování lidského organismu hrají důležitou a nepostradatelnou roli minerály (anorganické látky) a stopové prvky. Jejich zastoupení ovlivňuje udržování vnitřního prostředí organismu, růst kostí, činnost srdce, nervové, trávicí či vylučovací soustavy, plodnost a mnoho dalšího [30]. Pokud se objeví v lidském organismu nedostatek některého z prvků níže uvedených, vyvíjí se syndrom deficitu. Pokud dojde k doplnění daného prvku, symptomy vymizí [31]. Více informací o metabolismu, klinické funkci stopových prvků a jejich roli v lékařství pojednávají i tyto publikace [32-34].

Minerály jsou v lidském těle zastoupeny jen ve velmi malém množství přibližně 4 % tělesné váhy. Pro správnou funkci lidského organismu je potřeba 22 prvků, které podle jejich zastoupení (množství) dělíme na makroprvky a mikroprvky (stopové prvky). Mezi makroprvky patří Na, K, Ca, Mg a P. Stopové prvky (Zn, Cu, Fe, I, Cr, F, Se, Mn, Mo, Co a Li) jsou takové

prvky, které jsou pro člověka v nepatrných dávkách nezbytné, ale naopak od určitých koncentrací potencionálně škodlivé. Minerály přijímá člověk potravou nebo doplňky stravy [30, 35]. V Tabulce 4 jsou popsány funkce makro a mikroprvků v lidském organismu s odkazem na literaturu.

Tabulka 4 Přehled prvků v lidském organismu a jejich funkce.

Prvek	Zařazení	Funkce	Literatura
Na	makroprvek	Regulace vody Ovlivnění látkové výměny	[30, 35-38]
K	makroprvek	Pro správnou funkci srdce, ledvin; nervové, dýchací a endokrinní soustavy	[30, 35, 37, 38]
P	makroprvek	Růst a mineralizace kostí	[30, 35, 37]
Ca	makroprvek	Stavba kostí; srážení krve Pro funkci srdce, CNS, buněk	[30, 35]
Mg	makroprvek	Součást enzymů a molekul ATP/ADP Syntéza proteinů	[30, 35, 37]
Zn	mikroprvek	Aktivita enzymů Důležitý pro spermatogenezi	[30, 35, 39]
Cu	mikroprvek	Obsažen v enzymech Metabolismus železa, glukózy tvorba melatoninu	[30, 35]
Fe	mikroprvek	Obsažen v enzymech Transport kyslíku pomocí hemoglobinu a myoglobinu (je součást hemu) Nutný k syntéze glukokortikoidů, aldosteronu a pohlavních hormonů	[30, 35]
Se	mikroprvek	Antioxidant; součást enzymů metabolismus hormonů štítné žlázy důležitý pro spermatogenezi	[30, 35]
I	mikroprvek	Syntéza hormonů štítné žlázy	[30, 35]
Cr	mikroprvek	Metabolismus proteinů, sacharidů, lipidů Snižuje koncentraci cholesterolu a TAG Pomáhá inzulinu navázat inzulinové receptory	[30, 35, 40]
Mn	mikroprvek	Odbourávání MK; vznik energie Syntéza cholesterolu	[30, 35, 39]
F	mikroprvek	Součást zubů a kostí	[30, 35]
Mo	mikroprvek	Metabolismus pyridinů a pyrimidinů Součást enzymů	[30, 35]
Li	mikroprvek	Používá se v k léčbě manických příznaků	[30, 35]
Co	mikroprvek	Součást vitamínu B12 Tvorba erythropoetinu Vychytávání jódu štítnou žlázou	[30, 35]

Jak již bylo řečeno, mnoho faktorů může mít nepříznivé účinky a jedním z nich je expozice různých prvků na mužskou reprodukční funkci [41-43]. Účinky každého prvku na mužskou neplodnost mohou být různé a specifické (př.: Cd a jeho účinky na varlata) nebo naopak podobné pro větší skupiny kovových elementů (př.: As, Cr, Hg, Ni a Pb snižující motilitu spermií) [41]. Přehled jednotlivých prvků a jejich roli v mužské plodnosti je popsáno v Tabulce 5. Využití diagnostiky a znalosti účinků prvků v mužském ejakulátu na mužskou plodnost by se do budoucna dalo využít při práci s lékaři při léčbě neplodnosti daných pacientů. Je však nutné a nezbytné nejdříve dosáhnout přiměřených důkazů o vztahu mezi expozicí daných prvků a klinickými nálezy [41]. V seminální plazmě a ejakulátu se objevují především tyto prvky – Mg, Cu, Zn, Ca, Fe a Se, které hrají důležitou roli v mužské plodnosti a přímo ovlivňují kvalitu spermií. Nerovnováha těchto prvků může způsobovat poruchy mužské fertility [44].

Kupříkladu kovy a polokovy jsou všudypřítomné – v potravinách, v doplňcích stravy, vodě, vzduchu, alkoholických nápojích a tabáku. Jen v cigaretovém kouři je jich obsaženo okolo 30, kde Cd, As a Pb jsou v nejvyšších koncentracích [45]. Alkoholické nápoje včetně vína mohou být kontaminovány kovy, které převyšují přípustné hodnoty a způsobují toxické účinky především u alkoholiků [42]. Je tedy nezbytné při léčbě mužské infertility brát v úvahu nutriční přístup pacientů z důvodu jeho významnosti v reprodukci [44].

Tabulka 5 Přehled prvků a jejich vliv na mužskou plodnost.

Prvek	Vliv na mužskou plodnost	Literatura
Zn	<ul style="list-style-type: none"> + Ovlivňuje kvalitu spermií, především motilitu. + Nepostradatelný při vývoji varlat a spermatogenezi. + Působí antibakteriálně v mužské vylučovací soustavě. + Zvyšuje hladinu testosteronu. + Podílí se na regulaci akrozomové reakce. + Ovlivňuje kvalitu antioxidantů. + Ovlivňuje spotřebu kyslíku ve spermiích a dekonenzaci jaderného chromatinu. + Účastní se na stabilizaci chromatinu spermií. + Dočasně chrání vnitřní mechanismus dekonenzaci jaderného chromatinu spermie. + Důležitý pro energii spermií. + Ochranný účinek pro životaschopnost spermií. + Hladina zinku v seminální plasmě je ukazatelem funkce/dysfunkce prostaty. - Nedostatek negativně působí na spermatogenezi, morfologii spermií a snižuje hladinu testosteronu. -Nedostatek snižuje obsah DNA ve spermiích a destabilizuje kvartérní strukturu chromatinu. 	[46-52]
Mg	<ul style="list-style-type: none"> + Ovlivňuje kvalitu spermií – motilitu a spermatogenezi. + Je kofaktorem antioxidačních enzymů. + Napomáhá k udržení pro/antioxidační rovnováhy. + Ovlivňuje libido a endokrinní rovnováhu. + Marker sekrece semenných váčků. 	[44, 46, 51]

Tabulka 5 Pokračování.

Cu	<ul style="list-style-type: none"> + Ovlivňuje kvalitu spermií. + Napomáhá k udržení pro/antioxidační rovnováhy. + Je kofaktorem antioxidačních enzymů. + Chrání spermie před peroxidací lipidů. + Inhibičním faktor motility spermií. 	[46, 53, 54]
Ca	<ul style="list-style-type: none"> + Ovlivňuje pohyblivost spermií a spermatogenezi. + Je potřebný pro dozrávání spermií, kapacitaci spermií a akrozomovou reakci. + Je jedním z regulátorů fyziologických procesů v buňce. - Kanálky jsou vstupní cestou pro toxické kovové částice. 	[55-58]
K	<ul style="list-style-type: none"> + Podílí se na akrozomových reakcích a spermatogenezi. 	[55, 56]
Cd	<ul style="list-style-type: none"> + Napomáhá při ochraně varlat - Snižuje hustotu, objem spermatu a toxicky působí na spermie. - Snižuje/zvyšuje hladinu testosteronu. - Může ovlivňovat funkci Leydigových buněk. - Zhoršení integrity DNA. - Destrukce varlat a semenného epitelu. 	[58-63]
Se	<ul style="list-style-type: none"> + Ovlivňuje kvalitu spermií a je nezbytný pro spermatogenezi. + Je součástí selenoproteinů, které mají funkci antioxidantů a zapojují + se do kondenzace chromatinu spermie. + Nezbytný pro zachování a udržení normální spermatogeneze. + Nezbytný pro normální vývoj spermií. 	[64-67]
Co	<ul style="list-style-type: none"> - Snižuje/zvyšuje hladinu testosteronu. - Může ovlivňovat funkci Leydigových buněk. 	[68]

Tabulka 5 Pokračování.

Ni	- Snižuje/zvyšuje hladinu testosteronu. - Může ovlivňovat funkci Leydigových buněk. - Snižuje pohyblivost spermií a zvyšuje počet defektů ocásků spermií.	[68, 69]
As	- Negativně působí na motilitu spermií a celkovou kvalitu spermií. - Zhoršuje integritu DNA spermií.	[70]
Sn	- Zvyšuje procento apoptických spermií.	[70]
Al	- Snižuje pohyblivost spermií a negativně ovlivňuje morfologii spermií. - Negativně ovlivňuje spermatozou a toxicky působí na spermie.	[60, 71]
Cr	- Snižuje pohyblivost a koncentraci spermií. + Je součástí kofaktorů enzymů důležitých pro kvalitu spermií.	[69]
Hg	-Ve větším množství působí toxicky a poškozuje spermie.	[8]
Pb	- Působí toxicky na spermie – nepříznivě ovlivňuje tvar spermií, pohyblivost a integritu DNA.	[60]
Fe	+ Chrání spermie před peroxidací lipidů.	[53, 67]
Mn	+ Potřebný pro normální funkci spermií. - Při expozici negativně ovlivňuje pohyblivost, koncentraci spermií a může vyústit až v impotenci. + Je součástí kofaktorů enzymů důležitých pro kvalitu spermií.	[72, 73]
Mo	-Při expozici negativně ovlivňuje kvalitu spermií - koncentraci a morfologii. + Je součástí kofaktorů enzymů důležitých pro kvalitu spermií.	[73]
As	-Snižuje motilitu spermií. -Zhoršuje integritu DNA.	[41]

Nejedna studie [74-79] poukázala na vliv znečištěného ovzduší, kouření a expozici prvků v práci (hutní průmysl), kdy tyto dané faktory zvyšovaly hladinu mědi a naopak snižovaly hladiny zinku a hořčíku ve spermatu a v krvi, což negativně působilo na mužskou plodnost [46, 80]. Při expozici hořčíkem dochází ke snížení libida a endokrinní nerovnováze [44].

Důležitou roli v ochraně varlat před toxicitou Cd hraje MTLCDBP (= protein vázajícího kadmia podobný metalothioneinu). Byl proveden pokus na krysách, které byly exponované kadmiiem per os. Hladina MTLCDBP byla měřena pomocí imunochemických metod. Hladina Cd ve varlatech se zvyšovala v závislosti na expozici Cd a hladina MTLCDBP se s rostoucí akumulací Cd také značně zvyšovala, což dokazuje její ochrannou roli ve varlatech před Cd [62]. Na poškození varlat Cd má pozitivní vliv podávání Zn kvůli jeho antioxidační funkci. Právě podávání Zn snížilo hladiny volných toxických radikálů ve varlatech, čímž se obnovila hladina testosteronu a počet spermií [63].

Cd a jiné kovové ionty mohou mít jistý účinek na produkci testosteronu Leydigových buněk in vitro. Hodnocení in vivo toxického účinku na funkci Leydigových buněk je složité, protože se jedná o homeostatický mechanismus, proto se studoval vliv na tyto buňky in vitro. Buňky byly zpracovány s vybranými kovovými kationty při 3 hodinové inkubaci. Výsledky ukázaly, že Ca^{2+} , Cr^{3+} , Fe^{3+} , Mg^{2+} , Na^{+} a Pb^{2+} neměly žádný vliv na stimulaci testosteronu. Naopak kationty Cd^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} a Zn^{2+} způsobily zvýšenou produkci testosteronu. Z toho vyplývá, že Cd^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} a Zn^{2+} mohou působit a mít vliv na Leydigovy buňky [68].

Vybrané kovy a polokovy konkrétně metalloidy - As, Cd, Cu, Se a Sn mohou nepříznivě ovlivnit kvalitu spermatu, apoptózu (= buněčná smrt) spermií či integritu DNA. V semenné plazmě bylo během studie [70] stanoveno metodou ICP-MS 18 prvků (As, Cd, Cu, Se, Sn, Al, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Zn, Mo, Sb, W, Tl, Pb, U). Po vyhodnocení naměřených výsledků se ukázalo, že As negativně ovlivňuje motilitu spermií a jejich nižší kvalitu. Byla objevena korelace mezi koncentrací As a Se, kteří zhoršují integritu DNA. Sn zvyšoval procento apoptických spermií. Získané výsledky poukazují na to, že pokud jsou muži vystaveni prostředí, kde se vyskytují dané prvky, tak právě tyto prvky mohou poškodit reprodukční zdraví mužů.

Při mapování 15 stopových prvků (Al, Cd, Cr, Cu, Hg, Mn, Mo, Ni, Pb, Ti, V, Zn, As, Sb a Se v lidské semenné plazmě se hodnotil jejich vztah ke kvalitě spermií. Bylo zjištěno, že stopové prvky mohou být spojovány s DNA a jsou schopné měnit vzory genové exprese. Z toho vyplývá, že interakce stopových prvků s DNA může přispívat k mechanismu transgenního reprodukčního účinku. Byla vyvinuta analytická metoda pro stanovení stopových prvků vázaných na DNA spermií a odhad jejich afinity k DNA. Pomocí metody ICP-MS byly analyzovány hladiny výše zmíněných prvků. Po provedení výše uvedených analýz bylo

zjištěno, že v semenné plazmě byly přítomny všechny uvedené prvky, kdežto v DNA spermií byly detekovány pouze kovy. Nebyla zjištěna žádná korelace mezi koncentracemi kovů v semenné plazmě a v DNA spermií. Nejvyšší afinitu k DNA měl hliník a po něm následovalo olovo a kadmium. Tuto silnou afinitu můžeme vysvětlit mutagenními účinky těchto kovů. Naopak nižší afinita byla sledována u zinku a titanu. Byla zjištěna zvýšená hladina hliníku spojená s DNA spermií u pacientů s oligozoospermií a teratozoospermií [8].

Bylo prokázáno, že prvky (Fe, Zn, Ca, Al, Cu, Mg, Se a Sr) i v nízkých úrovních mohou mít nepříznivý vliv na reprodukci muže. Autoři zkoumali vztah mezi danými kovy a kvalitou mužského semene. Do této studie [81] bylo zařazeno 85 mužů trpících neplodností. Každému účastníkovi byla odebrána krev, moč a mužský ejakulát. Ze vzorků bylo metodou ICP-OES stanoveny hladiny 8 prvků. Zn byl nižší u jedinců s azospermií než u normospermiků; vysoká hladina Al se vyskytovala u azospermiků; vyšší koncentrace Cu u asthenozoospermiků; nižší koncentrace Mg u azospermiků a normospermiků; Se ve vyšší koncentraci u azospermiků a normospermiků; hladina Sr nižší u asthenozoospermiků.

Uvádí se, že Nigérie je země vysoce znečištěná toxickými kovy zejména Cd a Pb, proto bylo u 60 mužů navštěvující kliniku asistované reprodukce měřené hladiny Cd a Pb. Vyšší hladina Cd se objevovala u mužů bez spermií a u těchto mužů se objevily významně vyšší hladiny LH a FSH v séru [59, 82]. Podobné výsledky se ukázaly během indické studie [83], kdy neplodní muži měli asi 20x vyšší hladinu Cd. Vysoká hladina Cd korelovalo negativně s pohybem a koncentrací spermií. Nebyla jednoznačně prokázána spojitost vyšší hladiny Cd s kouřením tabáku.

Analýza Pb metodou AAS byla provedena u 21 studentů medicíny nebo technického oboru, kteří nebyli vystavováni expozici Pb. Porovnávala se hladina Pb v semenné plazmě a v krvi. Nebyla zjištěna žádná korelace mezi hladinou Pb v semenné plazmě a krvi ani korelace mezi množstvím Pb a počtem spermií. Naměřené hodnoty Pb sloužily jako referenční hodnoty pro měření Pb ve spermatu u mužů, kteří byli otráveni Pb [84].

Několik studií [85, 86] se zabývalo o účincích znečištěného životního prostředí kovy na mužskou neplodnost. Primárně bylo sledováno – koncentrace, % pohyblivých, % normální morfologie spermií a objem spermatu. Jak je již známo, některé kovy jsou nezbytné pro správné fungování organismu, ale na druhou stranu kovy jako Cu, Mn a Se mohou být škodlivé, jakmile přesáhne koncentraci jejich prahové hodnoty. Cd a Hg způsobují nepříznivé účinky na reprodukční zdraví mužů již ve velmi nízkých koncentracích a proto jsou cílem sledování pro veřejné zdraví. Mn – Cu a Cu – Mo poukázaly na korelaci s pohyblivostí a morfologií

spermií negativně. Vysoké hladiny Cd v krvi mohou mít negativní vliv na spermatogenezi. Pro statistické zpracování několika studií byla použita metoda U-skóre [85-87].

2.3 Problematika prvkové analýzy mužského ejakulátu nebo semenné plazmy

Hlavní úskalí prvkové analýzy mužského ejakulátu či semenné plazmy představují: příprava a zpracování vzorku (mineralizace), dále pak velice malý objem vzorku, který se pohybuje okolo 1–2 mL. V mužském ejakulátu se nachází prvky ve velmi nízkých koncentracích, proto je potřeba dobře zvolit metodu analýzy. Přehled naměřených koncentrací prvků v mužském ejakulátu či semenné plazmě uvedených ve dříve realizovaných studiích jsou shrnuty v Tabulce 6.

2.3.1 Uchování, zpracování a příprava vzorku k analýze

Odběr, příprava, skladování a zpracování vzorků je klíčový krok pro celý proces analýzy. Pro odběr a uchování mužského ejakulátu se využívá sterilních nádob nebo zkumavek, které se nejčastěji zamrazí na -20°C až -80°C [81, 88]. Stejně je tomu tak i u semenné plazmy, kde však musí nejdříve dojít k centrifugaci mužského ejakulátu. Po centrifugaci je semenná plazma odebrána pipetou do připravené sterilní zkumavky a zamrazí se [89].

Pro rozklad vzorků zpravidla potřebný pro analýzu metodami AAS, ICP-MS a ICP-OES [90] se nejčastěji využívá mikrovlnné mineralizace. Její hlavní výhodou je rychlost a účinnost rozkladu a v neposlední řadě snížení spotřeby kyselin a činidel pro zlepšení dopadu na životní prostředí [90-92]. Pro rozklad mužského ejakulátu nebo semenné plazmy se nejčastěji využívá směsí: $\text{HNO}_3 + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}$ [93], $\text{HNO}_3 + \text{HClO}_4$ [88], $\text{HNO}_3 + \text{HCl}$ [94] a nebo jednotlivě např.: HNO_3 [70]. Výběr chemikálií a jejich použité množství se liší téměř v každé studii.

Neopominutelným rizikem při stopové analýze je kontaminace vzorků. U stopových analýz se musí pracovat v čistých podmínkách, aby riziko kontaminace byla co nejnižší, proto se používá redestilovaná voda, čistá kyselina dusičná získávána podvarovou destilací a pečlivá příprava laboratorního nádobí, které se musí loužit zředěnou kyselinou dusičnou [90].

Tabulka 6 Přehled naměřených koncentrací jednotlivých prvků v mužském ejakulátu nebo semenné plazmě.

Prvek	Druh vzorku	Naměřená koncentrace	Jednotky	Použitá metoda	Literatura	
As	SP	1,8 ± 4	µg L ⁻¹	ICP-MS	[8]	
	SP	0,014	µg L ⁻¹	ICP-MS	[70]	
Al	E	21,741 – 28,009	ng mL ⁻¹	ICP-OES	[81]	
	SP	10 - 137	µg dL ⁻¹	AAS	[60]	
	SP	0,25	µg L ⁻¹	ICP-MS	[70]	
	E	0,068 – 0,77	mg L ⁻¹	ICP-OES	[88]	
Ca	E	694,320 – 694,763	ng mL ⁻¹	ICP-OES	[81]	
	SP	167 - 260	µg mL ⁻¹	ICP-MS	[16]	
	SP	2,2 – 2,3 ^M	mmol L ⁻¹	AAS	[46]	
	SP	98,8 – 161,9	µg dL ⁻¹	komerční kit	[56]	
Cd	SP	35 - 62	mg dL ⁻¹	AAS	[60]	
	E	1,29 – 2,49	µg dL ⁻¹	AAS	[85]	
	SP	1,01 ± 0,7	µg L ⁻¹	ICP-MS	[8]	
	SP	1,4 – 2,7	µg dL ⁻¹	AAS	[60]	
Cu	SP	0,0037	µg L ⁻¹	ICP-MS	[70]	
	SP	1,41 – 18,96	µg dL ⁻¹	AAS	[83]	
	E	LOD	ng mL ⁻¹	ICP-OES	[81]	
	SP	55,31 ± 31,7	µg L ⁻¹	ICP-MS	[8]	
	E	112,5 – 137,9	µg dL ⁻¹	AAS	[85]	
	SP	0,16 – 0,25	µg mL ⁻¹	ICP-MS	[16]	
	SP	1,05 – 1,87	mg mL ⁻¹	AAS	[44]	
	SP	5,5 - 5,9 ^M	µmol L ⁻¹	AAS	[46]	
Co	SP	0,16 ± 0,07	µg mL ⁻¹	AAS	[53]	
	SP	0,13	µg L ⁻¹	ICP-MS	[70]	
	SP	165,42 – 285,6	µmol L ⁻¹	AAS	[80]	
	SP	0,0040	µg L ⁻¹	ICP-MS	[70]	
	Cr	SP	28,14 ± 10,1	µg L ⁻¹	ICP-MS	[8]
		SP	0,32 – 0,84	µg mL ⁻¹	ICP-MS	[16]
		SP	0,032	µg L ⁻¹	ICP-MS	[70]
	Fe	E	246,4 – 258,1	ng mL ⁻¹	ICP-OES	[81]
SP		0,18 – 0,32	µg mL ⁻¹	ICP-MS	[16]	
SP		1,56 – 2,76	mg mL ⁻¹	AAS	[44]	
SP		0,38 ± 0,15	µg mL ⁻¹	AAS	[53]	
SP		0,41	µg L ⁻¹	ICP-MS	[70]	
Hg	E	18 – 26,7	µg dL ⁻¹	AAS	[85]	
	SP	0,73 ± 0,2	µg L ⁻¹	ICP-MS	[8]	
Mg	E	3083 - 4720	ng mL ⁻¹	ICP-OES	[81]	
	SP	54,4 – 103,1	µg mL ⁻¹	ICP-MS	[16]	
	SP	130,94 – 832,63	mg mL ⁻¹	AAS	[44]	
	SP	3,6 – 3,7 ^M	mmol L ⁻¹	AAS	[46]	
	SP	6,21 – 8,07	mg na 100 mL	neuveveno	[52]	
	SP	9,1- 24,9	mg dL ⁻¹	AAS	[60]	
	SP	6,92 – 17,88	µmol L ⁻¹	AAS	[80]	

Tabulka 6 Pokračování.

Mn	SP	4,83 ± 2,5	µg L ⁻¹	ICP-MS	[8]
	SP	0,017 – 0,032	µg mL ⁻¹	ICP-MS	[16]
	SP	0,060	µg L ⁻¹	ICP-MS	[70]
Mo	SP	6,27 ± 2,9	µg L ⁻¹	ICP-MS	[8]
	SP	0,033	µg L ⁻¹	ICP-MS	[70]
	E	0,129 – 0,528	mg L ⁻¹	ICP-OES	[88]
Ni	SP	5,28 ± 2,4	µg L ⁻¹	ICP-MS	[8]
	SP	0,036	µg L ⁻¹	ICP-MS	[70]
	E	0,011 – 0,113	mg L ⁻¹	ICP-OES	[88]
Pb	E	5,1 – 13,4	µg dL ⁻¹	AAS	[85]
	SP	1,75 ± 0,9	µg L ⁻¹	ICP-MS	[8]
	SP	0,006 – 0,024	µg mL ⁻¹	ICP-MS	[16]
	SP	4 – 20,5	µg dL ⁻¹	AAS	[60]
	SP	1,56 – 21,9	µg dL ⁻¹	AAS	[83]
Rb	SP	3,35 – 12,52	µg mL ⁻¹	ICP-MS	[16]
Sb	SP	2,19 ± 0,7	µg L ⁻¹	ICP-MS	[8]
Se	SP	23,54 ± 17,7	µg L ⁻¹	ICP-MS	[8]
	E	LOD	ng mL ⁻¹	ICP-OES	[81]
	SP	0,047	µg L ⁻¹	ICP-MS	[70]
Sn	SP	0,020	µg L ⁻¹	ICP-MS	[70]
	E	0,009 – 1,301	mg L ⁻¹	ICP-OES	[88]
Sr	E	25,5 – 25,76	ng mL ⁻¹	ICP-OES	[81]
	E	0,026 – 0,353	mg L ⁻¹	ICP-OES	[88]
Ti	SP	3598 ± 1891	µg L ⁻¹	ICP-MS	[8]
U	SP	0,0020	µg L ⁻¹	ICP-MS	[70]
V	SP	5,98 ± 2,9	µg L ⁻¹	ICP-MS	[8]
	SP	0,09 – 0,20	µg mL ⁻¹	ICP-MS	[16]
W	SP	0,055	µg L ⁻¹	ICP-MS	[70]
Zn	SP	145,567 ± 79,904	µg L ⁻¹	ICP-MS	[8]
	E	87,93 – 138,0	ng mL ⁻¹	ICP-OES	[81]
	E	71,0 – 72,2	µg dL ⁻¹	AAS	[85]
	SP	93 - 189	µg mL ⁻¹	ICP-MS	[16]
	SP	187,15 – 288,03	mg mL ⁻¹	AAS	[44]
	SP	1,4 ^M	mmol L ⁻¹	AAS	[46]
	SP	10,32 – 16,09	mg na 100 mL	AAS	[49]
	SP	11,6 – 19,6	mg dL ⁻¹	AAS	[50]
	SP	10,4 – 10,8	mg na 100 mL	neuveveno	[52]
	SP	9,02 – 11,6	µg dL ⁻¹	AAS	[60]
	SP	0,49	µg L ⁻¹	ICP-MS	[70]
	SP	92,55 – 138,39	µmol L ⁻¹	AAS	[80]

SP – semenná plazma; E – ejakulát; ^M – medián; LOD – nižší než mez detekce

2.3.2 Volba analytické metody

Prvkovou analýzu mužského ejakulátu nebo semenné plazmy můžeme provést několika metodami. Jelikož jsou ve vzorku koncentrace prvků velmi nízké, je vhodné použít metod atomové spektrální analýzy, konkrétně AAS, ICP-OES nebo ICP-MS.

Ve vzorku mužského ejakulátu či semenné plazmy se objevují jak matriční prvky, tak prvky v ultrastopových koncentracích. Pro analýzu makroprvků se nejčastěji volí metoda AAS nebo ICP-OES [95-99]. Výhodami metody AAS je vysoká specifita, možnost analyzovat různorodé vzorky a dobrá citlivost, naopak nevýhodou je monoelementárnost a horší linearita kalibrace [98, 100]. Nejčastěji se pro stanovení matričních prvků využívá AAS s atomizací v plameni (FAAS) [98, 100, 101]. Mezi výhody ICP-OES patří široký lineární dynamický rozsah (5-6 řádů), snadná a rychlá kvalitativní analýza, možnost simultánní analýzy, poměrně jednoduchá instrumentace.

Metoda ICP-MS se pak jeví jako účinná multielementární analýza prvků v ultrastopových koncentracích [109-114]. Nabízí mnoho výhod jako nízká mez detekce, lineární dynamický rozsah 8 - 10 řádů a dobrá rozlišovací schopnost. Bohužel i tato metoda má své nevýhody, mezi které patří zejména spektrální interference, složitá instrumentace, vysoké pořizovací a provozovací náklady apod. [102-108].

2.3.3 Problematika prvkové analýzy biologických vzorků metodou ICP-MS

Během analýzy ICP-MS musí docházet k převedení roztoku na aerosol, který doputuje do plazmy, kde probíhá desolvatace, atomizace, ionizace, excitace a odpařování. Během této cesty může nastat vznik interferencí, které způsobují omezení přesnosti při měření. Matricový efekt neboli interference jsou neopominutelné, protože mohou způsobovat systematické chyby a je nutné se snažit o jejich minimalizaci. Interference máme dvojího druhu a to spektrální a nespektrální [109, 110].

Spektrální interference v ICP-MS dále rozlišujeme na monoizotopické a polyatomické. První z uvedených typů nastává v případě, že existují 2 izotopy různých prvků, jejichž hmotnost je téměř totožná [102, 103]. Největším problémem pro ultrastopovou analýzu pak jsou polyatomické ionty. K jejich vzniku dochází reakcí dvou nebo více druhů atomů. Množství polyatomických iontů je závislé na koncentraci prvků, které ionty tvoří a také na nastavení parametrů plazmatu a zmlžovače [102, 103, 111]. Podrobný přehled polyatomických interferencí objevujících se v biologických materiálech při analýze na spektrometru s nízkým či středním rozlišením je uveden v Tabulce 7.

Během ICP-MS analýzy se mohou objevit i **nespektrální interference** jinak řečeno matricové efekty, které potlačují nebo zvyšují intenzitu signálu [103, 108, 111]. Nespektrální interference můžeme rozdělit na fyzikální a chemické. K fyzikálním interferencím dochází při dávkování roztoků o různé viskozitě, chemické interference vznikají při přenosu iontů z ICP do interface a z iontové optiky do spektrometru apod. [112, 113].

Pro odstranění spektrálních a nespektrálních interferencí lze použít instrumentálních, neinstrumentálních či alternativních metod.

Mezi **neinstrumentální metody** patří ředění vzorku, použití vhodného porovnávacího prvku (Rh, In, Y, La, apod.) nebo matematická korekce [103, 108, 111]. Tento typ korekce se používá zejména pro odstranění monoizotopické interference. Tato metoda není bohužel použitelná, pokud je koncentrace analytu výrazně nižší než interferentu [114]. Spektrální interference je možné potlačit vhodnou přípravou vzorku, izolací analytu od matrice před vlastní analýzou atd. [115].

Instrumentální metody pomáhají snižovat interference, které vznikají v důsledku přítomnosti polyatomických iontů. Využívá se k tomu přídavných zařízení, ale je dobré nejdříve zvážit jejich použití. Pomocí přídavných zařízení lze modifikovat plazmu – částečná náhrada argonu jiným plynem, snížení výkonu a tak i teploty. Díky této modifikaci se sníží tvorba polyatomických iontů [115, 116]. Jiným řešením může být použití kolizní/reakční cely, která na principu diskriminace kinetické energie či hmotnosti vede k eliminaci celé řady spektrálních interferencí [115]. Další možností je pro analýzu použití spektrometru s vysokým rozlišením, které dokáže vyřešit většinu spektrálních interferencí. Použití vysokého rozlišení však může v konečném důsledku snížit citlivost a přesnost detekce, což je pro tento typ analýzy nežádoucí a další stránkou je i finanční náročnost na zařízení [115, 117].

Mezi **alternativní metody** řadíme spojení ICP-MS s elektrotermickým vypařováním, generováním těkavých sloučenin, použití membránové desolvatace, apod. [118, 119]. Výhodou těchto metod je minimalizace interferencí, kterou jsou způsobené oxidy či hydroxidy, protože principem je vpravení suchého aerosolu do ICP [115]. Elektrotermické vypařování pak na základě důsledně optimalizovaného teplotního programu umožňuje eliminaci celé řady dalších interferencí polyatomických iontů různých matričních prvků [108].

Tabulka 7 Přehled polyatomických interferencí v ICP-MS [120, 121].

Izotop	Prvek	Interferent
75	As	$^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$, $^{59}\text{Co}^{16}\text{O}^+$, $^{36}\text{Ar}^{38}\text{Ar}^1\text{H}^+$, $^{38}\text{Ar}^{37}\text{Cl}^+$, $^{36}\text{Ar}^{39}\text{K}$, $^{43}\text{Ca}^{16}\text{O}_2$, $^{23}\text{Na}^{12}\text{C}^{40}\text{Ar}$, $^{12}\text{C}^{31}\text{P}^{16}\text{O}_2^+$
197	Au	$^{181}\text{Ta}^{16}\text{O}^+$
79	Br	$^{40}\text{Ar}^{39}\text{K}^+$, $^{31}\text{P}^{16}\text{O}^3+$, $^{38}\text{Ar}^{40}\text{Ar}^1\text{H}^+$
81	Br	$^{32}\text{S}^{16}\text{O}_3^1\text{H}^+$, $^{40}\text{Ar}^{40}\text{Ar}^1\text{H}^+$, $^{33}\text{S}^{16}\text{O}_3^+$
40	Ca	$^{40}\text{Ar}^+$
110	Cd	$^{39}\text{K}_2^{16}\text{O}^+$
114	Cd	$^{98}\text{Mo}^{16}\text{O}^+$, $^{98}\text{Ru}^{16}\text{O}^+$
35	Cl	$^{16}\text{O}^{18}\text{O}^1\text{H}^+$, $^{34}\text{S}^1\text{H}^+$, $^{35}\text{Cl}^+$
37	Cl	$^{36}\text{Ar}^1\text{H}^+$, $^{36}\text{S}^1\text{H}^+$, $^{37}\text{Cl}^+$
59	Co	$^{43}\text{Ca}^{16}\text{O}^+$, $^{42}\text{Ca}^{16}\text{O}^1\text{H}^+$, $^{24}\text{Mg}^{35}\text{Cl}^+$, $^{36}\text{Ar}^{23}\text{Na}^+$, $^{40}\text{Ar}^{18}\text{O}^1\text{H}^+$, $^{40}\text{Ar}^{19}\text{F}^+$
50	Cr	$^{34}\text{S}^{16}\text{O}^+$, $^{36}\text{Ar}^{14}\text{N}^+$, $^{35}\text{Cl}^{15}\text{N}^+$, $^{36}\text{S}^{14}\text{N}^+$, $^{32}\text{S}^{18}\text{O}^+$, $^{33}\text{S}^{17}\text{O}^+$
52	Cr	$^{35}\text{Cl}^{16}\text{O}^1\text{H}^+$, $^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}^+$, $^{36}\text{Ar}^{16}\text{O}^+$, $^{38}\text{Ar}^{14}\text{N}^+$, $^{36}\text{Ar}^{15}\text{N}^1\text{H}^+$, $^{35}\text{Cl}^{17}\text{O}^+$
53	Cr	$^{37}\text{Cl}^{16}\text{O}^+$, $^{38}\text{Ar}^{15}\text{N}^+$, $^{38}\text{Ar}^{14}\text{N}^1\text{H}^+$, $^{36}\text{Ar}^{17}\text{O}^+$, $^{36}\text{Ar}^{16}\text{O}^1\text{H}^+$, $^{35}\text{Cl}^{17}\text{O}^1\text{H}^+$, $^{35}\text{Cl}^{18}\text{O}^+$, $^{36}\text{S}^{17}\text{O}^+$, $^{40}\text{Ar}^{13}\text{C}^+$
63	Cu	$^{31}\text{P}^{16}\text{O}_2^+$, $^{40}\text{Ar}^{23}\text{Na}^+$, $^{47}\text{Ti}^{16}\text{O}^+$, $^{23}\text{Na}^{40}\text{Ca}^+$, $^{46}\text{Ca}^{16}\text{O}^1\text{H}^+$, $^{36}\text{Ar}^{12}\text{C}^{14}\text{N}^1\text{H}^+$, $^{14}\text{N}^{12}\text{C}^{37}\text{Cl}^+$, $^{16}\text{O}^{12}\text{C}^{35}\text{Cl}^+$
54	Fe	$^{37}\text{Cl}^{16}\text{O}^1\text{H}^+$, $^{40}\text{Ar}^{14}\text{N}$, $^{38}\text{Ar}^{15}\text{N}^1\text{H}^+$, $^{36}\text{Ar}^{18}\text{O}^+$, $^{38}\text{Ar}^{16}\text{O}^+$, $^{36}\text{Ar}^{17}\text{O}^1\text{H}^+$, $^{36}\text{S}^{18}\text{O}^+$, $^{35}\text{Cl}^{18}\text{O}^1\text{H}^+$, $^{37}\text{Cl}^{17}\text{O}$
56	Fe	$^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}^+$, $^{40}\text{Ca}^{16}\text{O}^+$, $^{40}\text{Ar}^{15}\text{N}^1\text{H}^+$, $^{38}\text{Ar}^{18}\text{O}^+$, $^{38}\text{Ar}^{17}\text{O}^1\text{H}^+$, $^{37}\text{Cl}^{18}\text{O}^1\text{H}^+$
71	Ga	$^{35}\text{Cl}^{18}\text{O}_2^+$, $^{37}\text{Cl}^{16}\text{O}^{18}\text{O}^+$, $^{37}\text{Cl}^{17}\text{O}_2^+$, $^{36}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$, $^{36}\text{S}^{17}\text{O}^{18}\text{O}^+$, $^{38}\text{Ar}^{33}\text{S}^+$
70	Ge	$^{40}\text{Ar}^{14}\text{N}^{16}\text{O}^+$, $^{35}\text{Cl}^{17}\text{O}^{18}\text{O}^+$, $^{37}\text{Cl}^{16}\text{O}^{17}\text{O}^+$, $^{34}\text{S}^{18}\text{O}_2^+$, $^{36}\text{S}^{16}\text{O}^{18}\text{O}^+$, $^{36}\text{S}^{17}\text{O}_2^+$, $^{34}\text{S}^{36}\text{S}^+$, $^{36}\text{Ar}^{34}\text{S}^+$, $^{38}\text{Ar}^{32}\text{S}^+$, $^{35}\text{Cl}_2^+$
72	Ge	$^{36}\text{Ar}_2^+$, $^{37}\text{Cl}^{17}\text{O}^{18}\text{O}^+$, $^{35}\text{Cl}^{37}\text{Cl}^+$, $^{36}\text{S}^{18}\text{O}_2^+$, $^{36}\text{S}_2^+$, $^{36}\text{Ar}^{36}\text{S}^+$, $^{56}\text{Fe}^{16}\text{O}^+$, $^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}_2^+$, $^{40}\text{Ca}^{16}\text{O}_2^+$, $^{40}\text{Ar}^{32}\text{S}^+$
39	K	$^{38}\text{Ar}^1\text{H}^+$
40	K	$^{40}\text{Ar}^+$
41	K	$^{40}\text{Ar}^1\text{H}^+$
24	Mg	$^{12}\text{C}_2^+$
25	Mg	$^{12}\text{C}_2^1\text{H}^+$
26	Mg	$^{12}\text{C}^{14}\text{N}^+$, $^{12}\text{C}_2^1\text{H}_2^+$, $^{12}\text{C}^{13}\text{C}^1\text{H}^+$
55	Mn	$^{40}\text{Ar}^{14}\text{N}^1\text{H}^+$, $^{39}\text{K}^{16}\text{O}^+$, $^{37}\text{Cl}^{18}\text{O}^+$, $^{40}\text{Ar}^{15}\text{N}^+$, $^{38}\text{Ar}^{17}\text{O}^+$, $^{36}\text{Ar}^{18}\text{O}^1\text{H}^+$, $^{38}\text{Ar}^{16}\text{O}^1\text{H}^+$, $^{37}\text{Cl}^{17}\text{O}^1\text{H}^+$, $^{23}\text{Na}^{32}\text{S}^+$, $^{36}\text{Ar}^{19}\text{F}^+$
58	Ni	$^{23}\text{Na}^{35}\text{Cl}^+$, $^{40}\text{Ar}^{18}\text{O}^+$, $^{40}\text{Ca}^{18}\text{O}^+$, $^{40}\text{Ca}^{17}\text{O}^1\text{H}^+$, $^{42}\text{Ca}^{16}\text{O}^+$, $^{29}\text{Si}_2^+$, $^{40}\text{Ar}^{17}\text{O}^1\text{H}^+$, $^{23}\text{Na}^{35}\text{Cl}^+$
45	Sc	$^{12}\text{C}^{16}\text{O}_2^1\text{H}^+$, $^{28}\text{Si}^{16}\text{O}^1\text{H}^+$, $^{29}\text{Si}^{16}\text{O}^+$, $^{14}\text{N}_2^{16}\text{O}^1\text{H}^+$, $^{13}\text{C}^{16}\text{O}_2^+$
48	Ti	$^{32}\text{S}^{16}\text{O}^+$, $^{34}\text{S}^{14}\text{N}^+$, $^{33}\text{S}^{15}\text{N}^+$, $^{14}\text{N}^{16}\text{O}^{18}\text{O}^+$, $^{14}\text{N}^{17}\text{N}_2^+$, $^{12}\text{C}_4^+$, $^{36}\text{Ar}^{12}\text{C}^+$
50	V	$^{34}\text{S}^{16}\text{O}^+$, $^{36}\text{Ar}^{14}\text{N}^+$, $^{35}\text{Cl}^{15}\text{N}^+$, $^{36}\text{S}^{14}\text{N}^+$, $^{32}\text{S}^{18}\text{O}^+$, $^{33}\text{S}^{17}\text{O}^+$
64	Zn	$^{32}\text{S}^{16}\text{O}_2^+$, $^{48}\text{Ti}^{16}\text{O}^+$, $^{31}\text{P}^{16}\text{O}_2^1\text{H}^+$, $^{48}\text{Ca}^{16}\text{O}^+$, $^{32}\text{S}_2^+$, $^{31}\text{P}^{16}\text{O}^{17}\text{O}^+$, $^{34}\text{S}^{16}\text{O}_2^+$, $^{36}\text{Ar}^{14}\text{N}_2^+$
66	Zn	$^{50}\text{Ti}^{16}\text{O}^+$, $^{34}\text{S}^{16}\text{O}_2^+$, $^{33}\text{S}^{16}\text{O}_2^1\text{H}^+$, $^{32}\text{S}^{16}\text{O}^{18}\text{O}^+$, $^{32}\text{S}^{17}\text{O}_2^+$, $^{33}\text{S}^{16}\text{O}^{17}\text{O}^+$, $^{32}\text{S}^{34}\text{S}^+$, $^{33}\text{S}_2^+$

3 Experimentální část

3.1 Chemikálie použité při experimentu

1. Komerčně dostupný standard prvků pro metodu IC-MS (standard A)

-Ag, Al, B, Ba, Bi, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Ga, In, K, Li, Mg, Mn, Na, Ni, Pb, Sr, Tl, Zn

- každý z prvků o koncentraci 1000 mg L⁻¹

- výrobce: SCP Science Ltd. Kanada

2. Multiprvkový standard B

-Ti, V, Ge, As, Se, Rb, Zr, Mo, Ru, Pd, Sn, Sb, Te, Ta, W, Re, Pt, Hg, Th, Cs, Hf – každý standard k dispozici v koncentraci 1 g L⁻¹

- výrobce: Analytika spol., s.r.o., ČR, anebo SCP Science Ltd. Kanada)

3. Komerčně dostupný standard prvků pro metodu ICP-MS (standard C)

-La, Ce, Pr, Nd o koncentraci 100 mg L⁻¹

-Sc, Y, Tb, Ho, Yb, Sm, Eu, Gd, Er, Tm, Lu, Dy o koncentraci 20 mg L⁻¹

- výrobce: Analytika, Ltd., ČR

4. Další použité chemikálie a standardy

- H₂O₂, 25 – 35% (m/m), výrobce: Sigma Aldrich, Co., USA
- HNO₃ 65% (m/m), výrobce: Penta spol., s.r.o. Česká republika
- Referenční vzorky moči – SeronormTM Trace Elements Urine (Lot 1,2),
výrobce: SERO a.s., Norsko.
- Redestilovaná voda (Milli-Q® Reference Water Purification Systém (Mere Millipore, Německo)

3.2 Příprava roztoků

3.2.1 Příprava zásobních roztoků

Zásobní multiprvkový roztok AB o koncentraci 10 mg L⁻¹ byl vytvořen následně: 0,5 mL standardu A + 0,5 mL standardu B a doplněním redestilovanou H₂O na finální objem 50 mL v odměrné baňce.

Zásobní roztok C o koncentraci 1 mg L^{-1} C1 (La, Ce, Pr, Nd, U) + $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ C2 (Sc, Y, Tb, Ho, Yb, Sm, Eu, Gd, Er, Tm, Lu, Dy) byl vytvořen z komerčního mixu standard C, kdy bylo odpipetováno $0,5 \text{ mL}^{-1}$ standardu C + $0,5 \text{ mL}^{-1}$ prvku U o koncentraci 100 mg L^{-1} a následně doplněno H_2O do 50 mL^{-1} odměrné baňky.

Zásobní roztok ABC o koncentraci $500 + 50 + 10 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ byl vytvořen následně: $2,5 \text{ mL}$ již vytvořeného standardu AB a $2,5 \text{ mL}^{-1}$ vytvořeného standardu C a doplněno redestilovanou H_2O do 50 mL^{-1} odměrné baňky.

3.2.2 Příprava podvarové HNO_3 pro rozklad vzorků

Podvarovou destilací koncentrované HNO_3 došlo k přečištění této kyseliny, která mohla být následně použita pro rozklad vzorků pro ultrastopovou analýzu ICP-MS.

3.2.3 Kalibrační roztoky

Kalibrační řada pro ICP-MS byla vytvořena ze zásobního standardu ABC. Ze zásobního standardu byla připravena kalibrační řada obsahující: 0, 2, 5, 10 a $20 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ prvků skupiny AB, 0,2, 0,5, 1 a $2 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ prvků skupiny C1 a 0,04, 0,1, 0,2 a $0,4 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ prvků C2. Každý z kalibračních roztoků obsahoval $1 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ Rh jako porovnávacího prvku.

Pro kalibraci metody AAS byly použity již připravené standardy v rozmezí koncentrací uvedených v kapitole 3.4.5.

3.3 Analyzované vzorky mužského ejakulátu

Vzorky mužského ejakulátu byly získávány v centru asistované reprodukce SANUS Pardubice od pacientů s informovaným souhlasem o použití vzorku pro vypracování diplomové práce a s příloženým dotazníkem. Vše bylo provedeno anonymně. Ke každému vzorku byl přidán spermioqram daného pacienta (pod číslem). Celkem bylo zpracováno 32 vzorků.

3.3.1 Přeprava a příprava vzorků mužského ejakulátu

Vzorky byly po provedení spermioqramu převedeny do očíslovaných zkumavek a následně zamrazeny na -20°C . Při transportu byly vzorky uloženy do termoboxu pro udržení teploty. Box byl přelepen a transportován na Univerzitu Pardubice, kde byly vzorky vyňaty z termoboxu a vloženy do mrazáku určeného na biologický materiál.

Vzorky mužského ejakulátu bylo potřeba nejdříve rozmrazit. Do kádinky byla nalita voda a do ní vloženy zkumavky se vzorky. Po chvíli byly vzorky rozmrazeny a připraveny k dalšímu zpracování.

3.3.2 Mikrovlnná mineralizace vzorků

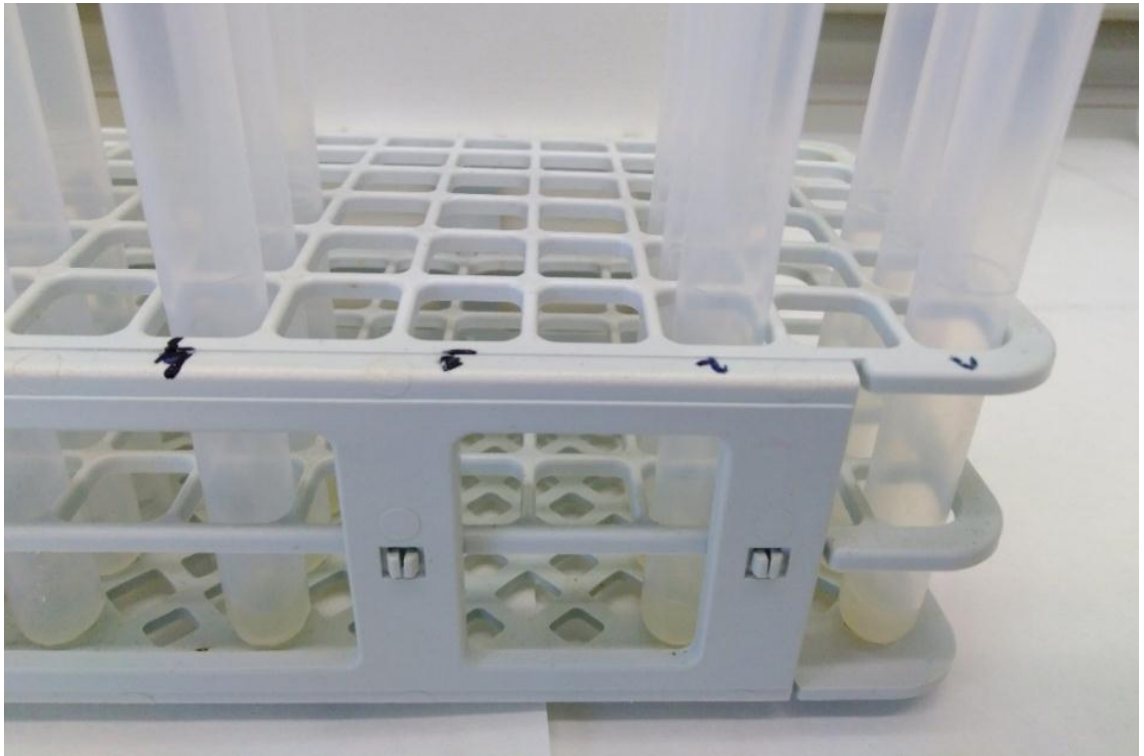
Do speciálních plastových zkumavek bylo na analytických vahách naváženo ideálně okolo 0,5 g ve 3 replikách od jednoho vzorku (Obrázek 3). Pokud byl objem vzorků malý, byl navážen pouze ve 2 replikách, kde druhá nebo třetí replika měla méně než 0,5 g.

Do každé zkumavky s odváženým vzorkem bylo ke vzorku napipetováno: 1 mL přečištěné HNO₃ podvarovou destilací, 1 mL H₂O₂ a 3 mL redestilované vody (Obrázek 4 – 6). Tyto zkumavky byly vloženy do nádob, ve kterých bylo napipetováno 4 mL podvarovou destilací přečištěné HNO₃, 4 mL H₂O₂ a 12 mL redestilované vody a uzavřeny víčkem s pojistkou (každé víčko bylo ještě mechanicky před uzavřením nádoby roztažené). Nádobka i se vzorky byla vložena do speciální nádoby na rozklad. Nádoba byla pečlivě uzavřena a vložena do přístroje na mikrovlnnou mineralizaci Speedwave Xpert. Na přístroji byl nastaven teplotní program více Tabulka 8, dle kterého probíhal rozklad vzorku. Po rozkladu vzorku mužského ejakulátu byl čirý mineralizát (Obrázek 7) převeden do připravené odměrné baňky o objemu 25 mL a po rysku doplněn redestilovanou vodou. Aby mohl být vzorek analyzován metodou ICP-MS, muselo být vzorkům přidán porovnávací prvek Rh o koncentraci 1 µg L⁻¹.

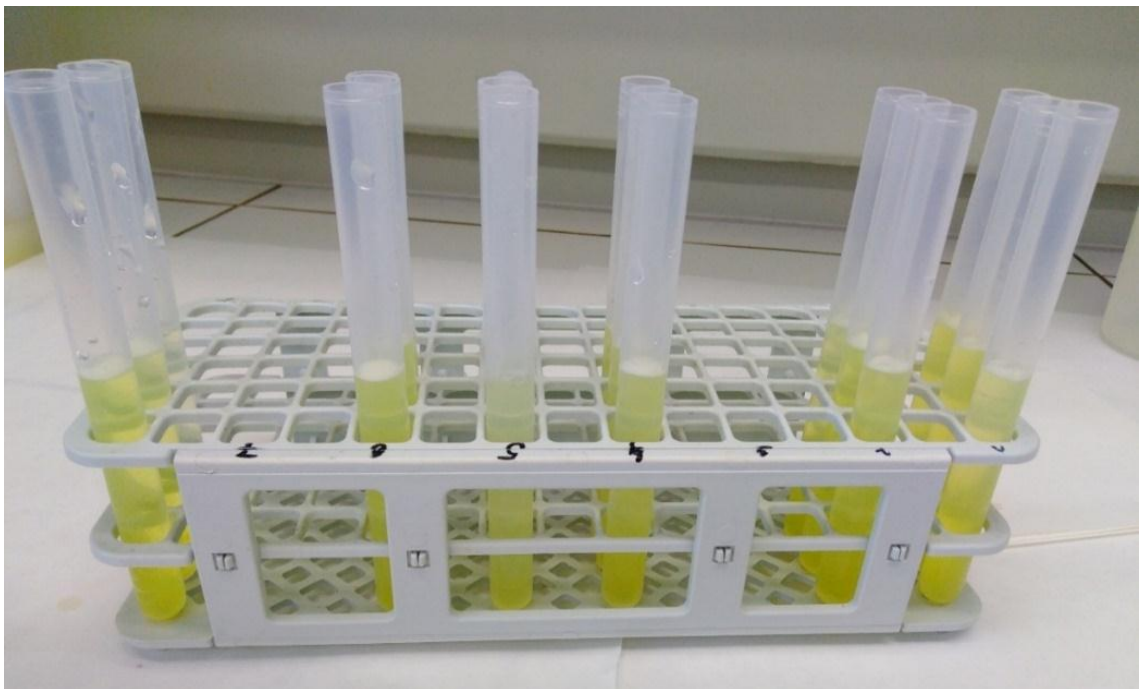
Tabulka 8 Teplotní program pro mineralizaci vzorků mužského ejakulátu.

	Teplota (°C)	Nárůst (min)	Držení (min)	Výkon (%)
Krok 1	170	5	15	30
Krok 2	220	5	20	30
Krok 3	50	1	10	0
Krok 4	50	0	0	0
Krok 5	50	0	0	0

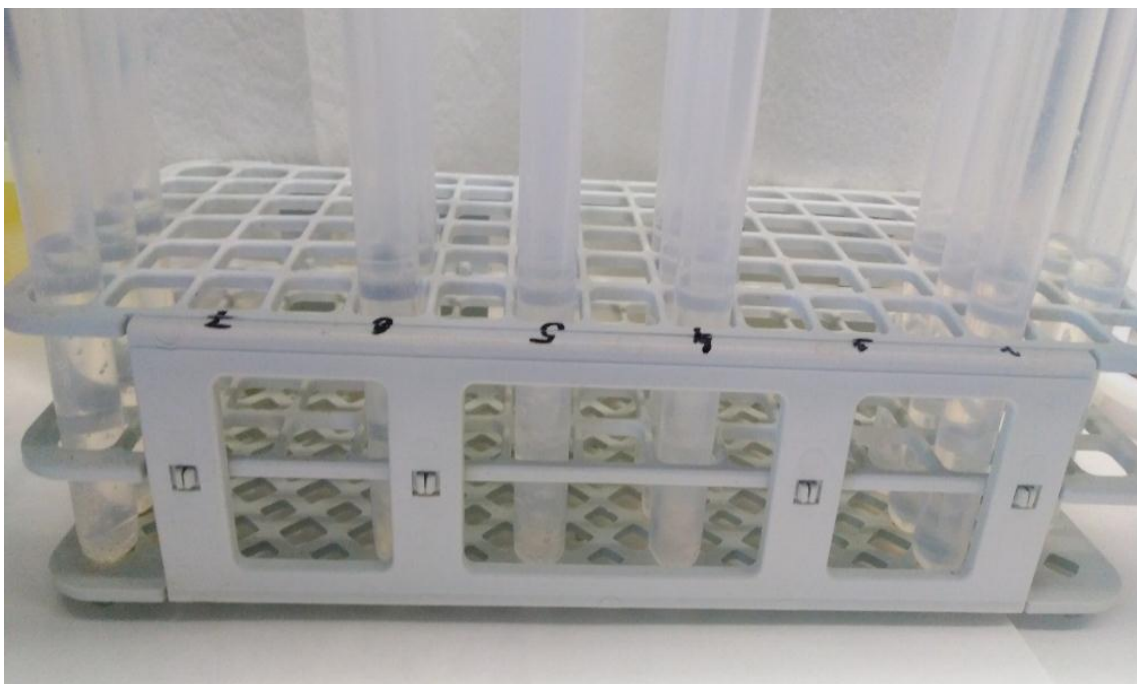
3A



3B



3C



Obrázek 3 Příprava reálného vzorku k analýze. **A** - Navážení mužského ejakulátu před mikrovlnnou mineralizací. **B** - Navážený vzorek mužského ejakulátu + 1 mL HNO_3 + 1 mL H_2O_2 + 3 mL H_2O . **C** - Vzorek mužského ejakulátu po mikrovlnné mineralizaci.

3.4 Použitá instrumentace

3.4.1 Zařízení pro podvarovou destilaci HNO_3

Pro získání ultračisté HNO_3 byl využit přístroj BSB 939IR od německé firmy Berghof GmbH (Obrázek 4). Takto připravená kyselina je téměř bez kontaminace a splňuje tak i nejvyšší nároky čistoty pro ultrastopovou analýzu ICP-MS. Výše zmíněné zařízení se skládá z několika částí - lampy (IR zářič), polytetrafluorethylenové nádoby s odpařovací komorou a polyfluorového chladiče. Vzniklý kondenzát je odváděn trubicí (z PFA), kterou je veden do průhledné láhve ze stejného materiálu jako je trubice [120].



Obrázek 4 Přístroj na podvarovou destilaci BSB 939IR od firmy Berghof GmbH [118].

3.4.2 Mikrovlnné zařízení

Pro rozklad vzorků byl použit přístroj Speedwave Xpert od firmy Berghof (Obrázek 5). Jedná se o německé, mikrovlnné a rozkladné zařízení, které proti předchozím modelům má vyšší výkon, který je 2000 W. Tento typ rozkladného zařízení se využívá především při ultrastopové analýze [121]. Je vhodný pro rozklad obtížných vzorků, proto je doporučován pro využití v oblastech léčiv, kosmetiky, geologie, životního prostředí, energetiky a materiálové vědy [122]. Výhodou tohoto zařízení je masivní a nerezová konstrukce, multitubes (možnost rozkladu 24 vzorků), vysoká homogenita mikrovlnného pole, kvalitní teflonové nádoby s dlouhou životností, display pro sledování průběhu procesu, eliminace kontaminace vzorků, rychlá reakční doba, zvýšení analytického výkonu, jednoduchá manipulace, bezpečnost, kontinuální měření teploty, dlouhá životnost zařízení, snadná obsluha a dobré pořizovací náklady [121].



Obrázek 5 Příklad Speedwave Expert od firmy Berghof – mikrovlnné zařízení.

3.4.3 Analyzátor rtuti AMA 254

Spektrometr AMA 254 (Obrázek 6) neboli Advanced Mercury Analyzer měřící absorpci uvolněných par při vlnové délce 253,65 nm je přístroj vyvinutý a vyráběný v České republice od firmy Altec [123]. Jedná se o jednoúčelový atomový absorpční spektrometr pro stanovení obsahu Hg jak v pevných, tak i v kapalných vzorcích. Principem analyzátoru je generování par Hg tepelným rozkladem vzorku, ke kterému dochází ve spalovací trubici. Následně dochází k zachycení a zakoncentrování tepelně rozloženého vzorku na amalgamátoru ze zlata, poté musí dojít k tepelnému vypuzení a následné detekci. Nosným plynem je kyslík. Obrovskou výhodou tohoto zařízení je malý objem nebo malé množství vzorku, není potřeba předešlá úprava vzorku, vysoká citlivost a mez detekce. Mez detekce se liší pro pevné a kapalně vzorky. Pro pevné vzorky je 1 ng L^{-1} , pro kapalně vzorky $0,1 \text{ ng L}^{-1}$. Analyzátor AMA 254 pro stanovení Hg má široké spektrum uplatnění v mnoha oborech – biologické obory, potravinářství, životní prostředí nebo geologie [123, 124].



Obrázek 6 Analyzátor rtuti AMA 254 od firmy Altec [123].

Před zahájením každého měření vzorku byla překontrolována čistota analyzátoru pomocí kontrolního standardu. Jakmile byla překontrolována čistota a funkčnost analyzátoru, došlo k vlastní analýze vzorků mužského ejakulátu. Pokud bylo vzorku dostatek, bylo měření opakováno 3x. Na vychladlou lodičku bylo automatickou pipetou napipetován vzorek a naváženo pomocí analytických vah, přibližně přesně 100 mg. Naměřené hodnoty Hg ve vzorcích mužského ejakulátu byly velmi nízké, pohybovaly se okolo stovek ng L^{-1} .

3.4.4 Spektrometr ICP-*oa*-TOF-MS GBC OptiMass 9000

GBC OptiMass 9000 (GBC Scientific Equipment Pty.Ltd, Austrálie) je typ hmotnostního spektrometru s průletovým analyzátozem s ortogonální akcelerací iontů je (Obrázek 7) vhodný pro rychlou přechodovou analýzu velkého počtu prvků [125, 126]. Tento analyzátor má několik částí – systém vnášení vzorku, ICP zdroj, interface a MS. Vzorek musí být zmlžen pomocí zmlžovače a následně jsou velké kapky odstraněny. K extrahování iontů dochází v interface, který je mezi vysokoteplotním plazmatem a MS. Tento typ hmotnostního spektrometru má bránu (Smart Gate), která dokáže vyřezat nechtěné izotopy z analyzovaného spektra a tím prodlouží životnost detektoru. Tento přístroj má nespočet výhod jako je citlivost, přesnost, rychlost, detekční limity, vysoká rychlost sběru dat, vhodnost pro analýzu přechodových signálů, vysoká průchodnost vzorku nebo víceprvková přechodová analýza [126].



Obrázek 7 Přístroj GBC OptiMass 9000 [127].

Parametry charakterizující nastavení spektrometru:

- odezva pro $1 \mu\text{g L}^{-1}$ izotopu $^{208}\text{U}^+$ činí 50 000 impulzů/s
- rozlišení pro $1 \mu\text{g L}^{-1}$ izotopu $^{208}\text{U}^+$ = 1900

Tabulka 9 Nastavení pro bránu „Smart Gate“ při analýze neřaděných vzorků.

Rozsah m/z	Interferující ionty
12 – 26	$^{12}\text{C}^{14}\text{N}^+$, $^{12}\text{C}^+$, $^{14}\text{N}^+$, $^{16}\text{O}^+$, $^{14}\text{N}^+$, $^{16}\text{O}^1\text{H}^+$, $^1\text{H}_2^{16}\text{O}^+$, $^{24-26}\text{Mg}^+$, $^{28}\text{N}_2^+$, $^{14}\text{N}^{16}\text{O}^+$, $^{40}\text{Ar}^+$, $^{40}\text{Ar}^1\text{H}^+$
55,5 – 57,5	$^{56}\text{ArO}^+$, ^{56}Fe
64 - 68	$^{65}\text{Cu}^+$, $^{64}\text{Zn}^+$, $^{68}\text{Zn}^+$
79 - 82	$^{40}\text{Ar}_2^+$, $^{85}\text{Rb}^+$, $^{88}\text{Sr}^+$

Tabulka 10 Nastavení podmínek přístroje ICP-oe-TOF-MS (GBC OptiMass 9000).

ICP Source		
RF power	1200 W	
Plasma gas flowrate	10 L/min	
Auxiliary gas flowrate	0,5 L/min	
Nebuliser gas flow rate	0,99 L/min	
Mass Spectrometer		
Ion optics	Skimmer	-1200 V
	Extraction	-1150 V
	Z1 gain	-950 V
	Y mean	-200 V
	Y deflection	0 V
	Z lens mean	-1120 V
	Z lens deflection	-1
Lens body	-180	
Pulse shaping	Fill	-38 V
	Fill bias	-0,7 V
	Fill grid	-35 V
	Pushout plate	650 V
	Pushout grid	-490 V
	Blanker	150 V
	Blanker spectral frequency	33 kHz
Reflection	670 V	
Detection	Multiplier gain	2650 V
	Ion threshold	5,78 mV
	Integration Windows	auto
	Measurement mode	Pulse counting/analog

3.4.5 Atomový absorpční spektrometr SensAA

Atomový absorpční spektrometr SensAA (GBC Scientific Equipment, Austrálie) nabízí jednoduchost, dobrý výkon, bezpečnost, bezproblémový provoz a funkčnost za příznivou cenu. Dalším pozitivem je celková úspora na náklady. Obsahuje špičkovou optiku a elektroniku. Výhodou je možnost pracovat jak se standardní lampou, tak s multikatodovou, díky které je možná automatická víceprvková analýza až 12 prvků. Tento typ AAS (Obrázek 8) je vybaven vestavěným počítačem s dotykovou obrazovkou, který umožňuje snadné vkládání dat a přehledné používání [128].



Obrázek 8 Přístroj SensAA (GBC Scientific Equipment, Austrálie) [128].

Tabulka 11 Nastavení přístroje GBC SensAA pro stanovené prvky.

Prvek	λ (nm)	Mód	d (nm)	I (mA)	Kalibrační rozsah (mg L ⁻¹)
Zn	213,9	absorpce	0,5	5,0	0,2 – 5,0
Mg	285,2	absorpce	0,2	3,0	0,05 – 4,0
Ca	422,7	absorpce	0,5	5,0	0,5 – 10,0
K	766,5	emise	0,5	6,0	2,0 – 20,0
Na	589,0	emise	0,5	5,0	2,0 – 20,0

^a Průtok plynu (L min⁻¹): C₂H₂ (1,5) ^a/vzduch (10), C₂H₂ (99,6 %, Linde Gas a.s., ČR);

λ vlnová délka, I žhavení lampy, d šířka spektrální štěrbin

3.4.6 Další použité laboratorní pomůcky a přístroje

- Elektronické analytické váhy KERN 870 (Německo)
- Přístroj na redestilovanou vodu Milli-Q® Reference Water Purification Systém (Mere Millipore, Německo)
- Pipeta opakovací plynule nastavitelná Distriman (Gilson, USA)
- Automatické pipety (Biohit, Finsko)
- Laboratorní nádobí (SIMAX, Česká republika)
- MS Office 2010 (Microsoft corporation, US)

4 Výsledky a diskuze

4.1 Optimalizace parametrů ICP-MS

Základní nastavení parametrů u přístroje ICP-oe-TOF-MS byla důsledně optimalizována. Optimalizace byla realizována tak, aby byla získána co nejlepší citlivost a rozlišení pro izotop $^{238}\text{U}^+$. Výsledné podmínky optimalizace jsou uvedeny v Tabulce 10. Pozornost byla dále soustředěna na nastavení parametrů brány „SmartGate“, které souvisí s eliminací interferentů. Přesné nastavení parametrů brány „SmartGate“ je uvedeno v Tabulce 9.

4.2 Přesnost stanovení

Před samotnou analýzou získaných vzorků mužského ejakulátu bylo zapotřebí ověřit přesnost a správnost zvolených metod: termooxidačního stanovení rtuti, FAAS a ICP- oe- TOF-MS, které byly použity pro stanovení: Hg, Mg, Zn, K, Na, Li, Cr, Mn, Ni, Co, As, Se, Sr, Mo, Cd, Sb, Cs, Tl, Pb, Sn a Te. Na trhu bohužel není dostupný komerční referenční vzorek mužského ejakulátu. Pro ověření přesnosti analýzy tak byl využit komerčně dostupný referenční vzorek moči SeronormTM Trace Elements Urine. V Tabulce 12 jsou přehledně uvedeny naměřené výsledky koncentrací stanovení, hodnoty deklarované výrobcem (indikované a certifikované hodnoty) i s intervaly nejistot.

Tabulka 12 Výsledky stanovení koncentrací vybraných prvků v SRM Seronorm™ Trace Elements Urine L1 a L2.

ICP-TOF-MS		Koncentrace^a [$\mu\text{g L}^{-1}$]		
	Deklarováno	Nalezeno	R^b (%)	RSD^c (%)
⁷ Li ⁺	7 ^d	9.2 ± 1,8	---	9.78
⁵² Cr ⁺	21.2 ± 4.3	16.7 ± 0.4	79	1.20
⁵⁵ Mn ⁺	10.9 ± 2.2	12.5 ± 0.9	115	3.60
⁵⁹ Co ⁺	10.6 ± 2.1	10.2 ± 1.1	96	5.40
⁷⁵ As ⁺	184 ± 37	200 ± 10	109	2.50
⁷⁷ Se ⁺	70.1 ± 14.1	68.2 ± 0.8	97	0.59
⁸⁸ Sr ⁺	88 ^d	104 ± 13	---	6.25
⁹⁶ Mo ⁺	38 ^d	44.3 ± 0.2	---	0.23
¹¹⁴ Cd ⁺	4.9 ± 0.2	5.0 ± 0.9	102	9.00
¹²⁰ Sn ⁺	49.7 ± 10	46 ± 3	93	3.26
¹²³ Sb ⁺	108 ± 22	106 ± 9	98	4.25
¹²⁶ Te ⁺	24.7 ± 0.8	22 ± 1	89	2.27
¹³³ Cs ⁺	5.8 ^d	7.7 ± 0.4	---	2.60
²⁰⁵ Tl ⁺	9.70 ± 0.67	23.6 ± 1.0	243	5.0
²⁰⁸ Pb ⁺	90.7 ± 18.3	107 ± 2	118	0.94
FAAS/FAES		Koncentrace^a [mg L⁻¹]		
	Deklarováno	Nalezeno	R^b (%)	RSD^c (%)
Na	2317 ^d	1614 ± 231	---	7.16
K	1487 ^d	1458 ± 55	---	1.89
Ca	71 ^d	91 ± 14	---	7.69
Mg	64 ^d	64 ± 4	---	3.12
Zn	1.34 ± 0.54	1.103 ± 0.001	82	0.05
AMA 254		Koncentrace^a [$\mu\text{g L}^{-1}$]		
	Deklarováno	Nalezeno	R^b (%)	RSD^c (%)
Hg SRM1	0.036 ± 0.014	0,0176 ± 0.001	49	7.69
Hg SRM2	39.8 ± 8	37.8 ± 0.16	95	0.42

^a Střední hodnota ± 2 SD (n = 3).

^b návratnost R (%) vyjádřená jako (poměr naměřené hodnoty ku certifikované) × 100.

^c Relativní směrodatná odchylka (%) ze tří nezávislých stanovení.

^d Indikovaná hodnota.

4.3 Detekční limity a meze stavitelnosti

V Tabulce 13 jsou uvedeny hodnoty detekčních limitů (LOD) a mezí stanovitelnosti (LOQ) pro jednotlivé analyty, které byly vypočítány dle doporučení komise IUPAC na základě opakované analýzy (n = 10) slepého vzorku.

Tabulka 13 Hodnoty LOD a LOQ u vybraných prvků pro metody oa-TOF-ICP-MS FAAS a termooxidační metodu.

ICP-oa-TOF-MS				
Analyt	LOD ^a [μg L ⁻¹]	LOQ ^a [μg L ⁻¹]	LOD ^b [μg L ⁻¹]	LOQ ^b [μg L ⁻¹]
⁷ Li ⁺	0,019	0,063	0,95	3,2
⁵² Cr ⁺	0,17	0,567	8,5	28
⁵⁵ Mn ⁺	0,017	0,057	0,85	2,83
⁵⁹ Co ⁺	0,0099	0,033	0,50	1,65
⁷⁵ As ⁺	0,045	0,15	2,25	7,5
⁷⁷ Se ⁺	0,83	2,77	41,5	138
⁸⁸ Sr ⁺	0,0046	0,02	0,23	0,77
⁹⁶ Mo ⁺	0,0098	0,03	0,49	1,63
¹¹⁴ Cd ⁺	0,0065	0,02	0,33	1,08
¹²⁰ Sn ⁺	0,0072	0,024	0,36	1,2
¹²³ Sb ⁺	0,0022	0,0073	0,11	0,37
¹²⁶ Te ⁺	0,019	0,0633	0,95	3,17
¹³³ Cs ⁺	0,00079	0,0026	0,040	0,13
²⁰⁵ Tl ⁺	0,00061	0,0020	0,031	0,10
²⁰⁸ Pb ⁺	0,00066	0,0022	0,033	0,11
Termooxidační metoda				
Analyt	LOD ^a [μg L ⁻¹]	LOQ ^a [μg L ⁻¹]	LOD ^b [μg L ⁻¹]	LOQ ^b [μg L ⁻¹]
Hg	0,0003	0,001	-	-
FAAS/FAES				
Analyt	LOD ^a [μg L ⁻¹]	LOQ ^a [μg L ⁻¹]	LOD ^b [μg L ⁻¹]	LOQ ^b [μg L ⁻¹]
Mg	0,005	0,017	0,25	0,83
K	0,20	0,67	10	33
Na	0,10	0,33	5	17
Ca	0,25	0,83	13	42
Zn	0,02	0,67	1,0	3,3

4.4 Aplikace jednorozměrné a vícerozměrné analýzy dat

Metodou atomové absorpční spektrometrie a hmotnostní spektrometrie s ionizací v indukčně vázaném plazmatu bylo ve 32 vzorcích mužského ejakulátu kvantifikováno 18 prvků (Mg, Ca, Zn, Na, K, Hg, Li, Mn, Co, As, Mo, Cd, Sb, Cs, Pb, Tl, Se a Sr). Analyzovány byly vzorky ze 2 kategorií (1-fertilní muži, 2-infertilní muži) s cílem posoudit a najít možné souvislosti mezi prvkovým složením ejakulátu a neplodností. Nalezené hodnoty koncentrací prvků jsou uvedeny v Tabulce 14. Za využití nástrojů diskriminační analýzy bylo cílem nalézt vhodné diskriminující proměnné a ověřit, zda je s jejich pomocí vzorky možné klasifikovat do příslušných tříd.

4.4.1 Exploratorní analýza

Souhrnné statistické charakteristiky analyzovaných dat jsou pro jednotlivé proměnné uvedeny v Tabulce 15. Základním předpokladem diskriminační analýzy je platnost vícerozměrné normality, tj. pro jednotlivé znaky normální rozdělení v rámci jednotlivých tříd. Na typ rozdělení lze v rámci základních charakteristik usoudit na základě srovnání hodnot aritmetického průměru a mediánu, hodnot šikmosti a špičatosti. Popisné statistiky diskriminátorů v rámci jednotlivých tříd dokumentuje Tabulka 16. Kategorizované rankitové Q - Q grafy použité k ověření normality vybraných znaků nejsou zde uváděny. V Tabulce 17 jsou uvedeny dále i hodnoty směrodatných odchylek, které umožňují posoudit podobnost kovariančních matic jednotlivých tříd, která je dalším předpokladem použití diskriminační analýzy. Na významnost jednotlivých diskriminátorů lze usoudit na základě rozdílů průměru dosažených v rámci jednotlivých tříd. Větší rozdíly byly pozorovány např. pro K, As, Cd, Se a Sr.

Tabulka 17 obsahuje hodnoty korelací a kovariancí vytvořené z jednotlivých kategorií, jsou-li ignorovány smíšené proměnné jejich diskriminátorů. Korelace jsou v dolní levé části, kovariance v pravé horní části matice. Z Tabulky 18 je patrné, že se v datech vyskytuje celá řada statisticky významných korelací. Významná korelace byla pozorována např. mezi koncentrací Ca, Zn, Na, která koreluje se sníženou kvalitou spermií a spermatogenezí. V korelační matici jsou záměrně i další sledované znaky – nošení mobilního telefonu v kapse kalhot a kouření, nicméně pro další analýzy je pouze diskutována plodnost a tyto znaky již ne. V grafické podobě je korelační matice uvedena na Obrázku 9. Pro jednotlivé proměnné dané koncentrací sledovaných prvků je krabicový graf uveden na Obrázku 10. Krabicový graf na Obrázku 14 pak dokumentuje hodnoty mediánu, minima, maxima, prvního a třetího kvartilu,

odlehých hodnot a extrémů pro jednotlivé diskriminátory v daných skupinách. Grafické diagnostiky jsou uvedeny již pro proměnné, které byly, jak bude diskutováno dále v textu, zvoleny za využití diskriminační analýzy jako nejvhodnější pro klasifikaci objektů. Z ikonových grafů uvedených na Obrázku 11 nebo 12 je možné v datech obtížně rozlišit několik skupin objektů.

Tabulka 14 Naměřené jednotlivé koncentrace prvků ve vzorcích mužského ejakulátu.

id	g kg ⁻¹					ppb								ppm				
	Mg	Ca	Zn	Na	K	Hg	Li	Mn	Co	As	Mo	Cd	Sb	Cs	Pb	Tl	Se	Sr
1	0,154	0,279	0,186	1,788	0,978	0,329	3,699	7,476	1,909	5,97	6,866	0,137	0,936	2,308	2,325	0,817	0,083	0,203
2	0,149	0,322	0,199	1,739	1,119	0,343	7,542	12,96	2,665	5,983	7,718	0,917	0,944	3,989	3,777	0,726	0,115	0,148
3	0,093	0,195	0,149	1,266	1,011	0,333	2,289	0,79	2,022	1,567	6,792	1,063	0,275	2,99	3,098	0,655	0,096	0,09
4	0,073	0,196	0,085	1,561	0,878	0,236	2,655	5,52	0,838	2,291	6,179	1,601	0,356	3,267	2,343	0,6	0,103	0,093
5	0,094	0,192	0,159	1,522	0,809	0,496	9,327	9,262	1,331	4,692	6,497	0,788	0,461	2,648	2,221	0,663	0,092	0,127
6	0,089	0,245	0,104	1,911	0,980	0,971	4,006	2,534	1,273	4,677	9,398	1,091	0,222	3,223	3,064	0,777	0,122	0,083
7	0,082	0,246	0,130	1,420	1,102	0,198	3,13	5,477	0,938	3,236	7,472	1,587	0,187	3,023	1,497	0,618	0,102	0,067
8	0,048	0,148	0,044	1,604	0,623	0,407	2,459	3,95	0,749	1,924	6,786	0,84	0,093	2,94	1,12	0,589	0,079	0,057
9	0,118	0,231	0,099	1,350	1,371	0,321	12,14	11,935	1,044	2,607	10,471	2,158	0,27	4,272	0,845	0,671	0,11	0,235
10	0,103	0,202	0,121	1,566	0,849	0,28	12,498	7,78	1,486	0,426	6,956	4,738	0,163	3,691	1,742	0,756	0,113	0,104
11	0,150	0,271	0,203	1,837	1,019	0,636	24,431	4,792	1,303	0,969	8,108	2,983	0,191	4,729	1,442	0,784	0,157	0,12
12	0,128	0,215	0,189	1,155	1,027	0,29	3,551	4,682	1,376	2,567	9,856	1,773	1,797	3,387	1,018	0,031	0,049	0,047
13	0,067	0,133	0,089	0,996	0,527	0,479	4,09	4,783	0,928	4,958	8,271	0,515	1,088	3,549	0,062	0,108	0,037	0,051
14	0,200	0,245	0,211	1,689	0,845	0,543	4,561	22,375	1,984	6,805	8,746	0,467	1,394	4,659	0,059	0,278	0,139	0,064
15	0,036	0,133	0,037	1,806	0,561	0,222	0,592	3,629	0,533	8,847	10,156	0,521	1,076	3,88	0,068	0,185	0,08	0,057
16	0,122	0,208	0,182	1,847	0,775	0,18	15,239	9,469	1,427	6,04	10,086	1,29	1,051	6,746	0,058	0,175	0,112	0,183
17	0,127	0,239	0,149	1,762	0,959	0,381	2,733	14,062	2,063	4,737	9,238	0,939	1,048	4,23	0,061	0,204	0,092	0,16
18	0,068	0,196	0,083	1,633	0,808	0,202	0,587	3,701	1,165	12,76	8,729	0,161	0,792	4,219	0,053	0,257	0,085	0,05
19	0,128	0,293	0,163	1,479	1,020	0,192	8,054	4,765	2,142	6,547	9,604	1,131	1,035	4,198	0,066	0,307	0,088	0,06
20	0,041	0,128	0,035	0,880	0,576	0,354	2,713	4,954	0,686	2,992	10,739	6,759	1,291	3,849	0,077	0,065	0,072	0,072
21	0,119	0,271	0,161	1,722	1,023	0,215	3,908	9,39	1,559	4,305	9,632	3,536	0,85	5,389	0,061	0,166	0,112	0,107
22	0,057	0,154	0,047	1,560	0,735	0,138	0,645	3,756	1,036	9,301	7,489	2,357	0,709	4,275	0,053	0,125	0,099	0,079
23	0,092	0,199	0,111	1,544	0,783	0,833	4,178	4,498	1,196	4,621	9,473	4,701	0,87	3,547	0,065	0,172	0,081	0,18
24	0,066	0,176	0,084	1,605	0,796	0,202	8,4	4,826	1	2,585	9,032	1,561	1,201	4,136	0,065	0,121	0,069	0,121

Tabulka 14 Pokračování.

25	0,088	0,232	0,086	1,631	0,858	0,205	2,553	7,735	1,685	6,205	7,721	2,073	0,691	4	0,05	0,237	0,086	0,079
26	0,070	0,267	0,044	1,546	6,770	0,413	4,758	10,648	1,075	7,909	9,501	6,328	0,979	3,46	0,064	0,079	0,099	0,058
27	0,141	0,264	0,220	1,869	1,425	0,262	1,84	10,243	2,058	6,15	8,16	0,314	0,774	7,095	0,054	1,622	0,119	0,138
28	0,158	0,346	0,220	1,334	1,451	0,37	3,487	8,663	2,526	3,929	9,527	2,714	1,023	6,019	0,067	0,219	0,127	0,115
29	0,074	0,201	0,088	1,552	0,639	0,171	1,055	3,969	1,192	6,025	10,253	0,853	0,888	4,228	0,064	0,226	0,097	0,088
30	0,111	0,250	0,142	1,604	0,882	0,141	5,078	6,249	1,503	5,215	9,313	1,15	1,037	6,49	0,065	0,119	0,094	0,113
31	0,140	0,264	0,244	1,810	1,011	0,228	5,965	12,858	1,646	6,742	9,775	2,633	0,894	4,998	0,066	0,217	0,204	0,099
32	0,076	0,242	0,108	1,765	0,754	0,129	2,539	6,218	1,43	6,983	7,835	1,381	0,75	3,678	0,052	0,34	0,09	0,071

Tabulka 15 Statistické charakteristiky pro jednotlivé analyty - Mg, Ca, Zn, Na, K, Hg, Li, Mn, Co, As, Mo, Cd, Sb, Cs, Pb, Tl, Se a Sr.

Analyt	Průměr	Spodní mez	Horní mez	Průměr ^a	Spodní IS ^a	Horní IS ^a	Rozptyl	Sm. odchylka	g^1	g^2	P^b	Medián	IS spodní	IS horní	OB
Mg	0,102	0,088	0,116	-	-	-	0,002	0,04	0,367	2,595	$6,5 \cdot 10^{-16}$	0,094	0,066	0,121	0
Ca	0,224	0,205	0,244	-	-	-	0,003	0,05	0,037	2,663	$9,4 \cdot 10^{-22}$	0,231	0,203	0,260	0
Zn	0,130	0,109	0,152	-	-	-	0,004	0,06	0,089	1,928	$1,0 \cdot 10^{-13}$	0,123	0,086	0,165	0
Na	1,574	1,485	1,662	-	-	-	0,060	0,25	-1,093	3,930	$3,2 \cdot 10^{-27}$	1,604	1,503	1,705	0
K	1,092	0,710	1,475	0,870	0,788	0,977	1,125	1,06	5,002	27,34	$1,0 \cdot 10^{-6}$	0,88	0,764	0,996	1
Hg	0,334	0,264	0,404	0,276	0,237	0,328	0,038	0,19	1,689	5,759	$2,9 \cdot 10^{-11}$	0,285	0,199	0,371	2
Li	5,334	3,536	7,133	-	-	-	24,893	4,989	2,142	8,076	$5,4 \cdot 10^{-7}$	3,804	2,543	5,064	2
Mn	7,311	5,761	8,861	-	-	-	18,485	4,299	1,457	5,815	$4,0 \cdot 10^{-11}$	5,869	3,529	8,209	1
Co	1,430	1,241	1,620	-	-	-	0,276	0,526	0,536	2,675	$2,3 \cdot 10^{-16}$	1,354	1,056	1,651	0
As	5,018	4,071	5,964	-	-	-	6,899	2,627	0,613	3,776	$2,4 \cdot 10^{-12}$	4,848	3,331	6,364	0
Mo	8,637	8,168	9,105	-	-	-	1,690	1,300	-0,278	1,862	$9,9 \cdot 10^{-28}$	8,889	7,949	9,829	0
Cd	1,908	1,301	2,515	-	-	-	2,832	1,683	1,512	4,627	$1,9 \cdot 10^{-7}$	1,336	0,670	1,981	2
Sb	0,792	0,645	0,939	-	-	-	0,167	0,408	-0,022	2,682	$1,7 \cdot 10^{-12}$	0,879	0,701	1,058	0
Cs	4,160	3,745	4,575	-	-	-	1,325	1,151	1,003	3,575	$7,5 \cdot 10^{-20}$	3,995	3,617	4,372	3
Pb	0,804	0,400	1,207	0,510	-	-	1,253	1,119	1,243	3,271	$1,5 \cdot 10^{-4}$	0,066	-0,484	0,616	0
Tl	0,403	0,281	0,526	-	-	-	0,116	0,341	1,522	5,937	$8,6 \cdot 10^{-8}$	0,247	0,017	0,477	0
Se	0,100	0,089	0,111	-	-	-	0,001	0,030	1,093	6,068	$1,1 \cdot 10^{-18}$	0,097	0,083	0,110	2
Sr	0,104	0,086	0,121	-	-	-	0,002	0,048	1,016	3,366	$1,1 \cdot 10^{-13}$	0,092	0,066	0,117	0

^a Odhad parametru, který byl získaný exponenciální transformací dat

^b Kombinovaný test normality – Pokud je hodnota $p > 0,05$, jedná se o normální rozdělení; pokud $p < 0,05$, nejedná se normální rozložení dat

zkratky: **IS** interval spolehlivosti; **SMODCH** směrodatná odchylka; g^1 šikmost; g^2 špičatost; **p** pravděpodobnost; **Me** medián; **OB** odlehlé body

Tabulka 16 Průměry a směrodatné odchylky pro jednotlivé analyty v třídách.

Průměr	Mg	Ca	Zn	Na	K	Hg	Li	Mn	Co	As	Mo	Cd	Sb	Cs	Pb	Tl	Se	Sr	N
Sk. 1	0,093	0,203	0,124	1,567	0,821	0,354	5,430	6,858	1,332	4,998	8,591	1,624	0,902	4,265	0,830	0,447	0,086	0,121	12
Sk. 2	0,107	0,238	0,134	1,577	1,256	0,323	5,277	7,583	1,489	5,029	8,664	2,078	0,726	4,097	0,788	0,377	0,109	0,093	20
všechny	0,102	0,224	0,130	1,574	1,093	0,334	5,334	7,311	1,430	5,018	8,637	1,908	0,792	4,160	0,8004	0,403	0,100	0,104	32
Sm.odchylka	Mg	Ca	Zn	Na	K	Hg	Li	Mn	Co	As	Mo	Cd	Sb	Cs	Pb	Tl	Se	Sr	N
Sk. 1	0,042	0,064	0,066	0,318	0,259	0,189	4,086	2,993	0,630	1,876	1,429	2,001	0,332	0,798	1,056	0,252	0,032	0,03	12
Sk. 2	0,037	0,042	0,058	0,201	1,312	0,201	5,562	4,977	0,460	3,036	1,254	1,485	0,442	0,798	1,056	0,252	0,032	0,040	20
všechny	0,039	0,053	0,060	0,246	1,061	0,194	4,989	4,299	0,526	2,627	1,299	1,683	0,408	1,151	1,119	0,341	0,030	0,048	32

Tabulka 17 Celková kovariance a korelace.

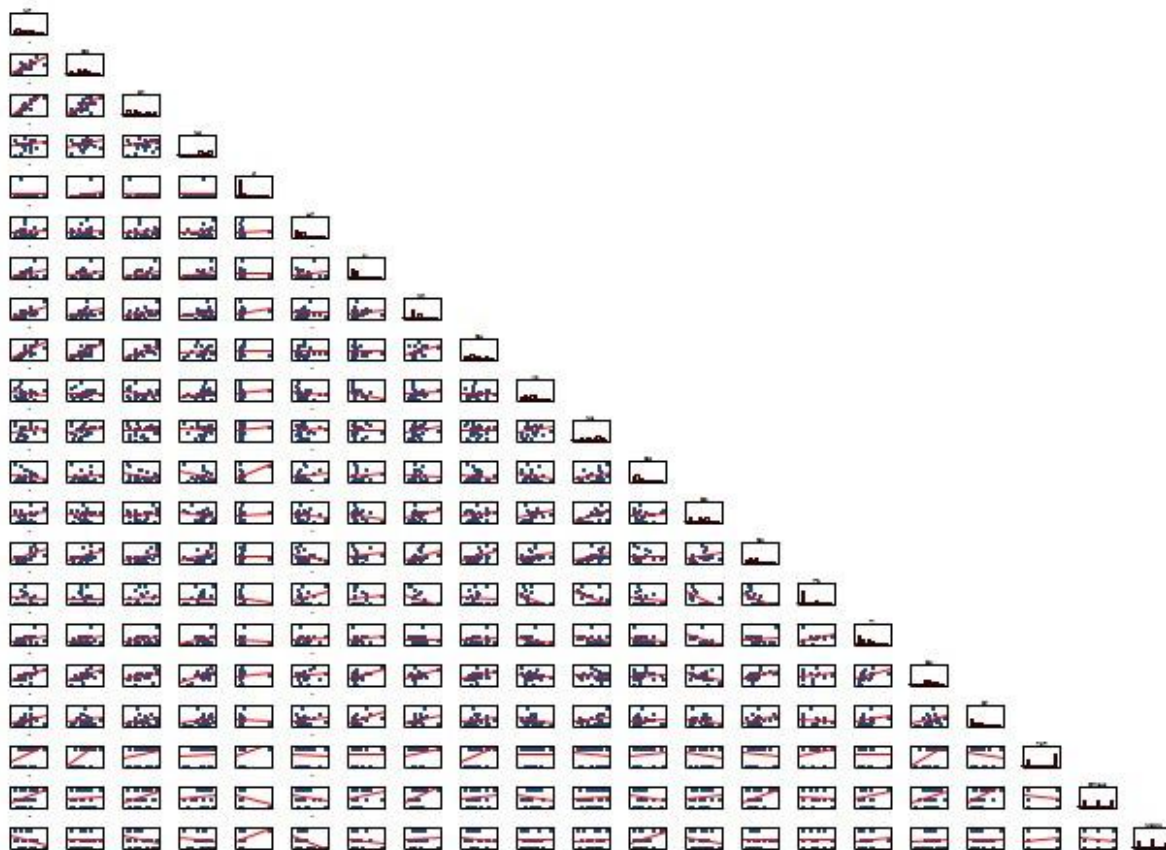
	Mg	Ca	Zn	Na	K	Hg	Li	Mn	Co	As	Mo	Cd	Sb	Cs	Pb	Tl	Se	Sr
Mg		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,10	0,10	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00
Ca	0,00		0,00	0,00	0,01	0,00	0,10	0,10	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02	0,00	0,01	0,00	0,00
Zn	0,00	0,00		0,00	-0,01	0,00	0,10	0,10	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,03	0,00	0,01	0,00	0,00
Na	0,00	0,00	0,00		0,00	0,00	0,20	0,30	0,03	0,20	-0,04	-0,10	-0,02	0,08	0,00	-0,02	0,00	0,00
K	0,00	0,01	-0,01	0,00		0,02	0,10	0,90	-0,01	0,40	0,17	0,80	0,04	-0,02	-0,10	0,01	0,00	0,00
Hg	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02		0,20	0,00	0,00	-0,10	0,00	0,10	-0,02	-0,07	0,10	0,34	0,06	0,10
Li	0,07	0,06	0,11	0,23	0,12	0,20		3,40	0,17	-5,60	0,15	1,50	-0,53	1,12	1,00	0,09	0,06	0,07
Mn	0,11	0,10	0,13	0,29	0,90	0,02	3,40		1,05	1,40	0,65	-0,20	0,52	1,64	-0,70	0,05	0,00	0,01
Co	0,02	0,02	0,02	0,03	-0,01	0,00	0,20	1,00		0,10	-0,07	-0,20	0,05	0,21	0,10	-0,23	0,00	-0,03
As	0,01	0,00	-0,02	0,21	0,44	-0,13	-5,60	1,40	0,06		0,72	-1,20	0,39	0,54	-1,20	-0,23	0,00	0,00
Mo	0,00	0,00	0,00	-0,04	0,17	0,00	0,10	0,70	-0,07	0,70		0,60	0,31	0,67	-0,80	-0,16	0,00	0,00
Cd	0,01	-0,01	-0,03	-0,14	0,79	0,06	1,50	-0,20	-0,23	-1,20	0,62		0,03	-0,03	-0,40	-0,16	0,00	0,00
Sb	0,00	0,00	0,00	-0,02	0,04	-0,02	-0,50	0,50	0,05	0,40	0,31	0,00		0,12	-0,20	0,00	0,00	0,01
Cs	0,02	0,02	0,03	0,08	-0,02	-0,07	1,10	1,60	0,21	0,50	0,67	0,00	0,12		-0,70	0,22	0,02	0,01
Pb	0,01	0,01	0,01	0,02	-0,08	0,07	1,00	-0,70	0,12	-1,20	-0,85	-0,40	-0,24	-0,67		0,12	0,00	0,00
Tl	0,00	0,01	0,01	0,03	-0,02	0,01	0,30	0,10	0,05	-0,20	-0,23	-0,20	-0,09	0,00	0,20		0,00	0,00
Se	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,10	0,10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02	0,00	0,00		0,00
Sr	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,10	0,10	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	

Tabulka 18 Vnitřní korelace – tučně označená korelace je významná.

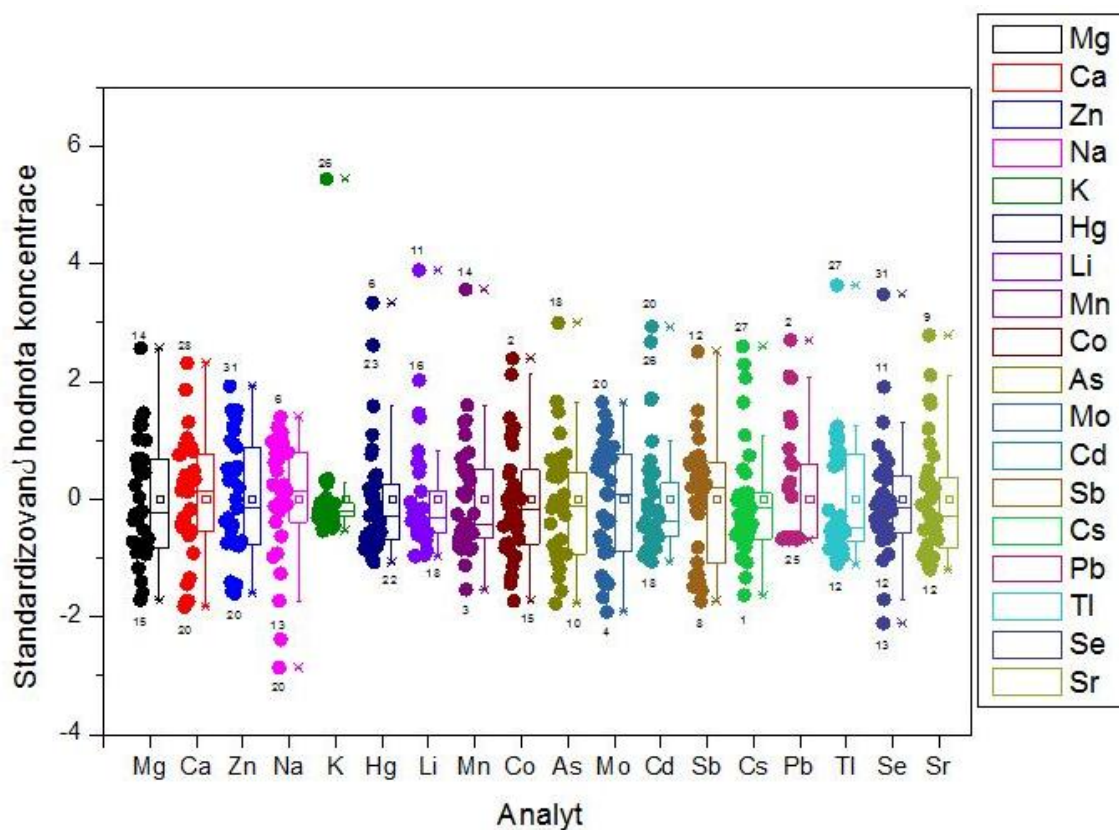
Pro	Ø	Sd	Mg	Ca	Zn	Na	K	Hg	Li	Mn	Co	As	Mo	Cd	Sb	Cs	Pb	Tl	Se	Sr	Fer	Smo	Mob
Mg	0,10	0,04		0,74	0,91	0,24	-0,02	0,17	0,38	0,65	0,78	-0,15	0,14	-0,17	0,18	0,53	-0,07	0,23	0,60	0,32	0,37	0,33	-0,23
Ca	0,22	0,05	0,74		0,68	0,29	0,36	0,09	0,23	0,38	0,73	-0,04	0,16	0,05	-0,03	0,44	-0,03	0,22	0,62	0,20	0,57	0,06	0,04
Zn	0,12	0,06	0,91	0,68		0,20	-0,14	0,10	0,36	0,41	0,77	-0,21	0,02	-0,27	0,14	0,54	0,06	0,33	0,50	0,28	0,21	0,38	-0,32
Na	1,54	0,26	0,24	0,29	0,20		0,03	0,12	0,21	0,22	0,15	0,27	-0,08	-0,31	-0,26	0,36	0,01	0,35	0,58	0,23	0,07	0,11	-0,13
K	1,14	1,17	-0,02	0,36	-0,14	0,03		0,04	0,00	0,21	0,01	0,18	0,15	0,46	0,06	-0,03	-0,11	-0,08	0,12	-0,09	0,24	-0,19	0,32
Hg	0,36	0,20	0,17	0,09	0,10	0,12	0,04		0,17	0,01	0,00	-0,20	0,07	0,12	-0,17	-0,26	0,34	0,15	0,21	0,13	-0,08	-0,15	-0,44
Li	5,57	5,43	0,38	0,23	0,36	0,21	0,00	0,17		0,11	0,03	-0,41	0,04	0,15	-0,25	0,20	0,15	0,19	0,45	0,45	0,02	0,17	-0,11
Mn	7,09	4,45	0,65	0,38	0,41	0,22	0,21	0,01	0,11		0,40	0,10	0,17	-0,03	0,27	0,38	-0,34	0,01	0,41	0,30	0,15	0,41	0,05
Co	1,36	0,51	0,78	0,73	0,77	0,15	0,01	0,00	0,03	0,40		-0,01	0,01	-0,18	0,15	0,48	-0,07	0,19	0,40	0,18	0,38	0,15	-0,11
As	4,76	2,85	-0,15	-0,04	-0,21	0,27	0,18	-0,20	-0,41	0,10	-0,01		0,24	-0,24	0,34	0,21	-0,52	-0,28	-0,09	-0,26	0,00	-0,15	0,04
Mo	8,64	1,32	0,14	0,16	0,02	-0,08	0,15	0,07	0,04	0,17	0,01	0,24		0,27	0,61	0,37	-0,55	-0,44	-0,09	0,21	-0,09	0,09	0,06
Cd	2,08	1,79	-0,17	0,05	-0,27	-0,31	0,46	0,12	0,15	-0,03	-0,18	-0,24	0,27		0,05	-0,08	-0,14	-0,27	0,05	0,07	0,06	-0,20	0,34
Sb	0,76	0,45	0,18	-0,03	0,14	-0,26	0,06	-0,17	-0,25	0,27	0,15	0,34	0,61	0,05		0,28	-0,66	-0,63	-0,41	-0,19	-0,19	0,13	-0,21
Cs	4,13	1,12	0,53	0,44	0,54	0,36	-0,03	-0,26	0,20	0,38	0,48	0,21	0,37	-0,08	0,28		-0,52	0,17	0,44	0,39	-0,09	0,32	0,05
Pb	0,75	1,01	-0,07	-0,03	0,06	0,01	-0,11	0,34	0,15	-0,34	-0,07	-0,52	-0,55	-0,14	-0,66	-0,52		0,49	0,21	-0,03	0,24	-0,05	-0,04
Tl	0,40	0,36	0,23	0,22	0,33	0,35	-0,08	0,15	0,19	0,01	0,19	-0,28	-0,44	-0,27	-0,63	0,17	0,49		0,48	0,25	-0,02	0,19	0,08
Se	0,10	0,03	0,60	0,62	0,50	0,58	0,12	0,21	0,45	0,61	0,40	-0,09	-0,09	0,05	-0,41	0,44	0,21	0,48		0,32	0,42	0,26	0,06
Sr	0,10	0,05	0,32	0,20	0,28	0,23	-0,09	0,13	0,45	0,30	0,18	-0,26	0,21	0,07	-0,19	0,39	-0,03	0,25	0,32		-0,15	0,51	0,04
Fer	0,31	0,97	0,37	0,57	0,21	0,07	0,24	-0,08	0,02	0,15	0,38	0,00	-0,09	0,06	-0,19	-0,09	0,24	-0,02	0,42	-0,15		-0,23	0,21
Smo	0,08	0,84	0,33	0,06	0,38	0,11	-0,19	-0,15	0,17	0,41	0,15	-0,15	0,09	-0,20	0,13	0,32	-0,05	0,19	0,26	0,51	-0,23		-0,11
Mob	-0,12	0,77	-0,23	0,04	-0,32	-0,13	0,32	-0,44	-0,11	0,05	-0,11	0,04	0,06	0,34	-0,21	0,05	-0,04	0,08	0,06	0,04	0,21	-0,11	

Označené korelace jsou významné na hladině $p < 0.05$, $N = 26$ (Celé případy vynechány u ChD)

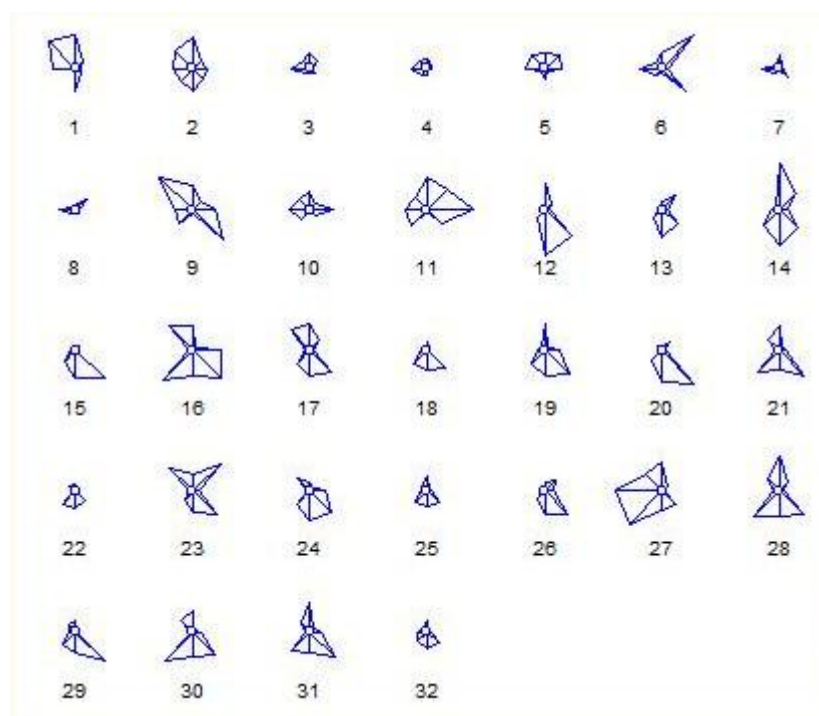
Zkratky: **Pro** proměnná; **Fer** fertilní; **Mob** mobilní telefon; **Smo** kuřáci; **Ø** aritmetický průměr; **Sd** směrodatná odchylka



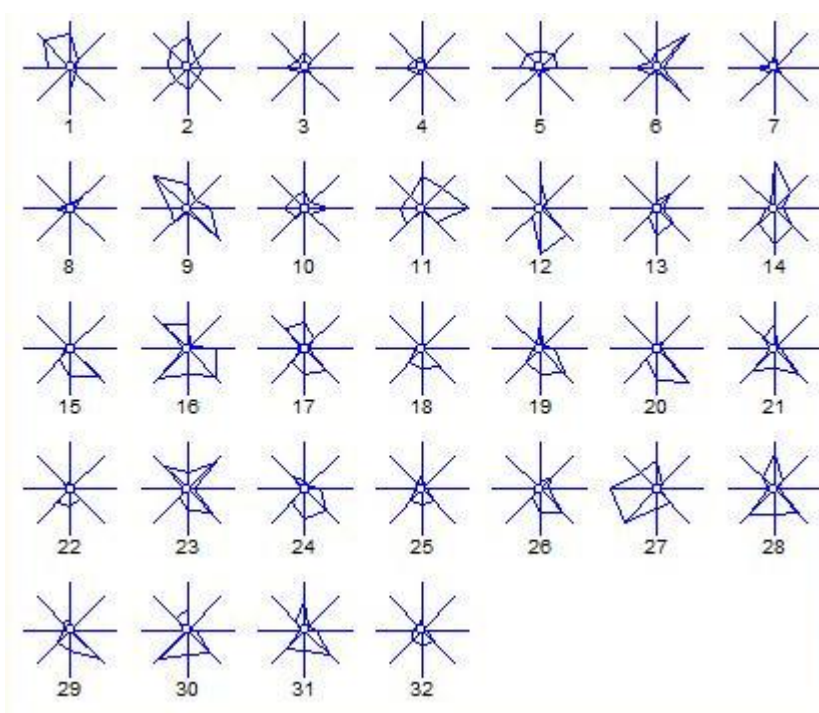
Obrázek 9 Grafické znázornění korelace



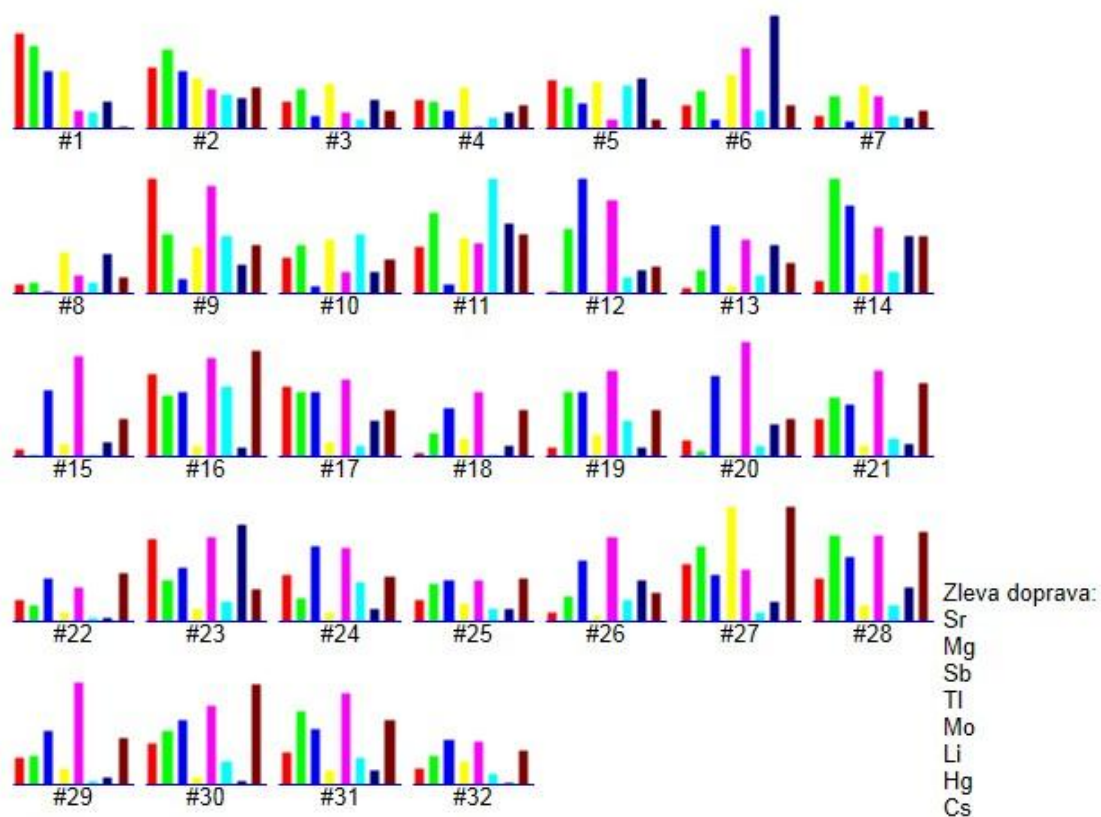
Obrázek 10 Krabicové grafy s označenými odlehlými body u jednotlivých analytů.



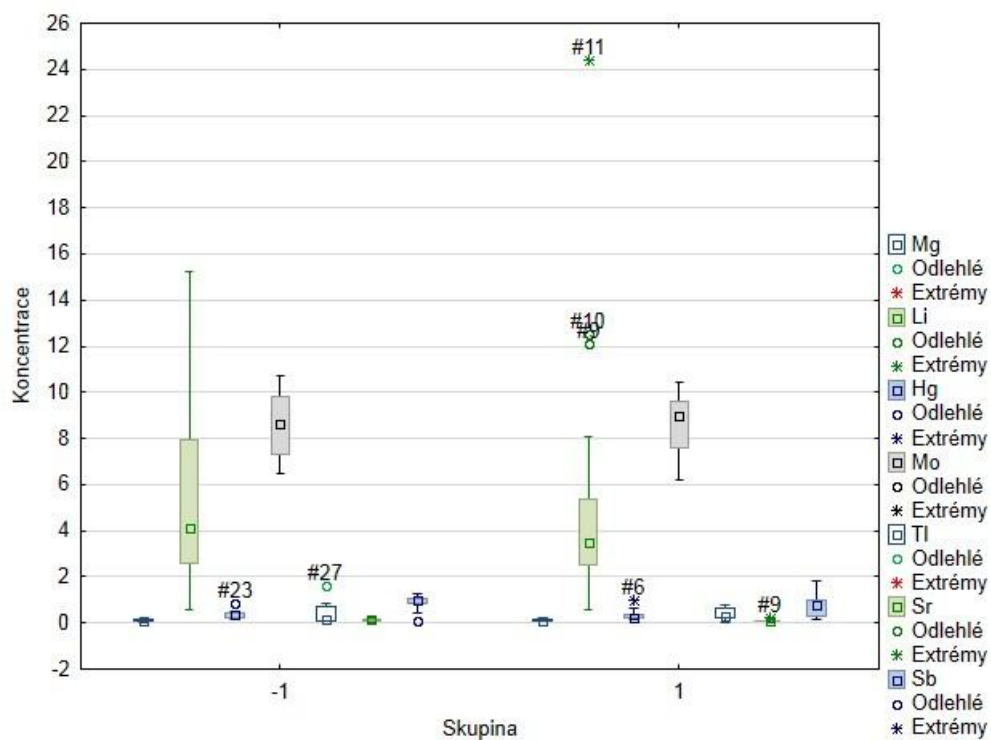
Obrázek 11 Ikonové grafy - Hvězdičky.



Obrázek 12 Ikonové grafy - Sluníčka.



Obrázek 13 Ikonové grafy – Sloupce pro 8 proměnných u všech pacientů.



Obrázek 14 Krabicový graf pro vybrané analyty v rámci sledovaných tříd.

4.4.2 Diskriminační analýza

A - Výběr diskriminátorů

V rámci diskriminační analýzy byla užitá kroková analýza dopředná. V několika krocích byly nalezeny znaky s dostatečnou diskriminační silou. Vyřazení znaků, které nebyly pro klasifikační analýzu významné, bylo provedeno s využitím několika kritérií: Wilkova kritéria λ , které nabývá hodnot od 0 do 1 značící výbornou, resp. nevýznamnou diskriminační sílu; kritéria F, kdy nejlepší znaky dosahují nejvyšších hodnot F; kritéria síly testu, které dokumentuje vypočtená hladina významnosti. Dalším kritériem je tolerance $1-R^2$, která je mírou redundance, tj. nadbytečnosti znaku. Nejlepší znaky pro klasifikaci dosahují nejvyšších hodnot tolerancí. Výsledky diskriminační funkční analýzy po provedení jednotlivých kroků s postupným vypouštěním znaků určily jako nejlepší znaky pro klasifikaci: Sr, Mg, Sb, Tl, Mo, Li, Hg a Cs.

B - Vyčíslení klasifikační funkce

Odhady parametrů klasifikační funkce pro zařazování objektů do jednotlivých tříd jsou uvedeny v Tabulce 19. Uvedeny jsou tedy celkem 2 diskriminační funkce, pro každou třídu jedna. Veličina p je apriorní pravděpodobnost, s jakou bude objekt zařazen do dané třídy.

Tabulka 19 Odhady parametrů klasifikační funkce pro jednotlivé třídy.

Proměnná	Skupina 1 $p = 0,0375$	Skupina 2 $p = 0,625$
Sr	10,3839	-42,9525
Mg	-15,7603	110,5554
Sb	4,2723	-8,9332
Tl	19,5744	12,9416
Mo	6,8041	8,9255
Li	-0,0129	-0,2373
Hg	3,8436	-5,1528
Cs	-0,2660	-1,7895
Absolutní člen	-36,4780	-37,1240

C - Klasifikační matice

Tabulka 20 znázorňuje klasifikační matici zařazení jednotlivých objektů do tříd. U testovacího souboru bylo dosaženo dobré klasifikace, z celkového počtu 32 vzorků, byly chybně zařazeny pouze dva objekty.

Tabulka 20 Zařazení jednotlivých objektů do tříd.

	Klasifikační matice - Řádky: pozorované klasifikace; Sloupce: předpovězené klasifikace		
	% správných	Skupina 1 p = 0,375	Skupina 2 p = 0,625
Skupina 1	83,33	10	2
Skupina 2	100,00	0	20
Celkem	93,75	10	22

D - Zařazení objektů do tříd

V Tabulce 21 jsou uvedeny výsledky klasifikace objektů. První sloupec uvádí skutečnou třídu, druhý pak první možnost klasifikace a poslední sloupec pak další možnost klasifikace. Z hodnot uvedených v tabulce je zřejmé, že s výjimkou dvou objektů testovacího souboru byly jednotlivé objekty správně zařazeny do příslušných tříd. Úspěšnost zařazení objektů do výše uvedených tříd byla tedy 93,75 %.

Hodnoty vypočtených aposteriorních pravděpodobností zařazení každého z objektů do každé z tříd jsou uvedeny v Tabulce 22. Nejvyšší hodnota pravděpodobnosti značí příslušnost objektu do dané třídy. I v daném případě byly s výjimkou dvou objektů všechny ostatní objekty klasifikovány správně.

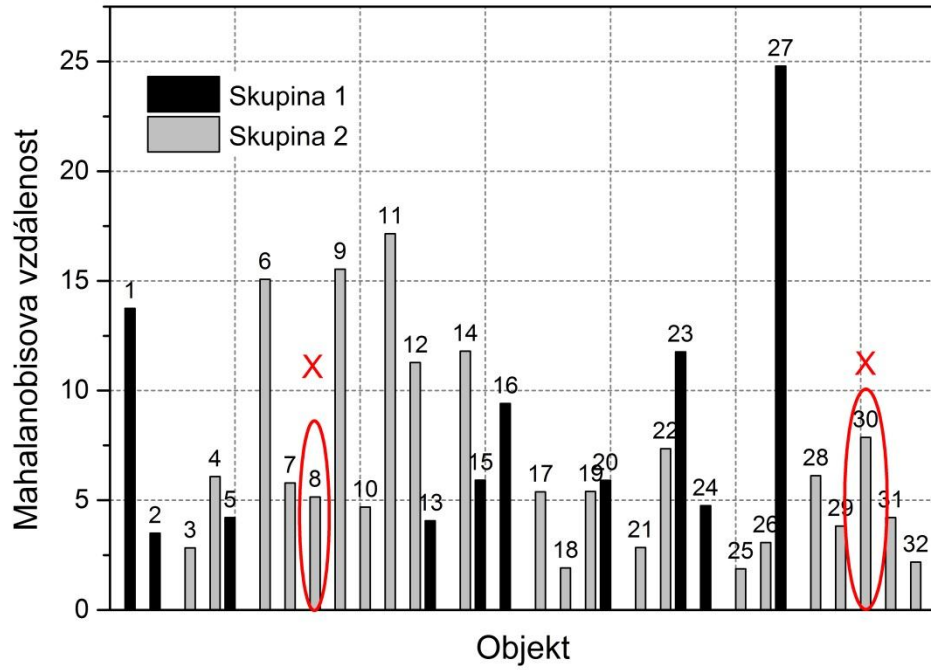
Tabulka 21 Klasifikace případů.

Případ	Klasifikace případů - nesprávná klasifikace je označena *		
	Pozorova klasif.	1 p = 0,375	2 p = 0,625
1	SKUPINA 1	SKUPINA 1	SKUPINA 2
2	SKUPINA 1	SKUPINA 1	SKUPINA 2
3	SKUPINA 2	SKUPINA 2	SKUPINA 1
4	SKUPINA 2	SKUPINA 2	SKUPINA 1
5	SKUPINA 1	SKUPINA 1	SKUPINA 2
6	SKUPINA 2	SKUPINA 2	SKUPINA 1
7	SKUPINA 2	SKUPINA 2	SKUPINA 1
*8	SKUPINA 1	SKUPINA 2	SKUPINA 1
9	SKUPINA 2	SKUPINA 2	SKUPINA 1
10	SKUPINA 2	SKUPINA 2	SKUPINA 1
11	SKUPINA 2	SKUPINA 2	SKUPINA 1
12	SKUPINA 2	SKUPINA 2	SKUPINA 1
13	SKUPINA 1	SKUPINA 1	SKUPINA 2
14	SKUPINA 2	SKUPINA 2	SKUPINA 1
15	SKUPINA 1	SKUPINA 1	SKUPINA 2
16	SKUPINA 1	SKUPINA 1	SKUPINA 2
17	SKUPINA 2	SKUPINA 2	SKUPINA 1
18	SKUPINA 2	SKUPINA 2	SKUPINA 1
19	SKUPINA 2	SKUPINA 2	SKUPINA 1
20	SKUPINA 1	SKUPINA 1	SKUPINA 2
21	SKUPINA 2	SKUPINA 2	SKUPINA 1
22	SKUPINA 2	SKUPINA 2	SKUPINA 1
23	SKUPINA 1	SKUPINA 1	SKUPINA 2
24	SKUPINA 1	SKUPINA 1	SKUPINA 2
25	SKUPINA 2	SKUPINA 2	SKUPINA 1
26	SKUPINA 2	SKUPINA 2	SKUPINA 1
27	SKUPINA 1	SKUPINA 1	SKUPINA 2
28	SKUPINA 2	SKUPINA 2	SKUPINA 1
29	SKUPINA 2	SKUPINA 2	SKUPINA 1
*30	SKUPINA 1	SKUPINA 2	SKUPINA 1
31	SKUPINA 2	SKUPINA 2	SKUPINA 1
32	SKUPINA 2	SKUPINA 2	SKUPINA 1

Tabulka 22 Vypočtené Aposteriorní pravděpodobnosti a zařazení objektů do jednotlivých tříd.

Případ	Aposteriorní pravděpodobnosti - nesprávná klasifikace je označena *		
	Pozorova klasif.	1 p = 0,375	2 p = 0,625
1	SKUPINA 1	0,926885	0,073115
2	SKUPINA 1	0,814784	0,185216
3	SKUPINA 2	0,009288	0,990712
4	SKUPINA 2	0,414211	0,585789
5	SKUPINA 1	0,944633	0,055367
6	SKUPINA 2	0,029970	0,970030
7	SKUPINA 2	0,00240	0,999760
*8	SKUPINA 1	0,049912	0,950088
9	SKUPINA 2	0,021805	0,978195
10	SKUPINA 2	0,030417	0,969583
11	SKUPINA 2	0,048670	0,951330
12	SKUPINA 2	0,194148	0,805852
13	SKUPINA 1	0,955802	0,044198
14	SKUPINA 2	0,001502	0,998498
15	SKUPINA 1	0,744686	0,255314
16	SKUPINA 1	0,981180	0,018820
17	SKUPINA 2	0,313691	0,686309
18	SKUPINA 2	0,037145	0,962855
19	SKUPINA 2	0,000855	0,999145
20	SKUPINA 1	0,974949	0,025051
21	SKUPINA 2	0,003123	0,996877
22	SKUPINA 2	0,465737	0,534263
23	SKUPINA 1	0,993264	0,006736
24	SKUPINA 1	0,998105	0,001895
25	SKUPINA 2	0,031452	0,968575
26	SKUPINA 2	0,147750	0,852250
27	SKUPINA 1	0,999415	0,000585
28	SKUPINA 2	0,005783	0,994217
29	SKUPINA 2	0,013159	0,986841
*30	SKUPINA 1	0,418986	0,581014
31	SKUPINA 2	0,000262	0,999738
32	SKUPINA 2	0,091446	0,908554

Další možností klasifikace na základě hodnot Mahalanobisových vzdáleností (míra vzdálenosti ve vícerozměrném prostoru) je v grafické formě znázorněna na obrázku 15. V grafu jsou uvedeny hodnoty odpovídající finálnímu zařazení do příslušných kategorií.



Obrázek 15 Finální zařazení do příslušných kategorií (fertilní x infertilní).

5 Závěr

Cílem této diplomové práce bylo stanovení multiprvkového profilu mužského ejakulátu metodami TOF-ICP-MS a AAS s cílem nalezení možných souvislostí mezi prvkovým složením a problémy s plodností. Teoretická část práce se zabývá mužskou neplodností (rozdělení, příčiny a vyšetření), vlivu prvků na lidské zdraví a mužskou plodnost a problematice prvkové analýzy mužského ejakulátu (spektrální a nespektrální interference).

Vzorky byly před vlastní analýzou pomocí ICP-MS a FLAAS mineralizovány v mikrovlnné peci. Pro tento účel byla provedena optimalizace podmínek mikrovlnného rozkladu. Zvýšení analytického výkonu bylo dosaženo za využití systému Multi-Tubes, který umožnil rozklad 24 vzorků najednou. Dochází tak nejen k časové úspoře, ale i úspoře energie a použitých činidel. Rozklad mužského ejakulátu (0.5 g) se podařilo realizovat za použití omezeného množství reakčních činidel, konkrétně 1 mL HNO₃ a 1 mL H₂O₂ s přídavkem 3 mL redestilované vody. Použití minimálního množství činidel je zcela v souladu s trendy současné zelené chemie.

Ověření přesnosti metody pro analýzu vybraných prvků bylo provedeno pomocí referenčních materiálů moči SeronormTM Trace Elements Urine (SERO, Norsko). Nalezené hodnoty byly v dobré shodě s hodnotami uvedenými výrobcem.

Analyzováno bylo celkem 32 vzorků, ve kterých bylo stanoveno 18 prvků (Mg, Ca, Zn, Na, K, Hg, Li, Mn, Co, As, Mo, Cd, Sb, Cs, Pb, Tl, Se a Sr). Pomocí nástrojů jednorozměrné a vícerozměrné statistické analýzy došlo ke zpracování výsledků naměřených hodnot prvků.

Pro zjištění odlehlých bodů v datech byly sestrojeny krabicové grafy. Pacienti 5, 24 a 30 nevykazují žádné odlehlé hodnoty, zbylí pacienti vykazují vybočující hodnoty u některých analytů. Nejvíce odlehlých bodů (5) vykazoval pacient číslo 20, konkrétně se jednalo o analyty Ca, Zn, Na, Mo a Cd. V tomto případě se jedná o neplodného muže s diagnózou teratozoospermie. Snížená hladina Ca, Zn, Na koreluje se sníženou kvalitou spermií a spermatogenezí. Ca je důležitý pro dozrávání spermií. Naopak zvýšená hladina Mo negativně ovlivňuje koncentraci a morfologii spermií. Zvýšená hladina Cd by mohla mít spojitost s tím, že pacient je občasný kuřák, též nosí mobilní telefon v přední kapse více jak 3 hodiny denně, což by mohlo mít negativní vliv na spermie. 4 odlehlé hodnoty u analytů Sb, Tl, Se a Sr vykazoval pacient číslo 12. Jedná se o normospermika. Tyto odlehlé hodnoty by mohly mít spojitost s občasným kouřením a bydlením ve městě. Odlehlé hodnoty Mg a Zn byly zjištěny u čtyř pacientů (14, 15, 20, 28). Z toho pacienti 15 a 20 jsou neplodní. U pacienta 15 (oligoastenoteratozoospermik) byla snížená hladina Mg a u pacienta 20 (teratozoospermik)

snížená hladina Zn a Ca. Právě tyto prvky ovlivňují kvalitu spermií, spermatogenezi a jsou nutné pro dozrávání spermií. Snížená hladina Mg a Zn má negativní vliv na mužskou plodnost. Pacienti 15 a 20 jsou oba kuřáci, nosí mobilní telefon v přední kapse kalhot. Pacienti 10 a 18 mají odlehle hodnoty u As, pacienti 18, 20, 26 vybočují u hladiny Cd. Prvky As a Cd negativně ovlivňují kvalitu - motilitu spermií. Kromě pacienta 20, jsou ostatní normospermikové. Vyčnívající hodnota Se je u pacientů 11, 12, 13 a 31, ale pouze pacient 13 je neplodný (oligoteratozoospermik), Se je nutný pro spermatogenezi a vývoj spermií. Zvýšená hladina Se se objevuje u normospermiků a snížená u neplodných mužů. Pacient 13 má sníženou hladinu Se oproti ostatním pacientům. Pacienti 13 a 31 jsou nekuřáci a 11, 12 občasní kuřáci. Kromě pacienta 31 nenosí ostatní mobilní telefon v přední kapse kalhot.

Za použití diskriminační funkční analýzy bylo díky vhodným diskriminujícím proměnným (Sr, Mg, Sb, Tl, Mo, Li, Hg a Cs) možno klasifikovat pacienty do dvou 2 kategorií – fertilní a infertilní muži, které odpovídají rozdělení v praxi. Úspěšnost zařazení objektů do výše uvedených tříd byla 93,75 % - celkového počtu 32 pacientů, bylo správně zařazeno 30. Špatně zařazené objekty byly pacient 8 a 32.

Korelace se objevuje především u Ca, Mg a Zn. Tyto prvky jsou velmi důležité pro správnou tvorbu spermií a spermatogenezi. Pokud jsou jejich hodnoty extrémně vychýlené, může se jednat o neplodné jedince. Další korelace se vyskytují mezi Mg, Zn, Mn a Co. Mn je též potřebný pro správnou funkci spermií, ale pokud se vyskytuje ve vyšší koncentraci, negativně ovlivňuje pohyb spermií. Co ovlivňuje hladinu testosteronu a ovlivňuje funkci Leydigových buněk. V korelaci se často objevuje Se např. s Mg, Ca, Zn, Na, Li, Mn, Co. Se je další z prvků, který je nepostradatelný pro správný vývoj spermií, spermatogenezi a je především důležitým antioxidantem. Mn a Sr poukazují na možnou souvislost s kouřením tabáku.

Pro zjištění více souvislostí by bylo zapotřebí více pacientů (vzorků) a podrobnější dotazník, díky kterému by bylo možné myšlenku této diplomové práce rozšířit. Více vzorků by bylo rovněž zapotřebí pro potřeby cross-validace výsledků diskriminační analýzy.

6 Seznam použité literatury

1. De Kretser, D. and H. Baker, *Infertility in men: recent advances and continuing controversies*. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 1999. **84**(10): p. 3443-3450.
2. Řežábek, K., *Asistovaná reprodukce*. 2 ed. Vol. 3. 2014, Praha: Maxdorf.
3. Sengupta, P., et al., *Decline in sperm count in European men during the past 50 years*. Human & experimental toxicology, 2018. **37**(3): p. 247-255.
4. Sengupta, P., S. Dutta, and E. Krajewska-Kulak, *The disappearing sperms: analysis of reports published between 1980 and 2015*. American journal of men's health, 2017. **11**(4): p. 1279-1304.
5. Sharma, R., et al., *Lifestyle factors and reproductive health: taking control of your fertility*. Reproductive Biology and Endocrinology, 2013. **11**(1): p. 66-81.
6. Oldereid, N., H. Rui, and K. Purvis, *Life styles of men in barren couples and their relationship to sperm quality*. International journal of fertility, 1992. **37**(6): p. 343-349.
7. Hassan, M.A. and S.R. Killick, *Effect of male age on fertility: evidence for the decline in male fertility with increasing age*. Fertility and sterility, 2003. **79**: p. 1520-1527.
8. Ali, S., et al., *Mapping fifteen trace elements in human seminal plasma and sperm DNA*. Biological trace element research, 2017. **175**(2): p. 244-253.
9. Reis, L.O. and F.G.F. Dias, *Male fertility, obesity, and bariatric surgery*. Reproductive sciences, 2012. **19**(8): p. 778-785.
10. Štramová, X., et al., *Effects of smoking on fatty acid composition of phospholipid sperm membrane and the malondialdehyde levels in human seminal plasma*. Andrologia, 2015. **47**(9): p. 967-973.
11. Bundhun, P.K., et al., *Tobacco smoking and semen quality in infertile males: a systematic review and meta-analysis*. BMC public health, 2019. **19**(1): p. 36-47.
12. Ibañez-Perez, J., et al., *An update on the implication of physical activity on semen quality: a systematic review and meta-analysis*. Archives of gynecology and obstetrics, 2019: p. 1-21.
13. Kołłątaj, W., et al., *Male infertility and human environmental pollution*. Journal of Education, Health and Sport, 2017. **7**(4).
14. Bergamo, P., et al., *Human semen as an early, sensitive biomarker of highly polluted living environment in healthy men: A pilot biomonitoring study on trace elements in*

- blood and semen and their relationship with sperm quality and RedOx status.* Reproductive toxicology, 2016. **66**: p. 1-9.
15. Bertrand, G. and R. Vladesco. *Role of zinc in reproduction.* in *Acad. Sci.* 1921.
 16. Abou-Shakra, F.R., N.I. Ward, and D.M. Everard, *The role of trace elements in male infertility.* Fertility and sterility, 1989. **52**(2): p. 307-310.
 17. Aleš, R. and a. kolektiv, *Moderní porodnictví.* Vol. 1. 2008, Praha: Grada Publishing, a.s.
 18. kolektiv, K.O., *Lékařská fyziologie.* Vol. 1. 2011, Praha: Grada Publishing, a.s.
 19. Vokurka, M. and J. Hugo, *Velký lékařský slovník.* Vol. 10. 2015, Praha: Maxdorf.
 20. Dylevský, I., *Funkční anatomie.* Vol. 1. 2009, Praha: Grada Publishing, a.s.
 21. Karel, L., Ž. Aleš, and a. kolektiv, *Chorobné znaky a příznaky: Diferenciální diagnostika.* Vol. 1. 2014, Praha: Grada Publishing, a.s.
 22. kolektiv, W.P., *Sexuologie.* Vol. 1. 2010, Praha: Grada Publishing, a.s.
 23. Skakkebaek, N.E., et al., *Is human fecundity declining?* International journal of andrology, 2006. **29**(1): p. 2-11.
 24. Dylevský, I., *Základy anatomie.* 2006 ed. 2006, PRAHA: TRITON. 241-244.
 25. Trojan Stanislav, S.M., *Atlas 430 biologie člověka + 430 modelových otázek k přijímacím zkouškám na medicínu + 100 obrazových podkladů k opakování a procvičování.* Vol. 2. 2002, Praha: Scientia.
 26. Trojan, S., *Lékařská fyziologie.* Vol. 4. 2003, Praha: Grada Publishing, a.s.
 27. *Elektronická učebnice - Spermatogeneze [online].* Available from: <https://eluc.kr-olomoucky.cz/verejne/lekce/15>. [cit. 1.4.2019]
 28. Kubíček, M.V., *Spermatologické vyšetření.* Urology for Practice, 2010. **11**(4): p. 204-210.
 29. 2010, W.H.O., *WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen - 5th ed,* W.H.O.c.b.o.f.W. Press, Editor. 2010, World Health Organization can be obtained from WHO Press: Geneva.
 30. Kladenský, J., *Vliv vitaminů, minerálů a stopových prvků na lidské zdraví s podrobnějším zaměřením na urogenitální systém. Jaká rizika přináší jejich deficit či předávkování? - 2. část.* Urology for Practice, 2017. **18**(3): p. 109-114.
 31. Versieck, J. and J.T. McCall, *Trace elements in human body fluids and tissues.* CRC Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences, 1985. **22**(2): p. 97-184.
 32. Mertz, W., *The essential trace elements.* Science, 1981. **213**(4514): p. 1332-1338.

33. Reinhold, J.G., *Trace elements—a selective survey*. Clinical chemistry, 1975. **21**(4): p. 476-500.
34. Ulmer, D.D., *Trace elements*. New England Journal of Medicine, 1977. **297**(6): p. 318-321.
35. Vetejška, K., *Vzácné a stopové prvky*. 1967, Praha: SNTL.
36. Svačina, Š., *Poruchy metabolismu a výživy*. Vol. 1. 2010, Praha: Galén.
37. Zadák, Z., *Magnezium a další minerály, vitaminy a stopové prvky ve službách zdraví*. Vol. 1. 2006, Břeclav: Presstempus.
38. Jiří, K. and a. kolektiv, *Pediatric pro nelékařské zdravotnické obory*. Vol. 1. 2016, Praha: Grada Publishing, a.s.
39. Carver, P.L., et al., *Essential Metals in Medicine: Therapeutic Use and Toxicity of Metal Ions in the Clinic*. 2019: De Gruyter.
40. Sigel, A., et al., *Metal Ions in Toxicology: Effects, Interactions, Interdependencies*. 2011: Royal Society of Chemistry.
41. Nordberg, G.F., B.A. Fowler, and M. Nordberg, *Handbook on the Toxicology of Metals*. 2014: Elsevier Science.
42. Pizent, A., B. Tariba, and T. Živković, *Reproductive toxicity of metals in men*. Archives of Industrial Hygiene and Toxicology, 2012. **63**(Supplement 1): p. 35-46.
43. Dunson, D.B., D.D. Baird, and B. Colombo, *Increased infertility with age in men and women*. Obstetrics & Gynecology, 2004. **103**(1): p. 51-56.
44. Hashemi, M.M., et al., *Impact of seminal plasma trace elements on human sperm motility parameters*. Romanian Journal of Internal Medicine, 2018. **56**(1): p. 15-20.
45. Atsdr, U., *Agency for toxic substances and disease registry*. Case Studies in environmental medicine. <http://www.atsdr.cdc.gov/HEC/CSEM/csem.html>, 1997.
46. Wong, W.Y., et al., *The impact of calcium, magnesium, zinc, and copper in blood and seminal plasma on semen parameters in men*. Reproductive toxicology, 2001. **15**(2): p. 131-136.
47. Kvist, U., *Importance of spermatozoal zinc as temporary inhibitor of sperm nuclear chromatin decondensation ability in man*. Acta Physiologica Scandinavica, 1980. **109**(1): p. 79-84.
48. Battersby, S., J.A. Chandler, and M.S. Morton, *Toxicity and uptake of heavy metals by human spermatozoa*. Fertility and sterility, 1982. **37**(2): p. 230-235.

49. Fallah, A., A. Mohammad-Hasani, and A.H. Colagar, *Zinc is an essential element for male fertility: A review of zn roles in men's health, germination, sperm quality, and fertilization*. Journal of reproduction & infertility, 2018. **19**(2): p. 69.
50. Madding, C.I., et al., *Serum and semen zinc levels in normozoospermic and oligozoospermic men*. Annals of nutrition and metabolism, 1986. **30**(4): p. 213-218.
51. Majzoub, A. and A. Agarwal, *Systematic review of antioxidant types and doses in male infertility: Benefits on semen parameters, advanced sperm function, assisted reproduction and live-birth rate*. Arab journal of urology, 2018. **16**(1): p. 113-124.
52. Caldamone, A.A., et al., *Seminal zinc and male infertility*. Urology, 1979. **13**(3): p. 280-281.
53. Kwenang, A., et al., *Iron, ferritin and copper in seminal plasma*. Human Reproduction, 1987. **2**(5): p. 387-388.
54. Skandhan, K. and B. Mazumdar, *Semen copper in normal and infertile subjects*. Experientia, 1979. **35**(7): p. 877-878.
55. Shinohara, A. and H. Watanabe, *Role of essential trace elements on sexual function and its disorder*. Nihon rinsho. Japanese journal of clinical medicine, 1996. **54**(1): p. 155-161.
56. Logoglu, G., A. Kendirci, and T. Ozgunen, *The role of seminal calcium in male infertility*. J Isla Acad Sci, 1997. **10**(1): p. 25-27.
57. Benoff, S., et al., *The effect of calcium ion channel blockers on sperm fertilization potential*. Fertility and sterility, 1994. **62**(3): p. 606-617.
58. Benoff, S., A. Jacob, and I.R. Hurley, *Male infertility and environmental exposure to lead and cadmium*. Human Reproduction Update, 2000. **6**(2): p. 107-121.
59. Wirth, J.J. and R.S. Mijal, *Adverse effects of low level heavy metal exposure on male reproductive function*. Systems biology in reproductive medicine, 2010. **56**(2): p. 147-167.
60. Dawson, E.B., et al., *Comparison of sperm viability with seminal plasma metal levels*. Biological trace element research, 1998. **64**(1-3): p. 215-219.
61. Pařizek, J., *The destructive effect of cadmium ion on testicular tissue and its prevention by zinc*. Journal of Endocrinology, 1957. **15**(1): p. 56-63.
62. OHTA, H., et al., *Role of metallothionein-like cadmium-binding protein (MTLcDBP) in the protective mechanism against cadmium toxicity in the testis*. Industrial health, 2018.
63. Amara, S., et al., *Preventive effect of zinc against cadmium-induced oxidative stress in the rat testis*. Journal of Reproduction and Development, 2008. **54**(2): p. 129-134.

64. Boitani, C. and R. Puglisi, *Selenium, a key element in spermatogenesis and male fertility*, in *Molecular Mechanisms in Spermatogenesis*. 2009, Springer. p. 65-73.
65. Behne, D., et al., *Selenium in the testis of the rat: studies on its regulation and its importance for the organism*. The Journal of nutrition, 1982. **112**(9): p. 1682-1687.
66. Hansen, J. and Y. Deguchi, *Selenium and fertility in animals and man--a review*. Acta Veterinaria Scandinavica, 1996. **37**(1): p. 19-30.
67. Nenkova, G., L. Petrov, and A. Alexandrova, *Role of trace elements for oxidative status and quality of human sperm*. Balkan medical journal, 2017. **34**(4): p. 343.
68. Laskey, J. and P. Phelps, *Effect of cadmium and other metal cations on in vitro Leydig cell testosterone production*. Toxicology and applied pharmacology, 1991. **108**(2): p. 296-306.
69. Danadevi, K., et al., *Semen quality of Indian welders occupationally exposed to nickel and chromium*. Reproductive toxicology, 2003. **17**(4): p. 451-456.
70. Wang, Y.-X., et al., *Relationships between seminal plasma metals/metalloids and semen quality, sperm apoptosis and DNA integrity*. Environmental pollution, 2017. **224**: p. 224-234.
71. Hovatta, O., et al., *Aluminium, lead and cadmium concentrations in seminal plasma and spermatozoa, and semen quality in Finnish men*. Human reproduction (Oxford, England), 1998. **13**(1): p. 115-119.
72. Wirth, J.J., et al., *Ambient manganese exposure is negatively associated with human sperm motility and concentration*. Epidemiology, 2007. **18**(2): p. 270-273.
73. Meeker, J.D., et al., *Cadmium, lead, and other metals in relation to semen quality: human evidence for molybdenum as a male reproductive toxicant*. Environmental health perspectives, 2008. **116**(11): p. 1473-1479.
74. Guzikowski, W., et al., *Trace elements in seminal plasma of men from infertile couples*. Archives of medical science: AMS, 2015. **11**(3): p. 591.
75. Bonde, J.P. and L. Storgaard, *How work-place conditions, environmental toxicants and lifestyle affect male reproductive function 1*. International journal of andrology, 2002. **25**(5): p. 262-268.
76. Sharpe, R.M., *Environment, lifestyle and male infertility*. Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism, 2000. **14**(3): p. 489-503.
77. Pacey, A., *Environmental and lifestyle factors associated with sperm DNA damage*. Human Fertility, 2010. **13**(4): p. 189-193.

78. Gaur, D.S., M.S. Talekar, and V.P. Pathak, *Alcohol intake and cigarette smoking: impact of two major lifestyle factors on male fertility*. Indian journal of Pathology and Microbiology, 2010. **53**(1): p. 35.
79. Tsujimura, A., et al., *EFFECT OF LIFESTYLE FACTORS ON INFERTILITY IN MEN*. Archives of andrology, 2004. **50**(1): p. 15-17.
80. Eshchenko, J.V., et al., *The change of biometals content (Cu, Mg, Zn) in blood and semen and their relationship to the fertility of men, who were contaminated by anthropogenic air pollution*. Вісник Запорізького національного університету. Біологічні науки, 2014(2): p. 138-145.
81. SAĞLAM, H.S., et al., *Trace elements levels in the serum, urine, and semen of patients with infertility*. Turkish journal of medical sciences, 2015. **45**(2): p. 443-448.
82. Akinloye, O., et al., *Cadmium toxicity: a possible cause of male infertility in Nigeria*. Reprod Biol, 2006. **6**(1): p. 17-30.
83. Pant, N., et al., *Lead and cadmium concentration in the seminal plasma of men in the general population: correlation with sperm quality*. Reproductive toxicology, 2003. **17**(4): p. 447-450.
84. Plechaty, M.M., B. Noll, and F. Sunderman, *Lead concentrations in semen of healthy men without occupational exposure to lead*. Annals of Clinical & Laboratory Science, 1977. **7**(6): p. 515-518.
85. Chia, S., et al., *Blood concentrations of lead, cadmium, mercury, zinc, and copper and human semen parameters*. Archives of andrology, 1992. **29**(2): p. 177-183.
86. Ramamoorthi, R., et al., *An application of multivariate ranks to assess effects from combining factors: metal exposures and semen analysis outcomes*. Statistics in medicine, 2008. **27**(18): p. 3503-3514.
87. Wittkowski, K.M., et al. *Bioinformatics tools enabling u-statistics for microarrays*. in *2006 International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society*. 2006: IEEE.
88. Umeyama, T., et al., *A comparative study of seminal trace elements in fertile and infertile men*. Fertility and sterility, 1986. **46**(3): p. 494-499.
89. Goldblatt, M., *Properties of human seminal plasma*. The Journal of physiology, 1935. **84**(2): p. 208-218.
90. Milde, D. *Příprava vzorků pro atomovou spektrometrii [online]*. 2017; Available from: <http://ach.upol.cz/user-files/intranet/01-apas-priprava-vzorku-1505758214.pdf>. [cit. 27.3.2019]

91. Baranowska, I., *Handbook of Trace Analysis: Fundamentals and Applications*. 2015, Switzerland: Springer International Publishing.
92. Bizzi, C., et al., *Microwave-assisted digestion methods: towards greener approaches for plasma-based analytical techniques*. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2017. **32**(8): p. 1448-1466.
93. Marzec-Wróblewska, U., et al., *Determination of rare earth elements in human sperm and association with semen quality*. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 2015. **69**(2): p. 191-201.
94. Massanyi, P., et al., *Concentration of copper, iron, zinc, cadmium, lead, and nickel in bull and ram semen and relation to the occurrence of pathological spermatozoa*. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 2004. **39**(11-12): p. 3005-3014.
95. Zettner, A., *Principles and applications of atomic absorption spectroscopy*, in *Advances in clinical Chemistry*. 1964, Elsevier. p. 1-62.
96. Van Loon, J.A., *Analytical Atomic Absorption Spectroscopy: Selected Methods*. 2012: Elsevier Science.
97. Haswell, S.J., *Atomic absorption spectrometry*. 1991, Hoboken: Blackwell Publishing Ltd. 1991.
98. *Atomová absorpční spektroskopie (AAS) [online]*. Available from: http://fch.upol.cz/skripta/zfcm_pred/9_AAS.pdf. [cit. 25.3.2019]
99. Huang, Y.-L., et al., *Trace elements and lipid peroxidation in human seminal plasma*. *Biological trace element research*, 2000. **76**(3): p. 207-215.
100. *Atomová spektrometrie [online]*. Available from: <https://web.vscht.cz/~koplkr/Atomov%C3%A1%20spektrometrie.pdf>. [cit. 26.3.2019]
101. *Atomová absorpční spektroskopie [online]*. Available from: http://fzp.ujep.cz/ktv/uc_texty/1IAME/3%20IAME-AAS.pdf. [cit. 26.3.2019]
102. Milde, D. *Porovnání metod atomové spektrometrie [online]*. 2017; Available from: <http://ach.upol.cz/user-files/intranet/02-apas-porovnani-metod-1505758225.pdf>. [cit. 26.3.2019]
103. Mestek, O. *Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem [online]*. Available from: http://old.vscht.cz/anl/josef/LabAtom/Navod_ICP-MS_2010.pdf. [cit. 26.3.2019]

104. Olesik, J.W., *Elemental analysis using ICP-OES and ICP/MS*. Analytical Chemistry, 1991. **63**(1): p. 12A-21A.
105. *Principle of ICP Optical Emission Spectrometry (ICP-OES) [online]*. Available from: <https://www.hitachihightech.com/global/products/science/tech/ana/icp/descriptions/icp-oes.html>. [cit. 26.3.2019]
106. Lajunen, L., *Spectrochemical Analysis by Atomic Absorption and Emission*. 2007: Royal Society of Chemistry.
107. Hill, S.J., *Inductively Coupled Plasma Spectrometry and its Applications*. 2008: Wiley.
108. MIHALJEVIČ, M., L. Strnad, and O. Šebek, *Využití hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem v geochemii*. Chemické listy, 2004. **98**(3): p. 123-130.
109. Mesko, M.F., et al., *Halogen determination in food and biological materials using plasma-based techniques: challenges and trends of sample preparation*. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 2016. **31**(6): p. 1243-1261.
110. Würfels, M., E. Jackwerth, and M. Stoeppler, *Residues from biological materials after pressure decomposition with nitric acid: Part 1. Carbon conversion during sample decomposition*. Analytica Chimica Acta, 1989. **226**(1): p. 1-16.
111. Milde, D. *Hmotnostní spektrometrie - Mass Spectrometry (MS) [online]*. 2003; Available from: <http://www.ach.upol.cz/user-files/intranet/vmach-04-1351607978.pdf>. [cit. 27.3.2019]
112. Agatemor, C. and D. Beauchemin, *Matrix effects in inductively coupled plasma mass spectrometry: a review*. Analytica Chimica Acta, 2011. **706**(1): p. 66-83.
113. Chan, G.C.-Y. and G.M. Hieftje, *Use of vertically resolved plasma emission as an indicator for flagging matrix effects and system drift in inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry*. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 2008. **23**(2): p. 193-204.
114. Arnquist, I.J., T.E. Kreschollek, and J.A. Holcombe, *Simultaneous electrothermal vaporization and nebulizer sample introduction system for inductively coupled plasma mass spectrometry*. Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy, 2011. **66**(3-4): p. 255-260.
115. Lum, T.-S. and K.S.-Y. Leung, *Strategies to overcome spectral interference in ICP-MS detection*. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 2016. **31**(5): p. 1078-1088.
116. Oliveira, E.d., *Sample preparation for atomic spectroscopy: evolution and future trends*. Journal of the Brazilian Chemical Society, 2003. **14**(2): p. 174-182.

117. Prohaska, T., C. Latkoczy, and G. Stingeder, *Precise sulfur isotope ratio measurements in trace concentration of sulfur by inductively coupled plasma double focusing sector field mass spectrometry*. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 1999. **14**(9): p. 1501-1504.
118. Resano, M., F. Vanhaecke, and M. de Loos-Vollebregt, *Electrothermal vaporization for sample introduction in atomic absorption, atomic emission and plasma mass spectrometry—a critical review with focus on solid sampling and slurry analysis*. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2008. **23**(11): p. 1450-1475.
119. Wu, P., et al., *Applications of chemical vapor generation in non-tetrahydroborate media to analytical atomic spectrometry*. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2010. **25**(8): p. 1217-1246.
120. *Podvarová destilace v teflonu [online]*. Available from: <http://www.rmi.cz/podvarova-destilace-v-teflonu>. [cit. 30.3.2019]
121. *Speedwave Xpert [online]*. Available from: <http://www.rmi.cz/speedwave-xpert>. [cit. 30.3.2019]
122. *Rychlostní vlna XPERT - Speedwave Xpert [online]*. Available from: <https://www.berghof-instruments.com/en/products/digestion-technology/speedwave-microwave-digestion/microwave-digestion-speedwave-xpert/>. [cit. 30.3.2019]
123. *Analyzátor rtuti (Hg) AMA-254 [online]*. Available from: <http://amatech.cz/produkty/analyzatory-rtuti/ama-254-advance-mercury-analyzer/>. [cit. 31.3.2019]
124. *Analyzátor rtuti AMA 254 [online]*. Available from: <https://www.natur.cuni.cz/geologie/laboratore/laboratore-a-metody/analyzator-rtuti-ama-254>. [cit. 31.3.2019]
125. *GBC Optimass 8000 ICP-TOF-MS [online]*. 2009; Available from: <http://holcombe.cm.utexas.edu/equipment.htm>. [cit. 31.3.2019]
126. *GBC vědecké vybavení Ltd. - OptiMass 8000 ICP Time-of-Flight hmotnostní spektrometr [online]*. 2003-2010; Available from: <http://www.speciation.net/Database/Instruments/GBC-Scientific-Equipment-Ltd/OptiMass-8000-ICP-TimeofFlight-Mass-Spectrometer-;i526>. [cit. 31.3.2019]

127. Equipment, G.S. *OptiMass 9000* [online]. 2019; Available from:
<http://www.gbesci.com/products/icp-tof-ms/optimass-9600/>. [cit. 18.4.2019]
128. Equipment, G.S. *SensAA* [online]. 2019; Available from:
<http://www.gbesci.com/products/aas/sensaa/>. [cit. 11.4.2019]