

UNIVERZITA PARDUBICE  
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2018

Bc. Lucie Dostálová

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Katedra biologických a biochemických věd

**Využití spektroskopie laserem buzeného mikroplazmatu (LIBS) při  
vyhodnocování testů ekotoxicity na kroužkovci *Enchytraeus crypticus***

Diplomová práce

**Autor:** Bc. Lucie Dostálová

**Vedoucí práce:** doc. Ing. Miloslav Pouzar, Ph.D.

2018

University of Pardubice

Faculty of Chemical Technology

Department of Biological and Biochemical Sciences

**Using laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS) for the evaluation of  
eco-toxicity tests in the pot worm *Enchytraeus crypticus***

Thesis

**Author:** Bc. Lucie Dostálová

**Supervisor:** doc. Ing. Miloslav Pouzar, Ph.D.

2018

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Lucie Dostálová**  
Osobní číslo: **C16442**  
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**  
Studijní obor: **Bioanalytik**  
Název tématu: **Využití spektroskopie laserem buzeného mikroplazmatu (LIBS) při vyhodnocování testů ekotoxicity na kroužkovci Enchytraeus crypticus**  
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

1. Vypracujte literární rešerši zaměřenou na možnosti využití LIBS pro kvantitativní stanovení toxických prvků ve vzorcích rostlinných a živočišných tkání. Zaměřte se zejména na problematiku stanovení Zn. Pozornost věnujte hlavně technikám přípravy vzorků k analýze, způsobům kalibrace a dosaženým hodnotám detekčních limitů.
2. Diskutujte možnosti využití techniky LIBS pro kvantitativní stanovení toxických prvků v gelech. Také v tomto případě věnujte zvláštní pozornost problematice stanovení Zn.

#### Experimentální část

3. Navrhněte metodiku stanovení Zn ve tkáňových vzorcích kroužkovce *Enchytraeus crypticus*, který je využíván jako biologický model při testech ekotoxicity půdních kontaminantů, pomocí techniky LIBS. Optimalizujte analytický proces tak, aby bylo dosaženo co nejnižšího detekčního limitu a zároveň vyhovující reprodukovatelnosti měření. Srovnajte metrologické parametry navržené metodiky s metodikou založenou na využití energiově disperzní rentgen-fluorescenční spektrometrie (ED XRF).
4. Pokuste se navrhnout postup stanovení Zn ve vzorcích agarových půd pomocí LIBS. Diskutujte nejvýznamnější praktická úskalí při LIBS analýze tohoto typu vzorků.
5. Diplomovou práci zpracujte v souladu se Směrnicí UPa č. 9/2012 "Pravidla pro zveřejňování závěrečných prací a jejich základní jednotnou formální úpravu".

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

**Podle pokynů vedoucího diplomové práce**

Vedoucí diplomové práce:

**doc. Ing. Miloslav Pouzar, Ph.D.**

Ústav environmentálního a chemického inženýrství

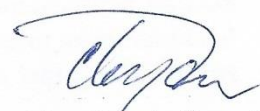
Datum zadání diplomové práce: **18. prosince 2017**

Termín odevzdání diplomové práce: **11. května 2018**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.  
děkan

L.S.



prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2018

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že předložená diplomová práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně výhradně s použitím citovaných zdrojů. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v textu a seznamu použité literatury.

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

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 3. 5. 2018

.....  
Bc. Lucie Dostálová

**Poděkování:**

Velmi ráda bych poděkovala vedoucímu práce doc. Ing. Miloslavu Pouzarovi, Ph.D. za odborné vedení, rady, konzultace a cenné připomínky v průběhu zpracování diplomové práce. Toto poděkování patří rovněž mé rodině za trpělivost a morální podporu v průběhu celého mého studia.

## **ANOTACE**

Diplomová práce je zaměřena na přípravu a prvkovou analýzu rostlinných, živočišných tkání a gelů. V experimentální části práce je kladen důraz na postup přípravy vzorků kroužkovce *Enchytraeus crypticus* pro stanovení zinku pomocí spektroskopie laserem buzeného mikroplazmatu (LIBS). Ověření navržené metody bylo provedeno srovnáním výsledků LIBS s ED XRF spektrometrií.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Spektroskopie laserem buzeného mikroplazmatu, příprava vzorku, optimalizace podmínek, lepicí páska, *Enchytraeus crypticus*, zinek

## **ANNOTATION**

The thesis is focused on preparation and elemental analysis of plant and animal tissues and gels. In the experimental part of the thesis, the emphasis is placed on the preparation of pot worms samples for the determination of zinc by laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS). Verification of the proposed method was performed by comparing LIBS results with ED XRF spectrometry.

## **KEYWORD**

Laser induced breakdown spectroscopy, sample preparation, optimization of conditions, sticky tape, *Enchytraeus crypticus*, zinc

# OBSAH

<b>ÚVOD .....</b>	<b>13</b>
<b>1 TEORETICKÁ ČÁST .....</b>	<b>14</b>
1.1 SPEKTROSKOPIE LASEREM BUZENÉHO MIKROPLAZMATU .....	14
1.1.1 Instrumentace LIBS .....	14
1.1.2 Princip LIBS .....	15
1.1.2.1 Laserová ablace .....	16
1.1.3 Vyhodnocení naměřených výsledků .....	17
1.1.3.1 Jednoduchá lineární regrese .....	17
1.1.3.2 Analýza pomocí bezkalibrační metody .....	18
1.1.4 Výhody a nevýhody LIBS techniky.....	18
1.1.4.1 Výhody.....	18
1.1.4.2 Nevýhody .....	19
1.2 KVANTITATIVNÍ STANOVENÍ TOXICKÝCH PRVKŮ VE VZORCÍCH ROSTLINNÝCH, ŽIVOČIŠNÝCH TKÁNÍ A GELŮ .....	20
1.2.1 Techniky přípravy vzorků.....	20
1.2.2 Rozdělení vzorků .....	21
1.2.2.1 Vzorky rostlin.....	21
1.2.2.2 Měkké tkáňové materiály .....	27
1.2.2.3 Vzorky kalcifikovaných tkání .....	28
1.2.2.4 Vzorky nehtů .....	29
1.2.2.5 Sol-gely.....	30
1.2.2.6 Vzorky gelů a agarů.....	30
1.3 TESTOVÁNÍ TOXICITY NANOČÁSTIC OXIDU ZINEČNATÉHO A CHLORIDU ZINEČNATÉHO NA ROUPICÍCH <i>ENCHYTRAEUS CRYPTICUS</i> V AGAROSOVÉM GELU.....	36

<b>2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....</b>	<b>39</b>
2.1 VZORKY .....	39
2.2 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE .....	39
2.3 OSTATNÍ LABORATORNÍ POMŮCKY A NÁDOBÍ .....	40
2.4 PŘEHLED POUŽITÝCH PŘÍSTROJŮ .....	40
2.4.1 Laserový optický emisní spektrometr LEA-S500 .....	41
2.4.2 Rentgenfluorescenční spektrometr ElvaX .....	41
2.5 VOLBA VHODNÉHO NOSIČE VZORKU A VÝBĚR ANALYTICKÉ ČÁRY ZN .....	42
2.6 PŘÍPRAVA TKÁŇOVÝCH VZORKŮ PRO OPTIMALIZACI LIBS .....	44
2.6.1 Expozice roupic v roztoku $Zn^{2+}$ .....	44
2.6.2 Obohacování tkáňových vzorků roupic Zn .....	45
2.6.3 Příprava tkáňových vzorků roupic k analýze .....	45
2.7 OPTIMALIZACE PODMÍNEK LIBS ANALÝZY .....	47
2.8 PŘÍPRAVA KALIBRAČNÍCH STANDARDŮ .....	48
2.9 KALIBRACE LIBS SPEKTROMETRU .....	49
2.10 ED XRF METODA PRO ANALÝZU ZN VE TKÁŇOVÝCH VZORCÍCH .....	49
2.11 ANALÝZA REÁLNÝCH VZORKŮ ROUPIC Z TOXIKOLOGICKÉHO EXPERIMENTU .....	50
<b>3 VÝSLEDKY A DISKUZE .....</b>	<b>51</b>
3.1 VOLBA VHODNÉHO NOSIČE VZORKU A VÝBĚR ANALYTICKÉ ČÁRY ZN .....	51
3.2 PŘÍPRAVA TKÁŇOVÝCH VZORKŮ PRO OPTIMALIZACI LIBS .....	54
3.2.1 Expozice roupic v roztoku $Zn^{2+}$ .....	54
3.2.2 Příprava tkáňových vzorků k analýze .....	54
3.3 OPTIMALIZACE PODMÍNEK LIBS ANALÝZY .....	56
3.4 KALIBRACE LIBS SPEKTROMETRU .....	59
3.5 ED XRF METODA PRO ANALÝZU ZN VE TKÁŇOVÝCH VZORCÍCH .....	63
3.6 ANALÝZA REÁLNÝCH VZORKŮ ROUPIC Z TOXIKOLOGICKÉHO EXPERIMENTU .....	66
<b>4 ZÁVĚR .....</b>	<b>68</b>
<b>5 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>71</b>

## SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK

Obrázek 1 - Uspořádání systému LIBS. Převzato a modifikováno z [4].....	14
Obrázek 2 - Schéma procesů laserové ablace a) interakce laser-materiál, b) rozvoj plazmatu, c) expanze a ochlazování plazmatu, d) uložení materiálu kolem kráteru. Převzato a modifikováno z [6].....	16
Obrázek 3 - Schematický přehled navrhovaného postupu přípravy fragmentu pro LIBS a ED XRF přímou analýzu listů cukrové třtiny. Převzato a modifikováno z [24].....	25
Obrázek 4 - Schéma LIBS analýzy vzorku na větší vzdálenosti. Převzato a modifikováno z [29].....	29
Obrázek 5 - Postup přípravy bakterií pro LIBS analýzu. Převzato a modifikováno z [33].....	31
Obrázek 6 - Uspořádání systému LIBS (A) a jednotlivé vzorky nových, mírně a velmi použitých tukových mazadel (B). Převzato a modifikováno z [36]. .....	35
Obrázek 7 - Chov kroužkoců <i>Enchytraeus crypticus</i> v plastové Petriho misce .....	39
Obrázek 8 - Dvacet dospělých roupic <i>Enchytraeus crypticus</i> v kádince s živným roztokem ..	44
Obrázek 9 - Tkáňový vzorek 20 roupic po usušení .....	46
Obrázek 10 - Tkáňový vzorek 20 roupic po usušení a nanesení laku.....	46
Obrázek 11 - Tkáňový vzorek 100 roupic na oboustranné lepicí pásce připravený k optimalizaci podmínek LIBS analýzy.....	47
Obrázek 12 - Kalibrační tkáňové standardy na oboustranné lepicí pásce .....	48
Obrázek 13 - Tkáňové vzorky 100 roupic na oboustranné lepicí pásce připravené k ED XRF a LIBS analýze.....	50
Obrázek 14 - LIBS spektrum oboustranné lepicí pásky s intenzivními čarami titanu v oblasti 315 až 345 nm.....	51
Obrázek 15 - LIBS spektra jednotlivých lepicích pásek v oblasti 192 až 222 nm .....	52
Obrázek 16 - Intenzity analytických čar Zn ve spektrech jednotlivých pásek v oblasti 192-222 nm .....	52
Obrázek 17 - LIBS spektrum charakterizující jednotlivé analytické čáry Zn .....	53
Obrázek 18 - Srovnání získaných spekter pro vzorek o koncentraci Zn 236,8 mg.kg <sup>-1</sup> před a po fixaci lakem.....	55
Obrázek 19 - Závislost fluence - koeficient determinace R <sup>2</sup> pro c-I křivky získané s využitím analytické čáry Zn o vlnové délce 202,6 nm .....	58
Obrázek 20 - c-I křivky při intenzitě analytické čáry Zn o vlnové délce 202,6 nm .....	58
Obrázek 21 - Kalibrační křivka LIBS spektrometru sestavená pro standardy roupic.....	59

Obrázek 22 - Kalibrační standardy tkáňových vzorků na oboustranné lepicí pásce s 25 % hydroxidem tetramethylamonným .....	61
Obrázek 23 - Kalibrační křivka LIBS spektrometru sestavená pro standardy roupic po přidání 25 % TMAH .....	62
Obrázek 24 - Kalibrační křivka ED XRF získaná s využitím standardů roupic bez TMAH ...	63
Obrázek 25 - Kalibrační křivka ED XRF získaná po proměření kalibračních standardů s TMAH .....	64
Obrázek 26 - Porovnávání jednotlivých výsledků získaných pomocí ED XRF, LIBS a ICP OES .....	67
Tabulka 1 - Volba vhodného nosiče vzorku .....	42
Tabulka 2 - Analytické čáry Zn ze spektrální knihovny obslužného programu LIBS spektrometru .....	43
Tabulka 3 - Koncentrační řada obohacených vzorků roupic pro optimalizaci podmínek LIBS analýzy .....	45
Tabulka 4 - Koncentrační řada tkáňových standardů roupic pro kalibraci LIBS spektrometru .....	48
Tabulka 5 - Koncentrace Zn ve tkáňových vzorcích roupic po jejich expozici v Zn obohaceném živném médiu změřená pomocí ICP OES .....	54
Tabulka 6 - Hodnoty průměrných intenzit, RSD a SBR pro vzorek o koncentraci 236,8 mg.kg <sup>-1</sup> před a po fixaci lakem .....	55
Tabulka 7 - Rovnice c-I křivek pro různé kombinace přístrojových parametrů.....	57
Tabulka 8 - Optimální parametry LIBS spektrometru následně využité pro kalibraci přístroje .....	59
Tabulka 9 - Koncentrační řada kalibračních standardů s 25 % hydroxidem tetramethylamonným .....	61
Tabulka 10 - Hodnoty RSD získané po LIBS analýze .....	62
Tabulka 11 - Hodnoty RSD získané při ED XRF analýze .....	64
Tabulka 12 - Souhrn parametrů regrese kalibračních závislostí pro LIBS a ED XRF.....	65
Tabulka 13 - Hodnoty RSD získané při ED XRF a LIBS analýze .....	66
Tabulka 14 - Výsledky LIBS a ED XRF analýzy tkáňových vzorků roupic.....	66
Tabulka 15 - Koncentrace Zn v reálných tkáňových vzorcích roupic po jejich expozici v Zn obohaceném živném médiu změřené pomocí ICP OES .....	67

## SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

AAS	Atomová absorpční spektrometrie
CRM	Certifikované referenční materiály
DFA	Diskriminační funkční analýza (z anglického: discriminant function analysis)
FAAS	Plamenová atomová absorpční spektrometrie
ICCD	Intenzifikované kamery (z anglického: intensified charged coupled device)
ICP MS	Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem
ICP OES	Optická emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem
LIBS	Spektroskopie laserem buzeného plazmatu (z anglického: Laser Induced Breakdown Spectroscopy)
LOD	Limit detekce (z anglického: limit of detection)
LTE	Lokální termodynamická rovnováha (z anglického: local thermodynamic equilibrium)
MCC	Karcinom z Merkelových buněk
NIST	Databáze atomových spekter (z anglického: National Institute for Standards and Technology)
PCA	Analýza hlavních komponent (z anglického: principal component analysis)
PCR	Metody regrese hlavních komponent (z anglického: principal component regression)
PLS	Regresní metoda parciálních nejmenších čtverců (z anglického: partial least squares)
RSD	Relativní směrodatná odchylka (z anglického: relative standard deviation)
SCC	Karcinom z dlaždicových buněk
TMAH	Hydroxid tetramethylamonný
XRF	Rentgenofluorescenční spektrometrie

## ÚVOD

Znečišťování složek životního prostředí (ovzduší, voda, půda) kovy je celosvětovým problémem. Kovy jsou přítomny ve vodním a půdním prostředí v důsledku přírodních i antropogenních procesů. Esenciální kovy ve vysokých koncentracích mohou mít subletální či letální účinky. Pro hodnocení úrovně zatížení složek životního prostředí těžkými kovy je nezbytné vyvíjet metody, které umožní dostatečně přesně a správně analyzovat velké množství vzorků v krátkém čase. Jen takové metody nám pak umožní získat dostatečně rozsáhlé soubory dat, jejichž statistickou analýzou můžeme dojít k věrohodným závěrům o míře kontaminace, jejich příčinách a případně i jejich dopadech na živé organismy. Právě takovou technikou je spektroskopie laserem buzeného mikroplazmatu (LIBS). LIBS je moderní analytická technika, kterou lze využít pro určení prvkového složení jakéhokoliv materiálu. LIBS lze také použít pro prostorové mapování, hloubkové profilování vzorků či kvantitativní stanovení prvku v určitém vzorku.

Hlavním cílem této diplomové práce je vývoj metody pro analýzu zinku (Zn) ve tkáňových vzorcích kroužkovce *Enchytraeus crypticus*, který je využíván jako biologický model při testech ekotoxicity půdních kontaminantů. Pro daný analytický úkol má být využita technika LIBS.

Teoretická část této diplomové práce popisuje fyzikální princip metody LIBS a nejběžnější postupy zpracování dat získaných pomocí dané techniky. Rešeršní část se zabývá kvantitativním stanovením toxických prvků ve vzorcích rostlinných, živočišných tkání a gelů. Práce je zaměřena zejména na problematiku stanovení Zn pomocí techniky LIBS. Zvláštní pozornost byla věnována technikám přípravy vzorků k analýze, způsobům kalibrace a dosaženým hodnotám detekčních limitů.

Experimentální část této práce je zaměřena na navržení metodiky stanovení Zn ve tkáňových vzorcích roupic *Enchytraeus crypticus* nanesených na pevný nosič. Na začátku práce byl proveden výběr lepivého podkladu pro vzorky roupic. Dále byl popsán způsob přípravy vzorků kroužkovce *E. crypticus* k analýze zinku pomocí techniky LIBS. Také byly optimalizovány podmínky LIBS analýzy. V další části byl navržen postup kalibrace LIBS spektrometru pro analýzu Zn v těchto vzorcích. V rámci práce byly vypočteny limity detekce. Metoda byla optimalizována, tak aby bylo dosaženo vyhovující úrovně reprodukovatelnosti měření. Zinek byl stanoven ve tkáňových vzorcích kroužkovce. Na závěr byly srovnány metrologické parametry navržené metodiky s metodikou založenou na využití energiově disperzní rentgenfluorescenční spektrometrie (ED XRF).

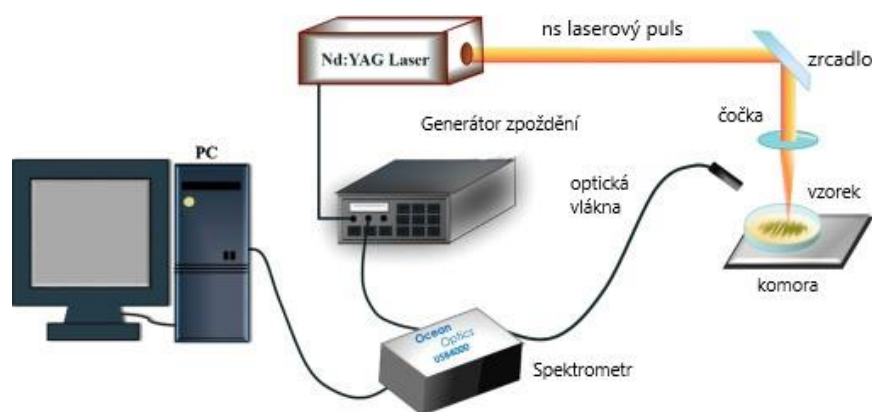
# 1 TEORETICKÁ ČÁST

## 1.1 Spektroskopie laserem buzeného mikroplazmatu

Spektrometrie laserem buzeného plazmatu (LIBS) je moderní metoda analytické chemie pracující na principu atomové emisní spektrometrie [1, 2].

### 1.1.1 Instrumentace LIBS

LIBS spektrometr (Obrázek 1) se skládá z vysokoenergetického laseru generujícího budící záření, optického systému (zrcadlo, zaostřovací čočka), ablační komory pro uložení vzorku v prostředí s inertním plynem, pod vakuem nebo na vzduchu, spektrometru pro shromažďování, rozpoznávání a měření čar atomové emise. Mezi často využívané lasery patří Nd:YAG laser pracující na vlnové délce 532 nm a 1064 nm, kde aktivním materiálem je izotropní krystal Yttrium Aluminium Granátu ( $Y_3Al_5O_{12}$ ) dopovaný ionty neodymu ( $Nd^{3+}$ ). Existují i jiné lasery jako je rubínový (693 nm), plynové:  $CO_2$  laser,  $N_2$  laser (337 nm) a excimerové lasery 193 nm [ArF], 248 nm [KrF], 308 nm [XeCl]. Spektrometr se skládá ze zaostřovací optiky (používané s kabelem optického vlákna pro dálkové snímání), disperzního prvku jako je monochromátor (Czerny-Turner, Echelle) nebo difrakční mřížky, elektroniky pro zpracování signálu a počítače pro zpracování a ukládání dat. Pro záznam LIBS spektra byly dříve používány různé typy detektorů jako je fotografická detekce, fotonásobič nebo fotodioda. V současné době se využívají některé typy CCD kamer [3, 4].



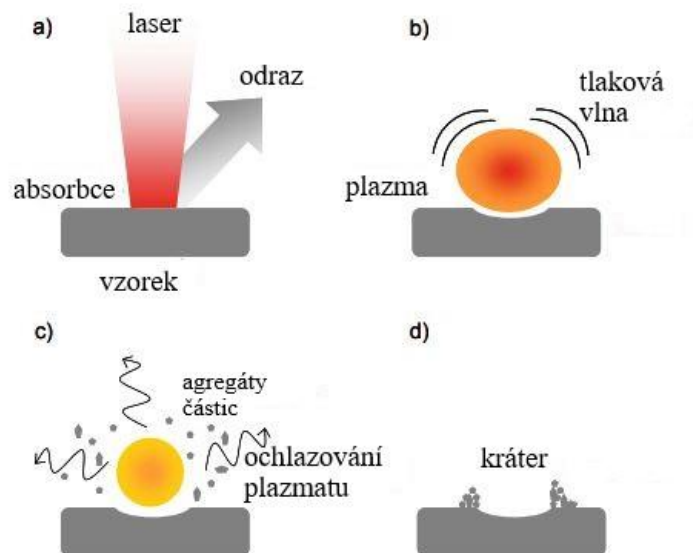
**Obrázek 1** - Uspořádání systému LIBS. Převzato a modifikováno z [4].

### 1.1.2 Princip LIBS

LIBS technika využívá vysokoenergetické laserové pulzy s velkou opakovací frekvencí, které jsou zaměřeny na povrch vzorku. Energie pulzu koncentrovaná na malé ploše může vést k rychlému lokálnímu zahřívání, intenzivnímu odpařování a degradaci analyzovaného materiálu, po němž následuje tvorba plazmatu [1, 3, 5].

Po interakci laserového paprsku se vzorkem dochází k laserové ablaci (Obrázek 2), jejíž průběh ovlivňuje citlivost, přesnost a časové a prostorové rozlišení měření. Ablatovaný materiál je emitován z místa dopadu budícího paprsku ve formě pevných částic, kapek nebo jako expandující plazmový oblak. Množství ablatovaného materiálu závisí na energii absorbované materiálem. Proces ablace je také ovlivňován kolísáním výkonu laserového pulzu; případně mechanickými, fyzikálními a chemickými vlastnostmi ablatovaného materiálu. LIBS lze použít ke studiu a analýze jak vodivých, tak nevodivých pevných vzorků. Laserová ablace pevných materiálů se skládá ze tří hlavních procesů. Prvním procesem je rozvoj mikroplazmatu, který začíná fotonovou absorpcí, následovanou ohřevem a fotoionizací. K excitaci polovodivých a nevodivých materiálů přispívají jak elektrony, tak ionty. U nevodivých materiálů není vodivostní pás obsazen elektrony, u polovodičů je obsazen jen částečně. Proto při multifotonové absorpci může vzniknout pár elektron – díra. Ve vodivostním pásu se při vysokých hodnotách zářivého výkonu může objevit dostatečný počet elektronů a může docházet ke generování volných elektronů. Volné elektrony a ionizované atomy se šíří a v okolní atmosféře vzniká tlaková vlna. Po interakci laser - materiál bude energie laserového paprsku absorbována volnými vodivostními elektrony, které nakonec předají energii iontům v mřížce, a dojde k ohřevu povrchu materiálu. Rozvoj plazmatu závisí na intenzitě laserového paprsku, jeho vlnové délce, složení a tlaku okolního plynu. Pokud laserový pulz trvá v řádu nanosekund, může být pozdější část laserového pulzu absorbována laserem indukovaným plazmatem, což se nazývá plazmové stínění. Interakce laser - materiál jsou řízeny zákony kvantové mechaniky. Dalším procesem je expanze a ochlazování mikroplazmatu. Během ochlazování vychází z plazmatu spojitě záření tvořené zejména brzdným zářením elektronů vyražených z valenční vrstvy atomů při jejich ionizaci a charakteristické záření jednotlivých prvků, vznikající de-excitací elektronů, které byly energií plazmatu excitovány do vyšších energetických hladin. Různé energetické úrovně každého typu atomu indukují konkrétní fotonové energie pro každý druh atomů, což se využívá při měření a získávání LIBS spektra. Průběh těchto dějů je ovlivněn jednak počátečními plazmatickými vlastnostmi (na konci laserového pulzu), ale také expanzním

médium. Vlastnosti (elektronová hustota, teplota a rychlost expanze) plazmatu zpočátku silně závisí na vlastnostech laseru. Ochlazování materiálu napomáhá k tvorbě agregátů a klastrů. Třetím procesem je odpaření částic, množství materiálu je ablatováno jako částice a tyto částice vytvářejí kondenzované páry, které neemitují záření. Ablatovaný materiál se spolu s roztaveným materiálem nachází kolem kráteru, jehož tvar a rozměry budou záviset na vlastnostech vzorku a parametrech laseru (vlnová délka, šířka impulsu) [1, 2, 3, 6, 7].



**Obrázek 2** - Schéma procesů laserové ablace a) interakce laser-materiál, b) rozvoj plazmatu, c) expanze a ochlazování plazmatu, d) uložení materiálu kolem kráteru. Převzato a modifikováno z [6].

### 1.1.2.1 Laserová ablace

Ultrakrátké laserové pulzy v délce trvání femtosekund (fs) a pikosekund (ps) lze použít k vysoce kvalitní a přesné analýze materiálu (například nanočástic). Bylo prokázáno, že trvání laserového pulzu má vliv na průběh laserové ablace materiálu a především na hloubku vznikajícího kráteru. Během interakce ultrakrátkého laserového pulzu s materiálem je kromě ablatované oblasti zbytek materiálu minimálně tepelně a mechanicky namáhán. Naopak delší trvání laserového pulzu v řádu nanosekund (ns) vede k zahřívání rozsáhlejší oblasti. Energie laserového pulzu se šíří i mimo oblast přímo ozařovanou laserovým paprskem. V případě kovů tak dochází k tvorbě taveniny a následně k odpařování. Dlouhé trvání laserového pulzu snižuje účinnou hloubku pronikání energie. Existují poměrně velké rozdíly mezi laserovou ablací materiálů pomocí nanosekundových a femtosekundových laserových pulzů. Při laserové ablaci se během nanosekundového laserového pulzu vytvoří plazma, takže pulz slouží i k ohřevu plazmatu. Při femtosekundové laserové ablaci se plazma vytvoří až po ukončení laserového pulzu [7].

### 1.1.3 Vyhodnocení naměřených výsledků

Výstupem LIBS analýzy je spektrum, čili závislost intenzity záření emitovaného plazmatem na vlnové délce. Technika LIBS v případě celé řady vzorků umožňuje provádění kvalitativní prvkové analýzy, tedy identifikaci přítomnosti jednotlivých prvků v neutrálním nebo ionizovaném stavu pomocí detekce jejich emisních čar.

Pro určení koncentrace daných prvků neboli kvantitativní analýzu je nutné provést kalibraci, proměřit standardy s vhodně zvoleným rozsahem koncentrací. V kvantitativní LIBS analýze se nejčastěji používá jednoduchá lineární regrese nebo se v některých studiích využívají tzv. bezkalibrační metody. V současné době jsou stále častěji jak pro identifikaci vzorků, tak i pro kvantitativní analýzu pomocí LIBS využívány i techniky vícerozměrné analýzy dat, jako je regresní metoda parciálních nejmenších čtverců (PLS), analýza hlavních komponent (PCA) či metody regrese hlavních komponent (PCR) [2, 8-11].

#### 1.1.3.1 Jednoduchá lineární regrese

V jednoduchém lineárním regresním modelu pro kalibraci LIBS představuje koncentrace měřeného prvku nezávislou proměnnou (osa X) a intenzita zvolené analytické čáry po odečtení pozadí, závislou proměnnou (osa Y). Nejjednodušší a nejrozšířenější metodou kvantitativní analýzy je standardní kalibrační metoda, která konstruuje vztah mezi integrovanou intenzitou analytické čáry nebo poměrem intenzit (analytická vs. referenční čára) sledovaného prvku a známou koncentrací analyzovaného prvku ve standardech s certifikovaným složením. Využívají se standardy, které mají složení podobné matricím vzorků, jež mají být analyzovány.

Také lze do vzorků přidat prvek sloužící jako interní standard, jehož analytické čáry se využívají v rámci matematických modelů sloužících ke korekci matričních efektů. Výběr interního standardu závisí na typu vzorku a vlastnostech emisních spekter vnitřních standardů a analytu. V případě vzorků, kde matrice nevykazuje takový stupeň heterogenity, jako je tomu u půd, lze jako interní standard využít i některý z matričních prvků jako je křemík ve skle, vápník v kostech a zubech nebo uhlík v rostlinných vzorcích. Využitím intenzit čar vnitřního standardu lze fluktuace plazmatu matematicky korigovat pulz od pulzu, kdy dochází ke změnám excitačních podmínek. Intenzita analytické čáry je dána do poměru k intenzitě čáry srovnávací ze stejné oblasti.

K vyjádření obsahu analytu ve vzorku se používají zejména hmotnostní (w/w) koncentrace v jednotkách  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ , hmotnostní procenta nebo lze při analýze ultratenkých vrstev použít plošnou koncentraci v jednotkách  $\text{mg}\cdot\text{cm}^{-2}$  [2, 10-14].

### 1.1.3.2 Analýza pomocí bezkalibrační metody

K analýze dat získaných pomocí techniky LIBS se využívají i tzv. bezkalibrační metody (CF-LIBS). Matematické modely aplikované v rámci CF-LIBS pracují s veličinami popisujícími základní vlastnosti plazmatu, jako je elektronová hustota a elektronová teplota. Tato metoda je založena na kompenzaci vlivu matrice použitím rovnic odvozených od předpokladu lokální termodynamické rovnováhy (LTE). Z jedné atomové a z jedné iontové čáry vybraného prvku jsou vypočteny pomocí Boltzmannova vztahu parametry, které popisují vlastnosti plazmatu. Tyto parametry lze poté použít pro určení koncentrace analyzovaného prvku z intenzity jeho čáry. Analyzovaný prvek je jiný než prvek, pomocí kterého byly vypočteny jednotlivé parametry. Výsledky některých studií vykazovaly dobrou shodu mezi hodnotami CF-LIBS a koncentracemi měřenými konvenčními technikami (ICP OES, ICP MS, AAS) [2, 9, 15, 16].

### 1.1.4 Výhody a nevýhody LIBS techniky

Původně byla LIBS navržena zejména jako screeningová terénní technika, avšak zlepšením instrumentálních parametrů a prohloubením znalostí o základních aspektech laserem buzeného mikroplazmatu umožnilo rozšíření LIBS i do oblasti laboratorních aplikací [13].

#### 1.1.4.1 Výhody

Proces analýzy pomocí metody LIBS je rychlý a může být použit pro různé druhy vzorků, jako jsou aerosoly, plyny, kapaliny nebo pevné látky. LIBS je technika použitelná pro analýzu polovodičů, supravodivých materiálů nebo extrémně tvrdých materiálů, které lze jen s velkými obtížemi převádět do roztoku. Při úpravě pevných vzorků může dojít ke kontaminaci, změně původního chemického složení vzorku, zvýšení doby analýzy či zničení původního vzorku. Technika LIBS má nízké nároky na úpravu vzorku a její využití tedy může být cestou, jak daným problémům předejít. Pomocí LIBS lze provádět multielementární analýzu, lokalizované mikroanalýzy a analýzy povrchu. Nevyžaduje žádný přímý kontakt se vzorkem, lze využít přenosné analyzátoři pro analýzu matričních prvků v horninách, či vysoce koncentrovaných kontaminantů *in situ*. Technika LIBS je vhodná pro rychlou elementární analýzu, například toxických prvků v různých typech matric vzorků a to i těch, které se vyskytují v prostředí s drsnými podmínkami. Analýzu lze provádět v reálném čase [3, 5, 13].

#### 1.1.4.2 Nevýhody

Ze srovnání LIBS s ostatními technikami elementární analýzy jako je optická emisní spektrometrie s buzením v indukčně vázaném plazmatu (ICP OES) a hmotnostní spektrometrie s buzením v indukčně vázaném plazmatu (ICP MS) vyplývá, že nejzávažnějším omezením LIBS jsou vysoké hodnoty limit detekce a nízká reprodukovatelnost měření. Hlavním důvodem těchto nedostatků je množství experimentálních parametrů, které ovlivňují analytický signál. Mezi tyto faktory patří vlnová délka, výkon laseru, úhel dopadu budícího paprsku na vzorek, profil a tvar paprsku, doba pulzu, proplachovací plyn, tlak pracovní atmosféry atd. Pro zlepšení analytické výkonnosti LIBS musí být tyto faktory optimalizovány [3].

Ke zlepšení citlivosti metody při analýze minoritních a stopových prvků lze využít dvoupulzní techniku LIBS, kontinuálně přivádět proplachovací plyn do ablační komory, kde je umístěn analyzovaný materiál nebo může laserový paprsek působit na povrch vzorku pod jiným úhlem než  $90^\circ$ . Při dvoupulzní LIBS dojde během prvního laserového pulzu k laserové ablaci a vzniku plazmatu. Plazma se nechá vyvíjet a nabyde na objemu. V této chvíli vyše laser druhý pulz do vzniklého plazmatu a dodá mu energii. Tím plazma nabyde na objemu a emituje více záření [1, 5, 13].

## **1.2 Kvantitativní stanovení toxických prvků ve vzorcích rostlinných, živočišných tkání a gelů**

Jak již bylo zmíněno metoda LIBS v mnoha případech nevyžaduje složitou přípravu vzorku, tím se liší od analytických technik jako je ICP OES, ICP MS nebo rentgenofluorescenční spektrometrie (XRF). Metody přípravy vzorku se v případě LIBS využívají ke zlepšení kvality analytických dat (limita detekce a přesnost) [13]. Experimentální část této práce je orientována na stanovení zinku (Zn) v biologickém materiálu, proto je řešeršní část práce věnována zejména pracím zabývajícím se LIBS analýzou tohoto prvku.

### **1.2.1 Techniky přípravy vzorků**

Zvolená technika přípravy vzorků k analýze má zásadní vliv na kvalitu výsledků stanovení. Správně zvolená technika úpravy vzorku může vést k potlačení matričních efektů. Matrice může být odstraněna, není to však triviální postup, protože matrice je často nedílnou součástí většiny pevných vzorků. Například při analýze zasolených roztoků s vysokým podílem nerozpustných částic (mořská voda) lze pevný podíl odstranit pomocí filtrace a kapalný podíl s vysokým obsahem solí, které by rušily stanovení konvenčními roztokovými technikami (ICP OES, ICP MS), pak analyzovat pomocí LIBS.

Při analýze hornin jsou často používány techniky pro úpravu granulometrie vzorku (drcení, mletí), zakoncentrování vzorku (magnetická separace) a separace částí vzorku obsahujících analyt (třídění pod mikroskopem a prosévání). Malá zrnka minerálů je nutné fixovat.

Pokud není možné odstranění matrice, je matrice zředěna, což může být účinné, pokud je koncentrace analytu vysoká. K ředění se využívají materiály, které nepodporují matriční efekty a neobsahují žádné rušivé prvky. Některé materiály používané k ředění vzorku, (celulóza, vosk) mohou sloužit i jako pojiva pro zlepšení soudržnosti pelet.

Povrch pevného vzorku je možné upravit broušením, granulometrií a homogenitě vzorku pak některou z technik mletí, při kterých se snižuje velikost částic a zvyšuje se specifický povrch. Mezi další metody k přípravě vzorků řadíme tavení a loužení. Vyluhování je časově náročné, náchylné ke kontaminaci, vyžaduje kyseliny a vysoké teploty. K přípravě vzorků se také využívá metoda sol-gel. Často využívanou technikou je i příprava pelet z prášků. Některé prášky netvoří soudržnou peletu, proto je přidáváno pojivo, jako je bromid draselný, polyvinylalkohol nebo škrob. Vzorky mohou být také nanášeny na tenké vrstvy (oboustranná lepicí páska, skleněné krycí sklíčko, vrstva lepidla, hliníková folie).

K analýze těžkých kovů se využívají také různé absorpční materiály, jako je filtrační papír nebo grafit.

Existují určité typy vzorků, které lze analyzovat bez jakéhokoliv zpracování. Jsou to homogenní pevné vzorky (kovy, sklo nebo polymery), které dokáží odolávat laserové rázové vlně. Dále jsou to materiály skládající se z homogenních vrstev (barvy, pokovování, povlaky), kdy lze analyzovat horní vrstvu nebo se využívá metoda hloubkového profilu. Heterogenní vzorky, které nevyžadují fixaci, mohou být analyzovány bez jakékoli přípravy s použitím rastrového vzoru nebo otáčením vzorku během analýzy. Tímto způsobem jsou získány výsledky vhodné spíše pro screening [13, 17].

## **1.2.2 Rozdělení vzorků**

Uplatnění LIBS metody v biologii a medicíně vzrůstá. Pomocí LIBS techniky lze analyzovat rostliny, pevné, „kvazi“ pevné (zuby, kosti), měkké tkáňové materiály (kůže, melanom), gely, bakteriální patogeny nebo kapaliny (krev, moč, sperma). Příprava biologických vzorků je často velmi podobná metodám přípravy pevných nebo kapalných vzorků. Biologické materiály jsou heterogenní a v mnoha případech je třeba provést homogenizaci k zlepšení reprodukovatelnosti výsledků [4, 13, 17-19].

### **1.2.2.1 Vzorky rostlin**

Práce L. C. Petruciové a kol. popisuje stanovení mikronutrientů (P, K, Ca, Mg, Fe, S, Mn a Zn) ve vzorcích pšeničné mouky a v certifikovaném referenčním materiálu (CRM) NIST SRM 1567a pšeničné mouky. K laboratorním vzorkům bylo před mletím v kryogenním mlýnu přidáno třicet hmotnostních procent celulózy. Po homogenizaci byly lisovány pelety tlakem  $8 \text{ tun.cm}^{-2}$  po dobu 5 minut. Použitý LIBS spektrometr byl vybaven Q-spínaným Nd:YAG laserem, monochromátorem Echelle a ICCD kamerou (LLA Instruments GmbH, Germany). Vlnová délka budícího záření byla 1064 nm a energie pulzu 177 mJ. Doba trvání pulzu byla 5 ns a frekvence opakování 10 Hz. Doba zpoždění pulzu byla od 1,0 do 3,0  $\mu\text{s}$  a velikost laserového bodu byla 750  $\mu\text{m}$ . Do ablační komory byl kontinuálně přiváděn proud argonu. Nejintenzivnější čára Zn v získaném spektru měla vlnovou délku 202,548 nm. Kromě LIBS využili k analýze Zn v daných vzorcích i metodu energiově disperzní XRF (ED XRF). Vzorky byly analyzovány pomocí EDX-720, který byl vybaven Rh rentgenkou o maximálním výkonu 50 W a polovodičovým Si (Li) detektorem s rozlišením 155 eV při Mn  $K\alpha$  5,90 keV. Pro analýzu byla zvolena oblast v rozmezí od 1 do 40 keV. Každý vzorek byl měřen ve třech replikách. Kalibrační závislosti pro LIBS i ED XRF byly získány pomocí techniky PLS.

Rozsah kalibrační řady pro Zn byl 3 až 26 mg.kg<sup>-1</sup>. Pro srovnávací účely byla využita metoda ICP OES. Limit detekce Zn byl 1,0 mg.kg<sup>-1</sup> a ED XRF 2,4 mg.kg<sup>-1</sup>, K $\alpha$  8,64 keV. Metody ED XRF a LIBS lze využít ke stanovení mikronutrientů ve vzorcích pšeničné mouky. Výsledky získané technikou LIBS a ED XRF se shodovaly s výsledky metody ICP OES [20].

L. C. Nunesová a kol. optimalizovali parametry LIBS, aby vytvořili funkční metodu pro stanovení makro (P, K, Ca, Mg) a stopových prvků (B, Cu, Fe, Mn a Zn) v listech cukrové třtiny. Koncentrace nutrientů v listech cukrové třtiny se může měnit v závislosti na odrůdě rostlin, věku a typu půdy. Určení obsahu těchto prvků se běžně používá pro hodnocení stavu výživy rostlin. Analyzovány byly CRMs (NIST) a reálné vzorky ve formě pelet. Sušené listy cukrové třtiny bez centrálních žil byly homogenizovány pomocí kryogenního mlýnu a poté lisovány tlakem 8 tun.cm<sup>-2</sup> po dobu 5 min do pelety o tloušťce 2 mm a průměru 15 mm. K analýze byl využit LIBS spektrometr s Nd:YAG laserem pracujícím na vlnové délce 1064 nm, monochromátorem Echelle a ICCD kamerou (Kodak KAF 1001). Energie budícího záření byla 110 mJ na pulz. Doba integrace emisních spekter byla 2  $\mu$ s a frekvence opakování laseru byla 10 Hz. Do ablační komory byl kontinuálně přiváděn proud argonu. Optimalizace byla prováděna u parametrů, jako je doba zpoždění pulzu, počet spekter z jednoho analytického bodu, energie pulzu a vzdálenost mezi objektivem a vzorkem. Jako nejintenzivnější byla vybrána čára pro Zn s vlnovou délkou 213,861 nm. Ke kalibraci byly využity standardy o rozsahu koncentrace Zn 4 až 19 mg.kg<sup>-1</sup>. Byla využita jednoduchá lineární regrese. Kalibrační závislost pro LIBS byla také získána pomocí technik PLS a PCR. Pro srovnávací účely byla využita metoda ICP OES. Limit detekce pro kalibrační model získaný jednoduchou lineární regresí, kde byla intenzita signálu vyhodnocena jako plocha píku, byl pro Zn 1,9 mg.kg<sup>-1</sup> a při použití vícerozměrného kalibračního modelu bylo dosaženo detekčního limitu o hodnotě 1,2 mg.kg<sup>-1</sup>. Volbou kalibračních standardů, které jsou matričně podobné vzorku, byla ovlivněna podoba kalibrace LIBS. Výsledky získané technikou LIBS se shodovaly s výsledky metody ICP OES [21].

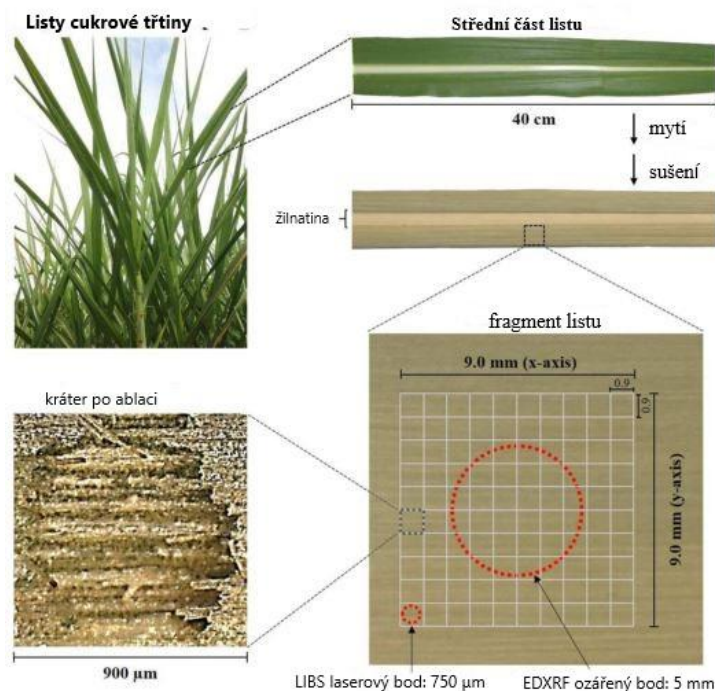
V některých situacích nejsou k dispozici CRMs. Cílem práce S. Gomeše a kol. bylo navrhnout kalibrační strategii pro LIBS analýzu pelet rostlinných materiálů. K měření Ca, Mg, K, P, Cu, Mn a Zn byly vybrány listy cukrové třtiny, které byly odděleně promyty vodou a následně sušeny. K mletí vzorku při teplotě kapalného dusíku byl využit kryogenní mlýn. Ke kryogenně mletým vzorkům byla přidána HNO<sub>3</sub>. Směs byla protřepávána a pevná fáze byla zachycena na filtračním papíru. Frakce zadržaná ve filtru byla potom přenesena do další nádoby a byla přidána nová dávka HNO<sub>3</sub>. Tento krok byl opakován 5 krát. Některé prvky (P, Mn a Zn) se nepovedlo zcela vyloužit. Finální zbytek byl vysušen, homogenizován

a následně analyzován metodou ICP OES po mikrovlnném rozkladu ( $\text{HNO}_3$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Tento materiál bez přítomnosti analytů byl použit jako pojivo a ředící materiál při přípravě kalibračních standardů. Kalibrační standardy byly připraveny z příslušného extrahovaného materiálu smíchaného s 25, 50 a 75 hmotnostními procenty původního rostlinného materiálu. Tyto materiály byly umlety v kryogenním mlýnu. Pelety standardů a vzorků byly lisovány tlakem  $8 \text{ tun.cm}^{-2}$  po dobu 5 minut a měly tloušťku přibližně 2 mm a průměr 15 mm. Použitý LIBS spektrometr byl vybaven Q-spínaným Nd:YAG laserem pracujícím na základní vlnové délce 1064 nm. Energie jednoho pulzu byla 110 mJ s dobou trvání 5 ns. Frekvence opakování byla 10 Hz. Byl použit spektrometr (ESA 3000, LLA Instruments GmbH, Německo) vybavený monochromátorem Echelle a ICCD kamerou (Kodak KAF 1001 CCD,  $1024 \times 1024$  pixelů). Do ablační komory byl kontinuálně přiváděn proud argonu. Kalibrační standardy a vzorky byly po mikrovlnném rozkladu analyzovány pomocí ICP OES. Byly stanoveny koncentrace Ca, Mg, P, K, Cu, Mn a Zn. Správnost metody ICP OES byla ověřena pomocí CRMs (NIST). Výsledky jednotlivých metod se shodovaly. Hodnoty LOD byly  $0,01 \text{ g.kg}^{-1}$  pro Ca,  $0,01 \text{ g.kg}^{-1}$  pro Mg,  $1,4 \text{ g.kg}^{-1}$  pro K,  $0,03 \text{ g.kg}^{-1}$  pro P,  $0,8 \text{ mg.kg}^{-1}$  pro Mn,  $1,0 \text{ mg.kg}^{-1}$  pro Zn a  $0,6 \text{ mg.kg}^{-1}$  pro Cu. Bylo možné připravit standardy, které jsou matričně velmi podobné vzorku, a tudíž nebudou příčinou nežádoucích interferencí [22].

V přehledovém článku D. Santose a kol. jsou shrnuty práce zabývající se LIBS analýzou různých druhů rostlin ve formě lisovaných pelet připravených z čistých, sušených a řádně rozemletých homogenizovaných listů. Stanovení makro- a mikronutrientů má klíčový význam v zemědělství a pro hodnocení nutričního stavu plodin, který by mohl omezit produkci nebo kvalitu (ovoce, zeleniny nebo obilovin). Zn byl stanoven v rozemletých listech, peletách, čerstvých a vysušených listech i ve dřevě. Vzorky rostlin byly analyzovány pomocí LIBS spektrometru s Nd:YAG laserem pracujícím na vlnové délce 1064 nm nebo 532 nm. Kalibrační závislosti byly sestrojeny s využitím dat získaných po proměření sady CRM (IAEA 359 zelí, BCR 60 mech, GBW 07603 větve a listy keře, IAEA 361 sója, NIST 1570a špenát, NIES 10-C rýže, NIST 1567a pšenice, atd.), které byly vyhodnoceny pomocí techniky PLS. K analýze dat byla využita i metoda CF-LIBS. Byla vybrána jedna ze studií citovaných v daném přehledovém článku. Práce G. de Carvalho a kol. se zabývala analýzou listů boldovníku vonného (*Peumus boldus*) a listy cukrové třtiny. Listy byly umlety pomocí kryogenního mlýna (Spex model 6800, USA) s kapalným dusíkem. Pelety byly lisovány tlakem  $8 \text{ tun.cm}^{-2}$  po dobu 5 minut. Peleta měla tloušťku 2 mm a průměr 15 mm. Byl využit LIBS spektrometr s Nd:YAG laserem pracujícím na vlnové délce 1064 nm, monochromátorem Echelle a detektorem ICCD (Kodak KAF 1001 CCD,  $1024 \times 1024$

pixelů). Energie pulzu byla  $365 \pm 3$  mJ, doba trvání pulzu 5 ns a opakovací frekvence byla 10 Hz. Nejintenzivnější emisní čára Zn v získaném spektru měla vlnovou délku 206,2 nm. Kvantitativní analýza byla prováděna technikou kalibrační křivky, pro kalibraci přístroje byly využity standardy připravené z CRMs. LOD techniky LIBS pro Zn byl  $0,2 \text{ mg.kg}^{-1}$ . Pro srovnávací účely byla využita metoda ICP OES. I když mají pelety rostlinných materiálů různé složení matrice (celulóza, lignin), získané výsledky technikou LIBS se téměř shodovaly s výsledky metody ICP OES. Bylo zjištěno, že obsah Zn v rostlinách s dobrým nutričním stavem se pohyboval v rozmezí od 5 do  $200 \text{ mg.kg}^{-1}$  [16, 23].

V práci M. Guerra a kol. byla využita technika mikrovzorkování pro přímou analýzu sušených listů cukrové třtiny pomocí ED XRF a LIBS. Části listů byly promyty a vysušeny při teplotě  $60 \text{ }^\circ\text{C}$ . K analýze byly využity vzorky fragmentů listů, které jsou zobrazeny na Obrázku 3. Jednotlivé fragmenty měly délku od 1,5 do 2,0 cm a šířku cca 1,5 cm. Vzorky fragmentů byly lisovány tlakem 3 tun po dobu 3 s použitím pneumatického lisu (Spex 3624B X-Press). Po analýze pomocí ED XRF a LIBS byly všechny fragmenty listů rozemlety v kryogenním mlýnu (Spex model 6800, USA) a poté byly lisovány tlakem  $8 \text{ tun.cm}^{-2}$  na pelety o tloušťce cca 2 mm. Využit byl LIBS spektrometr, který byl vybaven Q-spínaným Nd:YAG laserem pracujícím na základní vlnové délce 1064 nm, monochromátorem Echelle a detektorem ICCD s použitím optického vlákna. Energie pulzů byla až  $365 \pm 3$  mJ a doba trvání 5 ns. Frekvence opakování byla 10 Hz. Do ablační komory byl přiváděn nepřetržitě proud argonu. Testované vzorky (fragmenty listů) byly fixovány na stolku v ablační komoře. V získaném spektru byly vybrány nejintenzivnější emisní čáry s vlnovou délkou pro Zn 206,2 nm a 213,856 nm. Pro techniku ED XRF byl využit spektrometr (EDX 720, Shimadzu, Kjóto, Japonsko), který byl vybaven Rh rentgenkou 50 W a polovodičovým Si (Li) detektorem s rozlišením 155 eV při Mn  $K\alpha$  5,90 keV. Spektrální oblast byla v rozmezí od 1 do 40 keV. Kvantitativní analýza byla prováděna technikou kalibrační křivky. U ED XRF techniky byla využita oblast fragmentu listu o průměru 5 mm a u LIBS podstatně menší oblast  $750 \text{ }\mu\text{m}$ . Ve vzorcích listů byly stanoveny prvky P, K, Ca, S, Fe, Mn, Mg, Cu, Zn, B a Si. Limity detekce mědi ( $K\alpha$  8,05 keV) a zinku ( $K\alpha$  8,64 keV) nebyly zjištěny vzhledem k jejich nízkým koncentracím v listech cukrové třtiny ( $3,8$  až  $5,0 \text{ mg.kg}^{-1}$  pro Cu a  $12,6$  až  $14,8 \text{ mg.kg}^{-1}$  pro Zn). Jako referenční metoda byla zvolena analýza prvků v peletě pomocí ED XRF. Přímá LIBS a ED XRF analýza sušených listů cukrové třtiny je výhodnější než analýza pelet. Příprava vzorku je minimální a je sníženo i riziko systematických chyb [24].



**Obrázek 3** - Schematický přehled navrhovaného postupu přípravy fragmentu pro LIBS a ED XRF přímou analýzu listů cukrové třtiny. Převzato a modifikováno z [24].

G. de Carvalho a kol. ve své práci stanovovali makro- (Ca, Mg a P) a mikronutrienty (Cu, Fe, Mn a Zn) v rostlinných materiálech pomocí techniky LIBS s femtosekundovým laserem a nanosekundovým laserem (ns-LIBS). Experimenty byly prováděny s listy z laboratorních vzorků (cukrová třtina, sója, citrusy, káva, kukuřice, eukalyptus, mango, fazole, banán, salát, hrozen, rajčat) a CRM (NIST). Vzorky (a CRM) byly vysušeny při 60 °C a poté byly listy nejprve rozemlety v mlýnku Wiley a následně v kryogenním mlýnu (Spex model 680 0, USA) s kapalným dusíkem. Kryogenně mleté vzorky byly prosety. Pelety byly lisovány tlakem 8 tun.cm<sup>-2</sup> po dobu 3 minut. Výsledné pelety měly průměr cca 15 mm a tloušťku 2 mm. Pro referenční účely byla využita metoda ICP OES. Použitý LIBS spektrometr byl vybaven femtosekundovým Ti-safírovým laserem pracujícím na vlnové délce 80 nm s energií jednoho pulzu 1,65 mJ, délkou trvání pulzu 60 fs a opakovací frekvencí 1 kHz. Také byl využit Q-spínaný Nd: YAG laser Brilliant B (Quantel, Francie) pracující na vlnové délce 1064 nm, 532 nm a 266 nm. Délka trvání pulzu byla 6 ns, energie 70 mJ a opakovací frekvence byla 3,3 Hz. Do komory byl kontinuálně přiváděn proud argonu. Využit byl spektrometr Shamrock 303i s monochromátorem Czerny-Turner opatřený detektorem ICCD 1024 × 1024 pixelů. Jako nejintenzivnější byly vybrány čáry s vlnovou délkou pro Ca (II) 315,887 nm, Mg (I) 285,212 nm, P (I) 213,618 nm, Cu (I) 324,755 nm, Fe (II) 238,204 nm, Mn (II) 257,610 nm a Zn (II) 202,548 nm. Ke konstrukci kalibračních

závislostí byla využita jednoduchá lineární regrese. Kalibrační závislost pro LIBS byla také získána pomocí techniky PLS. Limit detekce byl pro Zn  $80 \text{ mg.kg}^{-1}$  (femtosekundový laser). Vypočtené limity detekce pro metodu využívající k vybuzení plazmatu nanosekundový laser se základní vlnovou délkou 1064 nm, 532 nm, 266 nm byly pro Zn  $14 \text{ mg.kg}^{-1}$ ,  $4 \text{ mg.kg}^{-1}$  a  $12 \text{ mg.kg}^{-1}$ . Výsledky získané technikou fs-LIBS se shodovaly s výsledky metody ICP OES. Ze srovnání kalibračních a validačních procesů (fs- a ns-LIBS) vyplývá, že analyzované rostlinné materiály technikou fs-LIBS jsou méně závislé na chemickém složení matrice [25].

J. Braga a kol. ve své studii porovnávali jednoduché a vícerozměrné kalibrační modely při analýze pelet rostlinných materiálů. V těchto peletách byly stanovovány prvky jako je B, Cu, Fe, Mn a Zn. Jako kalibrační standardy byly použity CRMs a dále vzorky se známou koncentrací analytů, které byly stanoveny pomocí ICP OES. Jako kalibrační vzorky byly použity následující CRMs BCR 60 (mech), GBW 07603 (větve a listy keře), IAEA 359 (zelí), IAEA 361 (sója), NIES 10-C (rýže), NIST 1567a (pšenice), NIST 1570a (špenát), atd.). Rostlinné materiály (nebo CRM) byly smíchány s třiceti hmotnostními procenty celulózy, rozemlety v kryogenním mlýnu a poté lisovány do pelet tlakem  $8 \text{ tun.cm}^{-2}$  po dobu 10 min. Ke kalibraci byly využity standardy o rozsahu koncentrace Zn 5,8 až  $313 \text{ mg.kg}^{-1}$ . Byl využit LIBS spektrometr s Nd:YAG laserem pracujícím na vlnové délce 532 nm, monochromátorem Echelle a kamerou ICCD. Energie pulzu byla 140 mJ a doba trvání 12 ns. Byly použity dvě oblasti vlnových délek: rozsah VUV (180 až 440 nm) a UV-VIS-NIR (278 až 820 nm). Do ablační komory byl přiváděn nepřetržitě proud argonu. V získaném spektru byly vybrány nejintenzivnější emisní čáry s vlnovou délkou pro B (I) 249,773 nm, Cu (I) 327,396 nm, Fe (II) 238,200 nm, Mn (II) 257,610 nm a Zn (II) 206,2 nm. Hodnoty LOD Zn byly vypočítány pomocí jednoduchého ( $4 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) a vícerozměrného regresního modelu ( $12 \text{ mg.kg}^{-1}$ ). Kalibrační závislosti získané pomocí metod vícerozměrné analýzy dat byly určeny jako robustnější. V kalibračním modelu pro prvky Cu a Zn byl pozorován výrazně nižší počet odlehlých hodnot. Pro omezení matričních vlivů byla navržena tvorba kalibračních modelů pro každou matici zvlášť [8].

Nejčastější technikou přípravy rostlinných materiálů je sušení, homogenizace pomocí kryogenního mletí s kapalným dusíkem a následné lisování do podoby pelet. Také lze analyzovat rostlinné listy hned po vysušení. Nejintenzivnější emisní čáry Zn v získaných LIBS spektrech měly vlnové délky 202,548 nm, 206,2 nm a 213,856 nm. Stanovené limity detekce pro Zn měly hodnoty od 0,2 až  $1,9 \text{ mg.kg}^{-1}$ , ale vyskytly se i hodnoty 4 až  $14 \text{ mg.kg}^{-1}$ .

### 1.2.2.2 Měkké tkáňové materiály

LIBS techniku lze využít k analýze zvířecích či lidských tkání, nejčastěji pro charakterizaci maligních tkáňových buněk nebo pro zobrazovací analýzu prvků v celém organismu nebo orgánech. V mnoha studiích se zvířecí tkáně lisují do pelet, což je jedna z nejjednodušších technik přípravy vzorku. Další často využívanou metodou přípravy je zmrazení v prostředí kapalného dusíku [19, 26].

J. R. Santos a kol. ve své studii pojednávají o analýze prvků (Na, K, Ca, Mg, P, Fe, Cu, Zn) v živočišných tkáních. K přípravě vzorků byly použity CRMs NRCC Dolt-3 (játra žraloka), BCR-CRM 186 (ledviny prasete), BCR-CRM 422 (svalovina tresky), NIST 1577b (játra skotu), NRCC Tort-2 (hepatopankreas humra). CRMs byly umlety v kryogenním mlýnu a následně byly lisovány tlakem  $2 \text{ tun.cm}^{-2}$ . Pelety měly tloušťku přibližně 3 mm a průměr 31 mm. Poté byly analyzovány LIBS spektrometrem s femtosekundovým laserem použitím 500 po sobě jdoucích laserových impulzů ve 3 různých oblastech. Do ablační komory byl kontinuálně přiváděn proud argonu. Využity byly ultrakrátké 40 fs pulzy generované Ti:safírovým laserem se zesílením čirpovaného impulzu (CPA) pracujícím na vlnové délce 800 nm s maximální energií jednoho pulzu  $840 \pm 20 \mu\text{J}$ . Frekvence opakování byla 90 Hz. Prvky Al, Sr a Zn lze stanovit pouze v toxických úrovních, limit detekce pro Zn byl  $203 \text{ mg.kg}^{-1}$  při nejintenzivnější vlnové délce 213,857 nm. Pro srovnávací účely byla využita metoda LA-ICP-MS. Přímá LA-ICP-MS analýza některých tkání (např. ledvin) je vhodnější. Byly vypočteny nižší hodnoty LOD pro Zn  $20 \mu\text{g.kg}^{-1}$  [26].

H. Imann a kol. ve své práci navrhuje techniku pro diagnostiku rakoviny a hodnocení jejího stupně včas, přesně a bezpečně. Cílem této studie bylo rozlišovat normální a maligní nádorové buňky z histologických preparátů tkání pomocí techniky LIBS. Třicet chirurgických vzorků tkání rakoviny prsu bylo náhodně získáno od pacientů ve věku od 30 do 65 let. Vzorky byly fixovány formalínem (10% formaldehyd ve vodě) a zality v parafinových bločcích, ze kterých byly nakrájeny mikrotromem plátky o velikosti  $4 \mu\text{m}$ . Tyto plátky byly barveny na sklíčku v hematoxylinu (zbarvuje jádro modrou) a eosinu (zbarvuje cytoplasmu a extracelulární matici pojivové tkáně růžovou). Histologické vzorky byly nakonec prohlédnuty pod mikroskopem a poté analyzovány pomocí LIBS spektrometru s Q-spínaným Nd:YAG laserem pracujícím na základní vlnové délce 1064 nm. Energie pulzu byla 350 mJ, doba trvání 10 ns a variabilní opakovací frekvence byla v rozmezí od 1 do 10 Hz. Byl použit spektrometr s monochromátorem Echelle a ICCD kamerou (Princeton, IMAX). V tkáňových vzorcích byl stanoven Zn, Cu, Fe, Mn a Ca. Každý vzorek byl měřen pětikrát na pěti různých místech. V získaném spektru byly vybrány nejintenzivnější

emisní čáry s vlnovou délkou 393,6 nm a 422,6 nm pro Ca, 388,6 nm pro Fe, 324,75 nm pro Cu, 334,5 nm pro Zn a 259,37 nm pro Mn. Využita byla technika kalibrační křivky. Byla použita srovnávací čára Ca s vlnovou délkou 393,36 nm ke snížení účinku fluktuační přístrojového signálu a vlivu interferencí matrice. Vápník se vyskytoval jako konstantní složka analyzovaného vzorku. Koncentrace těchto prvků byly významně vyšší v maligních než v normálních tkáních [27].

LIBS metodu lze využít pro mapování různých prvků. S. Moncayo a kol. použili techniku LIBS k multi-elementární analýze vzorků lidské kůže komplementárním a kompatibilním způsobem s mikroskopickým histopatologickým vyšetřením. Cílem studie bylo nalézt rozdíly v distribuci prvků P, Cu, Zn, Fe, Al, Mg, Na a Si ve vzorcích zdravé kožní tkáně, kožního melanomu (subkutánní metastázy), karcinomu z Merkelových buněk (MCC) a karcinomu z dlaždicových buněk (SCC). Vzorky tkání byly odebrány biopsií, poté byly fixovány formalínem a zality v parafinovém bločku. Před provedením LIBS analýzy byl tenký plátek (5  $\mu\text{m}$ ) parafinového bločku obarven hematoxylinem-eosinem-safranem (HES). Poté byla provedena LIBS analýza přímo na parafinovém bločku na tkáňové části s HES obarveným řezem. Použitý LIBS spektrometr byl vybaven Nd:YAG laserem pracujícím na základní vlnové délce 1064 nm. Energie jednoho pulzu byla až 2 mJ s dobou trvání 5 ns. Frekvence opakování byla 10 Hz. Byl použit spektrometr vybavený monochromátorem Czerny-Turner Shamrock 500 a ICCD kamerou 2048 x 512 pixelů a spektrometr Shamrock 303 s kamerou ICCD. Do ablační komory byl kontinuálně přiváděn proud argonu. Byly nalezeny rozdíly v distribuci prvků mezi různými typy nádorových vzorků. Prvky Ca, P, Na a Mg jsou přítomny jak ve zdravé části kůže tak i karcinomech. V MCC a SCC byly nalezeny vyšší koncentrace Ca, Zn, Na, P a Mg. Kompatibilita LIBS a histopatologických analýz umožňuje elementární zobrazení a identifikaci celé struktury kůže [28].

### **1.2.2.3 Vzorky kalcifikovaných tkání**

A. Hrdlička a kol. se zabývali LIBS analýzou kalcifikovaných tkání. Z holenní kosti (17- 18 století, Lukavice, Východní Čechy) byl diamantovou pilou uříznut plátek, který byl následně analyzován. Autoři práce se pokusili v laboratorních podmínkách napodobit situaci analýzy vzorků v terénu, např. archeologických vykopávek. Na Obrázku 4 lze vidět uspořádání LIBS systému. Byl využit LIBS spektrometr s Q-spínaným Nd:YAG laserem pracujícím na základní vlnové délce 532 nm. Energie jednoho pulzu byla 144 až 225 mJ s dobou trvání 9 ns. Frekvence opakování byla 10 Hz. K analýze byla využita Newtonová zrcadlová optická soustava se sférickým primárním zrcadlem a sekundárním

rovinným zrcadlem odrážejícím paprsek na vstupní otvor optického kabelu LLB592 (LOT-Oriel UK, Surrey, Anglie) a Galileův dalekohled se třemi čočkami, který zaostřuje laserový paprsek na vzorek vzdálený šest metrů. Spektrometr byl vybaven monochromátorem Czerny Turner s mřížkou (2400 drážek na mm) a detektorem CCD (Andor Technology, Belfast, Severní Irsko). Nejintenzivnější emisní čára Zn v získaném LIBS spektru měla vlnovou délku 330,29 nm. Jako standard byla využita kostní moučka NIST 1486 lisovaná do pelety. Pro referenční účely byla využita metoda LA-ICP-MS. Ve vzorku kosti byl stanoven P, Mg, Na, Zn a Sr. Následně byla provedena kvantitativní analýza. Intenzita signálu získaná po ablací vzorku kosti byla dělena intenzitou signálu standardu kostní moučky a vynásobena obsahem prvku ve standardu. Byl také vypočten limit detekce 1-2 mg.kg<sup>-1</sup> pro Zn a Sr. Získané výsledky technikou LIBS se shodovaly s výsledky metody LA-ICP-MS [29].



**Obrázek 4** - Schéma LIBS analýzy vzorku na větší vzdálenosti. Převzato a modifikováno z [29].

#### 1.2.2.4 Vzorky nehtů

D. Rusak a kol. ve své studii popisují stanovení prvků Mg, Zn, Ca v nehtech. Experimenty byly provedeny za účelem zjištění koncentrací daných prvků. Kvantitativní analýza je prováděna technikou kalibrační křivky, pro kalibraci přístroje byly použity dva typy standardů. V prvním případě byly připraveny standardy smícháním keratinového prášku s vodnými roztoky obsahujícími různé koncentrace požadovaných prvků. Takto smíchané standardy byly poté sušeny a lisovány do pelety. Keratinové standardy byly připraveny v koncentračním rozmezí od 50 až 1 000 mg.kg<sup>-1</sup> pro Mg, Zn a 100 až 5000 mg.kg<sup>-1</sup> pro Ca. Ve druhém případě byly použity filtrační papíry jako nosiče pro absorpci vodných roztoků obsahujících různé koncentrace požadovaných prvků. U obou typů standardů byla vypočtena teplota a elektronová hustota plazmatu. Po porovnání těchto parametrů byly zvoleny standardy připravené z filtračního papíru. Bylo zjištěno, že parametry u standardů připravených z filtračního papíru se lépe shodovaly s parametry vypočítanými u nehtů.

Vzorky nehtů byly pouze opláchnuty vodou. Použitý LIBS spektrometr byl vybaven Q-spínaným Nd:YAG laserem a ICCD kamerou (PI-Max, Princeton Instruments Inc., Trenton, NJ). Vlnová délka budícího záření byla 1064 nm, energie 20 mJ a délka trvání pulzu 7 ns. Zpoždění mezi laserem a detektorem bylo 1,0  $\mu$ s. Emise z indukované plazmy byla zaostřena objektivem f/2 s průměrem 50 mm do 0,30 m spektrometru (Spectra Pro 2300i, Princeton Instruments/Acton Research, Acton, MA). Nejintenzivnější emisní čáry Zn v získaném LIBS spektru měly vlnové délky 481 nm a 472,2 nm. Pro LIBS analýzu bylo použito pět laserových pulzů k odstranění jakékoliv možné kontaminace na povrchu nehtu a poté pět dalších pulzů na stejné místo pro vytvoření spekter. V lidských nehtech měl vápník koncentrace v rozmezí od 100 až 18 000  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  a hořčík od 50 do 250  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ . Stanovené koncentrace Zn měly hodnoty od 40 do 7000  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ , vyšší koncentrace byly zjištěny u osob, kteří pracují se zinkem [17].

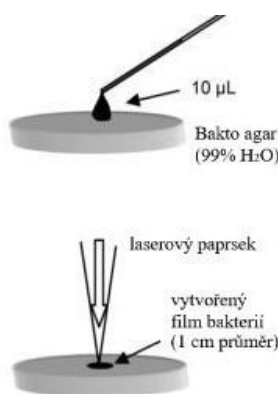
#### **1.2.2.5 Sol-gely**

V metodě sol-gel vznikají homogenní, amorfní, syntetické pevné látky (gely) gelováním koloidní suspenze pevných částic v kapalině (sol), vytvořené smísením prekurzoru kapalného kovu nebo prekurzoru alkoxidu metaloidu, jako je tetramethoxysilan s vodou, pomocným rozpouštědlem a kyselým nebo bazickým katalyzátorem. Metoda sol-gel nabízí jedinečnou možnost začlenit kovové složky do čisté nebo organicky modifikované anorganické matrice prostřednictvím různých metod, jako je elektrostatická interakce, adsorpce nebo kovalentní vazba. Vysušený gel získaný konvenčním tepelným sušením za atmosférického tlaku se nazývá xerogel. Procesy sol-gel jsou obzvláště dobře upraveny pro výrobu ZnO filmů, které mohou být následně analyzovány pomocí techniky LIBS. Přirozeně vysoká homogenita sol-gelů a velmi jednotná distribuce interních standardů přidávaných do vzorků během procesu sol-gel vede k významnému zlepšení přesnosti měření. Nezpochybnitelnou výhodou metody sol-gel je snadná a jednoduchá příprava vysoce homogenních kalibračních standardů v pevné formě. Kromě toho jsou sol-gelové prášky s různými koncentracemi analytů v průběhu času stabilní, mohou být skladovány a použity pro rychlou přípravu kalibračních standardů pro LIBS analýzu [13, 30-32].

#### **1.2.2.6 Vzorky gelů a agarů**

Studie, které popisují analýzu Zn v agaru pomocí LIBS neexistují. Pokud byly pomocí LIBS analyzovány vzorky agaru, šlo většinou o kvalitativní mapování za účelem identifikace bakterií nebo identifikace bakterií na základě tvaru spektra.

Q. Mohaidat a kol. identifikovali pomocí jednopulzní LIBS techniky nepatogenní bakterie *E. coli* a avirulentní bakterie *Streptococcus viridans* kultivované ve dvou různých živných médiích (trypton sójový agar, MacConkey agar). Bakterie byly identifikovány v různých metabolických stavech (živé, inaktivované na anabiotickém povrchu po vystavení baktericidnímu ultrafialovému záření a usmrcené autoklávováním). Odebrané bakteriální vzorky z živného média byly suspendovány v deionizované vodě a centrifugovány (5000 otáček za minutu) po dobu 3 minut. Polotekutá peleta obsahovala zhruba  $10^9$  bakterií na ml. Bakterie byly poté nanесeny na bakto-agar (Obrázek 5). Po přibližně třiceti minutách byla kapalina absorbována agarem a byla pozorována průhledná tenká vrstva bakterií. Využit byl LIBS spektrometr, který byl vybaven Nd:YAG laserem pracujícím na základní vlnové délce 1064 nm, monochromátorem Echelle a CCD detektorem. Energie pulzů byla 8 mJ. LIBS spektra pro *S. viridans* byla získána po jednom, šesti a devíti dnech a pro *E. coli* po jednom, čtyř, šesti a osmi dnech po nanесení na agar. K vyhodnocení dat byla použita statistická technika diskriminační funkční analýza (DFA). Byla porovnáována jednotlivá spektra. LIBS spektra *E. coli* a *S. viridans* se od prvního do posledního dne významně nezměnila. Procesy (UV záření, autoklávování a hladovění) zásadně nemění elementární složení bakterií, na kterém je založena klasifikace. Pro bakterie jsou důležité kationty  $\text{Ca}^{2+}$  a  $\text{Mg}^{2+}$ , které regulují životní funkce buněk a pórovitost membrány. Všechny vzorky bakterií jsou tedy rozlišitelné, protože si zachovávají rozpoznatelné spektrum. Klinické vzorky získané od infikovaných osob mohou být identifikovány na základě jejich LIBS spektra nezávisle na chemickém prostředí [33].



**Obrázek 5** - Postup přípravy bakterií pro LIBS analýzu. Převzato a modifikováno z [33].

Podobné fyzikálně chemické vlastnosti jako agar mají další typy vzorků např. guma, tuková mazadla, máslo nebo po úpravě i červené víno a mléko. Následující studie se zabývají kvalitativní i kvantitativní analýzou těchto vzorků [34-38].

Práce T. Borowika a kol. se zabývala kvantitativní LIBS analýzou Au a Fe ve feromagnetických nanočásticích použitím gelové matrice na bázi polymeru. Nanočástice  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  byly syntetizovány v argonové atmosféře smísením acetylacetonátu železitého, rozpuštěného ve fenyletheru s kyselinou olejovou a oleylaminem. Po přidání 1,2-hexadekandiolu byl roztok zahříván na teplotu 210 °C a poté ochlazen na laboratorní teplotu. Získané nanostruktury byly použity k přípravě nanočástic pokrytých zlatem. Příslušné množství octanu zlatitého, kyseliny olejové, 1,2-hexadekandiolu a oleylaminu bylo nejprve smíšeno s feromagnetickými nanostrukturami ve fenyletheru v atmosféře argonu. Roztok byl poté udržován při teplotě 180 °C. Po ochlazení roztoku na laboratorní teplotu byl přidán ethanol, aby se odstranil hydrofobní podíl vzorků. Byl získán tmavočervený materiál. Požadované množství prášku nanočástic ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ ) bylo rovnoměrně dispergováno ve známém množství nepolymerizované formy gelu. Směs byla poté ozařována UV zářením, aby se získala pevná matrice (vytvrzení gelu) obsahující imobilizované nanočástice pro LIBS měření. Byl využit LIBS spektrometr s Nd:YAG laserem pracujícím na vlnové délce 1064 nm, monochromátorem Czerny-Turner a CCD kamerou. Energie budícího záření byla 200 mJ, délka trvání pulzu 3 až 5 ns a frekvence opakování 2 Hz. Nejintenzivnější emisní čáry v získaném spektru měly vlnové délky 481,41 nm a 628,87 nm pro Au a 489,11 nm, 490,93 nm, 493,73 nm, 497,36 nm, 624 nm, 632 nm, 633 nm a 635 nm pro Fe. Kvantitativní analýza byla prováděna technikou kalibrační křivky. Byla připravena kalibrační křivka v rozsahu 0,5 až 4 hm % zlata a 0,5 až 7 hm % železa. Hodnoty obsahu Fe a Au ve vzorku získané pomocí techniky LIBS byly porovnávány s hodnotami získanými pomocí techniky ICP OES. Zjištěné rozdíly mezi výsledky jsou statisticky nevýznamné, k ověření byl využit Studentův t-test. Koeficient spolehlivosti byl  $\alpha = 0,01$ , tzn. 99,5 % interval spolehlivosti [39].

Práce B. Emdeho a kol. se zabývala hodnocením homogenity disperze Zn v syntetickém kaučuku pomocí techniky LIBS. Kvalita kaučukových výrobků závisí na správném smísení komponent. Oxid zinečnatý přidaný do kaučukové směsi podporuje tepelnou vodivost a zvýšení mechanické odolnosti pneumatik. Kaučukové vzorky byly analyzovány pomocí LIBS spektrometru s Nd:YAG laserem pracujícím na základní vlnové délce 1064 nm. Energie pulzu byla 100 mJ, doba trvání 8 ns a opakovací frekvence v rozmezí od 1 do 20 Hz. Spektrometr zaznamenával spektra v rozsahu vlnových délek od 314 do 977 nm. Do ablační komory byl kontinuálně přiváděn proud argonu. V LIBS spektru analyzovaného vzorku byly pozorovány čáry Zn s vlnovými délkami 328,2 nm, 330,3 nm, 334,5 nm, 468,0 nm, 472,2 nm a 481,1 nm. Také byly analyzovány referenční vzorky, které obsahovaly buď přírodní kaučuk nebo přírodní kaučuk a 10 phr (z anglického: parts per

hundred rubber) oxidu zinečnatého. V referenčních spektrech byla pozorována analytická čára Zn s vlnovou délkou 481,1 nm. Proto byla ke kvantitativní analýze vybrána pouze tato nejintenzivnější čára Zn. Kvantitativní LIBS analýza byla prováděna technikou kalibrační křivky. Byla připravena kalibrační řada o koncentracích 0,5, 1, 1,5, 5, 10 a 20 phr Zn. Kaučukové směsi byly smíchány se Zn při 40 a 70 otáčkách za minutu. Byl vypočten variační koeficient vzorku A (40 otáček za minutu) 26,3 až 37,0 % a vzorku B (70 otáček za minutu) 6,7 až 12,6 %. Nižší variační koeficient označuje homogenní disperzi zinku v kaučukové směsi. Pro srovnávací účely byla využita metoda ED XRF. Výsledky získané technikou LIBS se shodovaly s výsledky metody ED XRF. U vzorku A (analýza ED XRF) byly pozorovány aglomeráty Zn, nedošlo tedy k homogenní disperzi zinku. Ze všech výsledků vyplývá, že pokud byl vzorek kaučukové směsi smíchán se Zn při vyšších otáčkách za minutu, došlo k homogenní disperzi zinku [37].

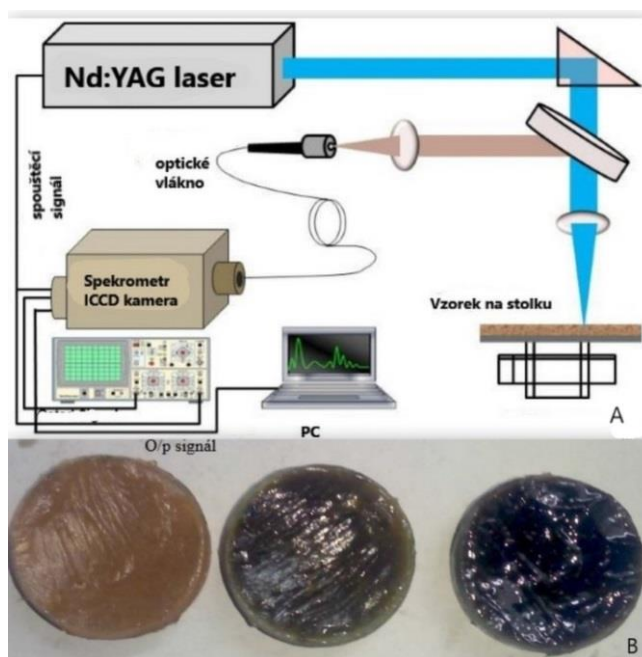
B. Sezer a kol. metodou LIBS analyzovali vzorky kravského, kozího a ovčího mléka. Autoři práce se snažili pomocí analýzy elementárního složení vzorků mléka odhalit podvod spočívající v přidávání méně jakostního druhu mléka do mléka více jakostního. Vzorky mléka byly získány z různých farem. Následně byly homogenizovány a přeměněny na gely použitím želatiny. Do kádinky bylo nalito pět mililitrů mléka a byly přidány 4 g želatiny. Tato směs byla nalita do Petriho misek a ponechána po dobu 15 minut, dokud nebyl vytvořen gel. Dále byly vzorky ponechány při teplotě 4 °C po dobu 45 minut. Konečný vzorek měl tloušťku přibližně 3 mm a byl připraven k LIBS analýze. Pro kvantitativní analýzu byly připraveny směsi jednotlivých mlék. Pro kalibraci bylo do kozího a ovčího mléka přidáno 2,5 až 60 % (v/v) kravského mléka s krokem po 2,5 %. Pro validaci LIBS metody byla připravena samostatná sada směsných vzorků mlék přidavkem 1 až 62 % (v/v) kravského mléka do mléka ovčího a kozího. Z těchto směsí byl vytvořen gel stejným způsobem jako u dříve zmíněných neznámých vzorků. Použitý LIBS spektrometr byl vybaven Q-spínaným Nd:YAG laserem a 5-kanálovým spektrometrem Aurora (Applied Spectra, Fremont, CA, USA), který zaznamenával spektra v rozsahu od 186 do 900 nm. Vlnová délka budícího záření byla 1064 nm a energie pulzu 36 mJ. Frekvence opakování byla 8 Hz. Každý vzorek byl analyzován dvakrát. K vyhodnocení naměřených dat byla využita technika PCA. Ve vzorcích byly identifikovány prvky jako je C, Mg, Ca, CN, Na, H, N, K a Zn. Kalibrační závislost pro LIBS pak byla získána pomocí techniky PLSR. Pro metodu určenou ke stanovení koncentrace kravského mléka v mléce ovčím byla určena hodnota LOD 1,29 % a RSD 7,75 % a pro metodu měření koncentrace kravského mléka v kozím mléce bylo LOD 1,39 % a RSD 7,16 %. Koncentrace jednotlivých prvků ve vzorcích mlék byly stanoveny metodou

plamenové AAS (FAAS) s použitím plynů acetylen/vzduch. Jako technika přípravy vzorku byla využita mikrovlnná mineralizace, kde bylo k 1 ml mléka přidáno 8 ml HNO<sub>3</sub> a 2 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Kalibrační standardy byly připraveny zředěním standardních roztoků 1 000 mg.l<sup>-1</sup>. Analyzováno bylo osm vzorků kravského mléka, kde se koncentrace Zn pohybovala od 2,6±0,2 do 4,0±0,4 μg.ml<sup>-1</sup>, devět vzorků kozího mléka s obsahem Zn od 2,3±0,1 až 6,6±1,7 μg.ml<sup>-1</sup> a osm vzorků ovčího mléka, kde se koncentrace Zn pohybovala od 3,2±0,4 do 6,7±0,4 μg.ml<sup>-1</sup>. Autoři konstatovali, že tvorba gelu a následná aplikace LIBS techniky může být užitečným nástrojem pro kontrolu kvality v mlékárenském průmyslu [34].

Studie H. Temize a kol. se zabývala detekcí podvodného mísení vzorků másla s levnými rostlinnými a živočišnými tuky. Pro elementární LIBS analýzu bylo použito 12 různých vzorků másla a 5 vzorků margarínu různých značek. Z každého vzorku másla a margarínu byl vytvořen homogenní vzorek (šířka 2,5 cm, délka 4 cm a výška 1,5 cm). Pro kvantitativní analýzu byla využita směs másla a margarínu připravená smísením různých značek vzorků másla a margarínu při laboratorní teplotě. Pro kalibraci bylo do másla přidáno 5 až 50 % (w/w) margarínu, přičemž konečná hmotnost vzorku byla 400 mg. Pro validaci LIBS metody byla připravena směs vzorků přidavkem 10 až 50 % (w/w) margarínu do másla. Každý vzorek byl analyzován třikrát a všechny vzorky byly uchovávány zmrazené při -18 °C až do LIBS analýzy. Byl využit LIBS spektrometr s Q-spínaným Nd:YAG laserem pracujícím na vlnové délce 1064 nm a 5-kanálovým spektrometrem Aurora (Applied Spectra, Inc., Fremont, CA). Spektrometr zaznamenával spektra v rozsahu 186 až 900 nm. Energie pulzu byla 40 mJ a opakovací frekvence byla 8 Hz. K vyhodnocení naměřených dat byla využita technika PCA. Ve vzorcích másla a margarínu byl stanoven obsah mikronutrientů a stopových prvků (Na, K, Ca, Mn, Fe a Mg). Prvky Cu, Cr, Ni a Zn byly ve vzorcích v relativně nižších koncentracích. Vzorky margarínu jsou bohatší na prvky Na, K a Fe v porovnání se vzorky másla. Podíl Ca, Mg, Cu, Cr, Mn a Ni v margarínu je nižší než u vzorků másla. Kalibrační závislost pro LIBS pak byla získána pomocí techniky PLS. Pro metodu určenou ke stanovení koncentrace margarínu v másle byla určena hodnota LOD 3,9 % a RSD 11,3 %. Koncentrace jednotlivých prvků ve vzorcích másel a margarínu byly stanoveny pomocí metod FAAS a ICP MS. Jako technika přípravy vzorku byla využita mikrovlnná mineralizace, kde bylo k 0,1 g vzorku přidáno 7 ml HNO<sub>3</sub> a 1 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Všechny kalibrační standardní roztoky byly připraveny z multielementárního standardního roztoku Cu, Cr, Mn, Fe, Ni, Zn a Mg (roztok v 2 % HNO<sub>3</sub>) a <sup>45</sup>Sc a <sup>72</sup>Ge (1 000 mg.l<sup>-1</sup> v 5 % HNO<sub>3</sub>) byly použity jako interní standardy. Rozsah kalibrační řady pro ICP MS byl 0,5 až 500 μg.l<sup>-1</sup> a pro FAAS byl 0,25 až 5 mg.l<sup>-1</sup>. Analyzováno bylo pět vzorků margarínu, kde se koncentrace

Zn pohybovala od 8 až 95  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  a dvanáct vzorků másla s obsahem Zn od 3 až 400  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  [38].

Předmětem studie CH. Dhimana a kol. bylo sledování nárůstu koncentrace vybraných prvků (Fe, Cu, Ba, Mg, Mn, Ni, S, Si, Pb, Ti, Ca a Al) v tukových mazadlech v důsledku opotřebení strojních součástí (motory a ložiska kolejových vozidel). Mimo jiné byl v rámci dané studie sledován i nárůst koncentrace Zn, který byl naměřen na analytické čáře Zn o vlnové délce 481,091 nm. Nové, mírně a velmi používané vzorky tukových mazadel byly nanášeny na skleněné Petriho misky a na sklíčka (Obrázek 6). Vzorek tuku byl odebrán čistou skleněnou tyčkou a byl rovnoměrně rozprostřen na sklíčko. Byla vytvořena vrstva o tloušťce 6 mm. Vzorky tukových mazadel byly analyzovány pomocí LIBS spektrometru s Nd:YAG laserem pracujícím na základní vlnové délce 1064 nm. Energie pulzu byla 50 mJ, doba trvání 6 ns a variabilní opakovací frekvence byla 1 Hz. Byl použit spektrometr (Andor, SR303i) vybavený mřížkou (1800 drážek na mm) a ICCD kamerou (Andor, iStar720-25-U). Spektrometr snímal rozsah vlnových délek 200 až 700 nm. LIBS spektra vzorků byla porovnána s emisními spektry prvků v databázi NIST. V LIBS spektrech nových tukových mazadel byly pozorovány převážně čáry Ca, Al a Na. Ve velmi využívaném vzorku tukového mazadla byly prvky (Fe, Cu, Ba, Mg, Mn, Ni, S, Zn, Si, Pb, Ti, Ca) stanoveny v koncentracích  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  nebo  $\text{mg.kg}^{-1}$  především v důsledku opotřebení či jakékoliv poruše části stroje při nedostatku mazání. Techniku LIBS lze využít k *in situ* analýze maziva v ložiscích a motorech kolejových vozidel [36].



**Obrázek 6** - Uspořádání systému LIBS (A) a jednotlivé vzorky nových, mírně a velmi použitých tukových mazadel (B). Převzato a modifikováno z [36].

### 1.3 Testování toxicity nanočástic oxidu zinečnatého a chloridu zinečnatého na roupicích *Enchytraeus crypticus* v agarosovém gelu

Kovy jsou přítomny ve vodním i půdním prostředí v důsledku přírodních a antropogenních procesů, díky zemědělské činnosti, kde se široce využívají hnojiva a pesticidy obsahující kovy. Základní kovy (Cu, Mn, Ni, Zn) hrají zásadní roli v různých biochemických a fyziologických procesech v živých organizmech. Příliš nízká koncentrace esenciálního kovu může vést k nedostatku, zatímco příliš vysoká koncentrace může způsobit toxické účinky. I když je Zn nejdůležitější stopový prvek v těle (po Fe) pro většinu organismů je po překročení určité koncentrace toxický.

Tradičně se ekotoxické účinky měří za použití standardních metod, založených především na akutní (úmrtnosti) a chronické reakci (reprodukcí nebo bioakumulace) citlivého biologického indikátoru. V současné době se na standardizované zkoušky ekotoxicity mimo jiné často využívají půdní bezobratlí, jako jsou žížaly (*Eisenia andrei* nebo *E. fetida*), chvostoskoci (*Folsomia candida*), roupice nebo dravý roztoč (*Hypoaspis aculeifer*). Čeleď roupicovití *Enchytraeidae* (kmen kroužkovci *Annelida*, třída máloštětinatci *Oligochaeta*, rod roupice *Enchytraeus*) jsou červi s průměrnou velikostí 20 mm žijící v mnoha typech půd ve svrchních vrstvách. Roupice reagují velmi citlivě na organické (pesticidy) a anorganické (kovy) látky. Patří mezi modelový organismus pro ekotoxikologické testy a slouží jako indikátor včasného varování změn ve složení a fungování ekosystému půdy. Nejznámější druhy tohoto rodu je *Enchytraeus albidus* a *Enchytraeus crypticus*. *E. crypticus* má kratší generační dobu, větší počet narozených mláďat a širší rozsah tolerance na různých půdách (pH, struktura a obsah organického materiálu) proto se využívá ke spolehlivému a rychlejšímu testu toxicity. *E. crypticus* byl vybrán jako testovací organismus v mé experimentální části práce [40-42].

Práce K. Hrdé a kol., z níž vycházejí některé postupy v experimentální části mé práce, se zabývala testováním nanočástic oxidu zinečnatého (ZnO-NP) a rozpustné soli ZnCl<sub>2</sub> na roupicích *E. crypticus* v agarosovém gelu. Byl studován vliv metody vnášení NPs na výslednou velikost aglomerátů. End-pointem ekotoxikologických testů byla mortalita *E. crypticus*. K rozlišení mezi účinkem samotných ZnO-NPs a uvolněných iontů Zn<sup>2+</sup> byl nejprve proveden test se ZnCl<sub>2</sub>. Expoziční média byla připravena přidáním 1 g suché agarózy do 49 ml roztoku ZnCl<sub>2</sub> v demineralizované vodě a mícháním směsi magnetickým míchadlem při teplotě 85 ± 5 °C po dobu 1 hodiny. Byla provedena předběžná zkouška s širokým rozsahem testovaných koncentrací (0, 50, 100, 200, 500 a 1 000 v mg ZnO-NP na kg agaru).

Koncentrace  $\text{ZnCl}_2$  ve vodných roztocích byly zvoleny tak, aby obsah Zn v médiích odpovídal obsahu Zn v testech se ZnO-NP. Horké agaróзовé médium bylo následně nalito do plastových Petriho misek. Koncentrace Zn byly ověřeny pomocí ICP OES. Bylo odebráno 15 vzorků z různých míst a hloubek (povrch, spodní část agaru v misce, ve vrstvě na víku) v každé testované koncentraci. Deset dospělých roupic s viditelnými vajíčky v oblasti opasku bylo umístěno do každé Petriho misky a udržováno ve tmě při 20 °C po dobu 96 hodin. Pro každou testovanou úroveň koncentrace včetně kontroly byly provedeny tři nezávislé opakování. 100% mortalita byla pozorována při 100 mg  $\text{Zn}^{2+}$  na 1 kg agaru, proto byly zvoleny koncentrace 0, 2, 4, 6, 10, 20, 40 a 60 mg  $\text{Zn}^{2+}$  na kg agaru. Byly použity dva způsoby zavádění prášku ZnO-NP do expozičního media. V prvním případě bylo nejprve provedeno kryogenní mletí 1 g suchého agaru (agaróza) s vhodným množstvím nano-prášku ZnO-NP. Získaný prášek byl převeden do Erlenmeyerovy baňky a potom bylo přidáno 49 ml demineralizované vody. Směs byla míchána 1 hodinu při teplotě  $85 \pm 5$  °C. Roupice *E. crypticus* byly vystaveny koncentracím ZnO-NPs 0, 50, 100, 200, 500 a 1 000 mg.kg<sup>-1</sup> agaru po dobu 96 hodin. Druhý způsob přípravy experimentálního média byl založen na resuspendování odpovídajícího množství koloidního roztoku nanočástic v 20 ml demineralizované vodě za přítomnosti 4 mg dispergačního činidla (dekahydrát pyrofosforečnanu sodného) a získaná suspenze byla sonikována (Bandelin, Sonorex) po dobu 45 min. Následně bylo přidáno 6 mg dispergačního činidla k 1 g suché agarózy a získaná směs byla míchána ve 29 ml vody a zahřívána na  $85 \pm 5$  °C. Tato teplota byla udržována po dobu 45 minut a poté byl po dobu 15 minut po kapkách přidán koloidní roztok ZnO. Pokračování testu bylo jako u  $\text{ZnCl}_2$  s roupicemi. Relativní mortalita u roupic pozorovaných po 96 hodinách po vystavení koncentracím ZnO-NP 50, 100, 200, 500 a 1 000 mg.kg<sup>-1</sup> v kryogenně mletém médiu se pohybovala mezi 28,9 a 34,4 % a nevykazovala žádnou koncentrační závislost. Při použití druhého způsobu přípravy expozičních médií se relativní úmrtnost pohybovala v rozmezí 0 až 66,6 % v téže koncentrační oblasti v závislosti na koncentraci. Vzorky agarového média s koncentrací 50 a 1 000 mg.kg<sup>-1</sup> ZnO-NP byly charakterizovány SEM (JSM-5500LV, JEOL, Japonsko) pomocí ED XRF (detektor GRESHAM Sirius 10). V průběhu přípravy vzorků byl horký agaróзовý gel nalit mezi dvě sklíčka a ochlazen. Agarová vrstva o tloušťce 3 mm byla lyofilizována při teplotě nižší než -50 °C a tlaku pod 60 Pa po dobu 6 hodin. Následně byly vzorky skenovány 10 kV. Za účelem stanovení množství uvolněného  $\text{Zn}^{2+}$  byly připraveny stabilizované a nestabilizované série s testovanými koncentracemi ZnO-NP, které byly stanoveny po 10 minutách a 96 hodinách po sonikaci. Poté bylo 20 ml koloidního roztoku centrifugováno po dobu 120 minut

při 11 000 g a supernatant byl následně analyzován za použití ICP OES. Pomocí SEM byla zjištěna přítomnost velkých aglomerátů (průměr 1 až 10  $\mu\text{m}$ ) v médiu připraveném kryogenním mletím s nejvyšší koncentrací ZnO-NP. Aglomeráty u nižších koncentrací ZnO-NP a u média připraveného z koloidních roztoků nepřesahovaly 100 nm. Experimentálně zjištěná hodnota  $\text{LC}_{50}$  (střední letální koncentrace) pro rozpuštěný  $\text{Zn}^{2+}$  činila  $37,2 \text{ mg.kg}^{-1}$  v agaru. Stejná koncentrace Zn indukovala přibližně 30 % úmrtnost *E. crypticus*, pokud byla podávána ve formě kryogenně mletých ZnO-NP s agarem. Nebyly zjištěny žádné pozorovatelné účinky, pokud bylo expoziční médium připraveno z koloidního roztoku. Koncentrace Zn v nestabilizovaných vzorcích analyzovaných 10 min po přípravě se pohybovala mezi  $2,2$  a  $8,1 \text{ mg.l}^{-1}$  a po 96 hodinách mezi  $2,9$  a  $6,8 \text{ mg.l}^{-1}$ . Koncentrace Zn v stabilizovaných vzorcích, které byly analyzovány 10 minut po přípravě koloidů, se pohybovaly mezi  $17,7$  a  $20,3 \text{ mg.l}^{-1}$ , což neodpovídá celkovému množství ZnO-NPs v koloidech ( $50$  až  $1\,000 \text{ mg.l}^{-1}$ ). Podobné koncentrace v rozmezí od  $15,3$  a  $19,2 \text{ mg.l}^{-1}$  byly měřeny také po 96 hodinách. Vyšší množství iontů bylo uvolněno ze stabilizovaných částic s menší velikostí a při nejnižší koncentraci. Podle SEM bylo zjištěno, že většina Zn byla přítomna ve formě aglomerátů menších než  $500 \text{ nm}$  v médiu s koncentrací ZnO-NPs  $1\,000 \text{ mg.kg}^{-1}$  agaru a menších než  $200 \text{ nm}$  v médiu s koncentrací ZnO-NPs  $50 \text{ mg.kg}^{-1}$  agaru. Bylo zjištěno, že toxicita Zn ve formě ZnO-NP je podstatně nižší než toxicita  $\text{ZnCl}_2$ . Použití agaru místo půdy nebo sedimentu je výhodné, pokud jde o analýzu či charakterizaci NPs v expozičních médiích, snížení aglomerace a vyloučení interakcí se složkami půdy [43].

## 2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 2.1 Vzorky

Z centra pro výzkum toxických látek v prostředí (RECETOX, Masarykova univerzita, Brno) byly získány vzorky roupic *Enchytraeus crypticus*. Chov roupic byl prováděn v plastových Petriho miskách s ventilačními výstupky (Fisherbrand, PS, aseptické, 90 x 14,2 mm, Fisher Scientific, USA, Obrázek 7). Organismy *E. crypticus* byly krmeny dvakrát týdně jemně mletými ovesnými vločkami (Country Life, Česká republika) sterilizovanými v laboratorní peci Memmert UN55 Single DISPLAY (Memmert, Německo) při teplotě 180 °C po dobu dvou hodin. Petriho misky obsahující roupice byly uchovávány ve tmě v klimatizovaném boxu WTW TS 606 CZ/2 (WTW, Česká republika) při teplotě  $21 \pm 2$  °C. Pro testy byly použity dospělé *Enchytraeus crypticus* s dobře vyvinutým opaskem s viditelnými vajíčky.



**Obrázek 7** - Chov kroužkoců *Enchytraeus crypticus* v plastové Petriho misce

### 2.2 Použité chemikálie

Chlorid vápenatý dihydrát p.a.-  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (PENTA s. r. o., ČR),

Síran hořečnatý heptahydrát -  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (PENTA s. r. o., ČR),

Hydrogenuhlíčan sodný -  $\text{NaHCO}_3$  (PENTA s. r. o., ČR),

Chlorid draselný -  $\text{KCl}$  (PENTA s. r. o., ČR),

Standardní roztok Zn o koncentraci  $1\,000\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  v 4%  $\text{HNO}_3$  (SCP Science, Kanada),

Chlorid zinečnatý -  $\text{ZnCl}_2$  (PENTA s. r. o., ČR),

Kyselina chlorovodíková p.a. (Lachner, ČR),

Hydroxid sodný p.a. (PENTA s. r. o., ČR),

Deionizovaná voda, destilovaná voda,  
Hydroxid tetramethylamonný 25 % (Sigma-Aldrich),  
Kyselina dusičná 65% p.p. (PENTA s. r. o., ČR)

### **2.3 Ostatní laboratorní pomůcky a nádobí**

Parafilm® M, Bemis,  
Oboustranná lepicí páska,  
Filtreační papír, střední filtrační rychlost KA 4 (papírna Perštejrn s.r.o. ČR),  
Skleněné odměrné baňky, kádinky, Pasteurovy pipetky, odměrné válce, lžička, Petriho misky,  
stříčka, štěteček, plastové zkumavky, mikrozukavky, lak na vlasy (Balea Trend it Up)

#### **Software:**

Obslužný software pro LIBS Atilla2pro (Elvatech, Kyjev, Ukrajina)

Obslužný software pro ED XRF ElvaX

Microsoft Excel 2013

### **2.4 Přehled použitých přístrojů**

Kompaktní LIBS spektrometr LEAS500 (SOLAR TII, LTD, Minsk, Bělorusko),  
Energiově disperzní rentgenfluorescenční spektrometr ElvaX (Elvatech, Kyjev, Ukrajina),  
ICP OES spektrometr Integra XL 2 (GBC, Austrálie),  
pH metr, CyberScan PC 300 Eutech Instruments,  
Oxymetr, CyberScan DO 300 Eutech Instruments,  
Váhy VIBRA SA-120CE (Shinko Denshi Co., Ltd., Japonsko),  
Váhy New Classic, MS semimikro (Mettler Toledo, Švýcarsko),  
Míchačka magnetická s ohřevem, řady VMS Advanced (VWR Collection),  
Ultrazvuková lázeň Powersonic UCC1 (Slovensko),  
Automatické pipety BIOHIT PRO LINE

### **2.4.1 Laserový optický emisní spektrometr LEA-S500**

LEA-S500 je kompaktní LIBS spektrometr, který využívá nanosekundový dvoupulzní Q-spínaný Nd:YAG laser, který emituje záření o základní vlnové délce 1064 nm. Laser pracuje s maximální opakovací frekvencí 20 Hz a emituje dva kolineární pulzy o trvání 12 ns. Zpoždění mezi dvěma po sobě jdoucími pulzy je nastavitelné v rozmezí 0 až 20  $\mu$ s. Energie pulzu se pohybuje v rozmezí od 80 do 150 mJ. Sekvenční monochromátor v uspořádání Czerny Turner má ohniskovou vzdálenost 500 mm a hustotu mřížky 1800 vrypů na 1 mm. Spektrometr umožňuje záznam spektra v rozsahu vlnových délek 170 až 800 nm v jednotlivých analytických oknech o šířce 30 nm. Záznam spektra zprostředkovává spektrometr v kombinaci s CCD detektorem, který detekuje spektrální oblast 170 až 1100 nm při rozlišení 2048 x 14 pixelů. Integrační čas detektoru je 1  $\mu$ s. LIBS je vybaven ablační komorou, kde se nachází motorizovaný posuvný stůl pro uchycení vzorku. Ablace komora je vyplněna vzduchem, ale nachází se zde i ventil, který umožňuje odděleně plnit vzorkový prostor i spektrometr proplachovacím inertním plynem (helium, argon). LIBS spektrometr je ovládán počítačem pomocí softwaru Atilla2pro.

### **2.4.2 Rentgenfluorescenční spektrometr ElvaX**

ElvaX (Elvatech Ltd., Ukrajina) je stolní energiově-disperzní XRF (rentgenofluorescenční) spektrometr umožňující analýzu prvků v rozsahu od Na po U. Přístroj je vybaven Rh rentgenkou o maximálním výkonu 5 kW a polovodičovým Si-pin detektorem s termoelektrickým chlazením, který na čáře 5,9 keV poskytuje rozlišení 200 eV. Přístroj je ovládán počítačem pomocí software ElvaX.

## 2.5 Volba vhodného nosiče vzorku a výběr analytické čáry Zn

LIBS spektrometr LEA S500 má přívod budícího záření umístěn pod vzorkovým prostorem, vzorek je tedy ozařován zespoda. V případě analýzy malých tkáňových vzorků je tedy třeba nalézt nosič, na němž by takový vzorek mohl být funkčně a bezpečně vkládán do přístroje. Pro uchycení vzorku bylo testováno několik typů lepicích pásek (viz. Tabulka 1). K základním nárokům na nosič patřilo, aby neobsahoval nadměrné množství analyzovaného prvku (Zn) a také jiných interferujících prvků a zároveň aby uchycení vzorku bylo dostatečně pevné.

**Tabulka 1** - Volba vhodného nosiče vzorku

<b>Lepicí pásky</b>	<b>Výrobce</b>
Hliníková páska	Blue Dolphin Tapes (XL TAPE INTERNATIONAL)
Oboustranná kobercová páska	Blue Dolphin Tapes (XL TAPE INTERNATIONAL)
DUCT TAPE textilní páska	Blue Dolphin Tapes (XL TAPE INTERNATIONAL)
Maskovací páska Scapa 9080s	Blue Dolphin Tapes (XL TAPE INTERNATIONAL)
Oboustranná lepicí páska	ULith – Německo

Přítomnost analytu a interferujících prvků v pásce byla zjišťována s využitím příslušných LIBS spekter. Na základě dřívějších zkušeností s analýzou podobného typu materiálu byly zvoleny následující podmínky LIBS spektrometru: dvoupulzní režim, počet analytických bodů 1, počet pulzů na jeden analytický bod 2, šířka vstupní štěrby spektrometru 80  $\mu\text{m}$ , energie laserového pulzu 98,6 mJ a průměr výstupní štěrby budícího paprsku 300  $\mu\text{m}$ .

Použitý LIBS spektrometr umožňuje snímání spekter v okně o šířce 30 nm. Obslužný software spektrometru nabízí pro analýzu Zn čáry, jejichž souhrn je uveden v Tabulce 2. Řešený analytický úkol předpokládá stanovení Zn na hraně detekčního limitu metody, proto byly testovány dva rozsahy vlnových délek 315 – 345 nm a 192 – 222 nm, které obsahovaly čáry s největší hodnotou relativní intenzity signálu.

**Tabulka 2** - Analytické čáry Zn ze spektrální knihovny obslužného programu LIBS spektrometru

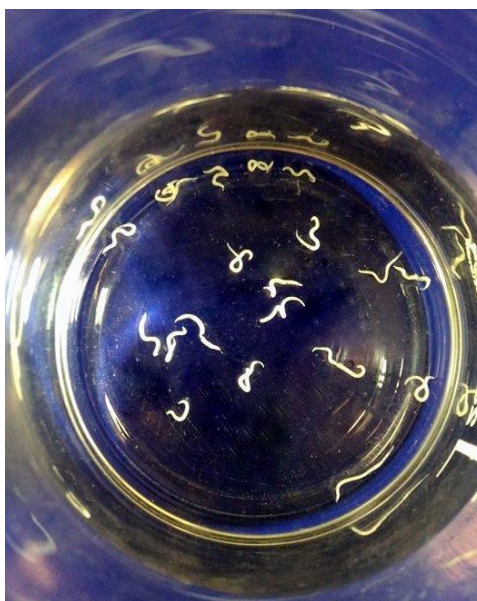
<b>Vlnová délka analytické čáry Zn [nm]</b>	<b>Ionizace</b>	<b>Potenciál [eV]</b>	<b>Relativní intenzita [<math>Ls^{-1}</math>]</b>
202,6	2	6,1	200
206,2	2	6	500
213,9	1	5,8	800
250,2	2	0	1 000
255,8	2	10,9	1 000
328,2	1	7,8	500
330,3	1	7,8	800
334,5	1	7,8	800
468	1	6,7	300
472,2	1	6,7	400
481,1	1	6,7	400
636,2	1	7,7	100
202,5	2	0	500

## 2.6 Příprava tkáňových vzorků pro optimalizaci LIBS

### 2.6.1 Expozice roupic v roztoku $Zn^{2+}$

Pro přípravu tkáňových vzorků se vzrůstající koncentrací Zn ve vhodném rozsahu byl nejprve testován postup expozice roupic Zn, který byl odvozen od testu akutní toxicity na roupicích *Enchytraeus crypticus* ve vodním prostředí. Nejprve bylo připraveno ředící médium (rekonstituovaná voda) ze čtyř zásobních roztoků (chlorid vápenatý dihydrát, síran hořečnatý heptahydrát, hydrogenuhličitan sodný a chlorid draselný). Bylo změřeno pH rekonstituované vody ( $6,5 \pm 0,5$ ). Rekonstituovaná voda byla aerována přes noc při laboratorní teplotě 23 až 25 °C. Takto připravená rekonstituovaná voda byla následně použita k ředění zásobního roztoku o koncentraci Zn  $1\,000\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  ve 4%  $\text{HNO}_3$ , čímž byla připravena řada živných roztoků o koncentraci Zn 600, 750, 850, 900, 925 a  $950\ \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ . Do kádinek s živnými roztoky (a rekonstituovanou vodou bez přídavku Zn) bylo umístěno vždy 20 dospělých roupic s viditelným opaskem a s vajíčky (Obrázek 8).

Koncentrace Zn v naexponovaných roupicích byla ověřena pomocí techniky ICP OES. Po ukončení expozice byly roupice vloženy do destilované vody a následně přeneseny na filtrační papír. Poté bylo dvacet roupic zváženo a vloženo do plastových mikrozkušavek. K roupicím byl přidán 1 ml 25 % hydroxidu tetramethylamonného. Mikrozkušavky byly vloženy na 15 min do ultrazvukové lázně a následně byly uchovány při teplotě 5 °C. Rozklad roupic trval 24 hod, poté byly mikrozkušavky doplněny 9 ml ultračisté vody a v takto získaném roztoku byla pomocí ICP OES stanovena koncentrace Zn.



**Obrázek 8** - Dvacet dospělých roupic *Enchytraeus crypticus* v kádince s živným roztokem

## 2.6.2 Obohacování tkáňových vzorků roupic Zn

Expozice roupic Zn postupem popsáním v kapitole 2.6.1 poskytovala vzorky s nízkým koncentračním rozpětím analytu, které by nebylo možné použít ke kalibraci LIBS spektrometru. Proto byl následně testován i postup obohacování tkáňových vzorků roztokem  $ZnCl_2$ . V Petriho misce byly rozplaveny roupice, které byly nabrány štětečkem ze zásobní kultury. Roupice byly zváženy a poté byly umístěny do plastové mikrozkušavky. Ke sto živým roupicím (cca 60 mg) bylo přidáno 100  $\mu$ l zásobního roztoku  $ZnCl_2$  rozpuštěného v destilované vodě. Koncentrace Zn v roztoku  $ZnCl_2$  a teoretická koncentrace Zn v takto obohacených tkáňových vzorcích jsou shrnuty v Tabulce 3. Při výpočtu teoretické koncentrace Zn v obohacených tkáňových vzorcích byl brán v úvahu obsah Zn v neexponovaných roupicích, který byl změřen pomocí ICP OES postupem popsáním v kapitole 2.6.1. Koncentrace Zn v neexponovaných roupicích byla 178,3  $mg \cdot kg^{-1}$ .

**Tabulka 3** - Koncentrační řada obohacených vzorků roupic pro optimalizaci podmínek LIBS analýzy

Koncentrace Zn v roztoku $ZnCl_2$ [ $mg \cdot l^{-1}$ ]	Hmotnost 100 roupic [mg]	Koncentrace Zn v roupicích [ $mg \cdot kg^{-1}$ ]
-	58,9	178,3
13,6	50,1	236,8
26,2	50,8	258,3
52,3	50,2	313,5
78,5	54,3	337,9
104,6	52,6	398,2
130,8	51,3	459,8

## 2.6.3 Příprava tkáňových vzorků roupic k analýze

Po ukončení 72 hodinové expozice byly naexponované roupice opláchnuty v destilované vodě a následně sušeny na vzduchu nalepené na oboustranné lepicí pásce s nízkým obsahem zinku. Takto připravený vzorek je znázorněn na Obrázku 9. Je z něho zřejmé, že vzorky vykazovaly nízkou míru homogenity, tvořily se vrstvy a shluky jednotlivých roupic.



**Obrázek 9** - Tkáňový vzorek 20 roupic po usušení

Pro zlepšení analytických vlastností vzorku byly roupice hned po vyndání na lepicí pásku zafixovány lakem na vlasy (Balea Trend it Up), jak lze vidět na Obrázku 10. Byla vytvořena jednolitá vrstva roupic a bylo dosaženo vhodné prostorové homogenity.



**Obrázek 10** - Tkáňový vzorek 20 roupic po usušení a nanesení laku

Vlastnosti vzorků připravených dvěma výše uvedenými postupy byly ověřeny pomocí LIBS. K tomu byl využit tkáňový vzorek roupic o hmotnosti 50,1 mg o koncentraci Zn 236,8 mg.kg<sup>-1</sup>, který byl analyzován za následujících podmínek: počet analytických bodů 1, počet pulzů na jeden analytický bod 2, dvoupulzní režim, šířka vstupní štěrby spektrometru 80 μm, energie laserového pulzu 98,6 mJ a průměr výstupní štěrby budícího paprsku 300 μm. Vzorek roupic byl nejprve analyzován bez zafixování a následně po zaschnutí laku. Tento vzorek byl proměřen 3 krát. Byly porovnávány intenzity analytických čar Zn v získaných spektrech. Hodnocena byla také hodnota RSD (relativní směrodatná odchylka) vypočtená z průměrných intenzit analytických čar Zn s vlnovými délkami 202,6 nm, 206,2 nm, 213,9 nm a hodnota odstupů signálu od šumu SBR.

Optimalizace podmínek LIBS spektrometru byla prováděna s využitím tkáňových vzorků, které byly připraveny ze 100 roupic obohacených 100 μl roztoku ZnCl<sub>2</sub>. Takový vzorek je znázorněn na Obrázku 11.



**Obrázek 11** - Tkáňový vzorek 100 roupic na oboustranné lepicí pásce připravený k optimalizaci podmínek LIBS analýzy

## 2.7 Optimalizace podmínek LIBS analýzy

Pro optimalizaci parametrů LIBS spektrometru byly použity vzorky roupic připravené podle postupu, který je popsán v kapitole 2.6.2 a 2.6.3. Na LIBS spektrometru byly fixně nastaveny hodnoty parametrů, které nebylo zejména kvůli fyzikálním vlastnostem analyzovaných vzorků, možné měnit v širším rozsahu hodnot. Šlo o následující parametry: doba zpoždění mezi pulzy v případě dvoupulzního režimu 7  $\mu\text{s}$ , počet analytických bodů 1, počet impulzů na jeden analytický bod 2 a šířka vstupní štěrbinu spektrometru 80  $\mu\text{m}$ . Další parametry byly optimalizovány. Průměr výstupní štěrbinu budícího paprsku byl postupně nastavován na 153, 200, 250, 300 až 400  $\mu\text{m}$ . Pro každou zvolenou hodnotu průměru výstupní štěrbinu budícího paprsku byla energie pulzu postupně měněna v rozsahu 85,7 – 111,4 mJ. Spodní hranice použitého rozsahu energií odpovídala nejnižší energii, při níž již došlo k zážehu plazmatu. Horní hranice byla zvolena tak, aby při ní ještě nedocházelo k zahlcení detektoru a pozorovatelnému samozvratu analytických čar.

Byla proměřena sada 7 tkáňových vzorků roupic (Tabulka 3) za zvolených analytických podmínek a následně byly sestrojeny křivky popisující závislosti koncentrace - intenzita analytické čáry (tzv. c-I křivky). Byl posuzován vliv dané sady podmínek na velikost směrnice sestrojené c-I křivky a na další statistické parametry ( $R^2$ ).

## 2.8 Příprava kalibračních standardů

Kalibrační standardy roupic byly připraveny podle postupu, který je popsán v kapitole 2.6.2. Pomocí metody ICP OES byl změřen obsah Zn v neexponovaných roupicích pro následný výpočet teoretické koncentrace Zn v obohacených tkáňových standardech. Koncentrace Zn v neexponovaných roupicích byla  $88 \text{ mg.kg}^{-1}$ . Koncentrace Zn v roztoku  $\text{ZnCl}_2$  a teoretická koncentrace Zn v obohacených tkáňových standardech jsou shrnuty v Tabulce 4. Takto připravené standardy lze vidět na Obrázku 12.

**Tabulka 4** - Koncentrační řada tkáňových standardů roupic pro kalibraci LIBS spektrometru

Koncentrace Zn v roztoku $\text{ZnCl}_2$ [ $\text{mg.l}^{-1}$ ]	Hmotnost 100 roupic [mg]	Koncentrace Zn v roupicích [ $\text{mg.kg}^{-1}$ ]
-	56,3	88
13,6	52,8	119,7
26,2	54,9	138
52,3	50,3	150,6
78,5	51,9	196,3
104,6	51,7	298,3
130,8	58,3	309,4



**Obrázek 12** - Kalibrační tkáňové standardy na oboustranné lepicí pásce

## 2.9 Kalibrace LIBS spektrometru

Pro kalibraci LIBS spektrometru byly použity tkáňové standardy roupic připravené podle postupu popsaného v kapitole 2.8, které byly změřeny za optimálních podmínek, jejichž výběr je popsán v kapitole 2.7. K vyhodnocení spekter byla vybrána analytická čára Zn o vlnové délce 202,6 nm. Pro konstrukci kalibrační křivky byl každý standard proměřen pětkrát. Kalibrační závislosti byly zkonstruovány tak, že na osu x byly vyneseny koncentrace zinku v příslušném standardu roupic [ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ] a na osu y odpovídající intenzity signálu vybrané analytické čáry s vlnovou délkou 202,6 nm [v a.u. – counts, arbitrary units]. K proložení získaných dat byl využit lineární kalibrační model, jehož parametry byly získány metodou nejmenších čtverců.

Limita detekce byla vypočítána podle vztahu  $\text{LOD} = 3\sigma/s$ , kde  $\sigma$  je směrodatná odchylka naměřených intenzit nejnižšího kalibračního standardu za optimálních podmínek a  $s$  je směrnice kalibrační křivky.

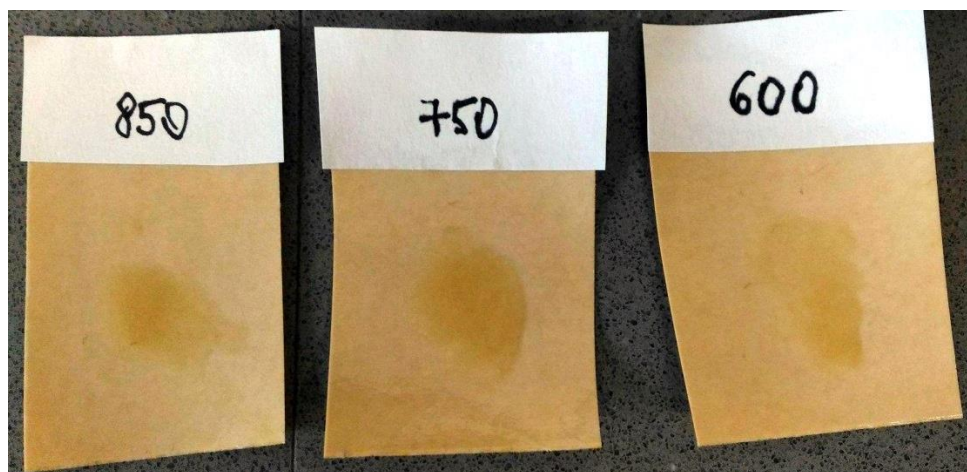
## 2.10 ED XRF metoda pro analýzu Zn ve tkáňových vzorcích

Kromě metody LIBS byla pro analýzu Zn ve tkáňových vzorcích navržena metodika založená na využití energiově disperzní rentgenfluorescenční spektrometrie (ED XRF). Stejně kalibrační standardy, které byly použity pro kalibraci LIBS byly také využity k vytvoření kalibrační křivky pro ED XRF. Analytické podmínky byly zvoleny s využitím autooptimalizačního procesu integrovaného v obslužném programu spektrometru. Proud na rentgence byl nastaven na 35  $\mu\text{A}$  a napětí na 10 kV. Doba integrace signálu byla 60 s. Spektra byla snímána v oblasti vlnových délek 4 až 36 keV.

## 2.11 Analýza reálných vzorků roupic z toxikologického experimentu

Po dokončení kalibrace spektrometru byly analyzovány roupičky, které byly exponovány v živných roztocích o koncentraci Zn 0, 500, 600, 750, 850 až 950  $\mu\text{g.l}^{-1}$ . Příprava tkáňových vzorků roupic je popsána v kapitole 2.6.1. Po ukončení 72 hodinové expozice byly naexponované roupičky opláchnuty v destilované vodě, vloženy do mikrozkušavky a poté k nim bylo přidáno 50  $\mu\text{l}$  25 % hydroxidu tetramethylamonného (TMAH). Jednotlivé mikrozkušavky byly vloženy do ultrazvukové lázně na 15 min a následně byly roztoky roupic přeneseny na oboustrannou lepicí pásku, zafixovány lakem na vlasy a sušeny na vzduchu.

Následně byla provedena ED XRF a LIBS analýza za optimálních podmínek, jejichž výběr je popsán v kapitole 2.7 a 2.10 s využitím reálných tkáňových vzorků, které byly připraveny ze 100 naexponovaných roupic. Takové vzorky jsou znázorněny na Obrázku 13. Pro výpočet koncentrace Zn v tkáňových vzorcích byla využita metoda kalibrační přímky. Koncentrace Zn v naexponovaných roupičkách byla také změřena pomocí techniky ICP OES. Naměřené hodnoty pomocí ED XRF a LIBS byly porovnány se získanými koncentracemi Zn technikou ICP OES.

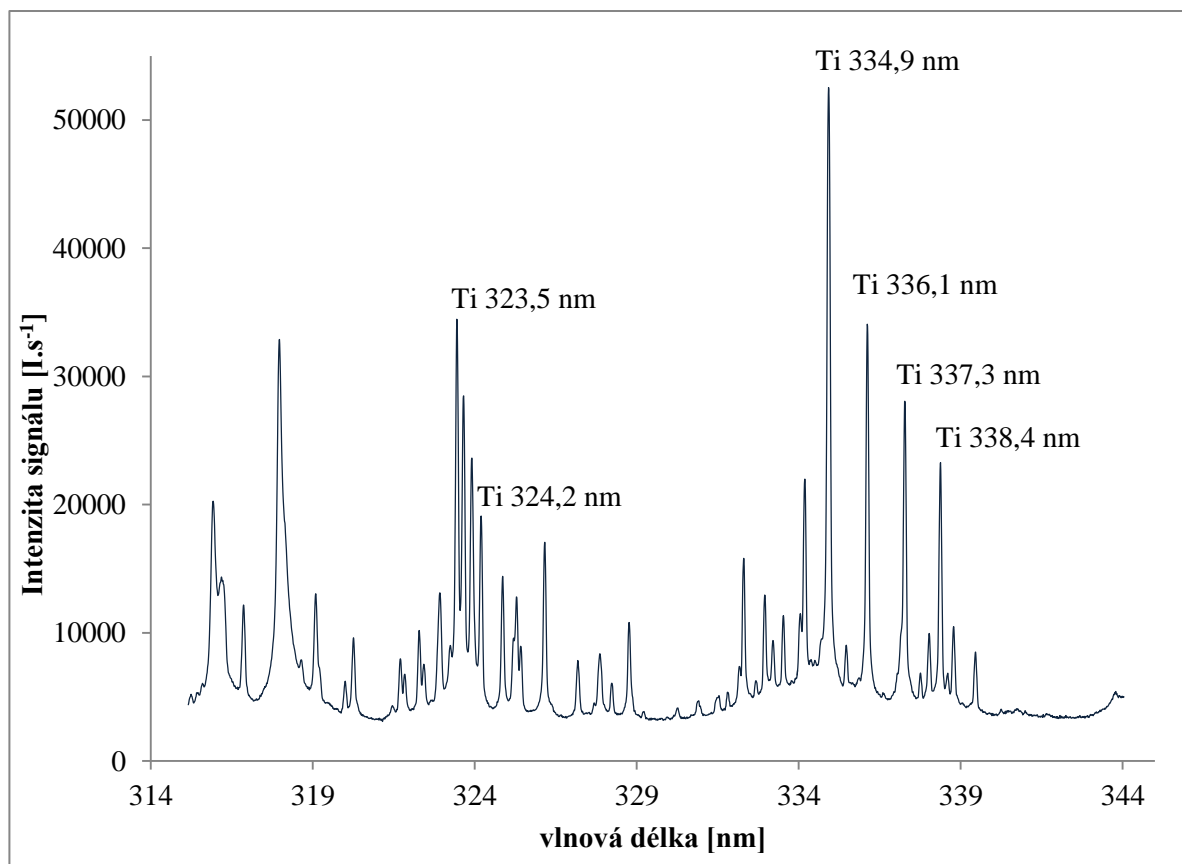


**Obrázek 13** - Tkáňové vzorky 100 roupic na oboustranné lepicí pásce připravené k ED XRF a LIBS analýze

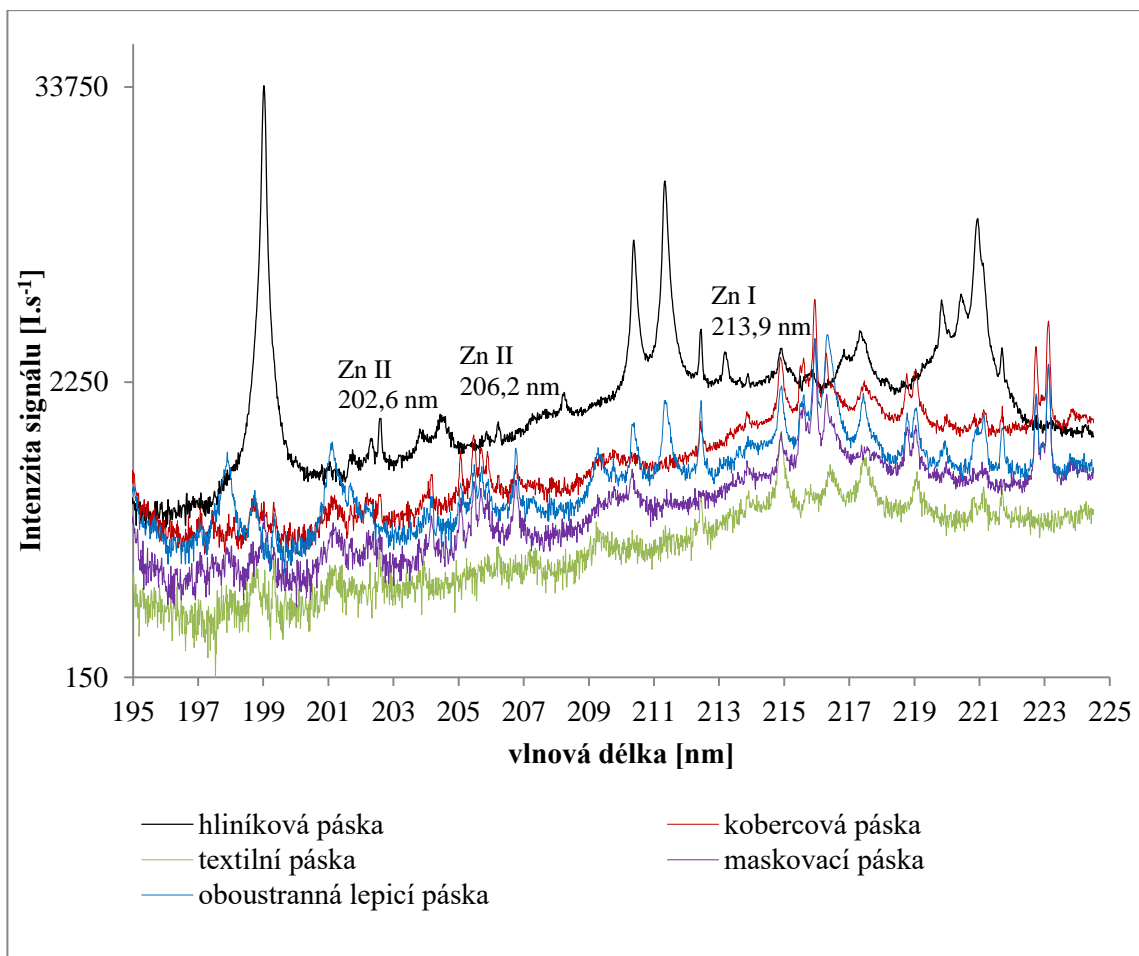
### 3 VÝSLEDKY A DISKUZE

#### 3.1 Volba vhodného nosiče vzorku a výběr analytické čáry Zn

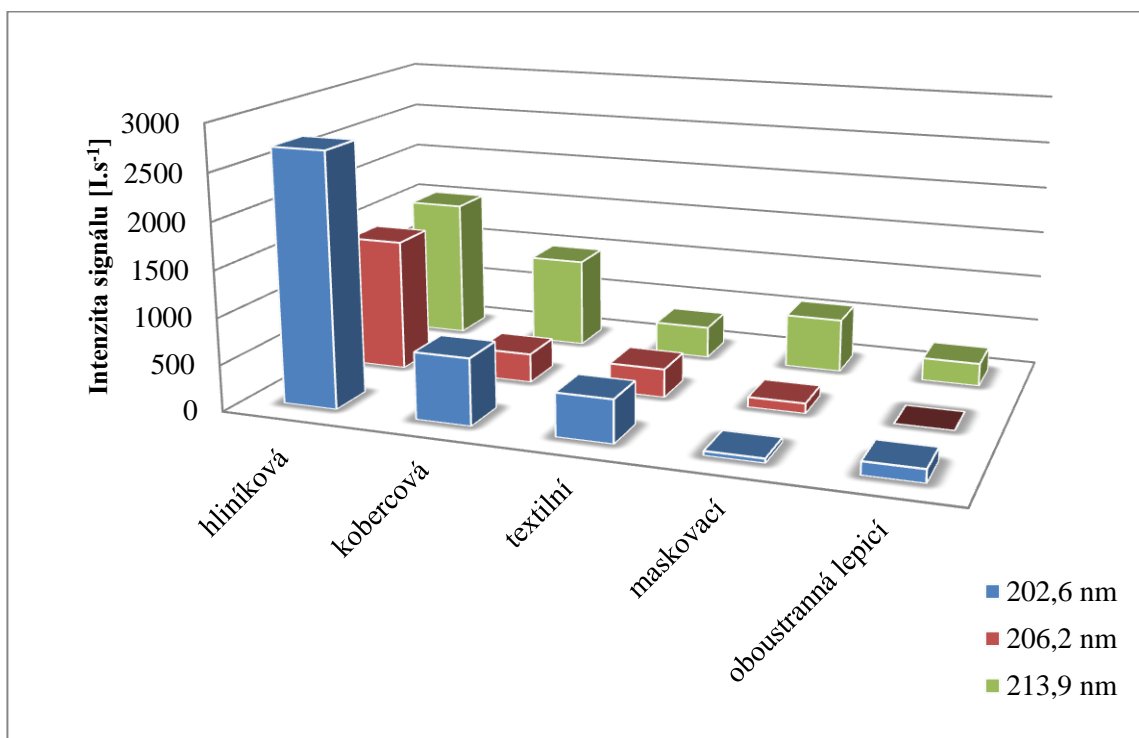
V kapitole 2.5 je popsána volba vhodného nosiče pro upevnění roupic. Pomocí LIBS spektrometru bylo proměřeno pět typů lepicích pásek. Měření bylo prováděno ve dvou spektrálních oknech: 315 – 345 nm a 192 – 222 nm. V oblasti 315 – 345 nm byly detekovány intenzivní čáry titanu interferující s čarami Zn uvedenými ve spektrální knihovně pro tuto oblast. Titan pochází patrně z barviva či plniva lepidla lepicí pásky (Obrázek 14). Spektra jednotlivých pásek snímaná v oblasti 192 – 222 nm jsou znázorněna na Obrázku 15 a intenzity analytických čar Zn o vlnových délkách 202,6 nm, 206,2 nm a 213,9 nm odečtené z příslušných spekter (průměr ze tří měření) jsou shrnuty na Obrázku 16. Z uvedených obrázků je zřejmé, že nejvyšší koncentrace Zn se nacházela v hliníkové pásce, naproti tomu nejnižší intenzita analytických čar Zn byla zjištěna v maskovací a oboustranné lepicí pásce. Maskovací páska však neměla vhodné vlastnosti (pevnost) pro upevnění vzorku. Jako nejvhodnější nosič vzorku byla tedy zvolena oboustranná lepicí páska s nízkým obsahem Zn a vhodnými mechanickými vlastnostmi.



**Obrázek 14** - LIBS spektrum oboustranné lepicí pásky s intenzivními čarami titanu v oblasti 315 až 345 nm

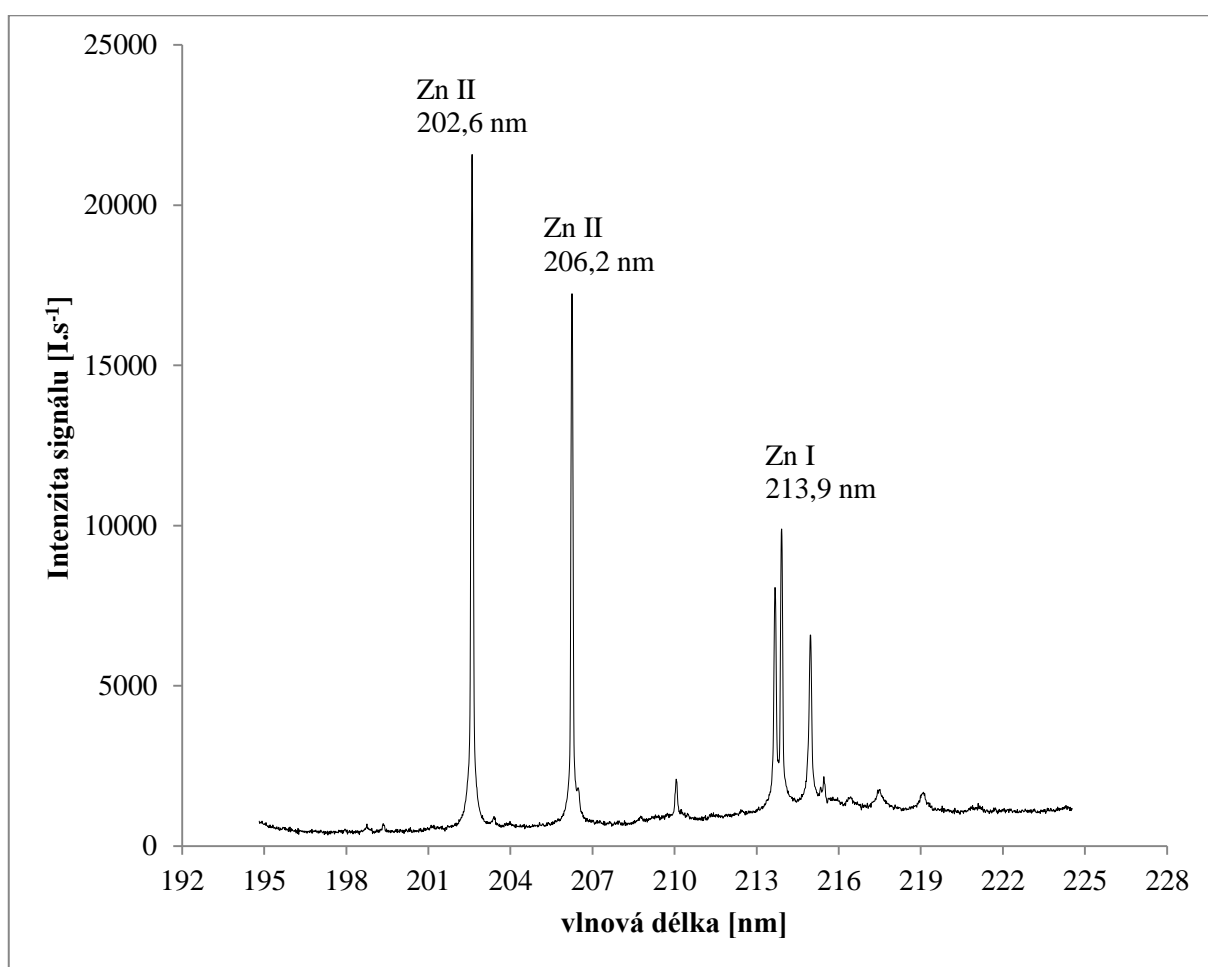


**Obrázek 15** - LIBS spektra jednotlivých lepicích pásek v oblasti 192 až 222 nm



**Obrázek 16** - Intenzity analytických čar Zn ve spektrech jednotlivých pásek v oblasti 192-222 nm

Ověření vhodnosti výběru pásky bylo provedeno i nasnímáním LIBS spektra po uchycení tkáňového vzorku o hmotnosti 51,3 mg a koncentraci Zn 459,8 mg.kg<sup>-1</sup>. Spektrum znázorněné na Obrázku 17 bylo získáno za následujících experimentálních podmínek – DP režim, průměr výstupní štěrby budícího paprsku 300 μm, šířka vstupní štěrby 80 μm, energie laserového pulzu 98,6 mJ, počet pulzů na jeden analytický bod 2 a počet analytických bodů 1. Z Obrázku 17 je zřejmé, že se ve sledované oblasti nacházejí tři dostatečně intenzivní analytické čáry Zn s vlnovými délkami 202,6 nm, 206,2 nm a 213,9 nm, které nejsou rušeny žádnou z čar případných interferujících prvků. Tyto čáry byly dále testovány pro použití v rámci vývoje metodiky pro stanovení Zn v tkáňových vzorcích roupic.



**Obrázek 17** - LIBS spektrum charakterizující jednotlivé analytické čáry Zn

## 3.2 Příprava tkáňových vzorků pro optimalizaci LIBS

### 3.2.1 Expozice rouspic v roztoku $Zn^{2+}$

V Tabulce 5 jsou uvedeny koncentrace Zn ve tkáňových vzorcích rouspic připravených postupem popsaným v kapitole 2.6.1 změřené pomocí ICP OES. Z uvedených dat je zřejmé, že rozsah koncentrací není dostatečný pro přípravu kalibračních standardů. Kalibrace přístroje v takto úzkém rozsahu by při typicky horší reprodukovatelnosti LIBS analýzy nebyla možná. Rozšířit rozsah koncentrací Zn ve tkáňových vzorcích cestou zvýšení koncentrace Zn v expozičních roztocích rovněž nebylo možné, neboť rouspice při vyšších než použitých koncentracích vykazovaly 100 % mortalitu. Uhynulé rouspice se v živném médiu okamžitě rozpadají, není možné s nimi manipulovat a tudíž z nich ani není možné připravit vzorek pro LIBS analýzu.

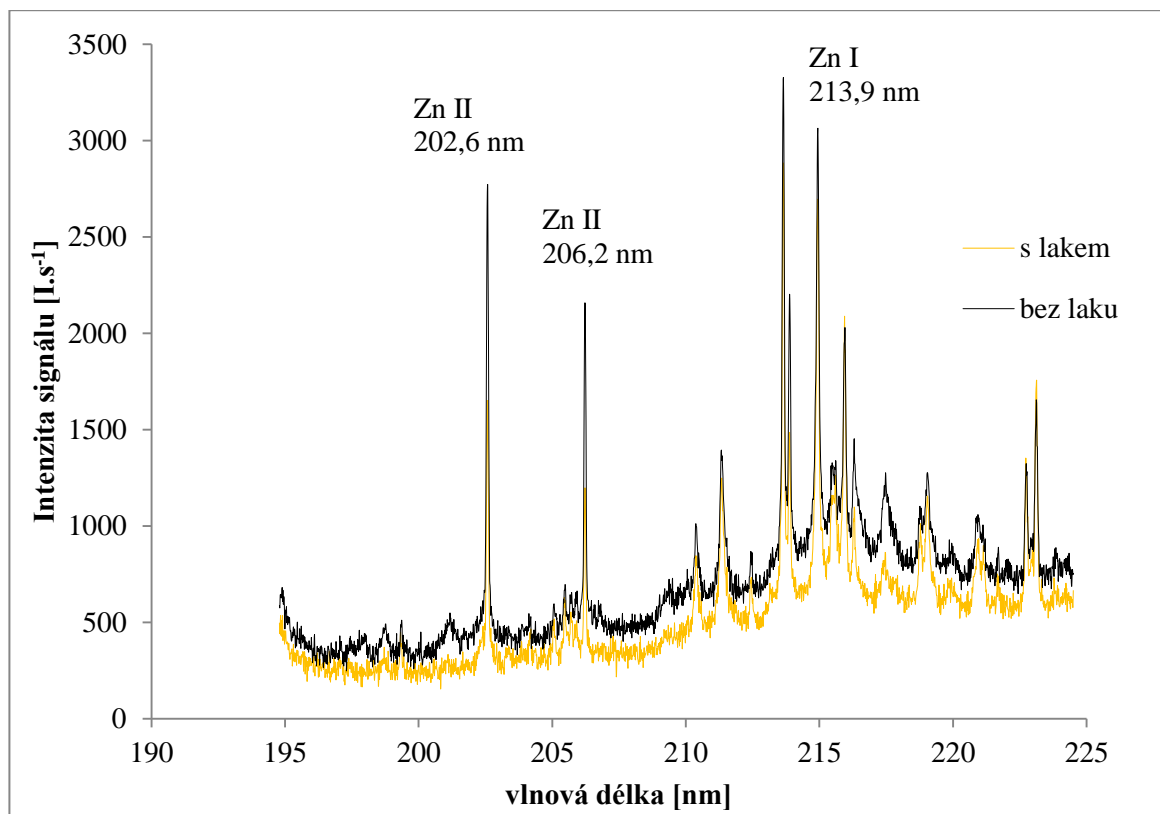
**Tabulka 5** - Koncentrace Zn ve tkáňových vzorcích rouspic po jejich expozici v Zn obohaceném živném médiu změřená pomocí ICP OES

Koncentrace Zn v expozičním médiu [ $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ]	Hmotnost tkáňového vzorku (20 jedinců) [mg]	Koncentrace Zn v rouspicích [ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ]
0	12,4	45,8
600	12,4	84
750	12,4	74,3
850	12,7	68,7
900	12,9	96,4
925	11,6	83,8
950	11,1	76,8

### 3.2.2 Příprava tkáňových vzorků k analýze

Na Obrázku 18 jsou znázorněna LIBS spektra tkáňového vzorku rouspic o hmotnosti 50,1 mg a o koncentraci Zn 236,8  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  změřená po nanesení vzorku na lepicí pásku a jeho usušení (bez laku) a po nanesení laku na povrch vzorku (s lakem). Jak je zřejmé z dat uvedených v Tabulce 6, hodnoty intenzit analytických čar ani hodnoty RSD se díky nalakování vzorku nijak výrazně nemění. Pokrytí vzorku lakem však v případě všech analytických čar vedlo k mírnému zvýšení odstupů signálu od šumu (vyšší SBR).

Vzhledem k tomu, že jedním z kritických parametrů navrhované metody je hodnota detekčního limitu, byla i tato malá změna SBR považována za žádoucí a lakování vzorku bylo dále používáno jako součást přípravy tkáňových vzorků k analýze.



**Obrázek 18** - Srovnání získaných spekter pro vzorek o koncentraci Zn 236,8 mg.kg<sup>-1</sup> před a po fixaci lakem

**Tabulka 6** - Hodnoty průměrných intenzit, RSD a SBR pro vzorek o koncentraci 236,8 mg.kg<sup>-1</sup> před a po fixaci lakem

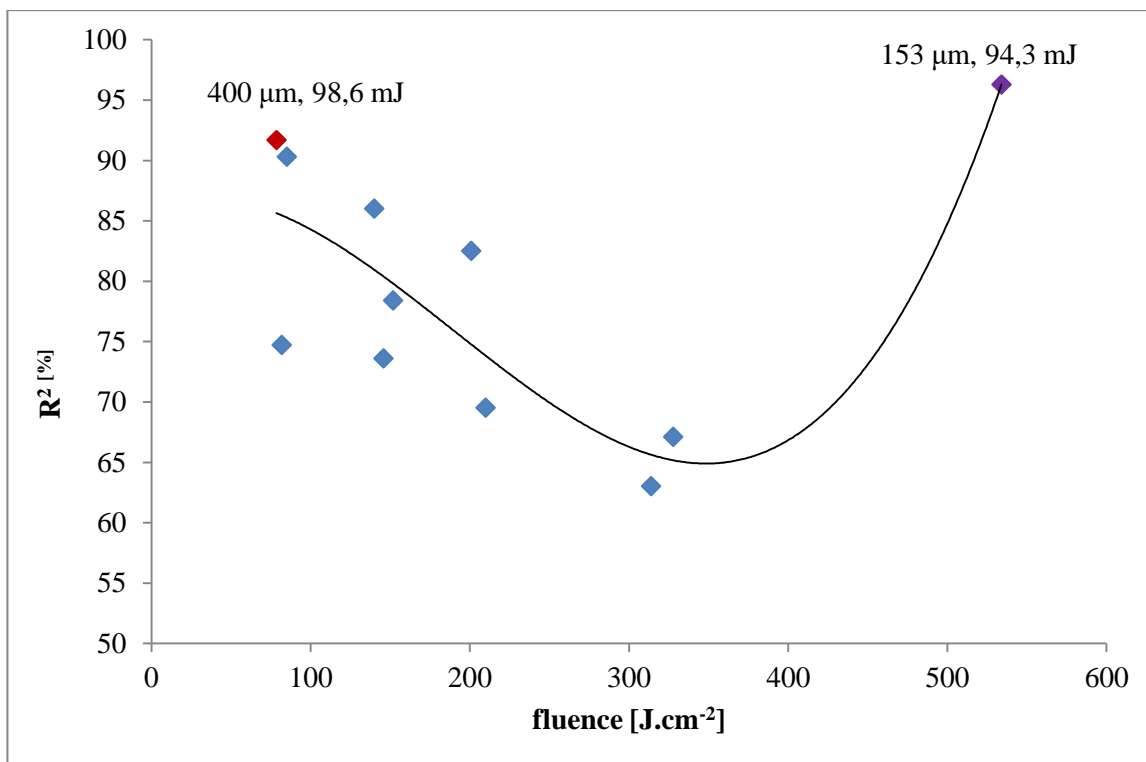
Úprava vzorku	Vlnová délka [nm]	Intenzita [I.s <sup>-1</sup> ]	RSD [%]	SBR
bez laku	202,6	8884	23,5	3,4
s lakem		8204	27,9	3,5
bez laku	206,2	6556	24,7	3,2
s lakem		8225	22,7	3,8
bez laku	213,9	3106	25,6	1,9
s lakem		3605	27,6	2,4

### 3.3 Optimalizace podmínek LIBS analýzy

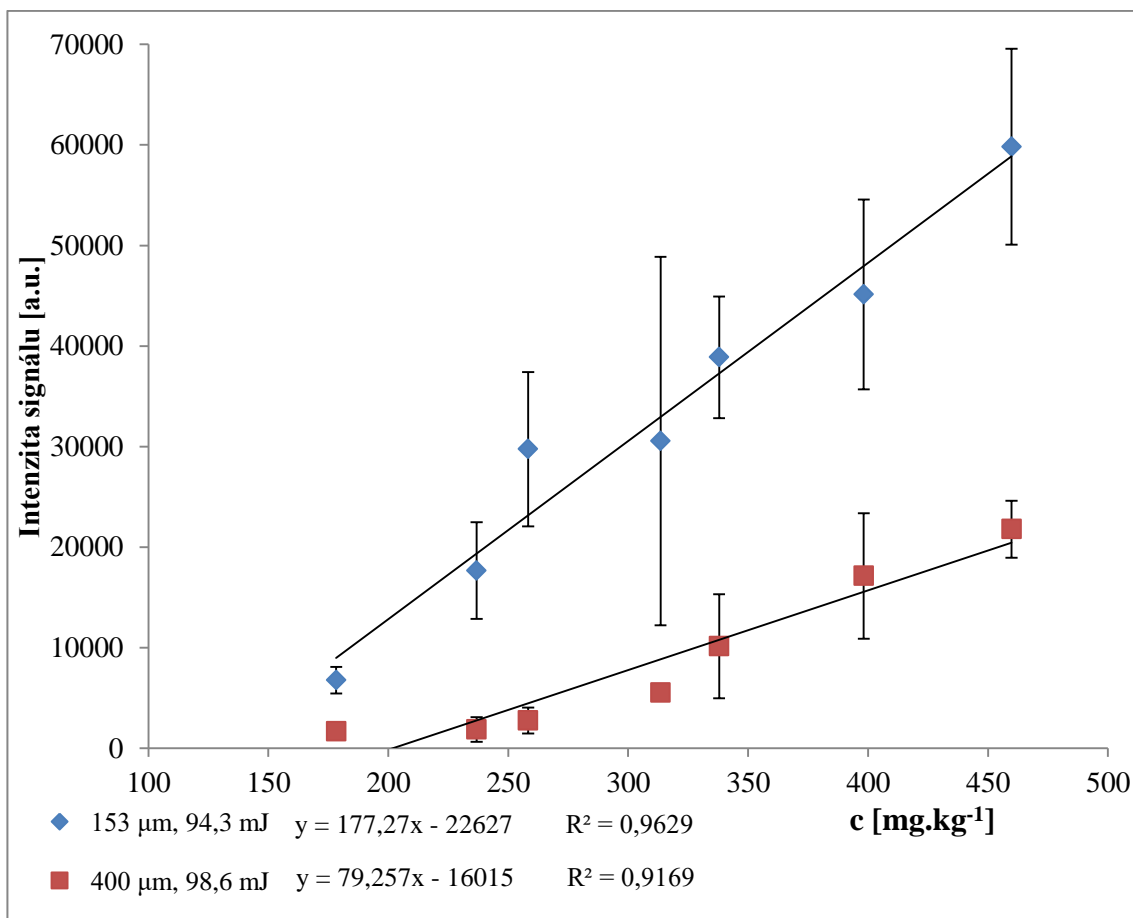
Postup optimalizace podmínek LIBS spektrometru je popsán v kapitole 2.7. Průměr výstupní štěrby budícího paprsku byl postupně nastavován na 153, 200, 250, 300 až 400  $\mu\text{m}$ . Pro každou zvolenou hodnotu průměru výstupní štěrby budícího paprsku byla energie pulzu postupně měněna v rozsahu 85,7 – 111,4 mJ. V Tabulce 7 jsou shrnuty rovnice c-I křivek a koeficienty determinace  $R^2$  vypočtené pro každou z kombinací podmínek měření. Intenzity analytických čar Zn použité při konstrukci c-I křivek jsou vždy průměrnou hodnotou ze tří opakovaných měření daného vzorku. Z dat shrnutých v Tabulce 7 je zřejmé, že pro každou kombinaci analytických podmínek jsou hodnoty koeficientů determinace příslušných c-I křivek podobné pro všechny tři testované analytické čáry Zn. Směrnice c-I křivek a tedy i citlivost metody je konzistentně nejvyšší pro analytickou čáru s vlnovou délkou 202,6 nm. Na Obrázku 19 je znázorněna závislost koeficientu determinace c-I křivek na hodnotě intenzity zářivého toku (fluence). Z daného grafu je zřejmé, že nejlepšího proložení c-I křivek bylo dosaženo při hodnotách fluence na hranicích testovaného rozsahu – tedy při maximální ( $534 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) a minimální ( $78,5 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) hodnotě tohoto parametru. Testovaný rozsah nelze rozšířit ani k vyšším ani k nižším hodnotám. Zvýšení rozsahu k vyšším hodnotám není možné kvůli maximálnímu výkonu použitého laseru, menší hodnoty fluence by vyžadovaly zvýšení průměru analytického bodu nad hranici, která by již neumožňovala dostatečný počet opakování při měření daného vzorku. Na Obrázku 20 jsou znázorněny c-I křivky pro obě hraniční hodnoty fluence. Křivka pro minimální hodnotu fluence má nižší hodnotu směrnice a závislost intenzity na koncentraci není ve spodní části křivky lineární. Vzhledem k požadavku na dosažení co nejnižší hodnoty detekčního limitu a co nejširšího koncentračního rozsahu kalibrace byla pro následnou kalibraci přístroje zvolena sada parametrů popsaná c-I křivkou s maximální hodnotou fluence. Příslušné přístrojové parametry jsou shrnuty v Tabulce 8.

**Tabulka 7** - Rovnice c-I křivek pro různé kombinace přístrojových parametrů

		85,7 mJ		90 mJ		94,3 mJ	
	Čára Zn [nm]	Rovnice regrese	R <sup>2</sup> [%]	Rovnice regrese	R <sup>2</sup> [%]	Rovnice regrese	R <sup>2</sup> [%]
153 [μm]	202,6	-	-	-	-	$Y = 1,8 \cdot 10^2 X - 2,3 \cdot 10^4$	96,3
	206,2	-	-	-	-	$Y = 1,2 \cdot 10^2 X - 1,4 \cdot 10^4$	93,5
	213,9	-	-	-	-	$Y = 69,3 X - 8,6 \cdot 10^3$	99,9
<b>Fluence [J.cm<sup>-2</sup>]</b>			-		-		<b>534</b>
		98,6 mJ		102,9 mJ		107,1 mJ	
	Čára Zn [nm]	Rovnice regrese	R <sup>2</sup> [%]	Rovnice regrese	R <sup>2</sup> [%]	Rovnice regrese	R <sup>2</sup> [%]
200 [μm]	202,6	$Y = 2 \cdot 10^2 X - 1,8 \cdot 10^4$	63	$Y = 2,6 \cdot 10^2 X - 3,7 \cdot 10^4$	67,1	-	-
	206,2	$Y = 1,2 \cdot 10^2 X - 6,9 \cdot 10^3$	41,4	$Y = 1,7 \cdot 10^2 X - 2 \cdot 10^4$	60,6	-	-
	213,9	$Y = 65 X - 4,2 \cdot 10^3$	56,9	$Y = 89 X - 9 \cdot 10^3$	77	-	-
<b>Fluence [J.cm<sup>-2</sup>]</b>			<b>314</b>		<b>328</b>		-
250 [μm]	202,6	$Y = 1,8 \cdot 10^2 X - 2,2 \cdot 10^4$	82,5	$Y = 3,1 \cdot 10^2 X - 4,3 \cdot 10^4$	69,5	-	-
	206,2	$Y = 1,2 \cdot 10^2 X - 1,2 \cdot 10^4$	77,2	$Y = 2,1 \cdot 10^2 X - 2,6 \cdot 10^4$	65,8	-	-
	213,9	$Y = 63 X - 6,6 \cdot 10^3$	79	$Y = 1 \cdot 10^2 X - 1,2 \cdot 10^4$	62,2	-	-
<b>Fluence [J.cm<sup>-2</sup>]</b>			<b>201</b>		<b>210</b>		-
300 [μm]	202,6	$y = 1,8 \cdot 10^2 X - 3,3 \cdot 10^4$	86	$Y = 1,8 \cdot 10^2 X - 2,5 \cdot 10^4$	73,6	$Y = 2 \cdot 10^2 X - 3,1 \cdot 10^4$	78,4
	206,2	$y = 1,2 \cdot 10^2 X - 2,1 \cdot 10^4$	86,7	$Y = 1,3 \cdot 10^2 X - 1,6 \cdot 10^4$	62,9	$Y = 1,4 \cdot 10^2 X - 2 \cdot 10^4$	68,8
	213,9	$y = 58 X - 9,7 \cdot 10^3$	91,2	$Y = 68 X - 8,7 \cdot 10^3$	70,1	$Y = 84 X - 1,3 \cdot 10^4$	80,7
<b>Fluence [J.cm<sup>-2</sup>]</b>			<b>140</b>		<b>146</b>		<b>152</b>
400 [μm]	202,6	$Y = 79 X - 1,6 \cdot 10^4$	91,7	$Y = 93 X - 1,5 \cdot 10^4$	74,7	$Y = 1,8 \cdot 10^2 X - 3,8 \cdot 10^4$	90,3
	206,2	$Y = 52 X - 1 \cdot 10^4$	91,6	$Y = 61 X - 9,2 \cdot 10^3$	61,1	$Y = 52 X - 8 \cdot 10^3$	93,1
	213,9	$Y = 31 X - 5,7 \cdot 10^3$	92,1	$Y = 29 X - 3,8 \cdot 10^3$	53	$Y = 33 X - 4,8 \cdot 10^3$	87,8
<b>Fluence [J.cm<sup>-2</sup>]</b>			<b>78,5</b>		<b>81,9</b>		<b>85,2</b>



**Obrázek 19** - Závislost fluence - koeficient determinace  $R^2$  pro c-I křivky získané s využitím analytické čáry Zn o vlnové délce 202,6 nm



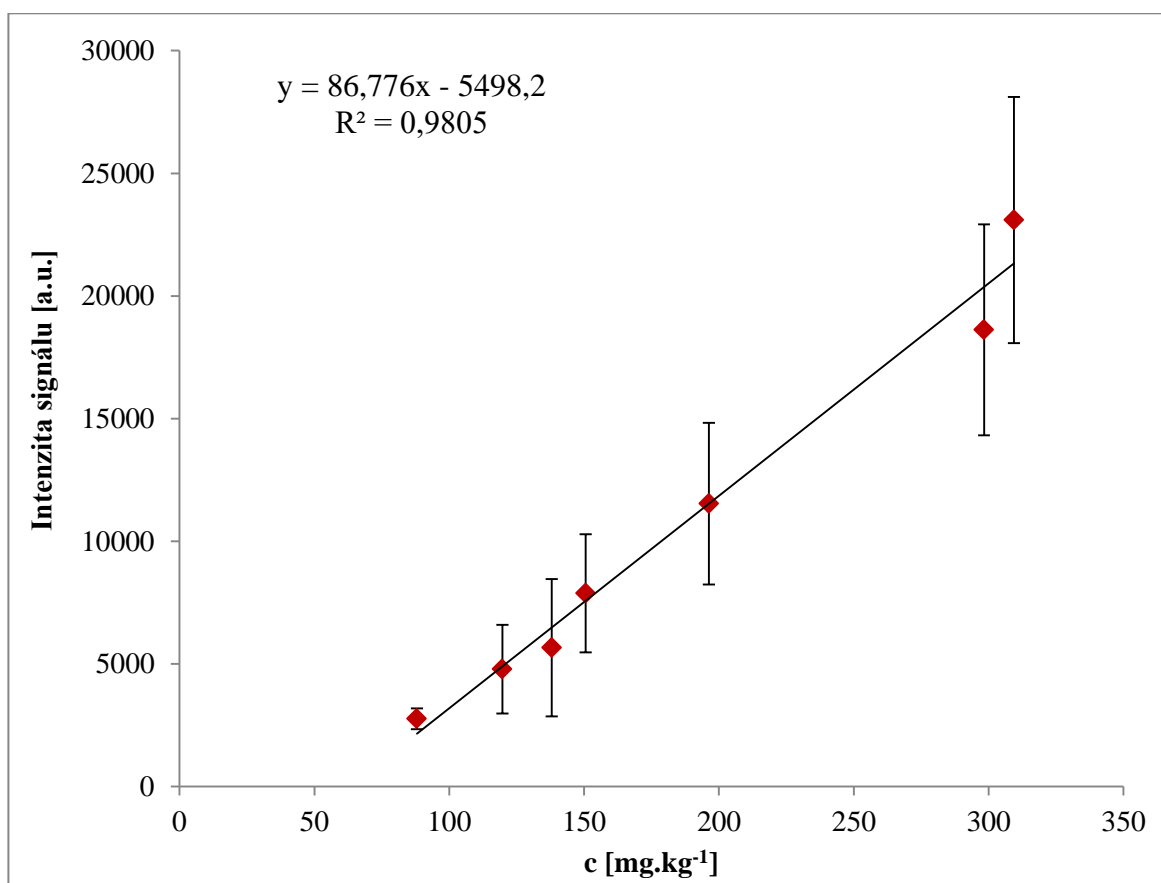
**Obrázek 20** - c-I křivky při intenzitě analytické čáry Zn o vlnové délce 202,6 nm

**Tabulka 8** - Optimální parametry LIBS spektrometru následně využité pro kalibraci přístroje

Parametry	Režim spektrometru	Energie pulzu [mJ]	Průměr vstupní štěrbinu budícího paprsku [ $\mu\text{m}$ ]	Šířka vstupní štěrbinu [ $\mu\text{m}$ ]	Počet impulzů
Podmínky	dvoupulzní	94,3	153	80	2

### 3.4 Kalibrace LIBS spektrometru

Postup kalibrace LIBS spektrometru je popsán v kapitole 2.9. Po zvolení podmínek uvedených v Tabulce 8 byla proměřena kalibrační řada standardů s rozsahem koncentrací Zn uvedených v Tabulce 4. Intenzity analytické čáry Zn použité při konstrukci kalibrační křivky jsou vždy průměrnou hodnotou z pěti opakovaných měření daného standardu. Na Obrázku 21 je znázorněna kalibrační závislost intenzity signálu analytické čáry s vlnovou délkou 202,6 nm na koncentraci Zn v kalibračních tkáňových standardech roupic. Na Obrázku 21 jsou také uvedeny chybové úsečky, znázorňující míru rozptylu měření vyjádřenou směrodatnou odchylkou.



**Obrázek 21** - Kalibrační křivka LIBS spektrometru sestavená pro standardy roupic

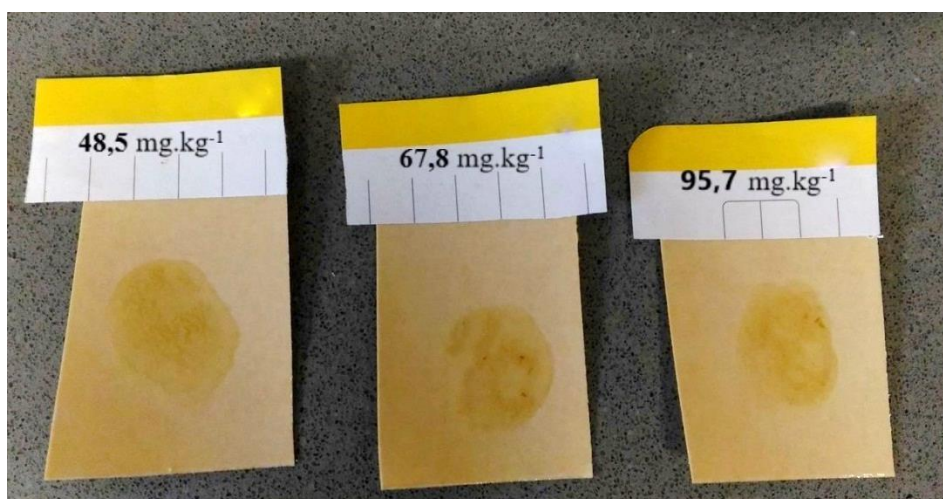
Z Obrázku 21 je zřejmé, že úprava standardů podle postupu 2.8 vedla k horší reprodukovatelnosti a tedy k vyšším hodnotám RSD. Z důvodu lepší homogenizace standardů bylo k připraveným roupicím přidáno 50  $\mu\text{l}$  25 % TMAH. Jednotlivé mikrozkušavky byly poté vloženy do ultrazvukové vany po dobu 15 min. Následně byl roztok roupic přenesen na oboustrannou lepicí pásku a po usušení byl zafixován lakem. Koncentrace Zn v roztoku  $\text{ZnCl}_2$  a teoretické koncentrace Zn v obohacených tkáňových vzorcích jsou shrnuty v Tabulce 9. Takto připravené standardy lze vidět na Obrázku 22. Také byl změřen obsah Zn v neexponovaných roupicích pomocí ICP OES postupem popsáním v kapitole 2.6.1. Koncentrace Zn v neexponovaných roupicích byla  $48,5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ .

Z hodnot RSD uvedených v Tabulce 10 je zřejmé, že navrhovaná homogenizace nemá dostatečný vliv na zlepšení reprodukovatelnosti měření. Příprava standardů s 25 % TMAH vedla k nižším hodnotám RSD pouze při nižších koncentracích Zn v tkáňových standardech roupic. Získané výsledky po proměření připravených typů kalibračních standardů pomocí LIBS techniky nebyly dostatečně reprodukovatelné. Důvodem může být velmi malé množství vzorku, které se přenese do plazmatu, dále pak chování oboustranné lepicí pásky při možné interakci s laserem a především nedostatečná homogenita vzorku. Vliv na nedostatečnou reprodukovatelnost měření mají také kroužkovci *Enchytraeus crypticus*, jak je z jednotlivých analýz zřejmé, obsah Zn v neobohacených standardech se výrazně liší. Domníváme se, že hlavním důvodem je odlišné stáří, velikost jednotlivých roupic, dále vliv jejich stravy a také kvalita opláchnutí od agaru.

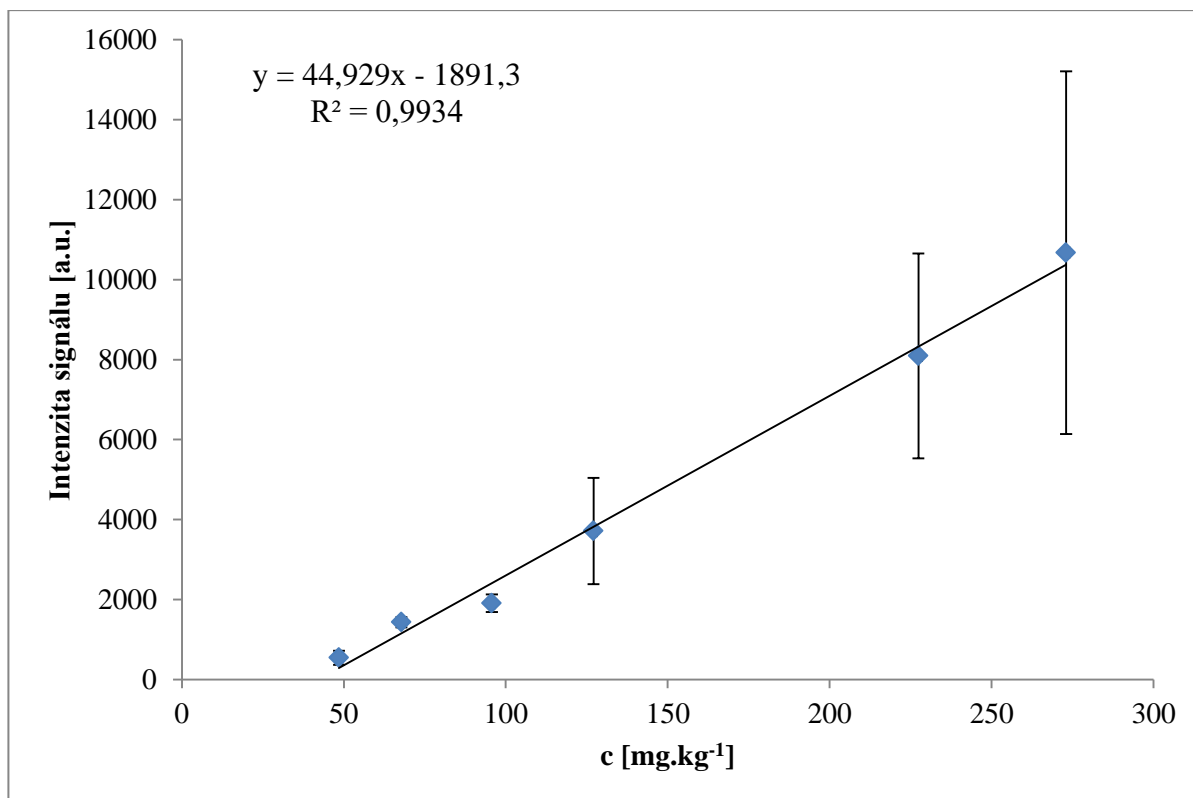
Na Obrázku 23 je znázorněna kalibrační závislost po přidání 25 % TMAH. Z kalibračních křivek na Obrázků 21 a 23 je zřejmé, že vyšší citlivosti měření, z hlediska hodnoty směrnice křivky bylo u standardů připravených bez 25 % TMAH.

**Tabulka 9** - Koncentrační řada kalibračních standardů s 25 % hydroxidem tetramethylamonným

Koncentrace Zn v roztoku ZnCl <sub>2</sub> [mg.l <sup>-1</sup> ]	Hmotnost 100 roupic [mg]	Koncentrace Zn v roupicích [mg.kg <sup>-1</sup> ]
-	61,7	48,5
13,6	64,2	67,8
25,8	58,3	95,7
51,7	64,2	127,1
103,4	58,6	227,4
129,2	58,3	273



**Obrázek 22** - Kalibrační standardy tkáňových vzorků na oboustranné lepicí pásce s 25 % hydroxidem tetramethylamonným



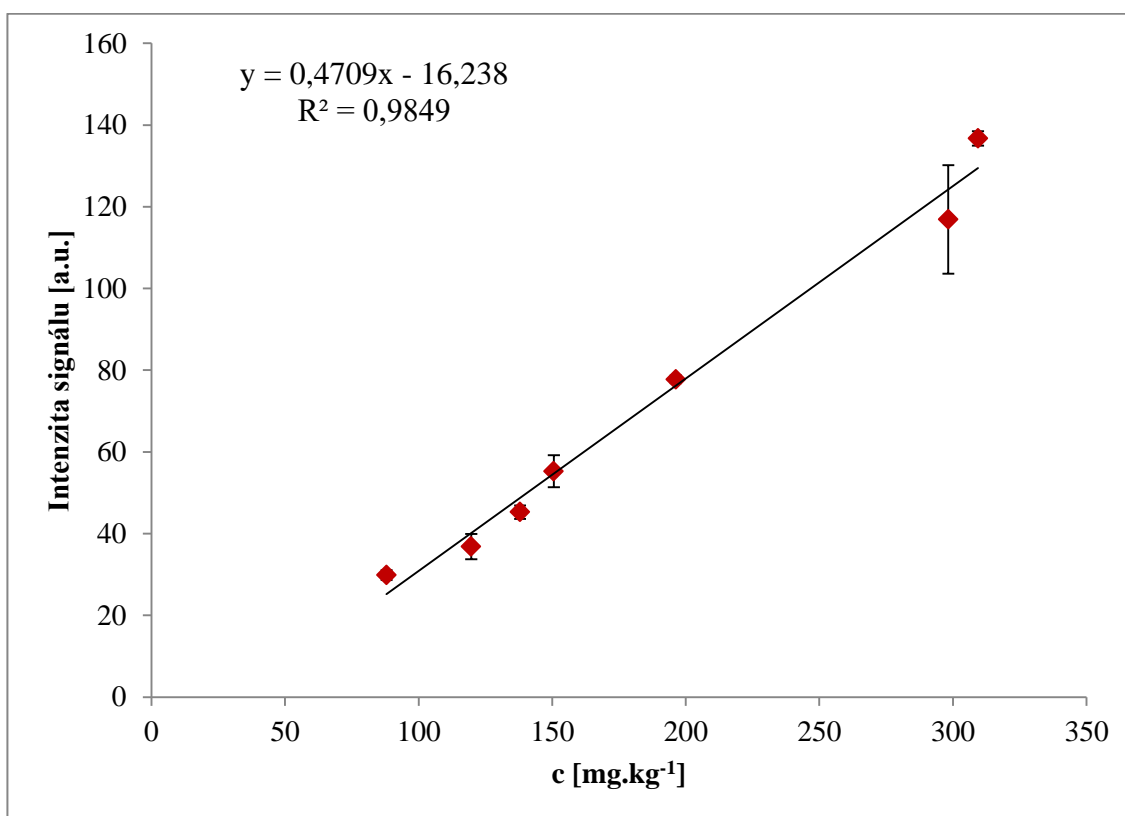
**Obrázek 23** - Kalibrační křivka LIBS spektrometru sestavená pro standardy roupic po přidání 25 % TMAH

**Tabulka 10** - Hodnoty RSD získané po LIBS analýze

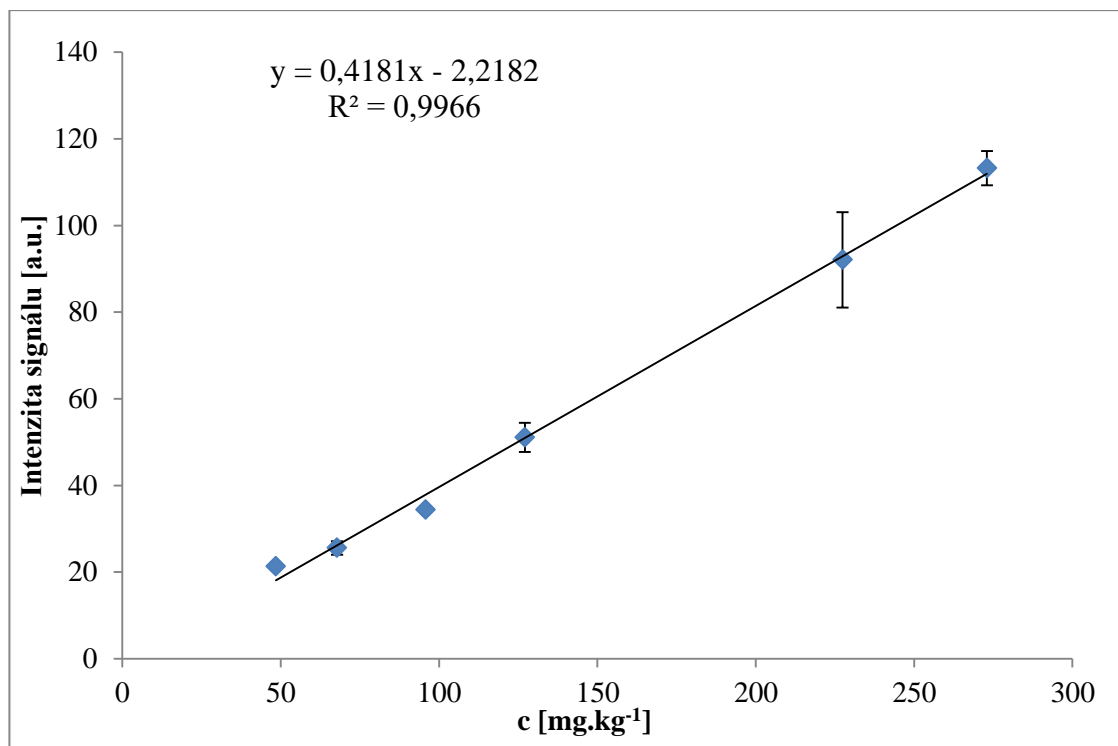
Koncentrace standardů bez 25% TMAH [mg.kg <sup>-1</sup> ]	RSD [%]	Koncentrace standardů s 25% TMAH [mg.kg <sup>-1</sup> ]	RSD [%]
88	20	48,5	32
119,7	37,8	67,8	8,9
138	53,3	95,7	11,4
150,6	30,5	127,1	35,8
196,3	28,5	227,4	31,7
298,3	23,1	273	42,5
309,4	21,7		

### 3.5 ED XRF metoda pro analýzu Zn ve tkáňových vzorcích

Pro kalibraci ED XRF spektrometru byla použita ta samá sada standardů, která byla předtím použita pro kalibraci LIBS spektrometru. Koncentrace Zn v jednotlivých standardech jsou uvedeny v Tabulce 4 a 9. Intenzity analytické čáry Zn použité při konstrukci kalibračních křivek jsou vždy průměrnou hodnotou z pěti opakovaných měření každého standardu. Na Obrázku 24 a 25 lze vidět získané kalibrační křivky bez přídavku a následně s přídavkem 25 % TMAH. V Tabulce 11 jsou uvedeny hodnoty RSD vypočítané po XRF analýze. Z Tabulky 11 je patrné, že hodnoty RSD XRF metody jsou nižší než hodnoty získané po LIBS analýze. Výsledky získané proměřením kalibračních standardů pomocí ED XRF byly dostatečně reprodukovatelné.



**Obrázek 24** - Kalibrační křivka ED XRF získaná s využitím standardů roupic bez TMAH



**Obrázek 25** - Kalibrační křivka ED XRF ziskaná po proměření kalibračních standardů s TMAH

**Tabulka 11** - Hodnoty RSD získané při ED XRF analýze

Koncentrace standardů bez 25% TMAH [mg.kg <sup>-1</sup> ]	RSD [%]	Koncentrace standardů s 25% TMAH [mg.kg <sup>-1</sup> ]	RSD [%]
88	4	48,5	2,8
119,7	8,5	67,8	6
138	3,7	95,7	1,9
150,6	7,1	127,1	6,6
196,3	1,2	227,4	12
298,3	11,4	273	3,5
309,4	1,3		

V Tabulce 12 je souhrn parametrů regrese kalibračních závislostí pro LIBS a ED XRF. Dále jsou v tabulce uvedeny vypočítané limity detekce (LOD) pro jednotlivé kalibrační závislosti. Vypočtená hodnota LOD pro LIBS analýzu byla bez TMAH 0,3 mg.kg<sup>-1</sup> Zn a následně po přidání 25 % TMAH 0,2 mg.kg<sup>-1</sup> Zn. Získané hodnoty LOD jsou nízké a při našem měření odpovídají spíše intenzitě pozadí. Vypočtená hodnota LOD pro ED XRF byla bez TMAH 16,3 mg.kg<sup>-1</sup> Zn a následně po přidání 25 % TMAH 10,1 mg.kg<sup>-1</sup> Zn. Z praktického hlediska nemá kvantitativní analýza Zn v koncentracích pod 10,1 mg.kg<sup>-1</sup> u takového typu tkáňového vzorku žádný význam. Z hlediska metrologických parametrů je navržená ED XRF technika použitelná pro vyhodnocení ekotoxikologických experimentů na *Enchytraeus crypticus*.

Postup přípravy kalibračních standardů s přidavkem 25 % TMAH byl vyhodnocen jako vhodnější pro praktické použití. Z jednotlivých kalibračních závislostí je zřejmé, že v případě TMAH dochází k nárůstu hodnoty výsledného R<sup>2</sup> a naopak k poklesu hodnoty RSD u standardů s nižší koncentrací analytu. Vzhledem k tomu, že jedním z kritických parametrů navrhované metody je dostatečná reprodukovatelnost, byla i tato malá změna považována za žádoucí.

**Tabulka 12** - Souhrn parametrů regrese kalibračních závislostí pro LIBS a ED XRF

<b>Metoda</b>	<b>Standardy</b>	<b>Rovnice regrese</b>	<b>R<sup>2</sup> [%]</b>	<b>LOD [mg.kg<sup>-1</sup>]</b>
<b>LIBS</b>	bez TMAH	Y = 86,776X - 5498,2	98	0,2
	s TMAH	Y = 44,929X - 1891,3	99,3	0,3
<b>ED XRF</b>	bez TMAH	Y = 0,4709X - 16,238	98,5	16,3
	s TMAH	Y = 0,4181X - 2,2182	99,7	10,1

### 3.6 Analýza reálných vzorků roupic z toxikologického experimentu

Pro ověření funkčnosti navrhované metody bylo analyzováno šest směsných tkáňových vzorků roupic (100 kusů na jeden vzorek) získaných kultivací organismů v roztocích o různé koncentraci Zn. Postup přípravy a analýzy reálných tkáňových vzorků je popsán v kapitole 2.11. Intenzity analytické čáry Zn použité pro získání koncentrace jsou vždy průměrnou hodnotou z šesti opakovaných měření daného vzorku pomocí ED XRF a LIBS. V Tabulce 13 jsou uvedeny hodnoty RSD vypočítané pro data získaná pomocí ED XRF a LIBS. Z Tabulky 13 je zřejmé, že výsledky získané proměřením tkáňových vzorků pomocí ED XRF a LIBS byly dostatečně reprodukovatelné. V Tabulce 14 jsou uvedeny získané koncentrace Zn v tkáňových vzorcích po ED XRF a LIBS analýze. Hodnoty návratnosti od 99,6 do 104,5 % v Tabulce 14 potvrzují dobrou shodu mezi oběma metodami. Pouze vzorky z expozičního média s koncentrací Zn 850 a 950  $\mu\text{g.l}^{-1}$  vykazují horší hodnoty (92,5 a 90,2 %) výtěžnosti metody. Důvodem může být nedostatečná homogenita těchto vzorků.

**Tabulka 13** - Hodnoty RSD získané při ED XRF a LIBS analýze

Koncentrace Zn v expozičním médiu [ $\mu\text{g.l}^{-1}$ ]	RSD XRF [%]	RSD LIBS [%]
0	12,3	7
500	6,2	12,3
600	22,5	26,3
750	3,3	23,2
850	9,1	15,8
950	2,1	8

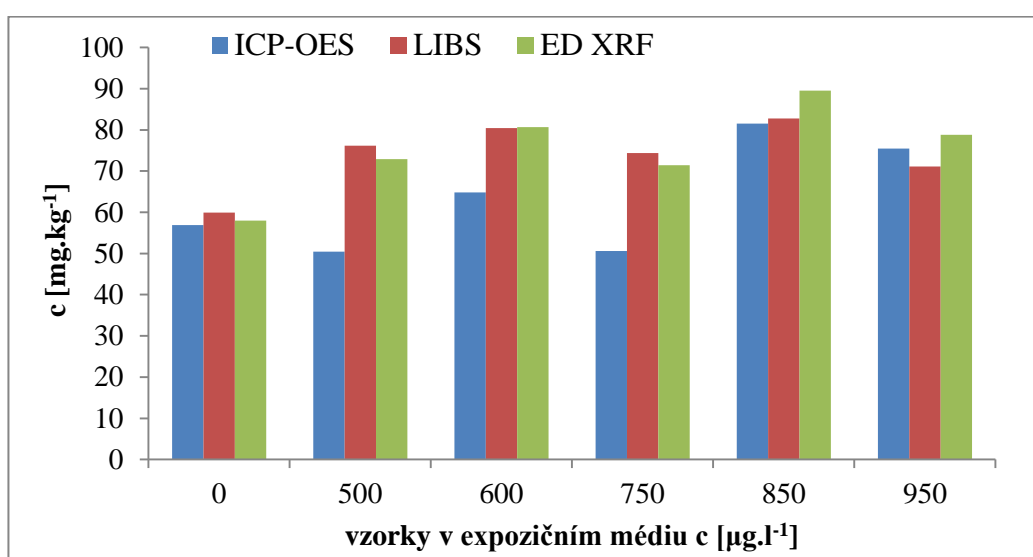
**Tabulka 14** - Výsledky LIBS a ED XRF analýzy tkáňových vzorků roupic

Koncentrace Zn v expozičním médiu [ $\mu\text{g.l}^{-1}$ ]	Hmotnost (100 jedinců) [mg]	Koncentrace Zn v roupicích [ $\text{mg.kg}^{-1}$ ]		Recovery (LIBS/ED XRF) [%]
		ED XRF	LIBS	
0	52	58	59,9	103,3
500	41,6	72,9	76,2	104,5
600	62,9	80,7	80,4	99,6
750	65,6	71,4	74,4	104,2
850	50,6	89,5	82,8	92,5
950	69,8	78,8	71,1	90,2

Pomocí ICP OES nebylo možné analyzovat stejnou sadu vzorků jako pomocí LIBS a ED XRF. Pro srovnání byla tedy kultivací v roztocích o stejných koncentracích jako v předchozím experimentu připravena nová skupina roupic. V Tabulce 15 jsou uvedeny koncentrace Zn změřené v těchto vzorcích pomocí ICP OES. Na Obrázku 26 jsou porovnávány jednotlivé výsledky získané pomocí ED XRF, LIBS a ICP OES. Z Obrázku 26 je zřejmé, že koncentrace Zn v neexponovaných roupicích a u vzorků z expozičního média s koncentrací Zn 850 a 950  $\mu\text{g.l}^{-1}$  získaná pomocí ED XRF a LIBS byla v dobré shodě s koncentrací získanou metodou ICP OES. Ostatní koncentrace Zn získané technikou LIBS a ED XRF se poměrně lišily od výsledků metody ICP OES. Domníváme se, že hlavním důvodem pozorovaného rozdílu je, že opakovaná expozice jednotlivých roupic v kultivačních médiích nevedla ke stejné koncentraci Zn v jejich tkáních. Výsledky tedy spíše odrážejí rozdíly v biologické dostupnosti Zn, nežli v rozdílech metrologických vlastností jednotlivých metod.

**Tabulka 15** - Koncentrace Zn v reálných tkáňových vzorcích roupic po jejich expozici v Zn obohaceném živném médiu změřené pomocí ICP OES

Koncentrace Zn v expozičním médiu [ $\mu\text{g.l}^{-1}$ ]	Hmotnost tkáňového vzorku (100 jedinců) [mg]	Koncentrace Zn v roupicích [ $\text{mg.kg}^{-1}$ ]
0	46,3	56,9
500	45,3	50,5
600	67,6	64,8
750	65,9	50,6
850	48	81,5
950	57,1	75,5



**Obrázek 26** - Porovnávání jednotlivých výsledků získaných pomocí ED XRF, LIBS a ICP OES

## 4 ZÁVĚR

Byla vypracována literární rešerše podávající informace o kvantitativním stanovení toxických prvků zejména zinku (Zn) ve vzorcích rostlinných, živočišných tkání a gelů. V práci jsou popsány metody přípravy vzorku před analýzou a následná analýza pomocí techniky LIBS. Rešerše obsahuje také poznatky z jednotlivých studií o limitech detekce a parametrech reprodukovatelnosti měření.

Předmětem experimentální části diplomové práce bylo navržení metody pro analýzu zinku ve tkáňových vzorcích kroužkovce *Enchytraeus crypticus*, který je využíván jako biologický model při testech ekotoxicity půdních kontaminantů. Analýza byla provedena pomocí techniky LIBS.

V případě analýzy tkáňových vzorků bylo třeba nalézt nosič, na němž by takový vzorek mohl být funkčně a bezpečně vkládán do přístroje. Pro uchycení vzorku byla vybrána oboustranná lepicí páska s nízkým obsahem zinku. Také byly zvoleny nejintenzivnější analytické čáry Zn v získaném spektru s vlnovými délkami 202,6 nm, 206,2 nm a 213,9 nm.

Příprava tkáňových vzorků pro optimalizaci podmínek LIBS analýzy byla zvolena následovně. Tkáňové vzorky roupic byly obohacovány roztokem  $ZnCl_2$ . V Petriho misce byly rozplaveny roupice, které byly nabrány štětečkem ze zásobní kultury. Roupice byly zváženy a poté byly umístěny do plastové mikrozkušavky. Ke sto živým roupicím (cca 60 mg) bylo přidáno 100  $\mu$ l zásobního roztoku  $ZnCl_2$  rozpuštěného v destilované vodě. Následně byly vzorky usušeny na vzduchu nalepené na oboustranné lepicí pásce a zafixovány lakem.

Optimalizace podmínek LIBS analýzy byla provedena na základě statistických parametrů regrese c-I křivek měřených za různých experimentálních podmínek. Jako nejvhodnější byla vybrána analytická čára zinku o vlnové délce 202,6 nm. Na LIBS spektrometru byly fixně nastaveny hodnoty parametrů následovně: doba zpoždění mezi pulzy v případě dvoupulzního režimu 7  $\mu$ s, počet analytických bodů 1, počet impulzů na jeden analytický bod 2 a šířka vstupní štěrbinu spektrometru 80  $\mu$ m. Byly zvoleny nejlepší optimální podmínky při analýze Zn následovně: energie pulzu 94,6 mJ a průměr výstupní štěrbinu budícího paprsku 153  $\mu$ m. Za těchto podmínek byla provedena následně kalibrace.

Byla připravena řada kalibračních standardů jednotlivých koncentrací Zn stejným postupem, jako u tkáňových vzorků pro optimalizaci podmínek. Po proměření řady kalibračních standardů byl připraven jiný typ kalibračních standardů s 50  $\mu$ l 25 % hydroxidu tetramethylamonného (TMAH), z důvodu lepší homogenizace a tedy reprodukovatelnosti měření. Jednotlivé mikrozkušavky s obohacenými roupicemi byly vloženy do ultrazvukové

vany po dobu 15 min. Následně byl roztok roupic přenesen na oboustrannou lepicí pásku a po usušení byl zafixován lakem. Takto připravené kalibrační standardy byly analyzovány LIBS spektrometrem. Z naměřených dat byly sestrojeny kalibrační závislosti intenzity signálu na koncentraci Zn v roupicích.

V průběhu kalibrace LIBS spektrometru byla zjištěna nízká reprodukovatelnost měření. Důvodem může být velmi malé množství vzorku, které se přeneso do plazmatu, dále pak chování oboustranné lepicí pásky při možné interakci s laserem a především nedostatečná homogenita vzorku. Vliv na nedostatečnou reprodukovatelnost měření mají také kroužkovci *Enchytraeus crypticus*, protože obsah Zn v neobohacených standardech se výrazně lišil. Domníváme se, že hlavním důvodem je odlišné stáří jednotlivých roupic, dále vliv jejich stravy a také kvalita opláchnutí tkáňových vzorků od agaru.

Jednotlivé kalibrační standardy na oboustranné lepicí pásce byly také využity pro sestavení kalibrační závislosti pro ED XRF techniku. Optimální podmínky při ED XRF analýze Zn byly zvoleny následovně: proud na rentgence 35  $\mu\text{A}$  a napětí na 10 kV. Doba integrace signálu byla 60 s. Spektra byla snímána v oblasti vlnových délek 4 až 36 keV. Výsledky získané proměřením kalibračních standardů pomocí ED XRF byly dostatečně reprodukovatelné.

Byly vypočteny limity detekce podle vztahu  $\text{LOD} = 3\sigma/s$ , kde  $\sigma$  je směrodatná odchylka naměřených intenzit nejnižšího kalibračního standardu za optimálních podmínek a  $s$  je směrnice kalibrační křivky. Také bylo provedeno porovnání metrologických parametrů navržených LIBS a ED XRF metod. Vypočtená hodnota LOD pro ED XRF byla bez TMAH 16,3  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  Zn a následně po přidání 25 % TMAH 10,1  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  Zn. Hodnota LOD vypočtená pro LIBS byla bez TMAH 0,2  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  a následně s 25 % TMAH 0,26  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  Zn. Získané hodnoty LOD po LIBS analýze byly nízké a odpovídají spíše intenzitě pozadí. Z praktického hlediska nemá kvantitativní analýza Zn v koncentracích pod 10,1  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  u takového typu tkáňového vzorku žádný význam.

Postup přípravy kalibračních standardů s přídavkem 25 % TMAH byl vyhodnocen jako vhodnější pro praktické použití, protože jedním z kritických parametrů navrhované metody je dostatečná reprodukovatelnost, která se po přídavku v nižších koncentracích Zn zlepšila.

Reálné tkáňové vzorky byly připraveny podle postupu, který byl odvozen od testu akutní toxicity na roupicích *Enchytraeus crypticus* ve vodním prostředí. Roupice byly exponovány v živných roztocích o koncentraci Zn 0, 500, 600, 750, 850 a 950  $\mu\text{g.l}^{-1}$ . Po ukončení 72 hodinové expozice byly naexponované roupice opláchnuty v destilované vodě, vloženy do mikrozkuřavky a poté k nim bylo přidáno 50  $\mu\text{l}$  25 % hydroxidu tetramethylamonného. Jednotlivé mikrozkuřavky byly vloženy do ultrazvukové lázně na 15 min a následně byly roztoky roupic přeneseny na oboustrannou lepicí pásku, zafixovány lakem na vlasy a sušeny na vzduchu. Použitím navržené metody byly změřeny koncentrace Zn v tkáňových vzorcích kroužkovců *Enchytraeus crypticus* pomocí ED XRF a LIBS analýzy. Výsledky získané proměřením tkáňových vzorků pomocí ED XRF a LIBS byly dostatečně reprodukovatelné. Hodnoty návratnosti 99,6 až 104,5 % potvrzují dobrou shodu mezi oběma metodami.

Na závěr byly porovnávány jednotlivé koncentrace Zn získané pomocí ED XRF, LIBS a ICP OES. Pomocí ICP OES nebylo možné analyzovat stejnou sadu tkáňových vzorků jako pomocí LIBS a ED XRF. Pro srovnání byla tedy kultivací v roztocích o stejných koncentracích jako v předchozím experimentu připravena nová skupina roupic. Některé koncentrace Zn získané technikou LIBS a ED XRF se poměrně lišily od výsledků metody ICP OES. Na zjištěné koncentrace Zn může mít vliv nedostatečná homogenita vzorku při jejich přípravě k LIBS a ED XRF analýze. Domníváme se, že hlavním důvodem pozorovaného rozdílu je, že opakování expozice jednotlivých roupic v kultivačních médiích nevedla ke stejné koncentraci Zn v jejich tkáních. Výsledky tedy spíše odrážejí rozdíly v biologické dostupnosti Zn, nežli v rozdílech metrologických vlastností jednotlivých metod.

Z hlediska metrologických parametrů je navržená LIBS a ED XRF technika použitelná pro vyhodnocení ekotoxikologických experimentů na *Enchytraeus crypticus*. Pro zlepšení reprodukovatelnosti měření, je třeba zvážit i jiný postup přípravy tkáňových vzorků.

## 5 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Rai, V. N., Rai, A. K., Yueh, F. Y., & Singh, J. P. (2014). Laser-induced breakdown spectroscopy for real time and online elemental analysis. *arXiv preprint arXiv:1407.0459*.
2. Anabitarte, F., Cobo, A., & Lopez-Higuera, J. M. (2012). Laser-induced breakdown spectroscopy: fundamentals, applications, and challenges. *ISRN Spectroscopy, 2012*.
3. Singh, J. P., & Thakur, S. N. (Eds.). (2007). *Laser-induced breakdown spectroscopy*. Elsevier.
4. Manzoor, S., Ugena, L., Tornero-Lopéz, J., Martín, H., Molina, M., Camacho, J. J., & Cáceres, J. O. (2016). Laser induced breakdown spectroscopy for the discrimination of *Candida* strains. *Talanta, 155*, 101-106.
5. Kim, T., & Lin, C. T. (2012). Laser-induced breakdown spectroscopy. In *Advanced Aspects of Spectroscopy*. InTech.
6. Čtvrtníčková, T. (2009). Analysis of solid materials by means of laser-induced breakdown spectroscopy (*Doctoral dissertation, Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta*).
7. Hamad, A. H. (2016). Effects of Different Laser Pulse Regimes (Nanosecond, Picosecond and Femtosecond) on the Ablation of Materials for Production of Nanoparticles in Liquid Solution. In *High Energy and Short Pulse Lasers*. InTech.
8. Braga, J. W. B., Trevizan, L. C., Nunes, L. C., Rufini, I. A., Santos, D., & Krug, F. J. (2010). Comparison of univariate and multivariate calibration for the determination of micronutrients in pellets of plant materials by laser induced breakdown spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy, 65*(1), 66-74.
9. Vítková, G. (2015) Spektrometrie laserem buzeného plazmatu (LIBS) vzdálených objektů, *Disertační práce, Brno*.
10. Zhang, T., Liang, L., Wang, K., Tang, H., Yang, X., Duan, Y., & Li, H. (2014). A novel approach for the quantitative analysis of multiple elements in steel based on laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS) and random forest regression (RFR). *Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 29*(12), 2323-2329.
11. Yang, N. (2009). Elemental Analysis of Soils Using Laser-Induced Breakdown Spectroscopy (LIBS).
12. Fantoni, R., Caneve, L., Colao, F., Fornarini, L., Lazic, V., & Spizzichino, V. (2008). Methodologies for laboratory laser induced breakdown spectroscopy semi-quantitative and quantitative analysis—a review. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy, 63*(10), 1097-1108.

13. Jantzi, S. C., Motto-Ros, V., Trichard, F., Markushin, Y., Melikechi, N., & De Giacomo, A. (2016). Sample treatment and preparation for laser-induced breakdown spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, *115*, 52-63.
14. Kratochvíl, T. (2010). Prvková analýza práškových vzorků ve formě tenké vrstvy pomocí LIBS spektrometrie. *Diplomová práce*. Pardubice
15. Cavalcanti, G. H., Teixeira, D. V., Legnaioli, S., Lorenzetti, G., Pardini, L., & Palleschi, V. (2013). One-point calibration for calibration-free laser-induced breakdown spectroscopy quantitative analysis. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, *87*, 51-56.
16. Santos, D., Nunes, L. C., de Carvalho, G. G. A., da Silva Gomes, M., de Souza, P. F., de Oliveira Leme, F., ... & Krug, F. J. (2012). Laser-induced breakdown spectroscopy for analysis of plant materials: a review. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, *71*, 3-13.
17. Rusak, D. A., Zeleniak, A. E., Obuhosky, J. L., Holdren, S. M., & Noldy, C. A. (2013). Quantitative determination of calcium, magnesium, and zinc in fingernails by laser-induced breakdown spectroscopy. *Talanta*, *117*, 55-59.
18. Alvira, F. C., Rozzi, F. R., & Bilmes, G. M. (2010). Laser-induced breakdown spectroscopy microanalysis of trace elements in homo sapiens teeth. *Applied spectroscopy*, *64*(3), 313-319.
19. Han, J. H., Moon, Y., Lee, J. J., Choi, S., Kim, Y. C., & Jeong, S. (2016). Differentiation of cutaneous melanoma from surrounding skin using laser-induced breakdown spectroscopy. *Biomedical optics express*, *7*(1), 57-66.
20. Peruchi, L. C., Nunes, L. C., de Carvalho, G. G. A., Guerra, M. B. B., de Almeida, E., Rufini, I. A., ... & Krug, F. J. (2014). Determination of inorganic nutrients in wheat flour by laser-induced breakdown spectroscopy and energy dispersive X-ray fluorescence spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, *100*, 129-136.
21. Nunes, L. C., Braga, J. W. B., Trevizan, L. C., de Souza, P. F., de Carvalho, G. G. A., Júnior, D. S., ... & Krug, F. J. (2010). Optimization and validation of a LIBS method for the determination of macro and micronutrients in sugar cane leaves. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, *25*(9), 1453-1460
22. da Silva Gomes, M., de Carvalho, G. G. A., Junior, D. S., & Krug, F. J. (2013). A novel strategy for preparing calibration standards for the analysis of plant materials by laser-induced breakdown spectroscopy: A case study with pellets of sugar cane leaves. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, *86*, 137-141.
23. de Carvalho, G. G. A., Junior, D. S., Nunes, L. C., da Silva Gomes, M., de Oliveira Leme, F., & Krug, F. J. (2012). Effects of laser focusing and fluence on the analysis of pellets of plant materials by laser-induced breakdown spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, *74*, 162-168.

24. Guerra, M. B. B., Adame, A., de Almeida, E., de Carvalho, G. G. A., Brasil, M. A. S., Santos Jr, D., & Krug, F. J. (2015). Direct analysis of plant leaves by EDXRF and LIBS: microsampling strategies and cross-validation. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 30(7), 1646-1654.
25. de Carvalho, G. G. A., Moros, J., Santos Jr, D., Krug, F. J., & Laserna, J. J. (2015). Direct determination of the nutrient profile in plant materials by femtosecond laser-induced breakdown spectroscopy. *Analytica chimica acta*, 876, 26-38.
26. Santos, D., Samad, R. E., Trevizan, L. C., de Freitas, A. Z., Vieira, N. D., & Krug, F. J. (2008). Evaluation of femtosecond laser-induced breakdown spectroscopy for analysis of animal tissues. *Applied Spectroscopy*, 62(10), 1137-1143.
27. Imam, H., Mohamed, R., & Eldakrouri, A. A. (2012). Primary study of the use of laser-induced plasma spectroscopy for the diagnosis of breast cancer. *Optics and Photonics Journal*, 2(03), 193
28. Moncayo, S., Trichard, F., Busser, B., Sabatier-Vincent, M., Pelascini, F., Pinel, N., ... & Motto-Ros, V. (2017). Multi-elemental imaging of paraffin-embedded human samples by laser-induced breakdown spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 133, 40-44.
29. Hrdlička, A., Prokeš, L., Staňková, A., Novotný, K., Vitešníková, A., Kanický, V., ... & Páleníková, K. (2010). Development of a remote laser-induced breakdown spectroscopy system for investigation of calcified tissue samples. *Applied Optics*, 49(13), C16-C20.
30. Viger, M. L., Gravel, J. F. Y., Brouard, D., Beauchemin, D., & Boudreau, D. (2005). Use of Sol–Gels as Solid Matrixes for Trace Analysis by UV Laser Ablation and Laser-Enhanced Ionization Detection. *Analytical chemistry*, 77(2), 706-710.
31. Jaiswal, S., McHale, P., & Duffy, B. (2012). Preparation and rapid analysis of antibacterial silver, copper and zinc doped sol–gel surfaces. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 94, 170-176.
32. Znaidi, L. (2010). Sol–gel-deposited ZnO thin films: A review. *Materials Science and Engineering: B*, 174(1-3), 18-30.
33. Mohaidat, Q., Palchaudhuri, S., & Rehse, S. J. (2011). The effect of bacterial environmental and metabolic stresses on a laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS) based identification of Escherichia coli and Streptococcus viridans. *Applied spectroscopy*, 65(4), 386-392.
34. Sezer, B., Durna, S., Bilge, G., Berkkan, A., Yetişemeyen, A., & Boyaci, I. H. (2017). Identification of milk fraud using laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS). *International Dairy Journal*.
35. Moncayo, S., Rosales, J. D., Izquierdo-Hornillos, R., Anzano, J., & Caceres, J. O. (2016). Classification of red wine based on its protected designation of origin (PDO) using Laser-induced Breakdown Spectroscopy (LIBS). *Talanta*, 158, 185-191.

36. Dhiman, C., Reddy, M. N., Gulati, K., & Khan, M. S. (2014). Detection of Elemental Composition of Lubricating Grease Using Laser Induced Breakdown Spectroscopy. *Lubricants*, 2(4), 223-236.
37. Emde, B., Hermsdorf, J., Kaieler, S., & Overmeyer, L. (2015). Identification of the zinc dispersion in rubber blends by LIBS with a Nd: YAG laser.
38. Temiz, H. T., Sezer, B., Berkkan, A., Tamer, U., & Boyaci, I. H. (2017). Assessment of Laser Induced Breakdown Spectroscopy as a Tool for Analysis of Butter Adulteration. *Journal of Food Composition and Analysis*.
39. Borowik, T., Przybyło, M., Pala, K., Otlewski, J., & Langner, M. (2011). Quantitative measurement of Au and Fe in ferromagnetic nanoparticles with Laser Induced Breakdown Spectroscopy using a polymer-based gel matrix. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 66(9-10), 726-732
40. Novais, S. C. (2011). *From genes to population: Effects of toxicants on Enchytraeus albidus* (Doctoral dissertation, Universidade de Aveiro (Portugal)).
41. He, E. (2015). Incorporating toxicokinetics and toxicodynamics in metal bioavailability models using *Enchytraeus crypticus*.
42. Pelosi, C., & Römcke, J. (2017). Enchytraeids as bioindicators of land use and management. *Applied Soil Ecology*.
43. Hrdá, K., Opršal, J., Knotek, P., Pouzar, M., & Vlček, M. (2016). Toxicity of zinc oxide nanoparticles to the annelid *Enchytraeus crypticus* in agar-based exposure media. *Chemical Papers*, 70(11), 1512-1520.