



ADAM JAROSŁAW SAJNÓG

ZASTOSOWANIE METODY  
ABLACJI LASEROWEJ POŁĄCZONEJ Z ICP-MS  
DO OZNACZANIA I WIZUALIZACJI  
ROZMIESZCZENIA PIERWIASTKÓW  
W MIĘKKICH TKANKACH USTROJOWYCH

PRACA DOKTORSKA WYKONANA  
W PRACOWNI ANALIZY SPEKTROSKOPOWEJ PIERWIASTKÓW  
WYDZIAŁU CHEMII  
UNIwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

PROMOTOR: PROF. DR HAB. DANUTA BARAŁKIEWICZ  
PROMOTOR POMOCNICZY: DR ANETTA HANĆ

POZNAŃ 2017

**Pragnę złożyć serdeczne podziękowania:**

**Pani Profesor Danucie Barańkiewicz**

za cenne rady, zaangażowanie, pomoc i opiekę merytoryczną  
w trakcie badań i pisania rozprawy doktorskiej

**Dr Anecie Hanć**

za cenne wskazówki, poświęcony czas,  
nieustającą pomoc i pogotowie naukowe i duchowe

**Koleżankom i Kolegom**

z Pracowni Analizy Spektroskopowej Pierwiastków

za serdeczną atmosferę pracy, życzliwość i ciekawe dyskusje  
naukowe i nie tylko

**Rodzicom i Rodzeństwu**

za niesłabnące wsparcie duchowe i materialnie.  
Bez Was ta praca by nie powstała.

Praca częściowo finansowana w ramach grantu:

NCN Preludium UMO-2015/N/17/ST4/03808

„Ilościowa wizualizacja rozmieszczenia pierwiastków  
w miękkich tkankach ustrojowych z zastosowaniem  
techniki LA-ICP-MS”

# SPIS TREŚCI

<b>WSTĘP .....</b>	<b>8</b>
<b>CZĘŚĆ TEORETYCZNA .....</b>	<b>9</b>
<b>1. ABLACJA LASEROWA Z DETEKcją W SPEKTROMETRZE MAS Z JONIZACją W PLAZMIE SPRZĘżONEJ INDUKCYJNIE .....</b>	<b>10</b>
1.1. INFORMACJE OGóLNE .....	10
1.2. RODZAJE LASERóW .....	11
1.3. KOMORA ABLACYJNA .....	11
1.4. KOMPROMIS MIĘDZY PARAMETRAMI APARATUROWYMI A JAKOŚCIĄ POMIARóW .....	12
1.5. MECHANIZMY ABLACJI .....	13
1.6. FRAKCJONOWANIE .....	13
1.7. INTERFERENCJE SPEKTRALNE .....	14
1.8. INTERFERENCJE FIZYCZNE .....	16
<b>2. KALIBRACJA .....</b>	<b>16</b>
2.1. WZORZEC WEWNĘTRZNY .....	17
2.2. STRATEGIE KALIBRACJI W ANALIZIE TKANEK .....	18
<b>3. BADANIE PRóBEK KLINICZNYCH .....</b>	<b>22</b>
3.1. PRZYGOTOWANIE PRóBEK KLINICZNYCH DO ANALIZY METODĄ LA-ICP-MS .....	22
3.2. PODSTAWKI POD PRóBKĘ .....	23
3.3. WYMIARY PRóBKI .....	24
3.4. ZAGADNIENIA ETYCZNE .....	24
3.5. IMPLANTY .....	25
3.6. TOKSYCZNOŚĆ PIERWIASTKóW .....	26
<b>4. PRZEGLĄD LITERATURY ŚWIATOWEJ – ANALIZA PRóBEK KLINICZNYCH METODĄ LA-ICP-MS .....</b>	<b>27</b>
4.1. CELE BADAń I RODZAJE PRóBEK .....	37
4.2. ANALITY .....	41
4.3. APARATURA .....	42
4.4. ASPEKTY METROLOGICZNE .....	43
<b>CEL PRACY .....</b>	<b>46</b>
<b>CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA .....</b>	<b>47</b>
<b>5. APARATURA, ODCZYNNIKI, ROZTWORY, MATERIAŁ BADAWCZY, MATERIAŁY ODNIESIENIA .....</b>	<b>48</b>
5.1. APARATURA I SPRZĘT LABORATORYJNY .....	48
5.2. ODCZYNNIKI, GAZY I MATERIAŁY ODNIESIENIA .....	48
5.3. PRZYGOTOWANIE WZORCÓW STAŁYCH I ROZTWORóW .....	50
5.4. MATERIAŁ BADAWCZY .....	53
5.5. OPTIMALIZACJA PARAMETRóW APARATUROWYCH .....	56
<b>WYNIKI I DyskusJA .....</b>	<b>66</b>
<b>6. PROCEDURY ANALITYCZNE OZNACZANIA TI, AL I V W TKANKACH MIĘKKICH .....</b>	<b>66</b>

6.1.	WYBÓR IZOTOPU TI. INTERFERENCJE SPEKTRALNE.....	66
6.2.	ANALIZA PODSTAWKI Z TWORZYWA SZTUCZNEGO .....	68
6.3.	KALIBRACJA (ASPEKTY ILOŚCIOWE).....	68
6.4.	ANALIZA ŚCIEŻEK POABLACYJNYCH Z UŻYCIEM PROFILOMETRII OPTYCZNEJ I SEM.....	79
6.5.	MINERALIZACJA WZORCÓW.....	82
6.6.	PARAMETRY WALIDACYJNE.....	84
6.7.	WŁAŚCIWOŚCI WYNIKU POMIARU.....	91
<b>7.</b>	<b>ZASTOSOWANIE PROCEDUR ANALITYCZNYCH OZNACZANIA TI, AL I V W PRÓBKACH RZECZYWISTYCH</b>	
	<b>– BŁONIE ŚLIZOWEJ JAMY USTNEJ.....</b>	<b>93</b>
7.1.	ANALIZA ELEMENTÓW SYSTEMU IMPLANTOLOGICZNEGO.....	94
7.2.	ANALIZA BŁONY ŚLIZOWEJ JAMY USTNEJ – PROCEDURA NR 1.....	95
7.3.	ANALIZA BŁONY ŚLIZOWEJ JAMY USTNEJ – PROCEDURA NR 2.....	101
7.4.	ANALIZA BŁONY ŚLIZOWEJ JAMY USTNEJ – PROCEDURA NR 3.....	110
<b>8.</b>	<b>PODSUMOWANIE I WNIOSKI .....</b>	<b>118</b>
	<b>LITERATURA .....</b>	<b>121</b>
	<b>STRESZCZENIE.....</b>	<b>132</b>
	<b>SUMMARY.....</b>	<b>135</b>
	<b>CURRICULUM VITAE .....</b>	<b>138</b>
	<b>SPIS DOROBKU NAUKOWEGO .....</b>	<b>139</b>

## WYKAZ STOSOWANYCH AKRONIMÓW

<b>AAS</b>	atomowa spektrometria absorpcyjna <i>Atomic Absorption Spectrometry</i>
<b>CCQM</b>	Komitet Liczności Materii <i>Comité Consultatif pour la Quantité de Matière</i>
<b>CRM</b>	certyfikowany materiał odniesienia <i>Certified Reference Material</i>
<b>CV</b>	współczynnik zmienności <i>Coefficient of Variation</i>
<b>ERM</b>	Europejskie Materiały Odniesienia <i>European Reference Materials</i>
<b>HE</b>	Hematoksylina i Eozyna
<b>ICP-MS</b>	spektrometria mas z jonizacją w plazmie sprzężonej indukcyjnie <i>Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry</i>
<b>ICP-OES</b>	optyczna spektrometria emisyjna z jonizacją w plazmie sprzężonej indukcyjnie <i>Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry</i>
<b>ICP-TOF-MS</b>	spektrometria mas z jonizacją w plazmie sprzężonej indukcyjnie z analizatorem czasu przelotu <i>Inductively Coupled Plasma Time-Of-Flight Mass Spectrometry</i>
<b>ID</b>	rozcieńczenia izotopowe <i>Isotope Dilution</i>
<b>IDL</b>	instrumentalna granica wykrywalności <i>Instrumental Detection Limit</i>
<b>IS</b>	wzorec wewnętrzny <i>Internal Standard</i>
<b>IUPAC</b>	Międzynarodowa Unia Chemii Czystej i Stosowanej <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
<b>LA</b>	ablacja laserowa <i>Laser Ablation</i>
<b>LA-ICP-MS</b>	ablacja laserowa z detekcją w spektrometrze mas z jonizacją w plazmie sprzężonej indukcyjnie <i>Laser Ablation Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry</i>
<b>LOD</b>	granica wykrywalności <i>Limit Of Detection</i>
<b>LOQ</b>	granica oznaczalności <i>Limit Of Quantification</i>
<b>MC-ICP-MS</b>	wielodetektorowa spektrometria mas z jonizacją w plazmie sprzężonej indukcyjnie <i>Multi-Collector Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry</i>

<b>MDL</b>	granica wykrywalności metody analitycznej <i>Method Detection Limit</i>
<b>MELISA</b>	test immunostymulacji limfocytów pamięci <i>MEmory Lymphocyte Immunostimulation Assay</i>
<b>MRI</b>	obrazowanie rezonansem magnetycznym <i>Magnetic Resonance Imaging</i>
<b>Nd:YAG</b>	granat itrowo-glinowy domieszkowany neodymem <i>Neodymium doped Yttrium-Aluminium Garnet</i>
<b>NIST</b>	Narodowy Instytut Standaryzacji i Technologii <i>National Institute of Standards and Technology</i>
<b>PET</b>	poli(tereftalanetylenu) <i>PolyEthylene Terephthalate</i>
<b>RSD</b>	względne odchylenie standardowe <i>Relative Standard Deviation</i>
<b>SD</b>	odchylenie standardowe <i>Standard Deviation</i>
<b>SEM</b>	skaningowy mikroskop elektronowy <i>Scanning Electron Microscope</i>
<b>SF-ICP-MS</b>	spektrometria mas z jonizacją w plazmie sprzężonej indukcyjnie z podwójnym ogniskowaniem <i>Sector Field Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry</i>
<b>SN-ICP-MS</b>	spektrometria mas z jonizacją w plazmie sprzężonej indukcyjnie z rozpylaniem roztworu <i>Solution Nebulisation Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry</i>
<b>Ti6Al4V</b>	stop o składzie ok. 90% Ti, 6% Al, 4% V, 0,25% Fe, 0,2% O
<b>Triton® X-100</b>	eter p-1,1,3,3-tetrametylobutylofenyloowo polietylenoglikolowy (Triton® X-100 to zarejestrowana nazwa handlowa firmy Union Carbide zakupiona od Rohm & Haas Co)
<b>VIM</b>	Międzynarodowy Słownik Terminów Metrologicznych <i>Vocabulaire International de Métrologie</i>
<b>Yb:KGW</b>	wolframian potasowo-gadolinowy domieszkowany iterbem <i>Ytterbium doped Potassium-Gadolinium Tungstate</i>

## WSTĘP

W ciągu ostatnich kilku dziesięcioleci medycyna poczyniła ogromne postępy w zakresie implantologii, oferując materiały o coraz lepszych właściwościach, poprawiając komfort życia pacjentów. W praktyce stomatologicznej najczęściej stosuje się implanty tytanowe ze względu na dobre właściwości mechaniczne, wysoką odporność na korozję i dobrą biokompatybilność. Jednakże, implanty mogą ulegać powolnej degradacji w wyniku działania sił mechanicznych i kontaktu ze środowiskiem jamy ustnej, uwalniając jony i cząstki metaliczne do okolicznych tkanek. Zwiększona zawartość pierwiastków metalicznych w organizmie pacjenta może być przyczyną niepożądanych reakcji, takich jak alergię, stany zapalne, zatrucia czy odrzucenie implantu. W celu monitorowania stanu zdrowia pacjenta oraz losów materiałów protetycznych w organizmie niezbędne jest prowadzenie badań interdyscyplinarnych wymagających współpracy lekarzy klinicystów oraz chemików analityków. Urządzenia diagnostyczne są narzędziami pracy chemików analityków, których ważnym zadaniem jest opracowywanie nowych procedur analitycznych i wprowadzanie zasad metrologii do pomiarów chemicznych, umożliwiając badania, na podstawie których opiera się diagnostyka medyczna oraz monitorowanie wpływu zabiegów związanych z wprowadzaniem ciał obcych do organizmu człowieka.

Aby zbadać jaki wpływ na okoliczne tkanki wywierają implanty konieczne jest nie tylko ilościowe określenie zawartości pierwiastków metalicznych pochodzących z implantu, ale także poznanie przestrzennego rozmieszczenia analitów na powierzchni tkanki oraz stwierdzenie formy występowania pierwiastków. Do tego celu należy zastosować metody pozwalające na wizualizację rozmieszczenia analitów na powierzchni badanej próbki poprzez mapowanie pierwiastków w sposób ilościowy. Metodą umożliwiającą sporządzenie map zawartości i rozmieszczenia pierwiastków na powierzchni próbki badanej jest ablacja laserowa z detekcją w spektrometrze mas z jonizacją w plazmie sprzężonej indukcyjnie, LA-ICP-MS (ang. *laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry*). Miarodajne wyniki analiz muszą opierać się na prawidłowo opracowanej procedurze przygotowania i pomiarów próbki i wzorców z uwzględnieniem zasad metrologii chemicznej czyli zastosowanie zwalidowanych metod i zapewnienie spójności pomiarowej wyników pomiarów próbki badanej.

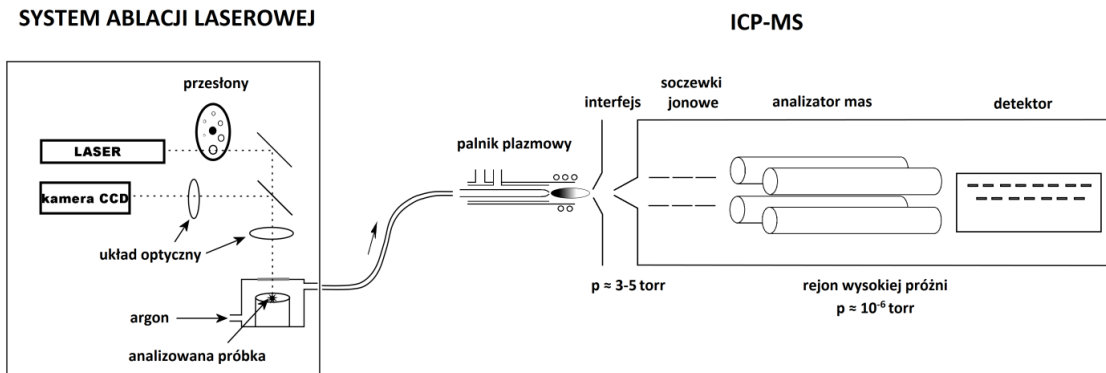
Główną ideą rozprawy doktorskiej było opracowanie procedur analitycznych w celu uzyskania informacji o rozmieszczeniu i zawartości analizowanych pierwiastków w tkankach miękkich ustrojowych metodą bezpośredniej analizy próbek stałych, LA-ICP-MS. Prezentowane w niniejszej pracy wyniki badań są efektem współpracy interdyscyplinarnej chemików analityków z lekarzami stomatologii.

## **CZĘŚĆ TEORETYCZNA**

# 1. Ablacja laserowa z detekcją w spektrometrze mas z jonizacją w plazmie sprzężonej indukcyjnie

## 1.1. Informacje ogólne

LA-ICP-MS jest nowoczesną metodą analityczną pozwalającą na bezpośredni pomiar *in-situ* zawartości pierwiastków w próbce stałej. Metoda ta jest połączeniem systemu ablacji laserowej, LA (ang. *laser ablation*), będącym sposobem wprowadzania próbki, oraz ICP-MS, pełniącemu funkcję detektora analizowanych pierwiastków [1–4]. Metoda LA-ICP-MS łączy zalety czułej techniki ICP-MS wraz z możliwością analizy powierzchni próbki stałej z rozdzielczością przestrzenną rzędu 4-200  $\mu\text{m}$ , umożliwiając stworzenie dwuwymiarowych map zawartości wybranych izotopów pierwiastków oferując niskie wartości precyzji i granicy wykrywalności, rzędu  $\text{ng g}^{-1}$ , oraz wysokie czułości. Ponadto, metoda umożliwia przeprowadzenie analizy wielopierwiastkowej w zakresie stężeń/zawartości sięgającym 8 rzędów wielkości, analiza przebiega w sposób mikroniszczący wobec próbki i wymagana jest minimalna obróbka próbki przed analizą, zwykle polegająca na przemyciu próbki rozpuszczalnikiem lub roztworem kwasu, i dopasowaniu wymiarów tak, aby zmieściła się w komorze ablacyjnej. Zasada działania systemu LA-ICP-MS jest następująca: wysokoenergetyczna wiązka laserowa odrywa porcję badanej próbki stałej, która pod postacią aerozolu jest transportowana w strumieniu argonu do plazmy, w której ulega szeregowi procesów, w tym desolvatacji, topnieniu, parowaniu, atomizacji, wzbudzeniu i jonizacji. Skupiona wiązka jonów wytworzonych w plazmie kierowana jest do analizatora mas, w którym następuje separacja jonów ze względu na stosunek masy do ładunku  $m/z$ , po czym jony o określonym stosunku  $m/z$  są zliczane przez detektor. W spektrometrach ICP-MS stosuje się jeden z trzech analizatorów mas: kwadrupol, analizator czasu przelotu ICP-TOF-MS (ang. *inductively coupled plasma time-of-flight mass spectrometry*) oraz z podwójnym ogniskowaniem SF-ICP-MS (ang. *sector field inductively coupled plasma mass spectrometry*). Ponadto, w instrumentach kwadrupolowych stosuje się komorę reakcyjną/kolizyjną, służącą do eliminacji interferencji spektralnych, przy użyciu odpowiedniego gazu, np. amoniaku, wodoru, helu, metanu. O usuwaniu interferencji można przeczytać więcej w dalszej części niniejszej pracy. W systemach LA stosuje się lasery o długości fali od nadfioletu próżniowego do podczerwieni oraz montuje się komory ablacyjne o różnych objętościach, w zależności od wielkości analizowanej próbki. Spotykane podzespoły komercyjnie dostępnych systemów LA, rodzaje laserów i komór ablacyjnych, opisane są poniżej. Na rysunku 1 przedstawiony jest schemat instrumentów w metodzie LA-ICP-MS, w której zastosowano spektrometr z analizatorem kwadrupolowym.



Rysunek 1 Schemat budowy i połączenia systemu LA z ICP-MS (źródło: własne)

### 1.2. Rodzaje laserów

System LA wyposażony jest w laser generujący wiązkę o określonej długości fali, w zależności od zastosowanego ośrodka czynnego. Najpowszechniej spotykane ośrodki czynne w systemach LA to kryształ granatu itrowo-glinowego domieszkowanego neodymem (Nd:YAG) generujący wiązkę w zakresie podczerwieni o długości fali  $\lambda=1064$  nm. Zastosowanie optyki opartej o kryształy generujące drugą i wyższe harmoniczne wyjściowej długości fali, powodując zwielokrotnienie jej częstotliwości, co w efekcie skutkuje emisją wiązki o zmniejszonej długości fali  $\lambda=532$  nm (druga harmoniczna),  $\lambda=266$  nm (czwarta harmoniczna),  $\lambda=213$  nm (piąta harmoniczna) i  $\lambda=193$  nm (zastosowanie optycznego oscylatora parametrycznego). W laserach ekscymerowych zastosowano gazowy ośrodek czynny, będący mieszaniną argonu i fluoru, emitujący wiązkę laserową w zakresie głębokiego ultrafioletu ( $\lambda=193$  nm) o czasie trwania impulsu w zakresie 10-25 ns [5]. Zastosowanie gazu jako ośrodka czynnego powoduje zwiększone nakłady pracy przy obsłudze systemu, jednakże generuje wiązkę o większej energii i o równomiernym profilu [1]. Systemy LA wyposażone w ośrodek tytanowo-szafirowy generują wiązkę w zakresie podczerwieni o ultrakrótkim czasie trwania impulsu rzędu 100 fs, co pozwala na znaczne ograniczenie niepożądanych efektów termicznych w wyniku interakcji wiązki laserowej z próbką.

### 1.3. Komora ablacyjna

Próbka badana umieszczana jest w komorze ablacyjnej, wyposażonej w okienko kwarcowe przepuszczalne dla wiązki laserowej, do której doprowadzany jest w sposób ciągły gaz nośny, najczęściej argon. Wiązka laserowa pozostaje nieruchoma w większości komercyjnych systemów LA i kierowana jest przez system przesłony, nadających jej odpowiednią średnicę i kształt. W zależności

od modelu systemu ablacji laserowej, możliwe jest zastosowanie komór o różnych objętościach, zwykle w zakresie 0,25-60 cm<sup>3</sup>, a także systemy przenośne, umożliwiając analizę większych próbek, np. dzieł sztuki [1,6]. Oprogramowanie sterujące pracą systemu LA umożliwia kontrolę energii wyjściowej wiązki laserowej, średnicę wiązki skupionej na próbce (w zakresie 4-200 μm), częstotliwość impulsów (typowo w zakresie 1-20 Hz), szybkość skanowania próbki. Ustawienie sposobu przesuwania komory ablacyjnej podczas analizy umożliwia przeprowadzenie ablacji w określony sposób: statyczny, komora pozostaje nieruchoma w płaszczyźnie „xy” ale może poruszać się w płaszczyźnie „z” w celu utrzymania skupionej wiązki na powierzchni próbki, oraz dynamiczny, komora przesuwa się w płaszczyźnie „x” i/lub „y” na kształt linii lub prostokątu.

#### **1.4. Kompromis między parametrami aparaturowymi a jakością pomiarów**

Objętość komory ablacyjnej ma istotny wpływ na dyspersję aerozolu wytworzonego podczas ablacji i szybkość wymywania aerozolu z komory do detektora. Większa objętość skutkuje większym rozproszeniem aerozolu w komorze i dłuższym czasem wymywania aerozolu, co z kolei ma wpływ na kształt i intensywność sygnałów analitycznych. W przypadku próbek niehomogenicznych, szczególnie gdy występują obszary o znacznie większej różnicy zawartości analitu, np. w przypadku drobin metalicznych w tkance miękkiej, sygnały będą nakładać się na siebie generując rozmyte sygnały (ogonowanie sygnałów). Objętość komory i długość oraz średnica przewodów transportujących aerozol wpływają również na czas jego transportu, od uderzenia wiązki laserowej do zarejestrowania sygnału przez detektor, który może wynosić nawet kilka sekund. W przypadku metody mapowania pierwiastków, optymalizacja warunków ablacji (szybkość przepływu gazu nośnego, szybkość skanowania, objętość komory, długość przewodów) jest szczególnie istotna dla uzyskania wysokiej jakości map zawartości pierwiastków. Niezbędne jest także odpowiednie ustawienie parametrów ICP-MS, a w szczególności czas zbierania danych dla poszczególnych m/z, liczba przemianań oraz liczba mierzonych m/z. Mniejsza szybkość skanowania próbki pozwala na uzyskanie lepszej rozdzielczości przestrzennej, ale wydłuża analizę, która może trwać nawet kilka do kilkunastu godzin dla pojedynczej próbki. Ustawienie mniejszej średnicy wiązki znacznie poprawia rozdzielczość map, ale jednocześnie wydłuża czas analizy i sprawia, że mniejsza ilość materiału trafia do detektora co obniża czułość. Ustawienia powyższych parametrów powinno być dostosowane do problemu badawczego tak, aby znaleźć kompromis między odpowiednio intensywnymi sygnałami, pożądaną rozdzielczością przestrzenną map i całkowitym czasem analizy.

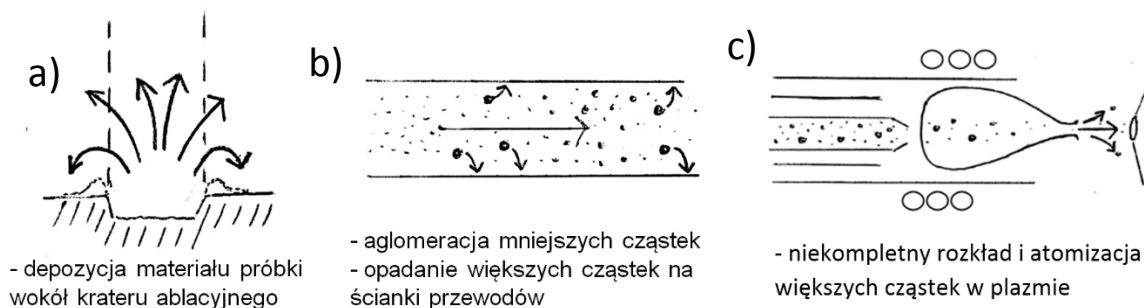
### **1.5. Mechanizmy ablacji**

Wiązka laserowa wchodzi w interakcję z powierzchnią próbki, gdzie zachodzi szereg procesów o czasach trwania od  $10^{-16}$  do  $10^{-1}$  s, m.in. wzbudzenie elektronowe, jonizacja, wzrost temperatury, topnienie, wrzenie i parowanie. W wyniku powyższych procesów, z materii próbki powstaje aerozol, na który składają się: gaz nośny, cząstki o wymiarach nm i  $\mu\text{m}$ , cząsteczki, atomy, jony i elektrony. Aerozol jest transportowany poprzez przewody z inertnego chemicznie polimeru, np. Teflon®, Tygon®, do źródła jonów - ICP. Wyróżnia się dwa mechanizmy, według których energia przenoszona jest z wiązki laserowej na próbkę: termiczny i elektronowy. Mechanizm termiczny przeważa w przypadku laserów o dłuższej długości fali, w zakresie podczerwieni, i polega na wzroście energii oscylacyjnej, prowadząc do wzrostu temperatury miejsca interakcji z wiązką, topnienia, wrzenia i jonizacji. Przewaga mechanizmu termicznego powoduje rozchodzenie się energii cieplnej w głąb próbki, w wyniku czego zaczyna ona pękać i generować większe, bardziej nieregularne cząstki stałe oraz nieregularne krawędzie krateru ablacyjnego. W przypadku mechanizmu elektronowego energia fotonów powoduje fotojonizację, czyli wzbudzenie elektronów walencyjnych atomów próbki, zrywanie wiązań chemicznych i przenoszenie atomów i cząsteczek do fazy gazowej bez efektów termicznych [7]. Ablacja spowodowana mechanizmami nietermicznymi skutkuje generowaniem mniejszych cząstek stałych z próbki oraz bardziej równomiernymi krawędziami kraterów ablacyjnych [8].

### **1.6. Frakcjonowanie**

Zjawiskiem niepożądanym, ale często nieuniknionym, jest frakcjonowanie. W ogólnym znaczeniu, frakcjonowanie polega na wzbogacaniu aerozolu próbki w składniki bardziej lotne. Proces ten ma miejsce na trzech etapach analizy w metodzie LA-ICP-MS: (i) podczas interakcji wiązki laserowej z próbką, (ii) podczas transportu aerozolu do plazmy i (iii) w plazmie, co zostało schematycznie przedstawione na rysunku 2. W wyniku interakcji wiązki laserowej z próbką generowany jest aerozol, który będzie bogatszy w atomy i cząsteczki bardziej lotne, co wynika z ich niższych temperatur topnienia i wrzenia, większych prężności par, większego stopnia absorpcji i przewodnictwa cieplnego. Wpływ na wydajność ablacji mają również promienie atomowe i jonowe oraz energia jonizacji. Większe i cięższe cząstki będą opadać po procesie ablacji i gromadzić się wokół krateru. W wyniku transportu aerozolu w strumieniu gazu nośnego mniejsze cząstki mogą tworzyć aglomeraty w wyniku zderzeń, natomiast większe i cięższe cząstki mogą opadać na wewnętrzne ściany przewodów z tworzyw sztucznych w wyniku działania grawitacji i siły bezwładności. Cząstki stałe docierające do plazmy ulegają stopieniu, odparowaniu, atomizacji i jonizacji. Jednakże, cząstki

większe i trudniej topliwe mogą nie ulegać całkowitemu rozkładowi i jonizacji podczas przejścia przez ICP co skutkuje utratą cięższych składników aerozolu i wzbogacaniem w składniki lżejsze, o mniejszych temperaturach topnienia i wrzenia. Powyższe efekty frakcjonowania powodują, że aerozol docierający do detektora nie jest reprezentatywny i nie odzwierciedla składu próbki stałej, z której został wytworzony [9].



Rysunek 2 Zjawisko frakcjonowania zachodzące: (a) na powierzchni próbki, (b) w przewodach łączących komorę ablacyjną i palnik plazmowy, (c) w plazmie (źródło: własne)

Frakcjonowania nie można wyeliminować, jednakże jego negatywne efekty można zmniejszyć stosując: (a) kalibrację opartą o wzorce jak najbardziej zbliżone składem i strukturą do próbki badanej, (b) CRM o zbliżonej matrycy do matrycy próbki, (c) lasery femtosekundowe, (d) lasery o krótszej długości fali, (e) filtry lub pętle zatrzymujące cząstki stałe przed plazmą, (f) hel jako gaz nośny, (g) ablację dynamiczną [9,10]. W przypadku laserów o czasie impulsu rzędu ns lub dłuższym występuje zjawisko ekranowania plazmy (ang. *plasma shielding*) polegające na absorpcji i rozpraszaniu wiązki lasera przez obłok materii/plazmy wyrzuconej z próbki podczas ablacji. Po przejściu przez plazmę wiązka laserowa jest mniej intensywna i słabiej oddziałuje na powierzchnię próbki.

### 1.7. Interferencje spektralne

Powszechnym zjawiskiem w pomiarach technikami spektrometrii mas jest występowanie interferencji spektralnych i fizycznych. Interferencje spektralne dzieli się na izobaryczne i wieloatomowe, a ich źródłem są procesy zachodzące w plazmie. Wysoka temperatura plazmy powoduje, że większość przechodzących przez nią atomów ulega niemal całkowitej jonizacji (stopień jonizacji pierwszego stopnia >90%) i mogą zachodzić procesy łączenia i rekombinacji jonów i atomów w plazmie [11]. Szczególnie duży wpływ na tworzenie jonów wieloatomowych ma argon, będący głównym składnikiem plazmy, a także gazy atmosferyczne – azot, tlen, wodór i węgiel. W metodzie LA-ICP-MS aerozol próbki nie zawiera rozpuszczalników, za wyjątkiem strategii kalibracji z

rozpylaniem wzorców ciekłych, a zatem jony wieloatomowe tworzą się w mniejszym stopniu niż przy metodzie rozpylania roztworu, SN-ICP-MS (ang. *solution nebulisation ICP-MS*). W dalszym ciągu jony wielokrotne mogą tworzyć się ze składników matrycy analizowanej próbki. W przypadku próbek biologicznych obserwuje się głównie interferencje pochodzące od węgla i tlenu. Przykładowe interferencje wieloatomowe dla wybranych izotopów zebrane są w tabeli 1. Najprostszym sposobem na wyeliminowanie interferencji spektralnych jest pomiar innego izotopu analizowanego pierwiastka, wybranego tak, aby nie był obciążony interferencjami, co nie zawsze jest możliwe. Ilość tworzących się jonów wieloatomowych w plazmie można zredukować, zmniejszając przepływ gazu nośnego, ustalenie warunków zimnej plazmy lub stosując komorę reakcyjną lub kolizyjną. Interferencje wieloatomowe można wyeliminować stosując instrumenty wysokorozdzielcze: z podwójnym ogniskowaniem i czasu przelotu, jednakże wiąże się z tym osiągnięcie gorszych czułości analiz. Inną metodą radzenia sobie z interferencjami wieloatomowymi jest zastosowanie równań korekcyjnych. Polega to na pomiarze innego izotopu badanego pierwiastka, izotopów innych pierwiastków i/lub jonu przeszkadzającego i ustalenie zależności matematycznej pozwalającej wyeliminować wpływ jonów przeszkadzających na mierzony izotop [12].

Interferencje izobaryczne jednoatomowe mają miejsce, gdy więcej niż jeden pierwiastek ma taką samą masę atomową, np.  $^{40}\text{Ar}$  i  $^{40}\text{Ca}$ ,  $^{48}\text{Ca}$  i  $^{48}\text{Ti}$ ,  $^{58}\text{Ni}$  i  $^{58}\text{Fe}$ . Ze względu na niemal identyczną masę, eliminacja interferencji może być nieskuteczna nawet przy zastosowaniu wysokorozdzielczych detektorów i konieczny może być wybór izotopu o innym stosunku  $m/z$ , zastosowanie równań korekcyjnych lub komory reakcyjnej/kolizyjnej [13]. Pierwiastki w plazmie mogą tworzyć jony z podwójnym ładunkiem dodatnim, które interferują z jonami pojedynczymi o dwukrotnie mniejszej masie, np. detektor zarejestruje jony  $^{138}\text{Ba}^{2+}$  przy  $m/z=69$  co zawyży sygnał dla jonów  $^{69}\text{Ga}^+$ .

Tabela 1 Wybrane interferencje wieloatomowe tworzące się w plazmie [14,15]

Izotop	Abundancja [%]	Teoretyczne interferencje wieloatomowe
$^{26}\text{Mg}$	11,01	$^{12}\text{C}^{14}\text{N}^+$ , $^{12}\text{C}_2^{14}\text{H}_2^+$ , $^{13}\text{C}_2^+$
$^{27}\text{Al}$	100	$^{13}\text{C}^{14}\text{N}^+$ , $^{12}\text{C}^{15}\text{N}^+$
$^{43}\text{Ca}$	0,14	$^{27}\text{Al}^{16}\text{O}^+$
$^{49}\text{Ti}$	5,41	$^{36}\text{Ar}^{13}\text{C}^+$ , $^{36}\text{Ar}^{12}\text{C}^1\text{H}^+$ , $^{32}\text{S}^{17}\text{O}^+$ , $^{12}\text{C}^{37}\text{Cl}^+$ , $^{14}\text{N}^{35}\text{Cl}^+$ , $^{33}\text{S}^{16}\text{O}^+$ , $^{31}\text{P}^{18}\text{O}^+$
$^{52}\text{Cr}$	83,76	$^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}^+$ , $^{36}\text{Ar}^{16}\text{O}^+$ , $^{38}\text{Ar}^{14}\text{N}^+$
$^{55}\text{Mn}$	100	$^{40}\text{Ar}^{14}\text{N}^1\text{H}^+$ , $^{40}\text{Ar}^{15}\text{N}^+$ , $^{38}\text{Ar}^{17}\text{O}^+$ , $^{36}\text{Ar}^{18}\text{O}^1\text{H}^+$ , $^{23}\text{Na}^{32}\text{S}^+$ , $^{37}\text{Cl}^{18}\text{O}^+$ , $^{39}\text{K}^{16}\text{O}^+$
$^{57}\text{Fe}$	2,12	$^{40}\text{Ar}^{17}\text{O}^+$ , $^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}^1\text{H}^+$ , $^{40}\text{Ca}^{16}\text{O}^1\text{H}$
$^{63}\text{Cu}$	69,17	$^{40}\text{Ar}^{23}\text{Na}^+$ , $^{47}\text{Ti}^{16}\text{O}^+$ , $^{23}\text{Na}^{40}\text{Ca}^+$
$^{66}\text{Zn}$	27,90	$^{38}\text{Ar}^{14}\text{N}_2^+$ , $^{33}\text{S}_2^+$ , $^{50}\text{Ti}^{16}\text{O}^+$ , $^{48}\text{Ti}^{18}\text{O}^+$ , $^{34}\text{S}^{16}\text{O}_2^+$ , $^{32}\text{S}^{16}\text{O}^{18}\text{O}^+$

### **1.8. Interferencje fizyczne**

Interferencje fizyczne (niespektralne) związane są z matrycą próbki i wpływają na czułość mierzonych izotopów. W metodzie LA-ICP-MS ilość analitów wykrywana przez detektor w ogromnym stopniu zależy od składu próbki, zachowania próbki podczas ablacji, wydajności transportu aerozolu do plazmy a także w rejonie stożków i optyki jonowej detektora. Opisane wyżej efekty frakcjonowania mają szczególnie istotny wpływ na występowanie interferencji fizycznych, dlatego powinno się zadbać, aby wzorce i analizowana próbka miały podobne własności fizykochemiczne, przez co efekty matrycowe będą zbliżone w próbce i we wzorcach, a tym samym wpływ na zmierzony sygnał będzie podobny. Długotrwała analiza próbek o bogatej matrycy powoduje odkładanie się materiału próbki w otworach stożków, próbnika i zgarniacza, a także w ujściu dyszy palnika, co może doprowadzić do ich zatkania i spadku czułości i pogorszenia powtarzalności pomiarów. W rejonie soczewek jonowych obserwuje się efekt ładunku przestrzennego (ang. *space charge*), który polega na odpychaniu jonów lżejszych pierwiastków przez jony cięższych pierwiastków w wiązce, jeśli obecne są w dużych stężeniach w próbce, przez co wiązka nie jest skupiona i następują straty lżejszych składników. Efekt ładunku przestrzennego można ograniczyć ustalając odpowiednie napięcie na soczewkach jonowych, indywidualne dla każdego mierzonego izotopu [13]. Na występowanie interferencji fizycznych mają wpływ także zmienna w czasie analiz temperatura otoczenia instrumentów LA-ICP-MS, co minimalizuje się stosując systemy termostатовane.

## **2. Kalibracja**

Bezpośrednia analiza próbki stałą metodą LA-ICP-MS ma szereg zalet, w porównaniu do techniki SN-ICP-MS: mniej pracochłonna obróbka próbki, mniejsze ryzyko wprowadzenia zanieczyszczeń wraz z odczynnikami, małe zużycie próbki, mniejszy wpływ interferencji wieloatomowych, możliwość mapowania i poznania rozmieszczenia przestrzennego pierwiastków w próbce z wysoką rozdzielczością. Jest to niezwykle użyteczne w badaniu złożonych próbek, np. przekrojów organów, fragmentów roślin, układów elektronicznych, minerałów, dzieł sztuki czy obiektów archeologicznych [16]. Informacja o zawartości pierwiastka jest ściśle związana z miejscem ablacji i nie reprezentuje składu całej próbki. Obróbka próbki i sam pomiar jest stosunkowo szybki i łatwy, lecz LA-ICP-MS, jako metoda porównawcza, wymaga zastosowania wzorców przed analizą właściwych próbek w celu ustalenia zależności kalibracyjnej. Aby wizualizacja ilościowa rozmieszczenia pierwiastków jak najwierniej odwzorowywała ich rzeczywistą zawartość, przygotowanie i analiza wzorców do kalibracji musi być przeprowadzona starannie, z uwzględnieniem charakteru, struktury i składu

próbki, ponieważ wydajność ablacji i stechiometria aerozolu jest ściśle zależna od własności mechanicznych i optycznych analizowanej próbki.

W przypadku tworzenia wzorców stałych, pożądana jest jak największa homogeniczność i równomierny rozkład analitu. Obecnie na rynku niedostępne są CRM lub wzorce bazujące na tkankach miękkich przeznaczone do analizy metodą LA-ICP-MS lub innymi technikami bezpośredniej analizy próbki stałej. Zastosowanie CRMu, dla którego zawartość danego pierwiastka jest certyfikowana, o matrycy zgodnej z matrycą próbki, pozwoliłoby na zweryfikowanie, czy zastosowana technika i ustawienie aparatury są prawidłowe, skutkują miarodajnymi wartościami pomiarów i nadają się do założonego celu. Konieczne jest zatem zastosowanie alternatywnych strategii wzorcowania. Takie wzorce powinny odtwarzać skład matrycy próbki, uwzględniając czynniki przeszkadzające, tak aby wygenerowany w czasie ablacji aerozol był jak najbardziej zbliżony składem do aerozolu wytworzonego w czasie analizy próbki. Każde podejście, zarówno już opisane w literaturze, jak i opracowane na potrzeby danej próbki powinno zostać zwalidowane z uwzględnieniem zasad metrologii i zastosowaniem materiałów odniesienia lub potwierdzone przez inną technikę analityczną.

### **2.1. Wzorzec wewnętrzny**

Intensywność sygnału zarejestrowanego podczas ablacji laserowej może ulegać zmianie pod wpływem zmiennej wydajności ablacji spowodowanej interferencjami matrycowymi i efektami frakcjonowania, zróżnicowaną geometrią i niehomogenicznością próbki lub zmienną zawartością wody. Wpływ mają także parametry aparaturowe, takie jak dryf sygnału podczas długotrwałej pracy ICP-MS, co powoduje zmiany stopnia jonizacji analitów w plazmie i czułości detektora, oraz wahania temperatury w pomieszczeniu. W celu zminimalizowania wpływu powyższych czynników na wynik pomiaru należy zastosować wzorzec wewnętrzny, będący izotopem pierwiastka równomiernie rozmieszczonego w próbce. W tym celu, wybiera się pierwiastek o dużej zawartości w próbce i mierzy się izotop o mniejszej abundancji i wolny od interferencji izobarycznych, np.  $^{13}\text{C}$ ,  $^{34}\text{S}$ ,  $^{43}\text{Ca}$ , tak aby zmierzony sygnał miał wystarczającą intensywność w stosunku do intensywności analitów. Idealny wzorzec wewnętrzny powinien być równomiernie rozmieszczony w próbce i we wzorcach stałych, zawartość wzorca wewnętrznego powinna być znana (np. poprzez analizę innymi technikami analitycznymi) i musi skutecznie niwelować czynniki wpływające na zmiany intensywności sygnału analitów [17]. Ponadto, wydajność ablacji, transportu i jonizacji oraz masa atomowa wzorca wewnętrznego powinna być zbliżona do analizowanych pierwiastków [18]. W przypadku próbek biologicznych wzorzec wewnętrzny wybierany jest na podstawie składu próbki, np. przy analizie kości, zębów i muszli stosuje się izotopy Ca [19–21], przy analizie włosów, paznokci,

roślin i piór – izotopy S [22–25], dla próbek bogatych w węglowodany i białka – izotopy C [26,27]. Aby wzorzec wewnętrzny optymalnie kompensował zmiany intensywności analitów pomiar powinien być jednoczesny, co możliwe jest wyłącznie w instrumentach z analizatorem TOF lub z instrumentem wielodetektorowym, MC-ICP-MS (ang. *multi-collector ICP-MS*), gdzie osiągnięta jest lepsza precyzja oznaczeń niż w przypadku sekwencyjnego analizatora kwadropolowego [13]. Węgiel jest najczęściej stosowanym wzorcem wewnętrznym w analizie większości próbek biologicznych, co wynika z faktu, że jest głównym składnikiem budulcowym tkanek miękkich. Jednakże, Frick i Günther wykazali, że ze względu na fakt, że węgiel nie jest dobrym wzorcem wewnętrznym, ponieważ podczas ablacji laserowej pierwiastek ten występuje w dwóch fazach (cząstki stałe i gazowe), które cechują się zmienną wydajnością transportu i atomizacji/ionizacji w plazmie [17]. Aby  $^{13}\text{C}$  mógł efektywnie spełniać funkcję wzorca wewnętrznego, sygnał  $^{13}\text{C}$  powinien stanowić co najmniej 6% całkowitego sygnału generowanego w wyniku ablacji próbki [28].

## **2.2. Strategie kalibracji w analizie tkanek**

Kilka metod opartych na wzorcach stałych o dopasowanej matrycy zostało zaproponowanych i z powodzeniem zastosowano w analizie tkanek. Najczęściej stosowanym podejściem jest użycie homogenizowanej tkanki z dodatkiem analitu [29,30]. Do innych metod należą sprasowane tabletki z materiału proszkowego (zwykle materiały odniesienia lub syntetyczna matryca) lub osadzanie w żywicy polimerowej [31]. Możliwe jest również wprowadzenie roztworu analitu wraz z aerozolem próbki bezpośrednio do ICP, pomijając tym samym krok przygotowania wzorców stałych z matrycą zbliżoną do badanej próbki [32]. Zaproponowano również kilka strategii kalibracji, opierających się na wzorcach z matrycą inną niż matryca próbki, np. przy użyciu agarozy i żelatyny [33,34], pokrywanie obrotowe filmem polimetakrylanu metylu z dodatkiem analitów [35], ablacji suchych kropli [36] drukowanie roztworu analitu na papierze lub innym medium [37]. Do kalibracji z powodzeniem zastosowano również definitywną metodę rozcieńczeń izotopowych, ID (ang. *isotope dilution*), poprzez ablację próbki stałej z jednoczesnym rozpylaniem roztworu wzorcowego o zaburzonym stosunku izotopowym [38].

### **2.2.1. Homogenizowana tkanka**

Największą zaletą tego podejścia jest otrzymanie wzorców o matrycy w zasadzie identycznej z matrycą próbki badanej, co zapewnia uzyskanie takich samych wydajności ablacji i transportu aerozolu do detektora. Ograniczeniem jest konieczność posiadania dużej ilości wyjściowego materiału biologicznego i zapewnienie dostatecznej homogeniczności materiału. Porcja badanej próbki jest rozdrabniania i homogenizowana przy użyciu młynków, moździerza lub elektrycznego

homogenizatora tkanek [19,39]. Do kilku dokładnie odważonych porcji dodaje się roztwór z analizowanymi pierwiastkami, po czym mieszaninę się ponownie homogenizuje, zamraża i tnie przy użyciu kriomikrotomu w taki sam sposób jak badaną próbkę, a uzyskane plastry umieszcza się na podstawce do wyschnięcia. Należy zwrócić uwagę na materiał, z którego wykonane są elementy narzędzi służących do rozdrabniania i homogenizacji tkanki, aby ograniczyć zanieczyszczenie materiału metalami lub ceramiką. Zaleca się stosować polimerowe ostrza i wymienne końcówki homogenizatora a także agatowe tłuczki i moździerz oraz kulki i walce w młynkach.

### *2.2.2. Sprasowane tabletki z dopasowaną matrycą*

Podejście to można zastosować, gdy ilość próbki badanej jest zbyt mała aby można ją było przeznaczyć do wytworzenia wzorców. Zamiast materiału próbki stosuje się materiały o zbliżonej matrycy, z użyciem komercyjnie dostępnych certyfikowanych materiałów odniesienia lub czyste składniki, z których wytwarza się syntetyczną matrycę. Porcję materiału odniesienia pod postacią proszku ściska się pod prasą hydrauliczną o nacisku kilku ton do postaci pastylki, która może zostać poddana ablacji, tworząc jednopunktową krzywą kalibracyjną. Alternatywnie, znając główne składniki matrycy próbki badanej można wytworzyć syntetyczną matrycę „*in-house*” z czystych substancji, do których dodaje się znaną ilość roztworu analizowanych pierwiastków. Takie podejście zastosowano przy oznaczaniu pierwiastków w kościach, gdzie jako wzorce posłużyły pastylki z fosforanu wapnia, będącego głównym składnikiem kości i zębów [40].

### *2.2.3. Osadzanie w syntetycznej żywicy polimerowej*

Reifschneider i in. zaproponowali kalibrację w oparciu o ciekłą żywicę używaną w preparatyce histologicznej tkanek i organów (Technovit 710, którego głównym składnikiem jest poli-2-hydroksyetylometakrylan) domieszkowaną Pt, która została poddana polimeryzacji na zimno [31,41]. Tak utworzone bloki zostały pocięte mikrotomem i poddane ablacji. Podobnie została potraktowana próbka badana – organy myszy. Metoda ta jest wieloetapowa, a przygotowanie próbki i wzorców jest długotrwałe i polega na dodawaniu określonych odczynników do badanej tkanki, m.in. dimetylosulfotlenku i nadtlenu benzoilu w celu rozpoczęcia rodnikowej reakcji polimeryzacji, a proces zastygania bloku polimerowego trwa 20 godzin. Do przygotowania wzorców posłużono się dobrze rozpuszczalnym w rozpuszczalnikach organicznych acetyloacetonianem platyny(II).

#### 2.2.4. Filmy z polimerów biologicznych

Zastosowanie cienkich filmów z surowców pochodzenia biologicznego, takich jak żelatyna [34] czy agaroz [42] ma wiele zalet w ilościowej analizie próbek biologicznych: skład matrycy jest zbliżony do matrycy próbek (białka, węglowodany), wyjściowe substraty są oczyszczone, przez co mają niskie zawartości pierwiastków śladowych, uzyskany film jest homogeniczny, składniki są niedrogie, nietoksyczne i łatwo dostępne, przygotowanie wzorców nie jest prac- ani czasochłonne. Do roztworu polimeru biologicznego dodaje się roztwór analitów po czym warstwę polimeru rozprowadza się na podstawce szklanej, na której zasycha tworząc cienki film.

#### 2.2.5. Film polimerowy

Austin i in. zaproponowali nowatorskie podejście polegające na pokrywaniu warstwą polimeru podstawki kwarcowej umieszczonej na szybkoobrotowym stoliku [35]. Jako polimer zastosowany został polimetakrylan metylu domieszkowany związkami metaloorganicznymi dostępnymi handlowo (Cu, Zn, Y) oraz syntezowanymi „in-house” (Ru). Po pokryciu podstawki warstwą polimeru była ona wygrzewana w 130 °C przez 2 min. Metoda jako niepraktyczna nie znalazła szerszego zastosowania w ilościowej analizie próbek biologicznych.

#### 2.2.6. Wzorce oparte na metodzie zol-żel

Technika przygotowania materiałów polegająca na przejściu zolu w żel jest wykorzystywana przy analizie materiałów na bazie krzemionki [43], jednakże Sela i in. zaproponowali wzorce przeznaczone do ilościowej analizy tkanek mózgu w oparciu o podejście zol-żel [44]. Wzorce te cechują się wysoką homogenicznością oraz stabilnością w czasie bez zmiany swoich właściwości. Substratem do produkcji wzorców jest tetraetoksylan, który po dodaniu homogenizowanego mózgu z dodatkiem analitu i serii odczynników, w tym stężonego HNO<sub>3</sub> i HF, i przelaniu do foremek, ulega sieciowaniu z wytworzeniem sztywnego żelu, który poddawany jest suszeniu w temperaturze pokojowej przez ok. tydzień.

#### 2.2.7. Drukowanie wzorów z roztworu analitu

W celu uzyskania wzorców do kalibracji zastosowane zostały komercyjnie dostępne drukarki atramentowe, w których tusze zostały domieszkowane roztworem analitu. Ablacji poddane zostały pojedyncze krople o wymiarach ok. 40 µm i objętości rzędu pL wygenerowane z dysz drukujących na papier [45], jak również wzory, kwadraty i prostokąty, o długości boku od 200 µm do 400 µm [37,46]. Bonta i in. zastosowali tusze w kolorze cyjan, które zawierały w składzie organiczny

kompleks miedzi, ale autorzy stwierdzają, że tuz można domieszkować także roztworem innych pierwiastków.

#### *2.2.8. Sucha kropla*

Technika analizy suchej kropli została zaproponowana w celu oznaczania substancji obecnych w próbkach ciekłych, takich jak krew, mocz czy surowica. Podejście to zastosowano przy oznaczaniu pierwiastków w moczu i krwi z użyciem metody LA-ICP-MS [47–49]. Hsieh i in. opracowali i zwalidowali metodę oznaczania 13 pierwiastków w suchej kropli krwi [50]. Kropla o objętości 0,5  $\mu\text{L}$  została naniesiona pipetą na hydrofobowy filtr membranowy i pozostawiona do wyschnięcia. W celu ustalenia zależności kalibracyjnej użyte zostały CRMy na bazie pełnej krwi ludzkiej, kolejno rozcieńczonej wodą w celu uzyskania serii wzorców o różnych stężeniach i naniesione na filtr. Metoda suchej kropli pozwala na szybkie i łatwe przygotowanie wzorców oraz na wielopierwiastkową analizę ilościową dużej liczby próbek, co jest istotne w rutynowych analizach i diagnostyce pacjentów.

#### *2.2.9. Rozpylanie roztworu*

Połączenie komory ablacyjnej ze standardowym rozpylaczem i komorą mgielną pozwala na wprowadzenie ciekłego roztworu jednocześnie z aerozolem wygenerowanym podczas ablacji próbki lub wzorca stałego. Zaproponowano i zwalidowano dwa rozwiązania techniczne: (i) rozpylacz umieszczono przed komorą ablacyjną, w której następowało mieszanie aerozolu po ablacji z rozpylonym aerozolem z roztworu [38,51] oraz (ii) rozpylacz umieszczony jest za komorą ablacyjną, a mieszanie aerozoli następuje przed palnikiem plazmowym [52,53]. Pickhardt i in. zastosowali rozpylacz mikroprzepływowy z przepływem roztworu 7  $\mu\text{L min}^{-1}$ , co pozwoliło na zastosowanie małych ilości roztworu wzorcowego, zbliżonych do ilości aerozolu generowanego w wyniku ablacji próbki [38].

#### *2.2.10. Rozcieńczenia izotopowe*

W ilościowej analizie metodą LA-ICP-MS zastosowano również odmianę kalibracji z rozpylaniem roztworów wzorców z zaburzonym stosunkiem izotopowym, czyli ID. ID jest metodą definitywną, gdyż pozwala na przeprowadzenie analizy ilościowej bez konieczności przygotowywania i analizy serii wzorców, a wyniki pomiarów otrzymuje się bezpośrednio w jednostkach SI, po zastosowaniu odpowiednich formuł matematycznych. Wyniki uzyskane podczas analizy z użyciem metody ID cechują się najwyższą jakością metrologiczną, wysoką dokładnością i precyzją oznaczeń. W celu uzyskania wyniku wymagane jest wykonanie dokładnego i precyzyjnego ważenia wzorca o

zaburzonym składzie izotopowym, dokładna znajomość masy atomowej analizowanych pierwiastków oraz stosunek izotopów. Metoda ID jest odporna na występowanie efektów matrycowych, dryf sygnału analitycznego czy straty analitu [54]. Poza rozpylaniem roztworu zaproponowano również wzorce stałe o zmienionym stosunku izotopów pod postacią sprasowanych proszków [55,56].

### **3. Badanie próbek klinicznych**

#### **3.1. Przygotowanie próbek klinicznych do analizy metodą LA-ICP-MS**

Próbki kliniczne pobiera się do wielu celów: (i) badania chorobowo zmienionych tkanek w celu diagnostyki medycznej, (ii) poznania mechanizmów transportu i działania leków, np. cisplatyny lub substancji kontrastujących [57,58], (iii) oszacowania stopnia ekspozycji na metale w przypadku zatruc lub wadliwych, bądź odrzuconych implantów, (iv) w medycynie sądowej, (v) w badaniach antropologicznych nad populacjami narażonymi na czynniki środowiskowe bądź antropogeniczne. Przygotowanie próbki do analizy metodą LA-ICP-MS zwykle nie jest problematyczne i czasochłonne. W przypadku próbek klinicznych, czyli fragmentów tkanek miękkich i twardych, najczęściej wystarcza przemycie wodą w celu usunięcia powierzchniowych zanieczyszczeń lub pozostałości płynów ustrojowych. Próbki włosów i paznokci są dużo bardziej podatne na kontakt z zanieczyszczeniami, dlatego stosuje się dodatkowe odczynniki, takie jak aceton [53], 0,1M HCl [22] czy 0,5% roztwór Tritonu® X-100 [59]. Dzięki ograniczeniu lub wyeliminowaniu dodatku odczynników chemicznych, próbka nie jest zanieczyszczana, a anality nie są z niej wymywane, co jest dużą zaletą metody LA-ICP-MS. W zależności od celu analizy, próbki pobierane są od osób chorujących na drodze biopsji lub cięcia chirurgicznego oraz *post-mortem*, np. wycięte fragmenty nowotworów, naczyń krwionośnych dotkniętych miażdżycą czy tkanki otaczające implanty. Mniej inwazyjne jest pobieranie włosów, paznokci, moczu i krwi, które przeprowadzane jest także u osób zdrowych, stanowiących grupę kontrolną lub w badaniach nad zdrowiem określonych populacji i społeczności. Do pobrania próbek zwykle używa się ostrzy i igieł z nierdzewnej stali chirurgicznej. Aby pobrane tkanki zachowały swój skład i strukturę oraz w celu zatrzymania rozkładu próbki i strat wody, powinny one być, natychmiast po pobraniu i przemyciu, umieszczone w szczelnie zamkniętym pojemniku i zamrożone. Stosuje się pojemniki z tworzyw sztucznych i szklane, a ich wybór zależy od celu analizy. Pojemniki szklane mogą zawierać duże ilości Al, Na i Ca, które mogą zanieczyszczać próbkę lub skutkować wysokim tłem, natomiast pojemniki plastikowe mogą zawierać katalizatory na bazie pierwiastków takich jak Al, Ti czy Sb. Próbki przechowywane są w temperaturach od kilku

°C poniżej zera do temperatury ciekłego azotu, -195,8 °C. Próbki biologiczne mogą być przygotowane do analizy, metodą LA-ICP-MS na dwa sposoby: (i) umieszczenie całego fragmentu tkanki na podstawce i ablacja powierzchni lub (ii) pocięcie zamrożonej próbki kriomikrotomem na plastry o grubości od kilku do ok. 100 µm. Próbki przed analizą są pozostawiane w temperaturze pokojowej lub w 37 °C przez ok. godzinę aby odtajały i wyschły [60]. Uzyskanie suchej próbki jest konieczne ze względu na możliwość zmian kształtu i struktury tkanki zawierającej wodę podczas przebywania w komorze ablacyjnej, gdzie poddawana jest ciągłemu przepływowi gazu nośnego, powodującego jej wysychanie. Próbkę powinna być stabilna i niezmienna pod względem składu, struktury i zawartości wody w czasie trwania analizy. Analogicznie, wzorce poddawane ablacji również powinny być odpowiednio wysuszone. Próbki zawierające wodę mogą być analizowane w systemach z chłodzoną komorą ablacyjną, w których układy Peltiera utrzymują niską temperaturę, do -20 °C [61]. Najczęściej stosowaną metodą przygotowania próbek tkanek miękkich jest cięcie ich kriomikrotomem na plastry o identycznej grubości. W kriomikrotomie utrzymywana jest stale ujemna temperatura, dzięki czemu zamrożona wcześniej próbka nie zmienia swojej struktury i składu. W zależności od strategii kalibracji, również wzorce są cięte przy użyciu takich samych ustawień grubości. W celu uzyskania informacji histologicznej badanej tkanki, część plastrów odbarwia się zestawem odczynników i barwników i próbkę przekazuje się do badania mikroskopem optycznym. Najczęściej stosowaną techniką barwienia, która jest często stosowana przy badaniu z użyciem metody LA-ICP-MS, jest barwienie hematoksyliną i eozyną, HE.

### **3.2. Podstawki pod próbkę**

Plastry próbki i wzorców umieszczane są na podstawce, dobranej i przygotowanej tak, aby mieściła się komorze ablacyjnej i nie wpływała na wynik pomiaru analizowanych pierwiastków w tkance. Najczęściej stosuje się podstawki szklane, będące komercyjnie dostępnymi szkiełkami mikroskopowymi lub nakrywkowymi, na bazie szkła boro-krzemianowego, sodowego lub kwarcu [62]. Zaletami są niska cena, łatwa dostępność i dobra adhezja dla tkanek, natomiast wadą jest generowanie wysokiego tła dla pierwiastków będących składnikami szkła, takimi jak Si, Ca, Na, B, Al. W przypadku, gdy szkło generuje wysokie tło dla analitu można zastosować podstawki polimerowe, zawierające w swoim składzie głównie C, H oraz O i N, w zależności od polimeru użytego do produkcji, a także pierwiastki pełniące funkcje katalizatorów, mogące generować wysokie tło. Przykładami polimerów użytych jako podstawki są polipropylen [63], poli(tereftalan etylenu) [64] czy poli(tetrafluoroetylen) [65]. Wysoka zawartość węgla w podstawkach polimerowych może istotnie podwyższyć sygnał węgla w tkance poddanej ablacji, przez co pierwiastek ten nie będzie mógł pełnić funkcji wzorca wewnętrznego, a także może wpłynąć na powstawanie interferencji

wieloatomowych z argonem, podwyższając tło dla  $^{52}\text{Cr}$  i  $^{53}\text{Cr}$ . W ostatnich latach, zaproponowano użycie wafli krzemowych, używanych do produkcji układów elektronicznych, wytworzonych z monokryształu krzemu o czystości >99,9999% [36,66]. Dobór odpowiedniego medium podtrzymującego próbkę w kriomikrotomie ma wpływ na wymywanie niektórych pierwiastków z tkanki. W badaniach próbek mózgow stwierdzono znacznie niższe sygnały Zn i Cu po określonym czasie przebywania próbki w formalinie [67].

### **3.3. Wymiary próbki**

Zaletą metody LA-ICP-MS jest możliwość analizy bardzo małych próbek klinicznych, o wymiarach poniżej 1 mm. W przypadku próbek klinicznych ma to duże znaczenie, ponieważ często próbki tkanek pobrane od pacjentów są bardzo małe, a osoba pobierająca próbkę nie może pobrać większej ilości w myśl zasady *primum non-nocere*. Tak małe ilości próbki, o masie kilku do kilkudziesięciu mg, mogą generować artefakty w przypadku zastosowania technik mineralizacyjnych z użyciem odczynników a uzyskane roztwory nie pozwolą na wykonanie odpowiedniej liczby powtórzeń. W zależności od rozmiarów próbki i od ustawionych parametrów systemu ablacji laserowej można uzyskać ilościową informację o rozmieszczeniu analitów w próbce w czasie od kilku minut do kilku godzin. Hare i in. stworzyli trójwymiarowy atlas zawartości pierwiastków w mózgu szczura, polegający na ablacji 46 plastrów mózgu po cięciu kriomikrotomem, umieszczonych na szkiełkach mikroskopowych w wielkowymiarowej komorze ablacyjnej (25x25 cm), co zajęło w sumie 158 godzin [68].

### **3.4. Zagadnienia etyczne**

Każde badania naukowe, w których pozyskiwane są tkanki pobrane od pacjentów, wymagają uzyskania zgody odpowiednich komisji bioetycznych oraz pisemnej zgody pacjenta. Pacjent musi zostać poinformowany o celu badań, sposobie przeprowadzenia badań i pobrania próbki, o potencjalnym ryzyku oraz zapewniony o tajności danych wrażliwych oraz osobowych. Ponadto, pacjent ma prawo wycofać się z udziału w badaniach w dowolnym momencie bez podania przyczyny oraz ma prawo do informacji dotyczących części eksperymentu, w której uczestniczy [69]. Na tym polu obowiązują ściśle określone normy prawne oraz kodeks etyczny, który obowiązuje badaczy i lekarzy, uczestniczących w badaniach z udziałem tkanek pochodzących z organizmów żywych, szczególnie od ludzi [70]. Zbiorem zasad dotyczącym prowadzenia badań klinicznych z udziałem ludzi o zasięgu międzynarodowym, stanowiącym wykładnie zasad etycznych dla badaczy, jest Deklaracja Helsińska [71]. Etyka badacza powinna obowiązywać na każdym etapie prowadzonych badań, od rozmowy z pacjentem lub dawcą, przez wykonanie pomiarów aż do opracowania i przedstawienia

wyników analizy. Kierując się przede wszystkim dobrem pacjenta (zasada *primum non-nocere*), nieetyczne, i prawdopodobnie nielegalne, jest zatajenie lub zafałszowanie informacji związanej ze stanem zdrowia pacjenta, która może niesłusznie doprowadzić do podjęcia decyzji o wszczęciu lub zakończeniu terapii.

### **3.5. Implanty**

Implanty tytanowe wprowadzono do praktyki stomatologicznej w roku 1960 gdzie zyskały uznanie za ich użyteczność i bardzo dobrą biokompatybilność [72]. Obecnie, najczęściej stosowanym materiałem do produkcji implantów stomatologicznych jest czysty tytan i jego stopy, głównie z glinem i wanadem [73]. Inne, rzadziej stosowane stopy metali to Ti6Al7Nb i Ti15Zr4Nb4Ta [74]. Poszukiwane są coraz nowsze stopy metali, o lepszych właściwościach mechanicznych, mniej toksycznych i bardziej trwałych niż dotychczas stosowane, np. stop Ti-Nb-Zr-Ta-Si [75] czy Ti-Nb-Sn [76], będące w fazie badań na zwierzętach. Ponadto, Główne zalety implantów opartych na Ti to: dobra osteointegracja, odporność na ścieranie, wysoka biokompatybilność, dobre właściwości mechaniczne i niska gęstość, dzięki czemu mogą zastąpić brakującego zęba na dziesięciolecia, jeśli są pozbawione wad strukturalnych, odpowiednio umieszczone i zadbane [77,78]. Jednakże siły mechaniczne wywierane na implant i środowisko jamy ustnej mogą powodować korozję elektrochemiczną implantu i uwalnianie jonów i cząstek metalicznych z powierzchni implantu, pomimo ochronnej warstwy tlenku tytanu [79]. Śródkostna część implantu ma bardzo dużą powierzchnię właściwą i porowatość, podobnie jak tkanka kostna, w celu pobudzenia osteoblastów do tworzenia nowych komórek wokół implantu [79]. W celu zwiększenia porowatości implanty są piaskowane proszkiem  $Al_2O_3$ , który pozostaje w porach i na powierzchni implantu [80,81]. Procedura implantacji wymaga wywiercenia otworu w kości i wkręcenia do niej implantu, podobnie jak śrubę. Powyższe czynniki mogą generować liczne cząstki metaliczne o wymiarach od nanometrów do setek mikrometrów, które pozostają w przyległych tkankach, tj. w kości i błonach śluzowych jamy ustnej [82]. Uwolnienie jonów pierwiastków metalicznych i drobin do tkanek może wywołać reakcje alergiczne u pacjenta powodując stany zapalne, tworzenie ziarnin i nowotworów, a w efekcie odrzucenie implantu lub toksyczność ogólnoustrojową w przypadkach wadliwego implantu, wielokrotnych implantów lub narażenia przewlekłego [83,84]. Czysty Ti i jego stopy uważane są za bezpieczne i dobrze tolerowane przez organizm, jednak wyżej wspomniane działania niepożądane mogą wystąpić ze względu na obecność innych pierwiastków obok Ti, takich jak glin i wanad w powszechnie stosowanym stopie Ti6Al4V lub śladowych ilości zanieczyszczeń, na których obecność pacjent może reagować alergicznie (np. Ni, Cr, Co). Reakcje alergiczne na Ti rozpoznano u 0,6% z 1500 pacjentów w badaniu klinicznym [85]. Możliwe jest, że śladowe ilości zanieczyszczeń

pierwiastkami metalicznymi obecne w środkostnej części implantu są odpowiedzialne za niepowodzenie implantacji w ciele człowieka [86,87]. Przed zabiegiem implantacji, pacjenci powinni zostać przebadani pod kątem podatności na wystąpienie reakcji niepożądanych powodowanych przez pierwiastki metaliczne, będące składnikami implantów, np. przy pomocy testu MELISA [88].

### **3.6. Toksyczność pierwiastków**

Mimo coraz lepszych rozwiązań technologicznych w dziedzinie implantologii, nie są one doskonałe i mogą ulegać korozji elektrochemicznej uwalniając jony i cząstki metaliczne do okolicznych tkanek. Cząstki metaliczne mają większą powierzchnię w porównaniu do nienaruszonego implantu, co może dodatkowo zwiększać ilość uwalnianych pierwiastków metalicznych do organizmu pacjenta. Poniżej zestawiono charakterystykę toksykologiczną pierwiastków, będących głównymi składnikami implantów (Ti, Al, V) [89].

#### **3.6.1. Tytan**

Tytan i tlenek tytanu (IV) są generalnie mało toksyczne i uznawane za bezpieczne, stąd znalazły szerokie zastosowanie w medycynie, a  $\text{TiO}_2$  jest często dodawany do przyrządów codziennego użytku wykonanych z tworzyw sztucznych oraz do żywności i kosmetyków jako biały barwnik i filtr UV [90]. W literaturze znaleźć można coraz więcej doniesień o szkodliwości nanocząstek metalicznego Ti i  $\text{TiO}_2$ , mogących uwalniać się z produktów używanych przez ludzi oraz z implantów [82]. Obecność nanocząstek  $\text{TiO}_2$  wywołuje stres oksydacyjny, zaburzając stężenie zredukowanych i utlenionych form glutationu w komórkach [91]. Badania na szczurach wykazały, że chroniczna, inhalacyjna ekspozycja na nanocząstki  $\text{TiO}_2$  powodują raka nabłonka wyścielającego pęcherzyku płucne [92]. W przypadku implantów na bazie Ti, nanocząsteczki i jony przenikają do głębszych tkanek i do naczyń krwionośnych, skąd mogą dotrzeć do dalszych narządów, takich jak węzły chłonne, płuca i śledziona [92].

#### **3.6.2. Glin**

Glin występuje w niewielkich ilościach w pożywieniu (do  $10 \text{ mg kg}^{-1}$ ) i w wodach naturalnych ( $0,001\text{-}1 \text{ mg L}^{-1}$ ) [93]. Organizm dobrze radzi sobie z wydalaniem związków Al i rzadko spotyka się ostre zatrucia. Większość przypadków zatrucia Al odnotowano u osób z przewlekłą niewydolnością nerek, narażonych zawodowo na kontakt ze związkami Al [94]. Al zaburza wchłanianie i metabolizm pierwiastków, takich jak F, Fe, Ca, P powodując ich niedobory a także osteomalację (rozmiękanie kości) i osteodystrofię (odwapnienie) [94]. Niebezpieczne jest wdychanie oparów i pyłów  $\text{Al}_2\text{O}_3$ , mogącego przyczyniać się do mięszonego zwłóknienia płuc i odmy opłucnowej. Ponadto, Al jest

podejrzewany o udział w rozwoju choroby Alzheimera i demencji dializacyjnej, poprzez działanie neurotoksyczne i akumulację w mózgu [93,95].

### 3.6.3. *Wanad*

Uważa się, że wanad jest pierwiastkiem śladowym niezbędnym do prawidłowego przebiegu procesów metabolicznych, przede wszystkim lipidów, cholesterolu i fosfolipidów a jego niedobór powodują zahamowanie wzrostu i zmniejsza zdolność reprodukcji zwierząt laboratoryjnych, jednakże brak jest jednoznacznych dowodów w przypadku ludzi [93]. Duże ilości V spotyka się w owocach morza i wodorostach, natomiast stężenie w wodzie ściśle zależy położenia geograficznego [94]. Najbardziej toksycznym związkiem wanadu jest  $V_2O_5$  i jest on najczęściej wchłaniany przez ludzi na drodze inhalacji w zakładach przemysłowych. Wanad odkłada się w nerkach, płucach, wątrobie, kościach i tkance tłuszczowej, prowadząc do osłabienia odporności, uszkodzenia płuc i układu krwiotwórczego oraz zmian skórnych i charakterystycznego zielonego zabarwienie języka [93]. Nie ma dowodów na rakotwórcze działanie związków wanadu u ludzi i zwierząt. Długotrwałe podawanie związków V powoduje zmniejszenie aktywności i zdolność uczenia się szczurów [95].

## **4. Przegląd literatury światowej – analiza próbek klinicznych metodą LA-ICP-MS**

Możliwość poznania rozmieszczenia przestrzennego pierwiastków z wysoką rozdzielczością oraz niskimi wartościami granic wykrywalności to cechy metody LA-ICP-MS, która jest niezwykle użyteczna w analizie próbek biologicznych, w tym próbek klinicznych. W literaturze znaleźć można liczne prace, w których sporządzono mapy zawartości pierwiastków, których zawartości w badanych tkankach zmieniały się pod wpływem przebytych chorób czy podanych leków. Informacja o przestrzennym rozmieszczeniu pierwiastków budulcowych, makro- i mikroelementów w tkankach pozwala poznać i zrozumieć procesy zachodzące w organizmie. Od roku 2009 wydanych zostało kilka prac przeglądowych omawiających zastosowanie metody LA-ICP-MS do analizy próbek biologicznych [60,96–98]. W kilku pracach przeglądowych skupiono się także nad podejściem ilościowym i dotychczas opracowanymi strategiami kalibracji, jednakże aspekty metrologiczne są omówione tylko pobieżnie [29,30,99,100]. Ponadto, w pracach przeglądowych omówiono następujące zagadnienia: strategie kalibracji [29,30,60,96,98–100], CRM [29,30,99], metoda ID [29,30,96,98,100], parametry pomiarowe i aparaturowe wpływające na sygnał analityczny [29,30,60,97,98,101], mapowanie pierwiastków w próbkach biologicznych i przygotowanie próbek do analizy [60,96,98], zastosowania biomedyczne [60,97], nanocząstki [96], sucha kropla [99],

omówienie innych technik analizy próbki stałej [100,101]. Jediną pracą krótko omawiającą wybrane aspekty walidacji procedury analitycznej w naukach biologicznych i przyrodniczych z użyciem metody LA-ICP-MS jest praca badawcza autorstwa Limbeck i in. [99]. Dyskusja dotycząca walidacji procedury i wyznaczania istotnych parametrów walidacyjnych jest zwykle pomijana, jednakże autorzy powyższych prac przeglądowych są jednomyślnie zgodni co do istotności stosowania CRMów w analizie metodą LA-ICP-MS i doceniają wysoką jakość metrologiczną metody definitywnej, jaką jest IDMS. Jednakże, nigdzie nie została poruszona istotna własność wyniku pomiaru, jaką jest spójność pomiarowa.

Znajdując lukę w pracach przeglądowych i badawczych, przeprowadzono przegląd publikacji omawiających zawartość pierwiastków badanych metodą LA-ICP-MS w próbkach klinicznych, zwracając szczególną uwagę na aspekty metrologiczne prowadzonych badań. W tabeli 2 zestawiono prace eksperymentalne, w których analizowane były próbki kliniczne: miękkie, twarde oraz ciekłe pod postacią suchej kropli. Wyszczególniono w niej następujące zagadnienia: (1) rodzaj badanej próbki, (2) analizowane pierwiastki ze wskazaniem wzorca wewnętrznego, (3) zastosowaną aparaturę, z uwzględnieniem rodzaju lasera, parametrów pracy systemu LA, rodzaj analizatora mas, (4) parametry walidacyjne i (5) sposób zapewnienia spójności pomiarowej. Prace, w których ablacji poddane zostały pojedyncze komórki, sztucznie hodowane linie komórkowe, próbki po elektroforezie żelowej lub innej technice rozdzielania oraz próbki archeologiczne nie zostały ujęte w tabeli 2.

Tabela 2 Zestawienie prac badawczych omawiających analizę próbek klinicznych metodą LA-ICP-MS

Próbka	Anality	Aparatura	Parametry metody analitycznej	Właściwość wyniku pomiaru	Literatura
1. rodzaj próbki 2. badana próbka	mierzone izotopy (wzorzec wewnętrzny) *dane jakościowe #nie wykryto w próbce	1. ICP-MS (rozdzielczość, m/Δm) 2. rodzaj lasera; długość fali [nm]; częstotliwość impulsów [Hz] /średnica wiązki [μm] /szybkość skanowania [μm s <sup>-1</sup> ]	1. LOD [μg g <sup>-1</sup> ] 2. LOQ [μg g <sup>-1</sup> ] 3. liniowość 4. precyzja [%] 5. poprawność, odzysk [%]	1. CRM (jako wzorzec kalibracyjny/do sprawdzenia poprawności) 2. roztwory wzorcowe z ustanowioną spójnością pomiarową	
1. miękka 2. zdrowy mózg (hipokamp)	<sup>31</sup> P, <sup>32</sup> S, <sup>56</sup> Fe, <sup>63</sup> Cu, <sup>64</sup> Zn ( <sup>238</sup> U, <sup>232</sup> Th)	1. SF-ICP-MS (średnia, 4400) 2. Nd:YAG; 213; 20/50/50	3. (R <sup>2</sup> ) <sup>232</sup> Th: 0,9995; <sup>238</sup> U: 0,9995 4. 2–3 5. (dokładność) 2–3	Brak danych	[51]
1. miękka 2. guz mózgu (glejak wielopostaciowy)	<sup>63</sup> Cu, <sup>64</sup> Zn, <sup>208</sup> Pb, <sup>238</sup> U	1. SF-ICP-MS ; (niska, 300) 2. Nd:YAG; 266; 20/50/30	1. <sup>63</sup> Cu: 0,34; <sup>64</sup> Zn: 0,14; <sup>208</sup> Pb: 0,0125; <sup>238</sup> U: 0,0069 3. (R <sup>2</sup> ) 0,9821–0,9962 4. (dla pojedynczej linii) 20–30	Brak danych	[102]
1. miękka 2. zdrowy mózg (hipokamp)	<sup>13</sup> C*, <sup>63</sup> Cu, <sup>64</sup> Zn	1. SF-ICP-MS ; (niska, 300) 2. Nd:YAG; 266; 20/50/40	4. (odtwarzalność metody) <sup>13</sup> C: 5,4–6,5; <sup>63</sup> Cu: 5,8–8,2; <sup>64</sup> Zn: 5,1–6,7	Brak danych	[103]
1. miękka 2. zdrowy mózg (obszar wyspy, centralny i hipokamp)	<sup>63</sup> Cu, <sup>64</sup> Zn, <sup>208</sup> Pb	1. SF-ICP-MS; (niska, 300) 2. Nd:YAG; 266; 20/200/30	1. <sup>63</sup> Cu: 0,1; <sup>64</sup> Zn: 0,5; <sup>208</sup> Pb: 0,01 3. (R <sup>2</sup> ) <sup>63</sup> Cu: 0,997; <sup>64</sup> Zn: 0,994; <sup>208</sup> Pb: 0,993	Brak danych	[104]
1. miękka 2. błona śluzowa jelit, zdrowa pierś, nowotwór piersi	<sup>197</sup> Au, <sup>107</sup> Ag	1. kwadrupol 2. #1 Nd:YAG; 213; 10/5/5 #2 Nd:YAG; 266; 10/20,100/20,60	1. [ng] <sup>197</sup> Au: 0,01; <sup>107</sup> Ag: 0,005	Brak danych	[105]
1. miękka 2. węzły chłonne i płuca	<sup>232</sup> Th, <sup>235</sup> U, <sup>238</sup> U, <sup>239</sup> Pu*, <sup>240</sup> Pu*, <sup>241</sup> Am#	1. kwadrupol 2. Nd:YAG; 213; 20/30,65/30,65	1. (szacowana) <sup>241</sup> Am: 0,001	2. spójność ze wzorcem NIST	[106]
1. miękka 2. naczynia krwionośne i blaszka miażdżycowa	<sup>26</sup> Mg*, <sup>42</sup> Ca*, <sup>68</sup> Zn*, <sup>208</sup> Pb* ( <sup>13</sup> C)	1. kwadrupol 2. Nd:YAG; 266; 10/50/25	4. odtwarzalność: z/bez wzorca wewnętrznego 5/13	Brak danych	[27]
1. miękka 2. zdrowy mózg (śródmózgowie)	<sup>13</sup> C*, <sup>44</sup> Ca*, <sup>55</sup> Mn, <sup>56</sup> Fe, <sup>63</sup> Cu#, <sup>64</sup> Zn#, <sup>60</sup> Ni*, <sup>111</sup> Cd, <sup>208</sup> Pb	1. kwadrupol 2. Nd:YAG; 266; 20/120/60	3. (R) >0,99; <sup>64</sup> Zn: 0,987 4. (precyzja wyrażona jako wartość bezwzględna [μg g <sup>-1</sup> ]) Fe: 2-6; Mn: 0,2-0,4; Pb: 0,2-0,3; Cd: 0,01	2. spójność ze wzorcem NIST	[67]
1. miękka 2. oczy	<sup>24</sup> Mg, <sup>56</sup> Fe, <sup>63</sup> Cu ( <sup>13</sup> C, <sup>197</sup> Au)	1. SF-ICP-MS; (średnia, 4000) 2. Nd:YAG; 213; 20/10/6.5	4. <sup>197</sup> Au: <20	Brak danych	[107]

1. miękka 2. wątroba (zwłóknienie i marskość)	<sup>13</sup> C*, <sup>23</sup> Na*, <sup>24</sup> Mg*, <sup>25</sup> Mg*, <sup>31</sup> P*, <sup>39</sup> K*, <sup>42</sup> Ca*, <sup>44</sup> Ca*, <sup>52</sup> Cr*, <sup>55</sup> Mn, <sup>56</sup> Fe, <sup>57</sup> Fe, <sup>59</sup> Co*, <sup>63</sup> Cu, <sup>65</sup> Cu, <sup>64</sup> Zn, <sup>66</sup> Zn, <sup>95</sup> Mo*, <sup>67</sup> Mo*, <sup>107</sup> Ag*, <sup>109</sup> Ag*, <sup>111</sup> Cd*, <sup>112</sup> Cd*, <sup>118</sup> Sn*, <sup>120</sup> Sn*, <sup>200</sup> Hg*, <sup>202</sup> Hg*, <sup>206</sup> Pb*, <sup>208</sup> Pb* ( <sup>34</sup> S)	1. kwadrupol 2. Nd:YAG; 213; 20/60/60	4. (odtwarzalność czterech przyległych fragmentów tej samej próbki wątroby) S: 9; Mn: 10; Fe:14; Cu: 6; Zn: 4; Cd: 4	1. SRM NIST 1577b bovine liver (single point wzorzec kalibracyjny)	[108]
1. miękka 2. guz płuc (złośliwy międzybłoniak opłucnej)	<sup>13</sup> C, <sup>31</sup> P, <sup>34</sup> S, <sup>194</sup> Pt, <sup>195</sup> Pt, <sup>196</sup> Pt ( <sup>197</sup> Au)	1. kwadrupol 2. Nd:YAG; 213; 20/60/60	1. Pt: 0,0016 3. (R <sup>2</sup> ) <sup>195</sup> Pt: 0,9996 4. (RSD drukowanego wzorca) <sup>195</sup> Pt: 16,6-31,1. (RSD wartości średnich, n=60) <sup>195</sup> Pt:1,0-1,5. (uśrednione, znormalizowane stężenie, n=5) <sup>195</sup> Pt:<5	2. spójność ze wzorcem NIST	[57]
1. miękka 2. soczewka oka	<sup>63</sup> Cu, <sup>64</sup> Zn, <sup>56</sup> Fe ( <sup>197</sup> Au)	1. SF-ICP-MS ; (średnia, 4000) 2. Nd:YAG; 213; 10/50/32.5	1. <sup>63</sup> Cu: 0,06; <sup>64</sup> Zn: 0,2; <sup>56</sup> Fe: 0,1 3. (R) <sup>63</sup> Cu: 0,9980; <sup>64</sup> Zn: 0,9855; <sup>56</sup> Fe: 0,9999 <b>soczewka bez torebki/torebka soczewki</b> 5. † <sup>63</sup> Cu: 126-139/103-113; <sup>64</sup> Zn: 93-98/89-95; <sup>56</sup> Fe: 130-137/78-85	2. spójność ze wzorcem NIST	[109]
1. miękka 2. wątroba (choroba Wilsona)	C, Fe, Mn, Cu, Zn (C, S)	1. kwadrupol 2. Nd:YAG; 213; 20/60/60	4. (precyzja pojedynczej analizy) 2-8	Brak danych	[110]
1. miękka 2. skóra	<sup>31</sup> P*, <sup>44</sup> Ca*, <sup>160</sup> Gd	1. kwadrupol 2. Nd:YAG; 213; 10/50/50	1. <sup>160</sup> Gd: 3 2. <sup>160</sup> Gd: 9 3. (R) <sup>160</sup> Gd: 0,999 4. (RSD wzorców) 3,4-13,0	2. spójność ze wzorcem NIST	[111]
1. miękka 2. guz wątroby	<sup>10</sup> B, <sup>11</sup> B*	1. kwadrupol 2. Nd:YAG; 213; 20/50/50	1. <sup>10</sup> B: 0,005 2. <sup>10</sup> B: 0,017 3. (R <sup>2</sup> ) <sup>10</sup> B: 0,999	Brak danych	[112]
1. miękka 2. gruczolakorak prostaty	<sup>55</sup> Mn, <sup>56</sup> Fe, <sup>63</sup> Cu, <sup>66</sup> Zn, <sup>78</sup> Se, <sup>80</sup> Se	1. potrójny kwadrupol 2. ekscymerowy ArF; 193; -/50/200	Bez gazu/H <sub>2</sub> /O <sub>2</sub> +H <sub>2</sub> 1. <sup>55</sup> Mn: 0,55/0,20/0,35; <sup>56</sup> Fe: 2,3/2,3/2,7; <sup>63</sup> Cu: 1,4/1,8/1,0; <sup>66</sup> Zn: 1,8/3,6/2,5; <sup>78</sup> Se: 0,93/0,31/1,2; <sup>80</sup> Se: -/0,44/0,55; 2. <sup>55</sup> Mn: 1,8/0,67/1,2; <sup>56</sup> Fe: 7,6/7,7/9; <sup>63</sup> Cu: 4,7/6,0/3,4; <sup>66</sup> Zn: 6,1/11,9/8,4; <sup>78</sup> Se: 3,1/1,0/4,0; <sup>80</sup> Se: -/1,5/1,8	Brak danych	[113]
1. miękka 2. guz płuc (złośliwy międzybłoniak opłucnej)	<sup>23</sup> Na, <sup>24</sup> Mg, <sup>26</sup> Mg, <sup>39</sup> K, <sup>42</sup> Ca, <sup>44</sup> Ca, <sup>55</sup> Mn, <sup>56</sup> Fe, <sup>57</sup> Fe, <sup>58</sup> Ni, <sup>60</sup> Ni, <sup>63</sup> Cu, <sup>64</sup> Zn, <sup>65</sup> Cu, <sup>66</sup> Zn ( <sup>197</sup> Au)	1. kwadrupol 2. Nd:YAG; 213; 10/40/120	1. <sup>23</sup> Na: 5,7; <sup>24</sup> Mg: 2,3; <sup>26</sup> Mg: 10,6; <sup>39</sup> K: 13,2; <sup>55</sup> Mn: 0,1; <sup>56</sup> Fe: 0,8; <sup>57</sup> Fe: 3,4; <sup>58</sup> Ni: 0,1; <sup>60</sup> Ni: 0,4; <sup>63</sup> Cu: 0,1; <sup>64</sup> Zn: 0,1; <sup>65</sup> Cu: 0,2; <sup>66</sup> Zn: 0,2 3. (R) >0,99; <sup>42</sup> Ca:<0,9 4. (wielokrotny pomiar wzorców) <5	1. for digestion and SN-ICP-MS only; BCR-CRM278 mussel tissue powder 2. spójność ze wzorcem NIST	[36]
1. miękka 2. wątroba (choroba Wilsona)	<sup>54</sup> Fe, <sup>56</sup> Fe, <sup>63</sup> Cu, <sup>65</sup> Cu	1. kwadrupol 2. Nd:YAG; 213; -/10/20	1. <sup>56</sup> Fe: 5; <sup>63</sup> Cu: 1 2. <sup>56</sup> Fe: 18; <sup>63</sup> Cu: 4 3. (R <sup>2</sup> ) >0,995 4. (RSD wzorców) <7,1	2. spójność ze wzorcem NIST	[114]

1. miękka 2. mózg (choroba Alzheimer)	<sup>31</sup> P*, <sup>56</sup> Fe ( <sup>13</sup> C)	1. potrójny kwadrupol 2. Nd:YAG; 213; -/80/-	3. (R <sup>2</sup> ) <sup>56</sup> Fe: 0,9849	Brak danych	[115]
1. miękka 2. błona śluzowa jamy ustnej	<sup>13</sup> C*, <sup>26</sup> Mg, <sup>27</sup> Al, <sup>43</sup> Ca, <sup>48</sup> Ti*, <sup>49</sup> Ti, <sup>51</sup> V, <sup>63</sup> Cu, <sup>66</sup> Zn ( <sup>34</sup> S)	1. kwadrupol 2. Nd:YAG; 266; 10/100/25	<b>procedura kalibracyjna #1/#2</b> 1. (granica wykrywalności instrumentu pomiarowego) Al: 0,83/0,24; Ti: 0,78/0,55; V: 0,24/0,10. (granica wykrywalności metody) Al: 4,8/1,8; Ti: 0,84/1,5; V: 0,58/0,82 2. (granica oznaczalności instrument pomiarowego) Al: 2,5/0,72; Ti: 2,4/1,7; V: 0,73/0,30. (granica oznaczalności metody) Al: 14/5,3; Ti: 2,5/4,4; V: 1,8/2,5 3. (R <sup>2</sup> ) Al: 0,9993/0,9999; Ti: 0,9998/0,9999; V: 0,9999/0,9999 4. (powtarzalność wzorców) Al: 5,0/4,8; Ti: 4,6/4,6; V: 4,1/4,4. (precyzja pośrednia wzorców) Al: 5,4/4,8; Ti: 5,1/4,6; V: 4,6/4,5 5. † (ERM-BB422) <sup>26</sup> Mg: 105; <sup>43</sup> Ca: 158; <sup>63</sup> Cu: 149; <sup>66</sup> Zn: 124. (odzysk dodatku analitu do ERM-BB422) <sup>27</sup> Al: 80; Ti: 115; V: 119	1. (oszacowanie poprawności) ERM-BB422 Fish Muscle 2. spójność ze wzorcem NIST	[63]
1. miękka 2. soczewka oka	<sup>63</sup> Cu, <sup>64</sup> Zn	1. SF-ICP-MS 2. Nd:YAG; 213; -/25/-	1. <sup>63</sup> Cu: 0,030; <sup>64</sup> Zn: 0,086	Brak danych	[116]
1. miękka 2. wątroba (choroba Wilsona)	<sup>56</sup> Fe, <sup>63</sup> Cu, <sup>64</sup> Zn	1. kwadrupol 2. Nd:YAG; 213; 20/10/20	1. <sup>56</sup> Fe: 2,4; <sup>63</sup> Cu: 0,3; <sup>64</sup> Zn: 0,7 2. <sup>56</sup> Fe: 7,9; <sup>63</sup> Cu: 1,1; <sup>64</sup> Zn: 2,4 3. (R <sup>2</sup> ) <sup>56</sup> Fe: 0,998; <sup>63</sup> Cu: 0,999; <sup>64</sup> Zn: 0,995 4. (RSD wzorców) <sup>56</sup> Fe: <9,8; <sup>63</sup> Cu: <5,1; <sup>64</sup> Zn: 5,1	Brak danych	[117]
1. miękka 2. błona śluzowa jamy ustnej	<sup>13</sup> C*, <sup>26</sup> Mg, <sup>27</sup> Al, <sup>31</sup> P*, <sup>43</sup> Ca, <sup>49</sup> Ti, <sup>55</sup> Mn, <sup>57</sup> Fe, <sup>63</sup> Cu, <sup>66</sup> Zn ( <sup>34</sup> S)	1. kwadrupol 2. Nd:YAG; 266; 10/25/100	1. (granica wykrywalności instrument pomiarowego) <sup>26</sup> Mg: 14; <sup>27</sup> Al: 4,1; <sup>43</sup> Ca: 450; <sup>49</sup> Ti: 14; <sup>55</sup> Mn: 1,8; <sup>57</sup> Fe: 43; <sup>63</sup> Cu: 2,4; <sup>66</sup> Zn: 18. (granica wykrywalności metody) <sup>26</sup> Mg: 419; <sup>27</sup> Al: 14; <sup>43</sup> Ca: 1174; <sup>49</sup> Ti: 21; <sup>55</sup> Mn: 4,7; <sup>57</sup> Fe: 98; <sup>63</sup> Cu: 33,6; <sup>66</sup> Zn: 61 3. (R) <sup>26</sup> Mg: 0,9968; <sup>27</sup> Al: 0,9998; <sup>43</sup> Ca: 0,9999; <sup>49</sup> Ti: 0,9996; <sup>55</sup> Mn: 0,9989; <sup>57</sup> Fe: 0,9989; <sup>63</sup> Cu: 0,9987; <sup>66</sup> Zn: 0,9993 <b>wzorce: 5/20/50/największy dla Al, Ti, Mn, Fe, Cu, Zn i 500/1000/3000 dla Mg, Ca</b> 4. (precyzja pojedynczej linii ablacyjnej) <sup>26</sup> Mg: 21/21/22; <sup>27</sup> Al: 25/18/17/22; <sup>43</sup> Ca: 27/24/23; <sup>49</sup> Ti: 31/28/21/19; <sup>55</sup> Mn: 27/23/17/19; <sup>57</sup> Fe: -/35/26/25; <sup>63</sup> Cu: 34/32/21/24; <sup>66</sup> Zn: -/42/31/26. (powtarzalność) <sup>26</sup> Mg: 23/25/16; <sup>27</sup> Al: 9/11/25/19; <sup>43</sup> Ca: 16/19/12; <sup>49</sup> Ti: 18/14/17/18; <sup>55</sup> Mn: 17/20/18/18; <sup>57</sup> Fe: 22/19/18/15; <sup>63</sup> Cu: 17/25/21/18; <sup>66</sup> Zn: 15/19/13/14. (precyzja pośrednia) <sup>26</sup> Mg: 23/21/18; <sup>27</sup> Al: 20/19/13/7; <sup>43</sup> Ca: 16/11/12; <sup>49</sup> Ti: 14/12/12/9; <sup>55</sup> Mn: 13/15/11/8; <sup>57</sup> Fe: 17/11/11/9; <sup>63</sup> Cu: 17/10/11/9; <sup>66</sup> Zn: 14/9/11/10 5. (odzysk dodatku analitu do ERM-BB184) <sup>26</sup> Mg: 117/94/101; <sup>27</sup> Al: 144/94/101/98; <sup>43</sup> Ca: 128/108/99; <sup>49</sup> Ti: -/93/101/103; <sup>55</sup> Mn: 91/91/83/102; <sup>57</sup> Fe: -/187/107/97; <sup>63</sup> Cu: 153/97/135/116; <sup>66</sup> Zn: -/139/84/99.	1. (oszacowanie poprawności) ERM-BB184 Bovine Muscle 2. spójność ze wzorcem NIST	[64]

			† (ERM-BB184) <sup>26</sup> Mg: 87,5; <sup>43</sup> Ca: 108,5; <sup>57</sup> Fe: 110,0; <sup>63</sup> Cu: 142,3; <sup>66</sup> Zn: 131,8		
1. twarda 2. zębina	<sup>69</sup> Ga, <sup>71</sup> Ga ( <sup>43</sup> Ca)	1. SF-ICP-MS 2. Nd:YAG; 266; -/-/-	4. (NIST-612) <sup>43</sup> Ca: 3,2-4,6; <sup>69</sup> Ga: 3,1-5,7; (ząb) <sup>43</sup> Ca: 15,4-19,1	1. (wzorzec kalibracyjny) NIST SRM-612 elements in glass	[118]
1. twarda 2. zębina	<sup>24</sup> Mg*, <sup>55</sup> Mn*, <sup>60</sup> Ni*, <sup>85</sup> Rb*, <sup>88</sup> Sr*, <sup>107</sup> Ag, <sup>109</sup> Ag, <sup>138</sup> Ba*, <sup>139</sup> La*, <sup>208</sup> Pb* ( <sup>43</sup> Ca)	1. SF-ICP-MS (niska, 300) 2. Nd:YAG; 266; 20/100/4	4. (NIST-612) <sup>24</sup> Mg: 3,8-4,6; <sup>43</sup> Ca: 1,8-2,5; <sup>55</sup> Mn: 2,1-4,3; <sup>60</sup> Ni: 3,2-6,8; <sup>85</sup> Rb: 2,3-3,6; <sup>88</sup> Sr: 2,8-3,1; <sup>107</sup> Ag: 2,6-4,4; <sup>138</sup> Ba: 2,4-3,7; <sup>139</sup> La: 4,0-5,3; <sup>208</sup> Pb: 2,9-5,4 (ząb) <sup>43</sup> Ca: 2,8-7,1	1. (wzorzec kalibracyjny) NIST SRM-612 elements in glass	[119]
1. twarda 2. szkliwo	<sup>208</sup> Pb ( <sup>43</sup> Ca)	1. kwadрупol 2. Nd:YAG; 213; 10/100/ablacja statyczna	1. <sup>208</sup> Pb: 0,011 4. (RSD dla pierwszych pomiarów, n=3) <sup>208</sup> Pb: 23. (RSD dla 3. i dalszych pomiarów) <sup>208</sup> Pb: 3,4 5. † (SRM 1400) <sup>208</sup> Pb: 96	1. (wzorzec kalibracyjny i oszacowanie poprawności) NIST SRM 1400 Bone Ash, NIST SRM 1486 Bone Meal	[120]
1. twarda 2. zęby	<sup>208</sup> Pb ( <sup>43</sup> Ca)	1. kwadрупol 2. Nd:YAG; 213; 5/40/-	1. <sup>208</sup> Pb: 0,01-0,05 5. <sup>208</sup> Pb: 7-10	1. (wzorzec kalibracyjny) NIST SRM-610 elements in glass; (oszacowanie poprawności) NIST SRM 1486 Bone Meal	[121]
1. twarda 2. zęby	<sup>55</sup> Mn ( <sup>43</sup> Ca)	1. kwadрупol 2. Nd:YAG; 213; 20/20/20	Brak danych	1. (wzorzec kalibracyjny) NIST SRM 1486 Bone Meal	[122]
1. twarda 2. zęby	<sup>66</sup> Zn, <sup>88</sup> Sr, <sup>111</sup> Cd, <sup>208</sup> Pb ( <sup>44</sup> Ca)	1. kwadрупol 2. Nd:YAG; 213; 20/30/30	5. (ogólna dokładność kalibracji jednopunktowej) ±20	1. (wzorzec kalibracyjny) NIST SRM 1486 Bone Meal	[123]
1. twarda 2. zęby	<sup>88</sup> Sr, <sup>138</sup> Ba ( <sup>43</sup> Ca)	1. kwadрупol 2. Nd:YAG; 213; -/30/60	Brak danych	1. (wzorzec kalibracyjny) NIST SRM 1486 Bone Meal	[124]
1. twarda 2. zęby	<sup>12</sup> C, <sup>31</sup> P, <sup>24</sup> Mg, <sup>66</sup> Zn ( <sup>43</sup> Ca)	1. kwadрупol 2. Nd:YAG; 213; -/30/60	Brak danych	1. (wzorzec kalibracyjny) NIST SRM 1486 Bone Meal	[125]
1. twarda 2. zęby	<sup>27</sup> Al, <sup>88</sup> Sr, <sup>138</sup> Ba, <sup>139</sup> La ( <sup>43</sup> Ca)	1. kwadрупol 2. Nd:YAG; 266; 20/100/25	1. <sup>27</sup> Al: 0,12; <sup>88</sup> Sr: 0,07; <sup>138</sup> Ba: 0,15; <sup>139</sup> La: 0,1 3. (R <sup>2</sup> ) <sup>27</sup> Al: 0,9991; <sup>88</sup> Sr: 0,9983; <sup>138</sup> Ba: 0,9985; <sup>139</sup> La: 0,9993 4. (RSD wzorców 5 µg g <sup>-1</sup> ) <sup>27</sup> Al: 4,2; <sup>88</sup> Sr: 2,8; <sup>138</sup> Ba: 2,7; <sup>139</sup> La: 2,1 5. (różnica między wartością zmierzoną a certyfikowaną) <sup>27</sup> Al: 4,2; <sup>88</sup> Sr: 6,8. (odzyski) <sup>27</sup> Al: 93; <sup>88</sup> Sr: 96	1. (oszacowanie poprawności) NIST SRM 1400 Bone Ash 2. spójność ze wzorcem NIST	[19]
1. twarda 2. włosy i paznokcie	(niska rozdzielczość) <sup>7</sup> Li, <sup>9</sup> Be, <sup>11</sup> B, <sup>23</sup> Na, <sup>75</sup> As, <sup>77</sup> Se, <sup>82</sup> Se, <sup>85</sup> Rb, <sup>88</sup> Sr, <sup>89</sup> Y, <sup>90</sup> Zr,	1. SF-ICP-MS (niska i średnia) 2. Nd:YAG; 266; 8/50/-	1. (dla większości pierwiastków) niski zakres pg g <sup>-1</sup> 4. RSD% dla próbek paznokci (powierzchnia) >20. (wnętrze) As, Br, Hg, Se, Zn: <10; pozostałe pierwiastki: <20	1. (wzorzec kalibracyjny) GBW07601 human	[23,59]

	<sup>93</sup> Nb, <sup>98</sup> Mo, <sup>99</sup> Ru, <sup>101</sup> Ru, <sup>102</sup> Ru, <sup>103</sup> Rh, <sup>105</sup> Pd, <sup>106</sup> Pd, <sup>108</sup> Pd, <sup>107</sup> Ag, <sup>109</sup> Ag, <sup>111</sup> Cd, <sup>114</sup> Cd, <sup>115</sup> In, <sup>118</sup> Sn, <sup>120</sup> Sn, <sup>121</sup> Sb, <sup>123</sup> Sb, <sup>125</sup> Te, <sup>126</sup> Te, <sup>127</sup> I, <sup>133</sup> Cs, <sup>138</sup> Ba, <sup>139</sup> La, <sup>140</sup> Ce, <sup>141</sup> Pr, <sup>143</sup> Nd, <sup>146</sup> Nd, <sup>147</sup> Sm, <sup>149</sup> Sm, <sup>151</sup> Eu, <sup>153</sup> Eu, <sup>157</sup> Gd, <sup>159</sup> Tb, <sup>160</sup> Gd, <sup>163</sup> Dy, <sup>165</sup> Ho, <sup>167</sup> Er, <sup>169</sup> Tm, <sup>171</sup> Yt, <sup>173</sup> Yt, <sup>175</sup> Lu, <sup>178</sup> Hf, <sup>180</sup> Hf, <sup>181</sup> Ta, <sup>183</sup> W, <sup>184</sup> W, <sup>185</sup> Re, <sup>186</sup> W, <sup>187</sup> Re, <sup>191</sup> Ir, <sup>193</sup> Ir, <sup>194</sup> Pt, <sup>195</sup> Pt, <sup>196</sup> Pt, <sup>197</sup> Au, <sup>202</sup> Hg, <sup>205</sup> Tl, <sup>206</sup> Pb, <sup>207</sup> Pb, <sup>208</sup> Pb, <sup>209</sup> Bi, <sup>232</sup> Th, <sup>238</sup> U (średnia rozdzielczość) <sup>26</sup> Mg, <sup>27</sup> Al, <sup>28</sup> Si, <sup>31</sup> P, <sup>35</sup> Cl, <sup>39</sup> K, <sup>44</sup> Ca, <sup>45</sup> Sc, <sup>47</sup> Ti, <sup>49</sup> Ti, <sup>51</sup> V, <sup>52</sup> Cr, <sup>55</sup> Mn, <sup>56</sup> Fe, <sup>59</sup> Co, <sup>60</sup> Ni, <sup>63</sup> Cu, <sup>64</sup> Zn, <sup>69</sup> Ga, <sup>71</sup> Ga, <sup>73</sup> Ge, <sup>74</sup> Ge, <sup>79</sup> Br, <sup>81</sup> Br, <sup>115</sup> In ( <sup>32</sup> S)	hair powder certified reference material		
1. twarda 2. włosy	<sup>202</sup> Hg ( <sup>34</sup> S)	1. kwadrupol 2. Nd:YAG; 266; -/50/-	1. <sup>202</sup> Hg: 0,2 4. (wzdłuż włosa) <sup>34</sup> S: 6	Brak danych [126]
1. twarda 2. włosy	<sup>194</sup> Pt, <sup>195</sup> Pt, <sup>196</sup> Pt, <sup>200</sup> Hg, <sup>201</sup> Hg, <sup>202</sup> Hg, <sup>206</sup> Pb*, <sup>207</sup> Pb*, <sup>208</sup> Pb* ( <sup>32</sup> S as <sup>32</sup> S <sup>16</sup> O)	1. kwadrupol 2. Nd:YAG; 213; -/20,50/16	1. Pt: 0,0005; Hg: 0,3 3. (RSD CRMu) Pt: 15; Hg: 10 5. † (CRM397) Hg: 107	1. (wzorzec kalibracyjny) NIST CRM397 Trace elements in human hair [127]
1. twarda 2. włosy	<sup>238</sup> U	1. kwadrupol 2. Nd:YAG; 266; 10/30,50/-, statyczna	1. (tryb ciągły) <sup>238</sup> U: 0,019. (pojedynczy impuls) <sup>238</sup> U: 0,700 3. (R <sup>2</sup> ) <sup>238</sup> U: 0,95 4. (RSD próbek i wzorców) <sup>238</sup> U: 12-86. (bez wartości odstających) <sup>238</sup> U: 12-22	Brak danych [128]
1. twarda 2. włosy	Zn, Fe, Cu, Cr, Pb, <sup>235</sup> U*, <sup>238</sup> U ( <sup>32</sup> S)	1. SF-ICP-MS (niska i średnia, 300 i 4400) 2. Nd:YAG; 266; 20/300/30	<b>Podejście kalibracyjne: dodatek wzorca/rozcieńczenia izotopowe/rozpylenie roztworu</b> 1. <sup>238</sup> U: 0,0012/0,002/0,002 3. (R <sup>2</sup> ) <sup>238</sup> U: 0,9975/-/0,9915 4. ‡ <sup>238</sup> U: 21/1,5/8,6. (średnia wartość RSD dla pojedynczych włosów, n=5) <sup>238</sup> U: 10-25	2. spójność ze wzorcem NIST [129]
1. twarda 2. włosy	<sup>194</sup> Pt*, <sup>195</sup> Pt, <sup>196</sup> Pt* ( <sup>34</sup> S)	1. kwadrupol 2. Nd:YAG; 266; 20/300/30	1. <sup>195</sup> Pt: 0,029 3. (R <sup>2</sup> ) <sup>195</sup> Pt: 0,9973	2. spójność ze wzorcem NIST [130]

1. twarda 2. włosy	<sup>7</sup> Li, <sup>23</sup> Na, <sup>25</sup> Mg, <sup>27</sup> Al, <sup>39</sup> K, <sup>51</sup> V, <sup>53</sup> Cr, <sup>55</sup> Mn, <sup>57</sup> Fe, <sup>58</sup> Ni, <sup>59</sup> Co, <sup>63</sup> Cu, <sup>64</sup> Zn, <sup>65</sup> Cu, <sup>66</sup> Zn, <sup>85</sup> Rb*, <sup>88</sup> Sr, <sup>98</sup> Mo, <sup>107</sup> Ag, <sup>111</sup> Cd, <sup>127</sup> I, <sup>137</sup> Ba, <sup>202</sup> Hg, <sup>205</sup> Tl, <sup>208</sup> Pb, <sup>209</sup> Bi, <sup>238</sup> U ( <sup>34</sup> S)	1. kwadрупol 2. Nd:YAG; 266; 20/300/30	1. <sup>7</sup> Li: 0,091; <sup>23</sup> Na: 34; <sup>25</sup> Mg: 67; <sup>27</sup> Al: 37; <sup>39</sup> K: 182; <sup>51</sup> V: 0,11; <sup>53</sup> Cr: 3,4; <sup>55</sup> Mn: 0,051; <sup>57</sup> Fe: 19; <sup>58</sup> Ni: 0,90; <sup>59</sup> Co: 0,056; <sup>63</sup> Cu: 0,18; <sup>64</sup> Zn: 15; <sup>65</sup> Cu: 0,19; <sup>66</sup> Zn: 5,1; <sup>88</sup> Sr: 0,086; <sup>98</sup> Mo: 0,027; <sup>107</sup> Ag: 0,005; <sup>111</sup> Cd: 0,048; <sup>127</sup> I: 0,12; <sup>137</sup> Ba: 0,13; <sup>202</sup> Hg: 0,15; <sup>203</sup> Tl: 0,001; <sup>208</sup> Pb: 0,043; <sup>209</sup> Bi: 0,026; <sup>238</sup> U: 0,001 3. (R) <sup>7</sup> Li: 0,9999; <sup>23</sup> Na: 0,9746; <sup>25</sup> Mg: 0,9798; <sup>27</sup> Al: 0,9916; <sup>39</sup> K: 0,9817; <sup>51</sup> V: 0,9998; <sup>53</sup> Cr: 0,9999; <sup>55</sup> Mn: 0,9994; <sup>57</sup> Fe: 0,9962; <sup>58</sup> Ni: 0,9995; <sup>59</sup> Co: 0,9995; <sup>63</sup> Cu: 0,9961; <sup>64</sup> Zn: 0,9963; <sup>65</sup> Cu: 0,9997; <sup>66</sup> Zn: 0,9985; <sup>88</sup> Sr: 0,9998; <sup>98</sup> Mo: 0,9998; <sup>107</sup> Ag: 0,9953; <sup>111</sup> Cd: 0,9988; <sup>127</sup> I: 0,9951; <sup>137</sup> Ba: 0,9998; <sup>202</sup> Hg: 0,9940; <sup>203</sup> Tl: 0,9999; <sup>208</sup> Pb: 0,9997; <sup>209</sup> Bi: 0,9999; <sup>238</sup> U: 0,9997	2. spójność ze wzorcem [53] NIST
1. twarda 2. włosy	<sup>208</sup> Pb ( <sup>34</sup> S)	1. kwadрупol 2. Nd:YAG; 266; 20/50/100	<b>dodatek analitu do: filmu keratynowego/włosów</b> 1. <sup>208</sup> Pb: 0,9998/0,9851 3. <sup>208</sup> Pb: 0,082/1,23 4. <sup>208</sup> Pb: -/>20%	Brak danych [22]
1. twarda 2. kamień moczowy	<sup>23</sup> Na, <sup>24</sup> Mg, <sup>43</sup> Ca, <sup>44</sup> Ca, <sup>88</sup> Sr, <sup>135</sup> Ba, <sup>137</sup> Ba (Ca)	1. kwadрупol 2. Nd:YAG; 213; 5/65/ablacja statyczna	3. <b>matryca: fosforany/mieszana</b> (R <sup>2</sup> ) <sup>23</sup> Na: 0,825/0,952; <sup>24</sup> Mg: 0,738/0,600; Ca: 0,825/0,952; <sup>88</sup> Sr: 0,903/0,856; Ba: 0,876/0,6101	Brak danych [131]
1. twarda 2. kamień moczowy	kwadрупol: <sup>23</sup> Na, <sup>24</sup> Mg, <sup>31</sup> P, <sup>42</sup> Ca, <sup>43</sup> Ca, <sup>44</sup> Ca, <sup>66</sup> Zn, <sup>86</sup> Sr, <sup>88</sup> Sr, <sup>135</sup> Ba, <sup>137</sup> Ba (Ca) SF-ICP-MS: <sup>13</sup> C, <sup>23</sup> Na, <sup>24</sup> Mg, <sup>26</sup> Mg, <sup>27</sup> Al, <sup>31</sup> P, <sup>39</sup> K, <sup>43</sup> Ca, <sup>44</sup> Ca, <sup>55</sup> Mn, <sup>57</sup> Fe, <sup>63</sup> Cu, <sup>65</sup> Cu, <sup>64</sup> Zn, <sup>66</sup> Zn, <sup>85</sup> Rb, <sup>86</sup> Sr, <sup>88</sup> Sr, <sup>118</sup> Sn, <sup>135</sup> Ba, <sup>137</sup> Ba, <sup>206</sup> Pb, <sup>208</sup> Pb and <sup>238</sup> U (Ca)	1. kwadрупol i SF-ICP-MS (niska, 300) 2. Nd:YAG; 213; 5/65/40 i ArF ekscymerowy; 193; 10/30/18	1. (SF-ICP-MS) Na: 20; Mg: 8; P: 80; Ca: 200; Zn: 3; Sr: 0,7	1. (wzorzec [132] kalibracyjny) NIST SRM 1486 Bone Meal
1. twarda 2. kamień moczowy	<sup>12</sup> C, <sup>13</sup> C, <sup>23</sup> Na, <sup>24</sup> Mg, <sup>26</sup> Mg, <sup>27</sup> Al, <sup>31</sup> P, <sup>39</sup> K, <sup>42</sup> Ca, <sup>43</sup> Ca, <sup>55</sup> Mn, <sup>56</sup> Fe, <sup>57</sup> Fe, <sup>63</sup> Cu, <sup>66</sup> Zn, <sup>68</sup> Zn, <sup>85</sup> Rb, <sup>86</sup> Sr, <sup>88</sup> Sr, <sup>118</sup> Sn, <sup>135</sup> Ba, <sup>137</sup> Ba, <sup>208</sup> Pb ( <sup>44</sup> Ca)	1. kwadрупol 2. Nd:YAG; 213; 5/65/40	1. Na: <1000; P: <1000; Zn: <70; Sr: <40; Ba: <2; Pb: <4 <b>wartości odstające: uwzględnione/wykluczone</b> 3. (R <sup>2</sup> ) Na: 0,9936/0,9955; P: 0,9991/0,9991; Zn: 0,9868/0,9966; Sr: 0,9896/0,9960; Ba: 0,9777/0,9957; Pb: 0,9861/0,9974 4. † (RSD sygnału <sup>44</sup> Ca w tabletkach z fosforanem) 0,5-10,8. (RSD dla SRM 1486 z zast. czteropunktowej krzywej kalibr., n=10) <sup>23</sup> Na: 6,3; <sup>31</sup> P: 5,6; Zn: 12; Sr: 6,2; Ba: 4,8; <sup>208</sup> Pb: 13 <b>czteropunktowa krzywa kal./6686 fosforan/8393 fosforan/9130 fosforan/6275 szczawian</b> 5. † <sup>23</sup> Na: 96/90/68/90/64; <sup>31</sup> P: 98/98/95/99/105; Zn: 101/143/104/103/87; Sr: 103/108/104/100/102; Ba: 79-132/75- 124/62-104/72-120/17-28; <sup>208</sup> Pb: 273/201/38/74/33	1. (oszacowanie [133] poprawności) NIST SRM 1486 Bone Meal

1. ciekła (sucha kropla) 2. krew	<sup>206</sup> Pb, <sup>207</sup> Pb, <sup>208</sup> Pb	1. ICP-TOF-MS 2. Nd:YAG; 213	1. [µg dL <sup>-1</sup> ] Pb: 0,9 3. (R <sup>2</sup> ) Pb: 0,996 4. (25 statycznych punktów ablacyjnych) Pb: 32-48; (ablacja liniowa; zakresy RSD wewnątrz kropli/między kropkami) Pb: 12-16/3-13; ‡ (RSD dla CRM) Pb: 5,3 5. † Pb: 170	1. (oszacowanie poprawności) Seronorm Whole Blood [134]
1. ciekła (sucha kropla) 2. krew	<sup>206</sup> Pb, <sup>207</sup> Pb, <sup>208</sup> Pb	1. kwadrupol 2. Nd:YAG; 213; 20/110/ablacja siatki punktów	<b>wzorce dopasowane matrycowo Seronorm/wzorce ciekłe</b> 1. [ng mL <sup>-1</sup> ] <sup>206</sup> Pb: 2,0/0,14; <sup>207</sup> Pb: 1,9/0,23; <sup>208</sup> Pb: 1,4/0,1 3. (R) <sup>206</sup> Pb: 0,9985/0,9897; <sup>207</sup> Pb: 0,9983/0,9956; <sup>208</sup> Pb: 0,9986/0,9988 <b>pomiary jednego wzorca o stężeniu: 84/55 ng mL<sup>-1</sup></b> 4. <sup>206</sup> Pb: 5/6; <sup>207</sup> Pb: 9/6; <sup>208</sup> Pb: 8/9 <b>wzorce dopasowane matrycowo Seronorm/wzorce ciekłe</b> 5. † (SRM 966 L-1) <sup>206</sup> Pb: 98/90; <sup>207</sup> Pb: 113/96; <sup>208</sup> Pb: 108/93; (SRM 966 L-2) <sup>206</sup> Pb: 100/122; <sup>207</sup> Pb: 109/107; <sup>208</sup> Pb: 106/108; (BCR635) <sup>206</sup> Pb: 98/120; <sup>207</sup> Pb: 110/108; <sup>208</sup> Pb: 110/110; (Seronorm L-3) <sup>206</sup> Pb: -/122; <sup>207</sup> Pb: -/97; <sup>208</sup> Pb: -/101	1. (wzorec kalibracyjny i oszacowanie poprawności) NIST SRM966 Level 1 Bovine Blood, NIST SRM966 Level 2 Bovine Blood, IRMM BCR635 Human Blood, Seronorm L-3 Whole Blood 2. spójność ze wzorcem NIST [65]
1. ciekła (sucha kropla) 2. krew	<sup>9</sup> Be, <sup>25</sup> Mg <sup>55</sup> Mn, <sup>59</sup> Co, <sup>60</sup> Ni, <sup>63</sup> Cu, <sup>66</sup> Zn, <sup>111</sup> Cd, <sup>121</sup> Sb, <sup>138</sup> Ba, <sup>205</sup> Tl, <sup>208</sup> Pb, <sup>209</sup> Bi	1. kwadrupol 2. Nd:YAG; 213; 20/110/ablacja siatki punktów	1. [ng mL <sup>-1</sup> ] <sup>9</sup> Be: 0,14; <sup>25</sup> Mg: 25; <sup>55</sup> Mn: 2,3; <sup>59</sup> Co: 0,13; <sup>60</sup> Ni: 1,4; <sup>63</sup> Cu: 2,2; <sup>66</sup> Zn: 2,8; <sup>111</sup> Cd: 1,1; <sup>121</sup> Sb: 0,20; <sup>138</sup> Ba: 1,4; <sup>205</sup> Tl: 0,26; <sup>208</sup> Pb: 0,13; <sup>209</sup> Bi: 0,23 2. [ng mL <sup>-1</sup> ] <sup>9</sup> Be: 0,47; <sup>25</sup> Mg: 97; <sup>55</sup> Mn: 7,7; <sup>59</sup> Co: 0,43; <sup>60</sup> Ni: 4,7; <sup>63</sup> Cu: 7,3; <sup>66</sup> Zn: 9,3; <sup>111</sup> Cd: 3,7; <sup>121</sup> Sb: 0,67; <sup>138</sup> Ba: 4,7; <sup>205</sup> Tl: 0,87; <sup>208</sup> Pb: 0,43; <sup>209</sup> Bi: 0,77 3. (R) <sup>9</sup> Be: 0,9995; <sup>25</sup> Mg: 0,9983; <sup>55</sup> Mn: 0,9988; <sup>59</sup> Co: 0,9984; <sup>60</sup> Ni: 0,9994; <sup>63</sup> Cu: 0,9996; <sup>66</sup> Zn: 0,9996; <sup>111</sup> Cd: 0,9991; <sup>121</sup> Sb: 0,9997; <sup>138</sup> Ba: 0,9984; <sup>205</sup> Tl: 0,9993; <sup>208</sup> Pb: 0,9988; <sup>209</sup> Bi: 0,9995 <b>w jednej analizie(n=4)/pomiędzy analizami(n=12)</b> 4. ‡ <sup>9</sup> Be: 8,4/9,7; <sup>25</sup> Mg: 3,3/8,6; <sup>55</sup> Mn: 11,3/11,0; <sup>59</sup> Co: 5,4/7,3; <sup>60</sup> Ni: 5,7/8,1; <sup>63</sup> Cu: 2,7/6,2; <sup>66</sup> Zn: 4,2/11,5; <sup>111</sup> Cd: 8,0/21,6; <sup>121</sup> Sb: 2,1/4,0; <sup>138</sup> Ba: 2,3/4,1; <sup>205</sup> Tl: 3,6/7,5; <sup>208</sup> Pb: 5,6/5,7; <sup>209</sup> Bi: 2,9/5,6 <b>(RSD dla: SRM966/BCR/635) <sup>111</sup>Cd: 8,5/11,7</b> <b>w jednej analizie(n=4)/pomiędzy analizami(n=12)</b> 5. <sup>9</sup> Be: 101/107; <sup>25</sup> Mg: 95/101; <sup>55</sup> Mn: 80/73; <sup>59</sup> Co: 101/100; <sup>60</sup> Ni: 104/98; <sup>63</sup> Cu: 101/97; <sup>66</sup> Zn: 82/89; <sup>111</sup> Cd: 186/223; <sup>121</sup> Sb: 98/98; <sup>138</sup> Ba: 107/110; <sup>205</sup> Tl: 111/106; <sup>208</sup> Pb: 102/105; <sup>209</sup> Bi: 101/105 <b>(odzysk dla: SRM966/BCR/635) <sup>111</sup>Cd: 108/114</b>	1. (wzorec kalibracyjny i oszacowanie poprawności) NIST SRM966 Level 2 Bovine Blood, IRMM BCR635 Human Blood, Seronorm L-3 Whole Blood 2. spójność ze wzorcem NIST [50]
1. ciekła (sucha kropla) 2. krew	SF-ICP-MS: <sup>59</sup> Co, <sup>65</sup> Cu, <sup>111</sup> Cd, <sup>208</sup> Pb ( <sup>195</sup> Pt) MC-ICP-MS: m/z: 61-65	1. SF-ICP-MS (niska, 400) i MC-ICP-MS (pseudo-wysoka, 5700) 2. fs Yb:KGW; 1030; 30000/21/(oś x)30*(oś y)10000	1. [µg L <sup>-1</sup> ] <sup>65</sup> Cu: 0,54; <sup>59</sup> Co: 0,42; <sup>111</sup> Cd: 0,043; <sup>208</sup> Pb: 0,040 <b>Pt dodana do: ciekłej próbki/filtra papierowego</b> 3. (R <sup>2</sup> ) >0,99; <sup>208</sup> Pb: 0,9999/0,9981 4. ‡ (Lypocheck L-2) <sup>65</sup> Cu: 13,9/17,2; <sup>59</sup> Co: 23,7/19,0; <sup>111</sup> Cd: 6,7/6,5; <sup>208</sup> Pb: 7,7/8,0. (Seronorm) <sup>65</sup> Cu: 17,0; <sup>59</sup> Co: 11,8; <sup>111</sup> Cd: 3,6; <sup>208</sup> Pb: 6,8. (Clincheck) <sup>65</sup> Cu: 15,9; <sup>59</sup> Co: 18,3; <sup>111</sup> Cd: 8,7; <sup>208</sup> Pb: 10,0. (Lypocheck L-1) <sup>65</sup> Cu: 17,2; <sup>59</sup> Co: 35,0; <sup>111</sup> Cd: 11,7; <sup>208</sup> Pb: 16,0	1. (wzorec kalibracyjny i oszacowanie poprawności) Seronorm L-2 Whole Blood, Clincheck L-2 Whole Blood, Lypocheck L-1 Whole [49]

	(Ni został użyty do korekcji przesunięcia masy Cu)		5. † (Lypocheck L-2) <sup>65</sup> Cu: 111/97; <sup>59</sup> Co: 100/111; <sup>111</sup> Cd: 106/103; <sup>208</sup> Pb: 96/101. (Seronom) <sup>65</sup> Cu: 97; <sup>59</sup> Co: 111; <sup>111</sup> Cd: 93; <sup>208</sup> Pb: 111. (Clincheck) <sup>65</sup> Cu: 106; <sup>59</sup> Co: 106; <sup>111</sup> Cd: 88; <sup>208</sup> Pb: 109. (Lypocheck L-1) <sup>65</sup> Cu: 101; <sup>59</sup> Co: 91; <sup>111</sup> Cd: 103; <sup>208</sup> Pb: 123	Blood, Lypocheck L-2 Whole Blood 2. spójność ze wzorcem NIST
1. ciekła (sucha kropla) 2. krew	<sup>208</sup> Pb ( <sup>57</sup> Fe)	1. kwadрупol 2. Nd:YAG; 213; 20/200/100	1. [μg L <sup>-1</sup> ] <sup>208</sup> Pb: 10 4. ‡ (typowe RSD dla wzorców ciekłych 400 ng mL <sup>-1</sup> , n=16) <sup>208</sup> Pb: 5. (Clincheck L-1) <sup>208</sup> Pb: 20,7. (Clincheck L-2) <sup>208</sup> Pb: 2,6. (Clincheck L-3) <sup>208</sup> Pb: 2,3 5. † (Clincheck L-1) <sup>208</sup> Pb: 98. (Clincheck L-2) <sup>208</sup> Pb: 100. (Clincheck L-3) <sup>208</sup> Pb: 99	1. (oszacowanie poprawności) Clincheck L-1,2,3 Whole Blood 2. spójność ze wzorcem NIST [135]
1. ciekła (sucha kropla) 2. mocz	<sup>7</sup> Li, <sup>11</sup> B, <sup>24</sup> Mg, <sup>48</sup> Ti, <sup>51</sup> V, <sup>52</sup> Cr, <sup>55</sup> Mn, <sup>57</sup> Fe, <sup>59</sup> Co, <sup>60</sup> Ni, <sup>63</sup> Cu, <sup>64</sup> Zn, <sup>65</sup> Cu, <sup>66</sup> Zn, <sup>69</sup> Ga, <sup>75</sup> As, <sup>85</sup> Rb, <sup>88</sup> Sr, <sup>98</sup> Mo, <sup>107</sup> Ag, <sup>111</sup> Cd, <sup>137</sup> Ba, <sup>208</sup> Pb, <sup>238</sup> U ( <sup>13</sup> C)	1. kwadрупol 2. Nd:YAG; 266; 20/160/50	1. <sup>7</sup> Li: 0,586; <sup>11</sup> B: 0,214; <sup>24</sup> Mg: 1,8; <sup>48</sup> Ti: 0,205; <sup>51</sup> V: 0,026; <sup>52</sup> Cr: 0,180; <sup>55</sup> Mn: 0,110; <sup>60</sup> Ni: 0,120; <sup>63</sup> Cu: 0,024; <sup>64</sup> Zn: 0,111; <sup>69</sup> Ga: 0,004; <sup>75</sup> As: 0,003; <sup>85</sup> Rb: 0,528; <sup>88</sup> Sr: 0,078; <sup>98</sup> Mo: 0,008; <sup>107</sup> Ag: 0,002; <sup>111</sup> Cd: 0,021; <sup>137</sup> Ba: 0,022; <sup>208</sup> Pb: 0,031; <sup>238</sup> U: 0,003 3. (R) <sup>7</sup> Li: 0,7852; <sup>11</sup> B: 0,9885; <sup>24</sup> Mg: 0,9944; <sup>48</sup> Ti: 0,9480; <sup>51</sup> V: 0,9985; <sup>52</sup> Cr: 0,9879; <sup>55</sup> Mn: 0,9577; <sup>60</sup> Ni: 0,9727; <sup>63</sup> Cu: 0,9795; <sup>64</sup> Zn: 0,9802; <sup>69</sup> Ga: 0,9945; <sup>75</sup> As: 0,9886; <sup>85</sup> Rb: 0,6449; <sup>88</sup> Sr: 0,9606; <sup>98</sup> Mo: 0,9842; <sup>107</sup> Ag: 0,9880; <sup>111</sup> Cd: 0,9752; <sup>137</sup> Ba: 0,9854; <sup>208</sup> Pb: 0,9268; <sup>238</sup> U: 0,9972	2. spójność ze wzorcem NIST [48]
1. ciekła (sucha kropla) 2. mocz	niska rozdzielczość <sup>9</sup> Be, <sup>111</sup> Cd, <sup>118</sup> Sn, <sup>121</sup> Sb, <sup>205</sup> Tl, <sup>206</sup> Pb, <sup>209</sup> Bi średnia rozdzielczość <sup>51</sup> V, <sup>59</sup> Co, <sup>60</sup> Ni, <sup>63</sup> Cu ( <sup>195</sup> Pt)	1. SF-ICP-MS (niska i średnia) 2. ArF ekscymerowy; 193; 20/400/400	1. [μg L <sup>-1</sup> ] <sup>9</sup> Be: 0,1; <sup>51</sup> V: 1; <sup>59</sup> Co: 0,2; <sup>60</sup> Ni: 10; <sup>63</sup> Cu: 13; <sup>111</sup> Cd: 0,5; <sup>118</sup> Sn: 0,5; <sup>121</sup> Sb: 1; <sup>205</sup> Tl: 0,1; <sup>206</sup> Pb: 1; <sup>209</sup> Bi: 0,3 3. (R <sup>2</sup> ) >0,99 <b>wzorce: dopasowane matrycowo(dodatek IS do ciekłego moczu)/dopasowane matrycowo(dodatek IS do suchej kropli)/IDMS(dodatek wzorca izotopowego do ciekłego moczu)/IDMS(dodatek wzorca do suchej kropli)</b> 4. ‡ (RSD) <sup>9</sup> Be: 22/24/-/-; <sup>51</sup> V: 6,0/9,8/-/-; <sup>59</sup> Co: 9,6/18/-/-; <sup>60</sup> Ni: 13/16/-/-; <sup>63</sup> Cu: 14/22/31/28; <sup>111</sup> Cd: 18/18/20/18; <sup>118</sup> Sn: 28/14/-/-; <sup>121</sup> Sb: 26/26/-/-; <sup>205</sup> Tl: 32/27/-/-; <sup>206</sup> Pb: 12/13/16/14; <sup>209</sup> Bi: 15/19/-/- 5. † <sup>9</sup> Be: 131/124/-/-; <sup>51</sup> V: 100/114/-/-; <sup>59</sup> Co: 97/121/-/-; <sup>60</sup> Ni: 86/81/-/-; <sup>63</sup> Cu: 106/113/100/102; <sup>111</sup> Cd: 109/90/98/124; <sup>118</sup> Sn: 127/109/-/-; <sup>121</sup> Sb: 85/107/-/-; <sup>205</sup> Tl: 82/94/-/-; <sup>206</sup> Pb: 106/112/101/97; <sup>209</sup> Bi: 105/96/-/-	1. (oszacowanie poprawności) Clincheck L-2 Urine Control 2. spójność ze wzorcem NIST [47]
1. ciekła (sucha kropla) 2. mocz	m/z: 61-65 (Ni został użyty do korekcji przesunięcia masy Cu)	1. MC-ICP-MS (pseudo-wysoka, 5700) 2. fs Yb:KGW; 257; 10000/8/10000	Brak danych	1. (oszacowanie poprawności) Clincheck L-2 Urine 2. spójność ze wzorcem NIST [136]

Wartości liczbowe w kolumnie analytical method parameters dotyczą wszystkich analitów, jeżeli nie przypisano konkretnego izotopu

IS – wzorzec wewnętrzny (ang. *internal standard*)

† - wartości odzysków obliczone przez porównanie wartości zmierzonej i odniesienia wg. wzoru  $R=c/c_{cert} \cdot 100\%$ , gdzie c-wartość zmierzona,  $c_{cert}$  – wartość odniesienia

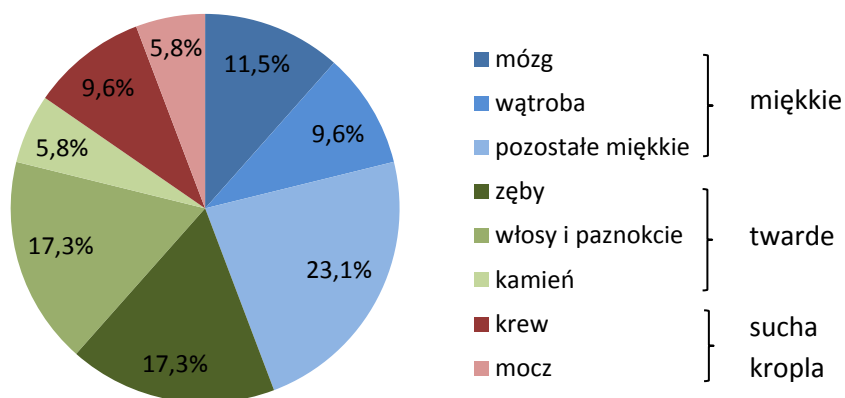
‡ - wartości RSD obliczone wg. wzoru  $RSD=SD/c \cdot 100\%$ , gdzie RSD – względne odchylenie standardowe, SD – odchylenie standardowe

#### 4.1. Cele badań i rodzaje próbek

Próbki kliniczne, w zależności od składu i struktury, można podzielić na:

- miękkie (narządy wewnętrzne, skóra, nabłonek)
- twarde (kości, zęby, włosy, paznokcie, kamienie żółciowe i moczowe)
- ciekłe (krew, osocze, mocz)

Na rysunku 3 przedstawiono procentowy udział wybranych organów i rodzajów próbek ze zbioru omawianych prac badawczych. Tkanki mocno skeratynizowane, takie jak włosy i paznokcie, są ubogie w wodę i mają uporządkowaną, dość homogeniczną strukturę, przez co pod wpływem ablacji laserowej zachowują się podobnie jak kości i zęby, dlatego można je zaklasyfikować jako tkanki twarde. Próbki ciekłe analizuje się pod postacią suchej kropli, po uprzednim umieszczeniu kropli płynu o objętości od 0,5  $\mu\text{L}$  do kilku  $\mu\text{L}$  na podstawie papierowej lub z hydrofobowego polimeru i pozostawieniu do wyschnięcia.



Rysunek 3 procentowy udział poszczególnych rodzajów próbek spośród omawianych prac

##### 4.1.1. Tkanki i próbki miękkie

Tkanki miękkie są grupą próbek, która była badana najczęściej (44% wszystkich omawianych prac), co wynika z faktu, że stanowią one największą część organizmu człowieka i są najbardziej różnorodne. W tabeli 2 zestawiono prace eksperymentalne, w których analizowane były następujące organy: mózg, wątroba, oczy, płuca, błony śluzowe jamy ustnej, jelita, piersi, węzły chłonne, naczynia krwionośne, skóra i prostata. Organem, któremu poświęcono najwięcej prac jest

mózg. Pionierskie prace, w których po raz pierwszy sporządzono mapy zawartości pierwiastków w próbkach mózgu, opracowane przez Becker i in., i ustanowiły one kierunek dalszym badaniom tkanek miękkich [51,67,102–104,115]. Próbki mózgow pobrane były *post-mortem* od pacjentów bez oznak chorób mózgu jak również cierpiących na wysoce złośliwy nowotwór - glejak wielopostaciowy oraz chorobę Alzheimera. Badania miały na celu wykazanie zaburzenia zawartości pierwiastków w badanych obszarach mózgu, Fe w przypadku choroby Alzheimera i Zn, Cu, Pb i U w przypadku glejaka [102,115]. Innym organem, któremu poświęcono dużo prac badawczych była wątroba, której fragmenty pobrane zostały od pacjentów cierpiących na zwłóknienie i marskość, nowotwór oraz chorobę Wilsona [108,110,112,114,117]. Autorzy badań wykazały zaburzenia rozmieszczenia i zwiększoną zawartość Cu i innych pierwiastków w wątrobie w przypadku osób cierpiących na chorobę Wilsona i proponują diagnostykę tej choroby w oparciu o analizę metodą LA-ICP-MS próbek z biopsji wątroby [110,114,117]. Reifschneider i in. zbadali rozmieszczenie izotopu boru  $^{10}\text{B}$  po podaniu kontrastu wzbogaconego tym izotopem pacjentowi chorującemu na nowotwór wątroby w celu określenia przyswajalności i farmakokinetyki zaaplikowanej substancji kontrastowej oraz potwierdzenia przydatności metody LA-ICP-MS w porównaniu do bardziej skomplikowanych technik, jak pozytronowa tomografia emisyjna PET (ang. *positron emission tomography*) czy obrazowanie rezonansem magnetycznym, MRI (ang. *magnetic resonance imaging*) [112]. Zespół Sanz-Medela analizował próbki oka ludzkiego w celu określenia udziału białek związanych z pierwiastkami (Zn, Fe, Cu) w procesach regeneracyjnych pod wpływem stresu oksydacyjnego i stanów zapalnych [116]. Ponadto, zaproponowali oni także nowatorską metodę normalizacji z użyciem pseudo-wzorca wewnętrznego, pokrywając badaną próbkę, fragmentu oka, cienką warstwą metalicznego złota [107]. Hare i in. analizowali fragmenty płuc i węzłów chłonnych pracowników pracujących z pierwiastkami promieniotwórczymi, gdzie wykryte zostały ogniska akumulacji pierwiastków takich jak Th, U i Pu [106]. Ten sam zespół analizował fragmenty prostaty usunięte pacjentom dotkniętym gruczolakorakiem pod kątem zawartości Se i innych pierwiastków z użyciem instrumentu z potrójnym kwadrupolem z wykorzystaniem różnych gazów reakcyjnych [113]. Dwie prace autorstwa Bonta i in. skupione są na analizie fragmentów opłucnej dotkniętej złośliwym międzybłoniakiem pobranej od pacjenta, któremu podawano cisplatynę. Mapy zawartości Pt wyraźnie wskazują specyficzne obszary, w których nastąpiła akumulacja leku, którym odpowiadają określone rodzaje tkanek wyróżnione w procesie barwienia HE [36,57]. Metoda LA-ICP-MS została z powodzeniem użyta do analizy fragmentów błony śluzowej wyścielającej jamę ustną pacjentów z implantami na bazie tytanu i stopu Ti6Al4V. Mapy zawartości Ti, Al i V wykazały

wysoką niehomogeniczność analitów, objawiającą się dużą ilością sygnałów o małej powierzchni i bardzo wysokiej intensywności, do czterech rzędów wielkości większej niż w grupie kontrolnej. Odpowiedzialne za generowanie takich sygnałów są drobiny metaliczne, znajdujące się na powierzchni próbek i mocno z nimi związane, pochodzące z implantów i uwolnione podczas zabiegu implantacji [63,64]. W dwóch kolejnych pracach wykazano wysoki stopień kumulacji pierwiastków: Gd, będący składnikiem kontrastu w technice MRI, oznaczany w skórze pacjenta z ostrą niewydolnością nerek po podaniu kontrastu oraz Au i Ag połączonych z antyciałami podanymi pacjentce z nowotworem piersi w celu pomiaru zawartości i rozmieszczenia biomarkerów nowotworowych [105,111]. Metoda LA-ICP-MS okazała się skuteczna w celu wskazania wpływu Zn, Ca i Mg na formowanie się złogów miazdżycowych w świetle naczyń krwionośnych wyciętych pacjentom chorującym na niewydolność i niedrożność naczyń krwionośnych [27].

#### *4.1.2. Tkanki i próbki twarde*

Badane próbki stanowią głównie zęby i włosy, ale także paznokcie i kamienie moczowe, samoistnie wydalone przez pacjentów. W przypadku włosów metoda LA-ICP-MS jest szczególnie atrakcyjna, ze względu na możliwość analizy pojedynczego włosa, co jest praktycznie niemożliwe z użyciem wstępnej mineralizacji próbki. Obróbka próbek i tkanek twardych jest mniej pracochłonna i najczęściej polega na przemyciu próbki i umieszczeniu jej na podstawce przy pomocy kleju lub na taśmie samoprzylepnej. W przypadku próbek zębów analizowane były twarde tkanki zęba, zębina i szkliwo, jednakże część autorów nie precyzuje, która tkanka była przedmiotem analizy. Zęby mleczne wypadały w sposób naturalny lub usuwane w gabinecie stomatologicznym i przekazane do analizy, zęby stałe były usuwane chirurgicznie. Cele analizy zębów były zróżnicowane: badanie stopnia dyfuzji Ga i Ag z kanałów korzenia do zębiny [118,119], oszacowanie ekspozycji na Pb w życiu płodowym i noworodkowym na podstawie analizy szkliwa i zębiny zębów mlecznych [120,121], określenie przyswajalności Mn w życiu płodowym przez zęby mleczne [122], opracowanie procedury analitycznej oznaczania Zn, Sr, Cd i Pb metodą LA-ICP-MS [123], określenie wpływu diety matek karmiących na zawartość Sr i Ba w zębach mlecznych pobranych od dzieci po upływie ok. 7 lat [124], badanie zmian strukturalnych powierzchni zębów spowodowanej działaniem mikroorganizmów [125] i badanie migracji pierwiastków (Al, Sr, Ba, La) będących składnikami stomatologicznych materiałów wypełnieniowych do zębiny i szkliwa zębów mlecznych i stałych [19].

Włosy były często przedmiotem analizy ze względu na łatwość pobrania próbki, całkowicie nieinwazyjne pobieranie i stosunkowo łatwe przygotowanie próbki i analizę przy użyciu metody LA-

ICP-MS. Badacze napotykali pewne problemy z unieruchamianiem pojedynczych włosów, które mogły zostać zanieczyszczone klejem z taśmy samoprzylepnej, bądź ablacji poddawana została podstawka lub taśma mogąca zawierać analizowane pierwiastki, a także niemożność analizy włosa na całej długości ze względu na zmniejszającą się szerokość włosa, która bliżej końcówek staje się mniejsza niż średnica wiązki laserowej [127]. Gdy dostępne liczby próbek były niewystarczające, stosowano ablację statyczną z jednym impulsem laserowym w kolejnych miejscach włosa [128]. Ponadto, analiza włosów i paznokci oferuje możliwość poznania zawartości analitów w czasie z przybliżoną precyzją równą ok. jednemu dniowi [127]. Pierwszymi pracami, w których analizowano całe, niezmielone włosy były autorstwa Rodushkin i in. i omawiały możliwości metody LA-ICP-MS do pomiaru ok. 100 izotopów w próbkach włosów i paznokci [23,59]. Jednakże wątpliwości budzą uzyskane wartości LOD, które wydają się być znacznie zaniżone i wg. autorów znajdują się w zakresie niskich wartości  $\text{pg g}^{-1}$  dla większości analitów, co jest wartością niespotykaną przy użyciu metody LA-ICP-MS [23]. Analiza włosów metodą LA-ICP-MS umożliwiła, m.in.: poznanie zawartości i rozmieszczenia Hg [126], wykazanie odstępu czasowego, w którym osoba zatrzymała się Hg lub w którym pacjent otrzymał dawkę leku cytostatycznego zawierającego Pt [127,130], pomiar zawartości U we włosach osób narażonych na ekspozycję zawodową [128], wykazanie korelacji zmienności zawartości pierwiastków niezbędnych i toksycznych, szczególnie U, w zależności od miejsca przebywania i spożywanej wody [129] a także opracowanie nowych strategii kalibracji opartych na rozpylaniu roztworu analitów oraz sporządzenie filmu keratynowego domieszkowanego analitem [22,53].

Kamienie moczowe, mimo iż nie są organem ani produktem metabolicznym zdrowego organizmu, zostały ujęte w zestawieniu w tabeli 2, gdyż są istotnym zagadnieniem medycznym i pobierane są od pacjentów cierpiących na zaburzenia gospodarki substancji, będących składnikami kamieni w organizmie. Zastosowanie metody LA-ICP-MS w badaniu składu kamieni moczowych wydalonych przez pacjentów, pozwoliłoby na szybszą diagnozę zaburzeń metabolicznych lub wykrycie substancji toksycznej, spożytej przez pacjenta. Zespół Kanicky'ego podjął się opracowania procedury analizy kamieni moczowych z użyciem wzorców dopasowanych matrycowo, z pomocą innych technik analitycznych, takich jak LIBS, SEM i profilometrii optycznej ukazując mapy zawartości pierwiastków, będących budulcami kamieni moczowych, takich jak Ca, P, Mg, Na, Sr i Zn, jak również toksycznych, jak Ba i Pb [131–133].

#### 4.1.3. Sucha kropla

Metoda LA-ICP-MS może stanowić alternatywę dla próbek ciekłych, o bogatej matrycy, która przed analizą metodą SN-ICP-MS przeważnie musi być zmineralizowana i rozcieńczona, powodując tym samym spadek czułości i wydłużenie czasu procedury i ryzyko zanieczyszczenia próbki odczynnikami użytymi do mineralizacji. Takie próbki mogą być z powodzeniem bezpośrednio analizowane metodą LA-ICP-MS pod postacią suchej kropli o ściśle określonej objętości, umieszczone na odpowiedniej podstawie, z której odparowana zostaje woda, pozostawiając zatężoną, suchą matrycę wraz z analitami. Pierwsza praca, w której analizowano suche krople krwi na filtrach papierowych, dotyczyła pomiaru zawartości i stosunków izotopowych Pb, jednakże autorzy konkludują, że metoda ta może być potencjalnie zastosowana do oznaczania innych pierwiastków toksycznych w szybkich testach przesiewowych dużej liczby próbek ze względu na wymaganą małą ilość próbki oraz krótki czas przygotowania i pomiaru próbki [134]. Hsieh i in. opracowali i zwalidowali procedurę oznaczania 13 pierwiastków, w tym toksycznych, w suchej kropli krwi, wskazując na ogromny potencjał metody w diagnostyce medycznej [50,65]. Metoda LA-ICP-MS okazała się również skuteczna do analizy suchej kropli moczu. Kumtabtim i in. podjęli się sprawdzenia kilku rodzajów bazy dla kropli moczu, od papieru do teflonu, oraz przeprowadzili pomiar wielu pierwiastków w zakresie mas od  ${}^7\text{Li}$  do  ${}^{208}\text{Pb}$ , wykazując przydatność metody do szybkiej i łatwej do przeprowadzenia analizy wielu próbek w celu diagnostyki medycznej [48]. Aramendia i in. zastosowali laser femtosekundowy o dużej szybkości skanowania, przeprowadzając całkowitą ablację suchej kropli, w przeciwieństwie do pojedynczych linii lub punktów stosowanych przez pozostałych autorów, uzyskując miarodajne wyniki oznaczania pierwiastków śladowych i toksycznych w moczu i krwi, potwierdzone przez analizę CRMów [47,49,136]. Alternatywną wersją analizy suchej kropli jest analiza suchej pozostałości krwi w rowkach wypalonych w bloku polimerowym przy użyciu techniki LA, pozwalając na uzyskanie powtarzalnych ilości próbki na małej powierzchni, a przez to powtarzalnych pomiarów zawartości Pb w badanej próbce [135].

#### 4.2. Anality

W zależności od celu prowadzonych badań, mierzone były izotopy pierwiastków, zarówno budulcowych i fizjologicznych, jak również toksycznych i promieniotwórczych. Pierwiastki stanowiące główne składniki budulcowe tkanek były często monitorowane, m. in. w celu wykazania różnic w strukturze analizowanej próbki. W przypadku tkanek miękkich były to  ${}^{13}\text{C}$ ,  ${}^{31}\text{P}$  i  ${}^{34}\text{S}$ , natomiast w przypadku próbek twardych:  ${}^{34}\text{S}$ ,  ${}^{42}\text{Ca}$ ,  ${}^{43}\text{Ca}$  i  ${}^{44}\text{Ca}$ . Badane tkanki miękkie zwykle

pochodziły od osób dotkniętych chorobami, mogącymi wpływać na prawidłowe zawartości pierwiastków fizjologicznych, do których zalicza się Na, Mg, K, Ca, Mn, Fe, Cu, Zn, Se. Określone choroby zaburzają zawartości charakterystycznych sobie pierwiastków, np. Cu i Fe w przypadku choroby Wilsona, Ca w przypadku miażdżycy, Cu i Zn w przypadku nowotworów. Toksyczne pierwiastki były mierzone nie tylko w przypadkach podejrzenia zatrucia, ale także w celu sprawdzenia naturalnego poziomu danego pierwiastka oraz czy następuje kumulacja pierwiastków w przypadku określonej choroby. Wyniki dla pierwiastków toksycznych w omawianych pracach dotyczą: (i): Al, Ni, Cd, Sn, Hg, Pb, Th, U, Pu, Am w tkankach miękkich (ii) Al, Ni, Rb, Cd, Sn, Ba, La, Hg, Tl, Pb, U w próbkach twardych i (iii) Be, Ni, As, Rb, Cd, Sb, Ba, Tl, Pb, U w suchej kropli. Próbkę pobrane od ofiar zatrucia lub narażenia zawodowego, stanowiące także materiał postępowaniu sądowym, były badane pod kątem substancji podejrzewanych o zatrucie. Mierzonymi izotopami były m.in.  $^{232}\text{Th}$ ,  $^{235}\text{U}$ ,  $^{238}\text{U}$ ,  $^{239}\text{Pu}$ ,  $^{240}\text{Pu}$ ,  $^{241}\text{Am}$ ,  $^{200}\text{Hg}$ ,  $^{201}\text{Hg}$ ,  $^{202}\text{Hg}$ ,  $^{206}\text{Pb}$ ,  $^{207}\text{Pb}$ ,  $^{208}\text{Pb}$  [106,127]. W tkankach pacjentów, którym podano lek cytostatyczny na bazie Pt, kontrast stosowany do obrazowania lub substancję podawaną podczas terapii wychwytu neutronu, zmierzono sygnały izotopów  $^{10}\text{B}$ ,  $^{160}\text{Gd}$ ,  $^{194}\text{Pt}$ ,  $^{195}\text{Pt}$ ,  $^{196}\text{Pt}$  [57,111,112,130]. W próbkach pobranych od pacjentów leczonych implantami stomatologicznymi na bazie stopu tytanu obserwowano izotopy pierwiastków, będących składnikami zastosowanych implantów, czyli  $^{49}\text{Ti}$ ,  $^{27}\text{Al}$ ,  $^{51}\text{V}$  [63,64]. W badaniach próbkach zębów mierzono izotopy pierwiastków, będących składnikami preparatów stosowanych przy zabiegach stomatologicznych, takich jak:  $^{27}\text{Al}$ ,  $^{69}\text{Ga}$ ,  $^{71}\text{Ga}$ ,  $^{88}\text{Sr}$ ,  $^{107}\text{Ag}$ ,  $^{109}\text{Ag}$ ,  $^{138}\text{Ba}$ ,  $^{139}\text{La}$  [19,118,119]. W pracach, których głównym celem było opracowanie procedury analitycznej, oznaczanych było wiele pierwiastków, także obejmujących szeroki zakres mas [36,48,50,53,132,133].

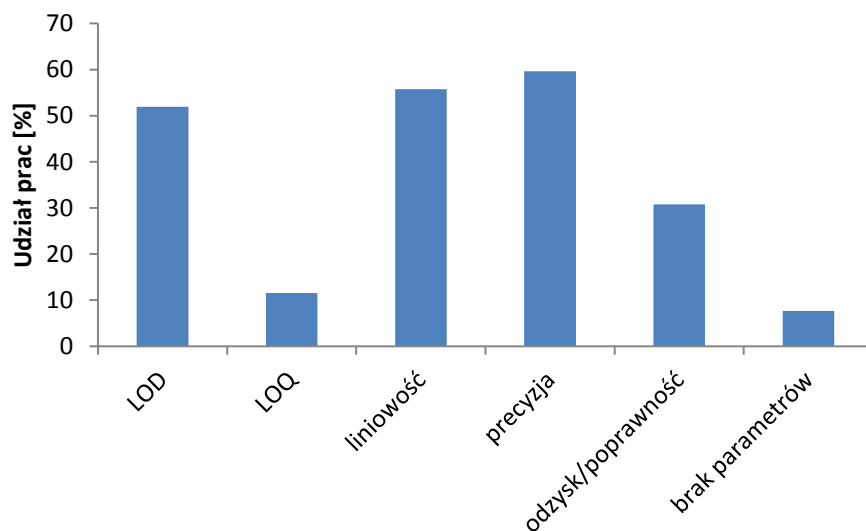
### **4.3. Aparatura**

Autorzy korzystają z różnorodnych instrumentów pomiarowych w badaniu próbek klinicznych. Pomiar prowadzone są najczęściej przy użyciu systemu ablacji laserowej z laserem Nd:YAG o długości fali 213 nm i 266 nm i z detektorem ICP-MS wyposażonym w analizator kwadrupolowy, co jest wystarczającą konfiguracją do większości celów omawianych badań. Innym często stosowanym detektorem jest wysokorozdzielczy spektrometr SF-ICP-MS umożliwiający analizę jonów w trzech trybach rozdzielczości: niskiej ( $R=300$ ), średniej ( $R=3000-4400$ ) i wysokiej ( $R=10000$ ). W przypadku omawianych prac, nie stosowano trybu wysokiej rozdzielczości ze względu na niskie intensywności sygnałów osiągnane w tym trybie. W pojedynczych pracach zastosowane zostały wysokorozdzielcze

detektory MC-ICP-MS w przypadku analizy suchej kropli moczu [136] oraz ICP-TOF-MS w analizie suchej kropli krwi [134]. Rzadziej stosowane systemy ablacji laserowej oparte na laserze ekscymerowy o  $\lambda=193$  nm [47,113,132] oraz femtosekundowy laser Yb:KGW o wysokiej szybkości skanowania z możliwością wyboru długości fali wiązki [49,136].

#### 4.4. Aspekty metrologiczne

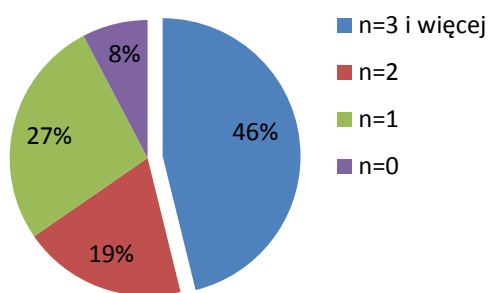
Oceniając aspekty metrologiczne prac związanych z badaniami próbek klinicznych z zastosowaniem metody LA-ICP-MS można stwierdzić, że znaczna większość badaczy jest świadoma istotności parametrów walidacyjnych charakteryzujących metodę analityczną stosowaną we własnych pracach. W tabeli 2 zebrane zostały prace o charakterze ilościowym, w których poruszony został co najmniej jeden z następujących aspektów: obliczony został co najmniej jeden parametr walidacyjny lub zastosowany został CRM lub wzorzec kalibracyjny z ustanowioną spójnością pomiarową. Liczba zebranych w tabeli prac, zgodnie z powyższym założeniem, wynosi 52 spośród 70 publikacji dot. analizy próbek klinicznych metodą LA-ICP-MS, znalezionych w bazie Scopus. Parametry walidacyjne uwzględnione w zestawieniu to: (i) LOD, jako zawartość lub masa analitu, (ii) LOQ, (iii) liniowość, (iv) precyzja i (v) odzysk, dokładność/poprawność. W nawiasach przedstawiony jest zapis danego parametru stosowany przez autorów danej publikacji. Rysunek 4 przedstawia udział procentowy powyższych parametrów walidacyjnych w omawianych publikacjach.



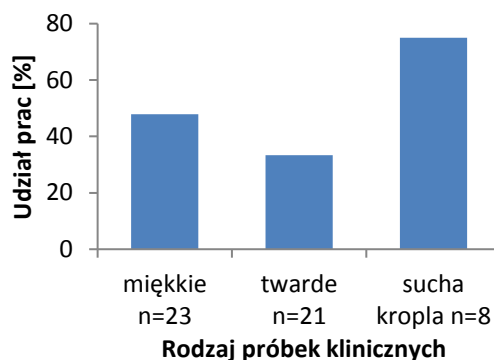
Rysunek 4 Udział prac, w którym wyznaczono dany parametr walidacyjny

Na rysunku 5 przedstawiony jest procentowy udział prac, w których obliczone zostały określone liczby parametrów walidacyjnych spośród omawianych 52 publikacji. W przypadku 4 prac (8%) nie

obliczono żadnego parametru, a w 24 pracach (46%) obliczono trzy lub więcej parametrów. Większa liczba parametrów dostarcza pełniejszej informacji nt. możliwości i ograniczeń zastosowanej procedury analitycznej. W 46% prac obliczono tylko jeden lub dwa parametry, co dostarczyło tylko częściowej informacji nt. stosowanej metody. Na rysunku 6 przedstawiono udział procentowy badań dot. danego rodzaju próbki, w których obliczono trzy i więcej parametrów walidacyjnych.



Rysunek 5 Procentowy udział prac, w których obliczona została n liczba parametrów walidacyjnych ze zbioru 52 prac omawianych w tabeli 2.

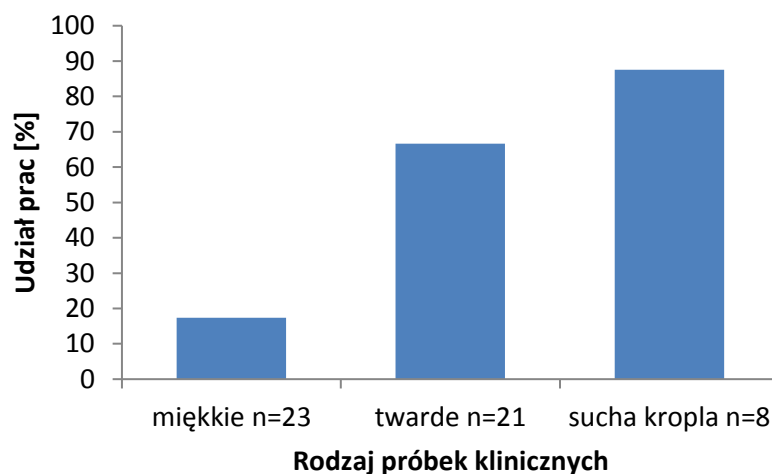


Rysunek 6 Procentowy udział prac, w których obliczono 3 lub więcej parametrów walidacyjnych w obrębie danej grupy próbek

Z zestawienia literatury światowej wynika, że do aspektów metrologicznych nie jest przykładana wystarczająca uwaga, gdyż często parametry walidacyjne nie są obliczane lub brakuje zachowania spójności pomiarowej. Są to cechy metody i wyniku pomiaru, które są konieczne aby uzyskać miarodajne wyniki, które można porównywać oraz żeby wyciągnąć prawidłowe wnioski z przeprowadzonych badań, co jest szczególnie istotne w przypadku próbek klinicznych. Należy zwrócić uwagę, że w większości próbek przeprowadza się analizę śladową, gdzie wymagana jest pełna walidacja metody z zapewnieniem i wykazaniem spójności pomiarowej. W przypadku analizy suchej kropli, ze względu na małe ilości próbki potrzebne do analiz i możliwość wielokrotnego powtórzenia pomiaru, położono większy nacisk na wyznaczenie parametrów walidacyjnych zastosowanej procedury analitycznej i obliczono najwięcej parametrów walidacyjnych w stosunku do wszystkich przeanalizowanych próbek ujętych w ocenianych publikacjach w tabeli 2 [47–50,65,135]. W celu zapewnienia spójności, w omawianych pracach stosowane były CRMy oraz roztwory jedno- i wielopierwiastkowe, z których wykonywane były wzorce do kalibracji. Tego typu wzorce są opatrzone certyfikatem poświadczającym stężenie analitu wraz z niepewnością oraz informację o sposobie zapewnienia spójności pomiarowej. W omawianych pracach CRMy używane były na dwa sposoby: jako wzorzec kalibracyjny w celu stworzenia jednopunktowej krzywej

kalibracyjnej lub jako wzorzec służący do oszacowania dokładności/poprawności metody. W przypadku tkanek miękkich, postać w jakiej występują CRMy, czyli suchy proszek, powoduje trudności w odtworzeniu oryginalnej struktury badanej tkanki, która najczęściej jest zwarta i lita [36,63,64,108]. Pierwszą pracą, w której użyto CRMu do wykazania spójności została opublikowana w roku 2000 [118]. Praca ta dotyczyła analizy zębów, natomiast w celu stworzenia zależności kalibracyjnej użyty został CRM na bazie szkła – NIST 612 Elements in Glass, jednakże nie jest to materiał o matrycy zgodnej z matrycą badanej próbki. W roku 2003 zastosowano CRMy - NIST SRM 1400 Bone Ash i NIST SRM 1486 Bone Meal o matrycy zgodnej z badaną próbką, jaką był również ząb [120]. Natomiast pierwszą pracą, w której użyty został CRM na bazie tkanek miękkich ukazała się dopiero w 2013 i użyty został SRM NIST 1577b Bovine Liver w ilościowej analizie wątroby dotkniętej marskością [108]. Generalnie, znacznie częściej stosowano CRMy w przypadku analizy tkanek twardych, jak zęby i włosy, czy suchej kropli. W przypadku analizy suchej kropli, w handlu dostępne są CRMy na bazie krwi i moczu, które, po dodaniu wody, mają cechy i skład identyczne jak próbka badana, dzięki czemu możliwe jest przeprowadzenie pełnej walidacji i uzyskanie miarodajnych wyników.

Na rysunku 7 przedstawiony jest procentowy udział prac, w których użyto CRMu, w obrębie danego rodzaju próbek. Badacze pracujący z użyciem metody LA-ICP-MS przeważnie są zgodni, że często nie ma dostępnych komercyjnie CRMów o matrycy zgodnej z matrycą badanych próbek.



Rysunek 7 Procentowy udział prac, w których zastosowano CRM w analizie próbek klinicznych w obrębie danej grupy próbek

## Cel pracy

W niniejszej pracy podjęty został problem zbadania zawartości i rozmieszczenia pierwiastków we fragmentach błony śluzowej pobranych od pacjentów leczonych stomatologicznie po procesie implantacji. Oznaczano pierwiastki zawarte w implantach: Ti, V i Al oraz pierwiastki fizjologiczne: Ca, Mg, Fe, Mn, Cu, Zn, stosując metodę LA-ICP-MS. Biorąc pod uwagę wiedzę przedstawioną w części literaturowej rozprawy doktorskiej określono szczegółowe cele dotyczące realizacji badań eksperymentalnych: 1) optymalizacja parametrów instrumentalnych systemu LA i detekcji ICP-MS; 2) przygotowanie wzorców stałych do oznaczania pierwiastków metodą LA-ICP-MS; 3) wybór odpowiedniego wzorca wewnętrznego w analizach ilościowych; 4) opracowanie etapu kalibracji bezpośredniej analizy tkanek miękkich ustrojowych; 5) wprowadzenie zasad metrologii w przeprowadzonych pomiarach chemicznych; 6) zaprojektowanie procedur analitycznych oznaczania pierwiastków w błonie śluzowej mającej kontakt z implantami, pobranej od pacjentów leczonych stomatologicznie; 7) prezentacja uzyskanych wyników w postaci dwuwymiarowych map zawartości i rozmieszczenia analizowanych pierwiastków.

## CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA

Etapy procedur klinicznych przeprowadzono za zgodą Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu. Wszyscy uczestnicy badania dostarczyli pisemną zgodę na pobranie tkanek.

## **5. Aparatura, odczynniki, roztwory, materiał badawczy, materiały odniesienia**

### **5.1. Aparatura i sprzęt laboratoryjny**

- system ablacji laserowej wyposażony w laser Nd:YAG emitujący wiązkę o długości fali 266nm (LSX-500, CETAC Technologies, Omaha, NE, USA);
- kwadrupolowy spektrometr mas z jonizacją w plazmie sprzężonej indukcyjnie wyposażony w dynamiczną komorę reakcyjną (Elan DRC II, Perkin Elmer Sciex, Kanada);
- System mineralizacji wspomaganey mikrofalami wyposażony w naczynka kwarcowe i bomby teflonowe ( Ethos One, Milestone, Italy);
- skaningowy mikroskop elektronowy (EVO 40 Series, Carl Zeiss AG, Niemcy);
- kriomikrotom (Cryostat CM 1850, Leica, Niemcy);
- mikroskop optyczny (PZO, Polska);
- profilometr optyczny (WYKO NT 1100, Veeco Instruments, NY, USA)
- suszarka laboratoryjna (SLW 32 STD INOX/G, Pol-Eko, Polska);
- waga analityczna (ABS/ABJ, Kern, Niemcy);
- system demineralizacji wody (Smart2Pure, TKA, Niemcy);
- młynek kulowy, wibracyjny (Mini-Mill Pulverisette 23, FRITSCH, Niemcy);
- (Atlas Series Manual Hydraulic Press, Specac, UK);
- pipety automatyczne Research Plus o różnych zakresach pojemności od 0,5  $\mu$ L do 10000  $\mu$ L (Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Niemcy);
- moździerz z tłuczkiem, agatowy;
- szklany sprzęt laboratoryjny;
- probówki typu Eppendorf 1,5 mL (Sarstedt);
- polipropylenowe łopatki i łożeczki do ważenia.

### **5.2. Odczynniki, gazy i materiały odniesienia**

Odczynniki:

- kwas azotowy(V) 65%, Suprapur (Merck, Niemcy);

- roztwory wzorcowe jednopierwiastkowe Al, V, Ca, Mg, Fe, Mn, Zn, Cu w formie azotanów w 2%-3% HNO<sub>3</sub> o stężeniu 1000 mg L<sup>-1</sup> i 10000 mg L<sup>-1</sup> (Merck, Niemcy);
- roztwór wzorcowy Ti w formie (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>TiF<sub>6</sub> w wodzie o stężeniu 1000 mg L<sup>-1</sup> (Merck, Niemcy);
- roztwór do codziennej optymalizacji spektrometru ICP-MS o stężeniu 10 µg L<sup>-1</sup> Ba i 1 µg L<sup>-1</sup> Mg, Co, Fe, Be, In, Ce, Pb, U, Th w 0,5% HNO<sub>3</sub> Smart Tune Solution – Elan DRC II/plus (Atomic Spectroscopy Standard, Perkin Elmer Pure);
- żelatyna (czystość zgodna z Farmakopeą, VWR Chemicals);
- środek powierzchniowo czynny Triton® X-100 (cz.d.a., Merck, Niemcy);
- medium chłodzące do kriomikrotomu (OCT Embedding matrix, CellPath);
- nadsiarczan amonu (>98%, Sigma Aldrich);
- chlorek sodu (99.99%, Merck);
- fosforan amonu (>99%, Sigma Aldrich);
- metionina (>98%, Sigma Aldrich);
- cysteina (>98%, Sigma Aldrich).

#### Materiały odniesienia:

- certyfikowany materiał odniesienia SRM 610 pierwiastki w szkle (National Institute of Standards and Technology, USA);
- certyfikowany materiał odniesienia ERM-BB184 Bovine Muscle, mięsień wołowy (Institute for Reference Materials and Measurements, Joint Research Centre, Belgia);
- certyfikowany materiał odniesienia ERM-BB422 Fish Muscle, mięsień ryby, (Institute for Reference Materials and Measurements, Joint Research Centre, Belgia);
- certyfikowany materiał odniesienia M-4 CormTis, tkanka kormorana (Konsorcjum MODAS, Polska).

#### Gazy:

- argon sprężony o czystości >99,999%, (Linde Gaz Polska, Kraków).

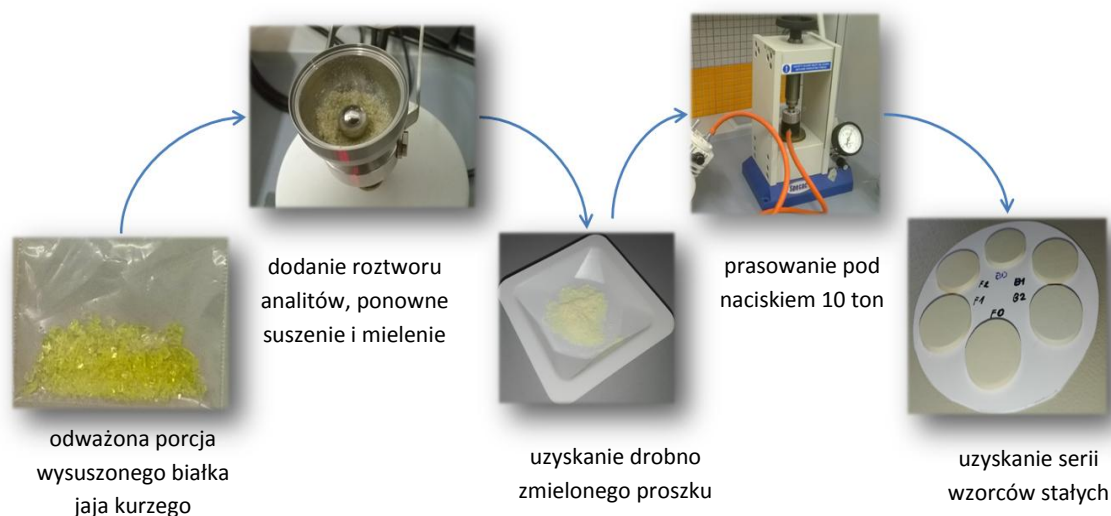
Operacje na danych, obliczenia statystyczne oraz krzywe kalibracyjne wykonywane były w programie Microsoft Excel 2010. Dwuwymiarowe mapy zawartości pierwiastków w tkankach wykonane zostały w programie and OriginLab Pro 2016.

### 5.3. Przygotowanie wzorców stałych i roztworów

W celu uzyskania danych ilościowych zastosowano strategię kalibracji z użyciem wzorców stałych o matrycy zbliżonej do matrycy badanej próbki z dodatkiem analitów.

#### 5.3.1. procedura nr 1 i 2 - wzorce dopasowane matrycowo w formie tabletki

Jako materiał matrycowy użyty zostało sproszkowane białko jaja kurzego. Świeże białko umieszczone w szalce szklanej było suszone w suszarce laboratoryjnej w temperaturze 36 °C aż do całkowitego odparowania wody. Odwodnione białko w postaci stałej zmielono w moździerzu i odważono porcje po 200 mg na wadze analitycznej i dokładnie wymieszano ze 150  $\mu\text{L}$  roztworu analitów o zmiennym stężeniu oraz z 10  $\mu\text{L}$  Triton® X-100. Przygotowano takie stężenia roztworów wzorcowych aby uzyskać następujące zawartości analitów w gotowych wzorcach stałych: (procedura nr 1) (0, 1, 25, 100, 500)  $\mu\text{g g}^{-1}$  dla Ti i Al i (0, 1, 10, 50)  $\mu\text{g g}^{-1}$  dla V, (procedura nr 2) (0, 1, 5, 25, 100, 500, 1000)  $\mu\text{g g}^{-1}$  dla Ti, Al i V. Mieszaninę ponownie suszono w suszarce laboratoryjnej do suchej masy, następnie zmielono w młynku wibracyjnym o częstotliwości 50 Hz w czasie 10 min. Uzyskany drobny proszek umieszczono w prasie hydraulicznej o nacisku 10 ton w celu uzyskania tabletek o średnicy ok. 12 mm i grubości ok. 2 mm, które umieszczono na podstawie



Rysunek 8 Etapy przygotowania wzorców stałych zgodnie z procedurą nr 1 i 2 (źródło: własne)

polipropylenowej za pomocą samoprzylepnej, dwustronnej taśmy. Wzorce wykonano ponownie i przeznaczono do mineralizacji. Na rysunku 8 etapy przygotowania wzorców stałych na bazie sproszkowanego jaja kurzego w procedurze nr 1 i 2.

### 5.3.2. procedura nr 3 - wzorce dopasowane matrycowo w formie cienkich plastrów

Jako materiał matrycowy zastosowano CRM w postaci proszku, MODAS-4 CormTis tkanki kormorana, do którego dodano żelatynę w celu poprawienia własności mechanicznych wzorców. W celu stworzenia serii wzorców dokładnie odważono 200 mg CRMu i 100 mg suchej żelatyny na wadze analitycznej. Roztwory analitów przygotowano z jednopierwiastkowych roztworów wzorcowych (Ti, Al, Mg, Ca, Fe, Zn, Cu, Mn) oraz 65% HNO<sub>3</sub> tak, aby uzyskać ok. 2,5% stężenie kwasu w każdym roztworze. Roztwory analitów dobrano tak, aby uzyskać następujące zawartości analitów w gotowych wzorcach stałych (wartości podano w  $\mu\text{g g}^{-1}$ ): Ti, Al (5, 20, 50, 100, 400); Mg, Ca (300, 500, 1000, 3000); Fe, Zn (20, 50, 300); Cu, Mn (1, 5, 20, 50, 100, 200). Do odważonej porcji suchej żelatyny, umieszczonej w moździerzku agatowym, dodano 300  $\mu\text{L}$  roztworu analitów i wymieszano dokładnie tłuczkiem aby cała porcja żelatyny zaabsorbowała roztwór. Po ok. 3 minutach mieszania, dodano suchą odważkę CRMu i wymieszano dokładnie w celu wytworzenia dobrze zhomogenizowanej pasty, którą natychmiast zamrożono w temperaturze  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ , aby ograniczyć straty wody, i przechowano do cięcia kriomikrotomem. Próbkę ślepą przygotowano z użyciem 2,5% HNO<sub>3</sub>. Zamrożone wzorce umieszczono w kriomikrotomie za pomocą medium chłodzącego i cięto na plastry o grubości 30  $\mu\text{m}$  w temperaturze  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Tak powstałe cienkie plastry wzorca umieszczono na podstawce z poli(tereftalanu etylenu), PET (ang. *polyethylene terephthalate*), pozostawiono do wyschnięcia na powietrzu w temperaturze pokojowej i przeznaczono do analizy metodą LA-ICP-MS.

### 5.3.3. Mineralizacja wzorców stałych

Wzorce stałe przygotowywane były zgodnie z opisem przedstawionym w rozdziale 5.3.1: dla procedury nr 1 przygotowanych zostało 5 niezależnych tabletek na każdym poziomie zawartości analitu. Przed ważeniem i mineralizacją, tabletki poddano ablacji zgodnie z parametrami procedury nr 1. W przypadku procedury nr 3, bezpośrednio po przygotowaniu wzorca zgodnie z opisem przedstawionym w rozdziale 5.3.2, przed zamrożeniem mieszaniny CRMu i żelatyny odkrojona została porcja materiału przeznaczona do mineralizacji, a pozostała porcja została zamrożona i przeznaczona do pocięcia kriomikrotomem. W celu mineralizacji wzorców stałych przygotowanych

zgodnie z procedurami 1 i 3 odważono porcję przygotowanego wzorca o masie ok. 150-200 mg, którą przeniesiono do kwarcowego naczynka, dodano 2 mL HNO<sub>3</sub> o stężeniu 65% i umieszczono w bombie teflonowej. Program mineralizacji był przeprowadzony w dwóch krokach: (1) czas wzrostu temperatury 15 min, (2) czas utrzymania temperatury maksymalnej 15 min, temperatura maksymalna 150 °C, moc maksymalna 1100 W. Mineralizację wzorców stałych przeprowadzono w systemie mineralizacji wysokociśnieniowej wspomaganej promieniowaniem mikrofalowym przedstawionym na rysunku 9.

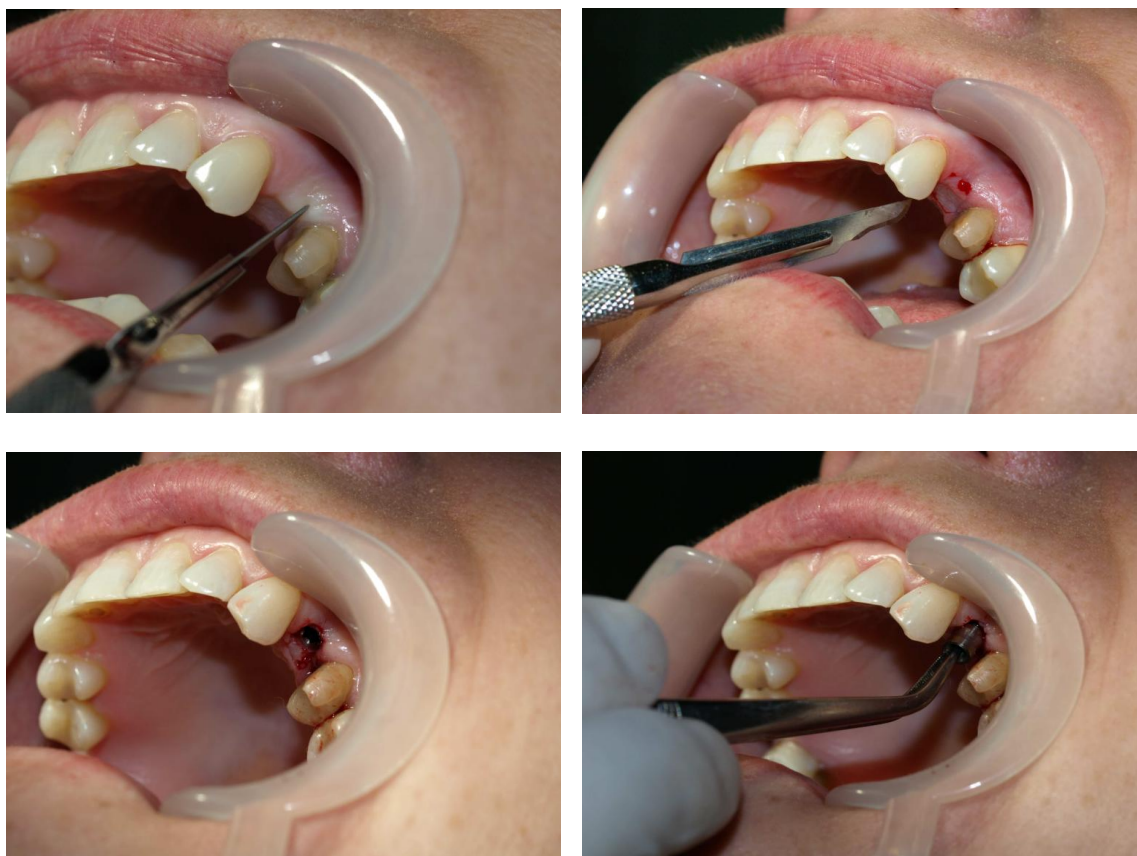


Rysunek 9 System mineralizacji wysokociśnieniowej wspomaganej promieniowaniem mikrofalowym (źródło: własne)

Zmineralizowane wzorce przeniesiono ilościowo do polipropylenowych kolb miarowych o objętości 25 mL i uzupełniono do kreski wodą demineralizowaną. Roztwory uzyskane po mineralizacji wzorców stałych według procedury nr 1 o zawartości 500 µg g<sup>-1</sup> i 100 Ti i Al µg g<sup>-1</sup> oraz wzorce przygotowane według procedury nr 3 o zawartości analitów w zakresie 100 µg g<sup>-1</sup> do 3000 µg g<sup>-1</sup> rozcieńczono dodatkowo dziesięciokrotnie. Uzyskane roztwory przeznaczone do analizy metodą SN-ICP-MS. Przed analizą roztworów po mineralizacji przygotowano roztwory wzorcowe w celu wykreślenia krzywej kalibracyjnej. Serię roztworów wzorcowych sporządzono poprzez rozcieńczenie roztworów jednopierwiastkowych Ti, Al, V, Ca, Mg, Fe, Mn, Cu i Zn o stężeniu 1000 mg L<sup>-1</sup> i 10000 mg L<sup>-1</sup>. Zakresy krzywych kalibracyjnych wynosiły (1 – 500) µg L<sup>-1</sup> dla Ti, Al, V, Fe, Mn, Cu, Zn i (100-3000) µg L<sup>-1</sup> dla Ca i Mg.

#### 5.4. Materiał badawczy

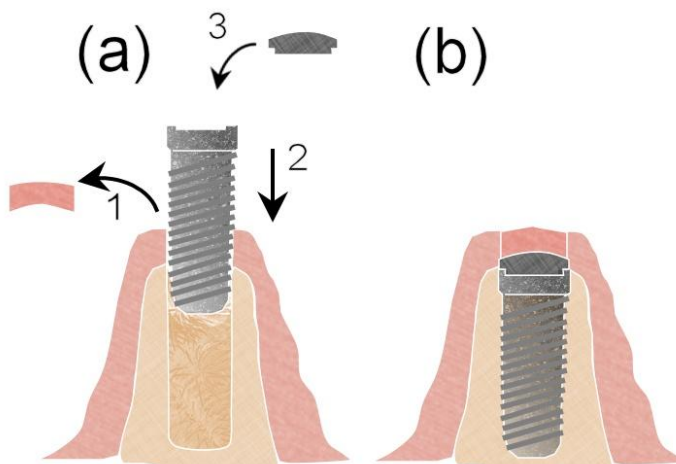
Materiał badawczy stanowiły fragmenty błony śluzowej jamy ustnej pokrywającą dwuetapowe, śrubowe, śródkostne implanty na bazie tytanu. Wszystkie etapy związane z pobieraniem próbki wykonywane były w gabinetach stomatologicznych. Błona śluzowa pobierana była z wyrostka zębodołowego szczęki i żuchwy nad wszczepami śródkostnymi. Podczas pierwszego zabiegu, w kości wiercony jest otwór, w który następnie wkręcany jest wszczep śródkostny wraz ze śrubą zamykającą. Po 4-6 miesiącach, czyli okresie gojenia tkanek i osseointegracji implantu, procedura odsłaniania implantu została przeprowadzona przez wycięcie zagojonej błony śluzowej pokrywającej platformę implantu i śrubę zamykającą, co przedstawiono na rysunku 10 .



Rysunek 10 Pobranie fragmentu błony śluzowej zarastającej implant (źródło: fotografie wykonane przez Krzysztofa Makucha)

Odsłonięcie było wykonywane ostrożnie przy użyciu skalpela ze stali chirurgicznej, aby zminimalizować zanieczyszczenie materiału badawczego drobinami metalicznymi, mogącymi powstać wskutek uszkodzeń mechanicznych. Po zabiegu zastosowano gojenie zamknięte,

polegające na dokładnym zasyciu rany tak aby ograniczyć kontakt implantu ze środowiskiem jamy ustnej. Przed implantacją, podczas przygotowywania płyta błony śluzowej na grzbiecie wyrostka zębodołowego, zebrano fragment błony śluzowej planowanego łoża wokół implantu, jak pokazano na ilustracji (a) na rysunku 11.



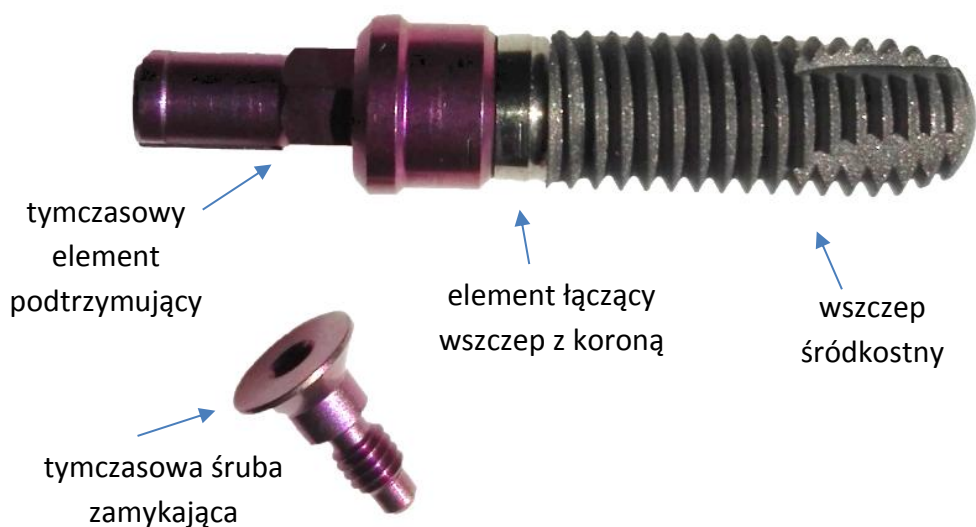
Rysunek 11 Schemat umieszczenia implantu jest następujący: (a) w pierwszym etapie (1) wycinany był fragment błony śluzowej pokrywający wyrostek zębodołowy, co stanowiło grupę kontrolną, (2) następnie wiercony był otwór w kości, do którego wkręcono implant i (3) umieszczono w nim śrubę zamykającą; (b) po okresie gojenia i osseointegracji implant obrastał nową tkanką (źródło: własne)

Ten skrawek służył jako materiał kontrolny w celu określenia zawartości Ti, Al i V w tkankach, które wcześniej nie miały styczności z implantem. Próbkę błony śluzowej starannie spłukano wodą dejonizowaną natychmiast po pobraniu, aby usunąć nadmiar krwi i ewentualnych odłamków od wiercenia. Następnie, próbki tkanek przechowywano w  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  w polipropylenowych probówkach Eppendorfa, aby zahamować rozkład i rozwój mikroorganizmów (rysunek 12). Próbki kontrolne i po implantacji były traktowane w ten sam sposób. Wszystkie szklane i plastikowe naczynia laboratoryjne dokładnie przepłukano 1% kwasem azotowym i wodą demineralizowaną.



Rysunek 12 fragment błony śluzowej umieszczony w probówce polipropylenowej Eppendorfa (źródło: własne)

System implantologiczny składa się ze wszczepu śródkostnego oraz z tymczasowej śruby zamykającej, umieszczanej we wszczepie na czas gojenia (rysunek 13). Wszczep śródkostny wykonany był z tytanu klasy IV o czystości ok. 99%, natomiast śruba zamykająca, w zależności od zastosowanego systemu implantologicznego, składała się z czystego tytanu lub ze stopu Ti6Al4V o składzie ok. 90% Ti, 6% Al, 4% V, 0,25% Fe, 0,2% O [73]. Wszczep śródkostny jest bezpośrednio umieszczany w kości i cechuje się porowatą strukturą powierzchni w celu poprawy osseointegracji. Porowatość implantu zwiększa się przez piaskowanie za pomocą proszku  $Al_2O_3$  [80,137].



Rysunek 13 Elementy systemu implantologicznego: wszczep śródkostny i śruba zamykająca (źródło: własne)

#### Przygotowanie próbki do analizy: procedura nr 1 i 2

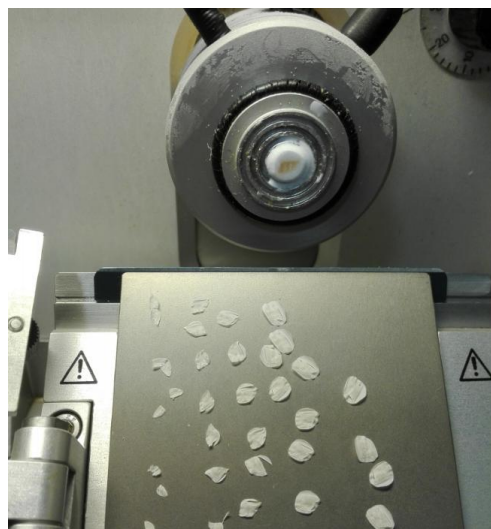
Przed analizą próbki suszono w piecu laboratoryjnym z wymuszonym obiegiem w temperaturze 25 ° C przez około 60 minut i umieszczono na podstawce polipropylenowej przy pomocy kropli żelatyny o objętości 2-10  $\mu$ L, w zależności od wielkości tkanki. Wybrano do tego celu farmakologicznie czystą żelatynę ze względu na niską zawartość analizowanych pierwiastków. Na rysunku 14 przedstawiono sposób, w jaki umieszczono i unieruchomiono próbki błony śluzowej na podstawce z tworzywa sztucznego, którą następnie przyklejono do podstawki papierowej. Tak umieszczone próbki są gotowe do analizy LA-ICP-MS lub do wykonania fotografii przy pomocy mikroskopu optycznego.

### Przygotowanie próbki do analizy: procedura nr 3

Po wyciągnięciu z zamrażalnika, próbki umieszczono w kriomikrotomie przy użyciu medium chłodzącego i pocięto na plastry o grubości 30  $\mu\text{m}$  w temperaturze  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ , co pokazano na rysunku 15. Plastry próbki wraz z medium chłodzącym przeniesiono na podstawkę z PET i pozostawiono do wyschnięcia na powietrzu w temperaturze pokojowej. Przed analizą LA-ICP-MS plastry próbki były fotografowane w powiększeniu przy pomocy mikroskopu optycznego. Część próbek została poddana barwieniu HE.



Rysunek 14 Próbki umieszczone na podstawkach z tworzywa sztucznego wg. procedury nr 1 i 2 (źródło: własne)



Rysunek 15 Próbka cięta kriomikrotomem wg. procedury nr 3 (źródło: własne)

#### 5.5. Optymalizacja parametrów aparaturowych

Pomiary wzorców stałych i fragmentów błony śluzowej wykonano przy użyciu systemu LA połączonego z detektorem ICP-MS, które przedstawione są na rysunku 16. Przed rozpoczęciem analiz wzorców stałych i właściwych próbek należy przeprowadzić optymalizację ustawień aparatury pomiarowej, tak aby uzyskać pożądane wartości intensywności i precyzji sygnałów, rozdzielczości map zawartości pierwiastków i optymalny czas analizy.



Rysunek 16 System LA i detektor ICP-MS zastosowane w niniejszej pracy (źródło: własne)

#### 5.5.1. Optymalizacja systemu LA

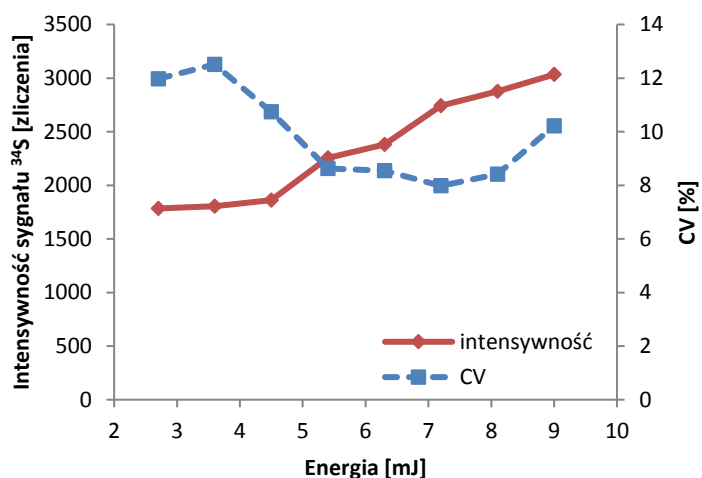
Wybór parametrów pracy systemu LA wg. procedury nr 1 i 2 polegała na ablacji wzorca na bazie jaja kurzego z zawartością analitu  $25 \mu\text{g g}^{-1}$ , sposobem jednej zmiennej. Zmieniane były następujące zakresy parametrów: energia lasera (1,8 mJ - 9,0 mJ, co odpowiada 20% - 100% energii maksymalnej), szerokość wiązki (10  $\mu\text{m}$  - 150  $\mu\text{m}$ ), częstotliwość impulsów (1 Hz - 20 Hz). Mierzonym izotopem w procesie optymalizacji był izotop wzorca wewnętrznego -  $^{34}\text{S}$ . Wyniki optymalizacji energii, średnicy i częstotliwości impulsów wiązki laserowej przedstawione są odpowiednio na rysunkach 17, 18 i 19. Szybkość skanowania była ustalona arbitralnie w zależności od średnicy wiązki tak, aby uzyskać mapy zawartości analitów o odpowiedniej rozdzielczości w określonym czasie. Ponadto, w przypadku procedury nr 3 istotne było ustawienie szybkości skanowania i częstotliwości impulsów tak, aby wiązka laserowa nie oddziaływała zbyt mocno na podkładkę, z powodu małej grubości próbki. Przy wyborze parametrów do dalszych analiz kierowano się następującymi zasadami: (i) wystarczająca intensywność sygnałów, (ii) niska wartość precyzji sygnałów, (iii) wystarczająca rozdzielczość przestrzenną map zawartości analitów, (iv) nie zbyt długi całkowity czas analizy jednej próbki. Spełnienie wszystkich warunków nie było możliwe z technicznego punktu widzenia, stąd ostateczny wybór parametrów systemu LA był pewnym kompromisem pomiędzy zadowalającym czasem analizy, osiągnięciem odpowiedniej rozdzielczości

przestrzennej i wystarczającymi intensywnościami i precyzją mierzonych sygnałów. Parametry pracy systemu LA według procedury nr 3 zostały wybrane arbitralnie, na podstawie wyników pomiarów uzyskanych podczas analiz zgodnie z procedurą nr 1 i 2, tak aby poprawić rozdzielczość uzyskanych map zawartości osiągając zadowalające intensywności sygnałów i unikając nadmiernego wydłużenia czasu analizy. W tabeli 3 zebrane są parametry aparaturowe systemu LA dla trzech procedur zastosowanych w niniejszej pracy.

Tabela 3 Zestawienie parametrów aparaturowych systemu LA dla procedury nr 1, 2 i 3

Parametr	Procedura nr 1	Procedura nr 2	Procedura nr 3
energia lasera (mJ)	5,4	5,4	5,4
częstotliwość impulsów (Hz)	10	10	10
średnica wiązki ( $\mu\text{m}$ )	100	50	25
odległość między środkami linii ablacyjnych ( $\mu\text{m}$ )	100	50	25
szybkość skanowania ( $\mu\text{m s}^{-1}$ )	25	50	100
odstęp czasu między liniami (s)	5	5	3
gaz nośny	Ar	Ar	Ar

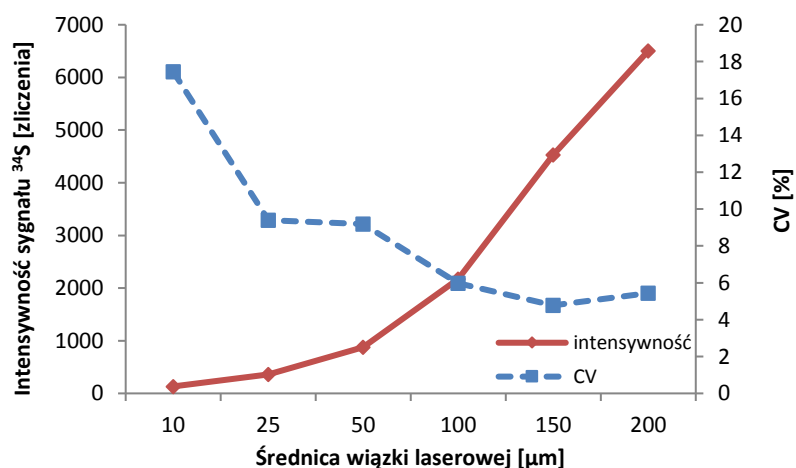
Na rysunku 17 przedstawiono wyniki optymalizacji energii wiązki laserowej. Optymalizacja polegała na ablacji wzorca przez 60 s przy różnych energiach wiązki laserowej, od 2,7 mJ do 9,0 mJ, co stanowi odpowiednio 30% i 100% maksymalnej energii wiązki, ze skokiem o 10%. Inne parametry pozostały niezienne podczas eksperymentu i zostały ustawione następująco: średnica wiązki laserowej 100  $\mu\text{m}$ , częstotliwość impulsów 10 Hz, szybkość skanowania, 25  $\mu\text{m s}^{-1}$ .



Rysunek 17 Zależność intensywności i CV sygnału  $^{34}\text{S}$  od energii wiązki laserowej

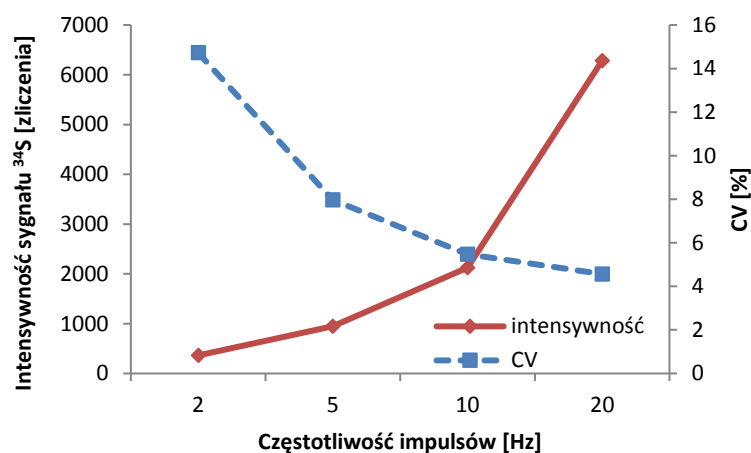
Na wykresie przedstawiona jest zależność uzyskanych intensywności sygnałów  $^{34}\text{S}$  od ustawionej energii wiązki (wartości uśrednione dla jednej linii ablacyjnej) i odpowiadające im wartości współczynnika zmienności, CV (ang. *coefficient of variation*). Wybór energii wiązki uzależniony był od uzyskanego poziomu intensywności sygnału, wartości precyzji i zachowania powierzchni wzorca poddanego ablacji. Optymalna wartość energii wiązki laserowej wybrana do dalszych badań to 5,4 mJ, co odpowiada 60% energii maksymalnej.

Na rysunku 18 przedstawiono wyniki optymalizacji średnicy wiązki laserowej. Ablacji poddany został wzorec przez 60 s zmieniając dla każdej linii inną średnicę wiązki: 10  $\mu\text{m}$ , 25  $\mu\text{m}$ , 50  $\mu\text{m}$ , 100  $\mu\text{m}$ , 150  $\mu\text{m}$  i 200  $\mu\text{m}$ . Pozostałe parametry pozostały niezmiennie podczas eksperymentu i zostały ustawione następująco: energia wiązki 5,4 mJ, częstotliwość impulsów 10 Hz, szybkość skanowania, 25  $\mu\text{m s}^{-1}$ . Na wykresie przedstawiona jest zależność uzyskanych intensywności sygnałów  $^{34}\text{S}$  od ustawionej średnicy wiązki (wartości uśrednione dla jednej linii ablacyjnej) i odpowiadające im wartości CV. Intensywność uzyskiwanych sygnałów rośnie proporcjonalnie wraz ze wzrostem średnicy wiązki, jednakże decydującym czynnikiem była pożądana rozdzielczość map zawartości analitów, która została arbitralnie ustawiona w zależności od zastosowanej procedury i wynosiła 100  $\mu\text{m}$ , 50  $\mu\text{m}$  i 25  $\mu\text{m}$ , odpowiednio dla procedury nr 1, 2 i 3. Sygnały uzyskiwane przy średnicy wiązki 10  $\mu\text{m}$  były zbyt niskie. Natomiast ustawienie średnicy wiązki na 150  $\mu\text{m}$  lub 200  $\mu\text{m}$  skutkowało mapami zawartości o zbyt niskiej rozdzielczości przestrzennej. Ponadto, wysokie średnice wiązki skutkowały znacznym kruszeniem się wzorców i zbyt głęboką penetracją wiązki w głąb próbki.



Rysunek 18 Zależność intensywności i CV sygnału  $^{34}\text{S}$  od średnicy wiązki laserowej

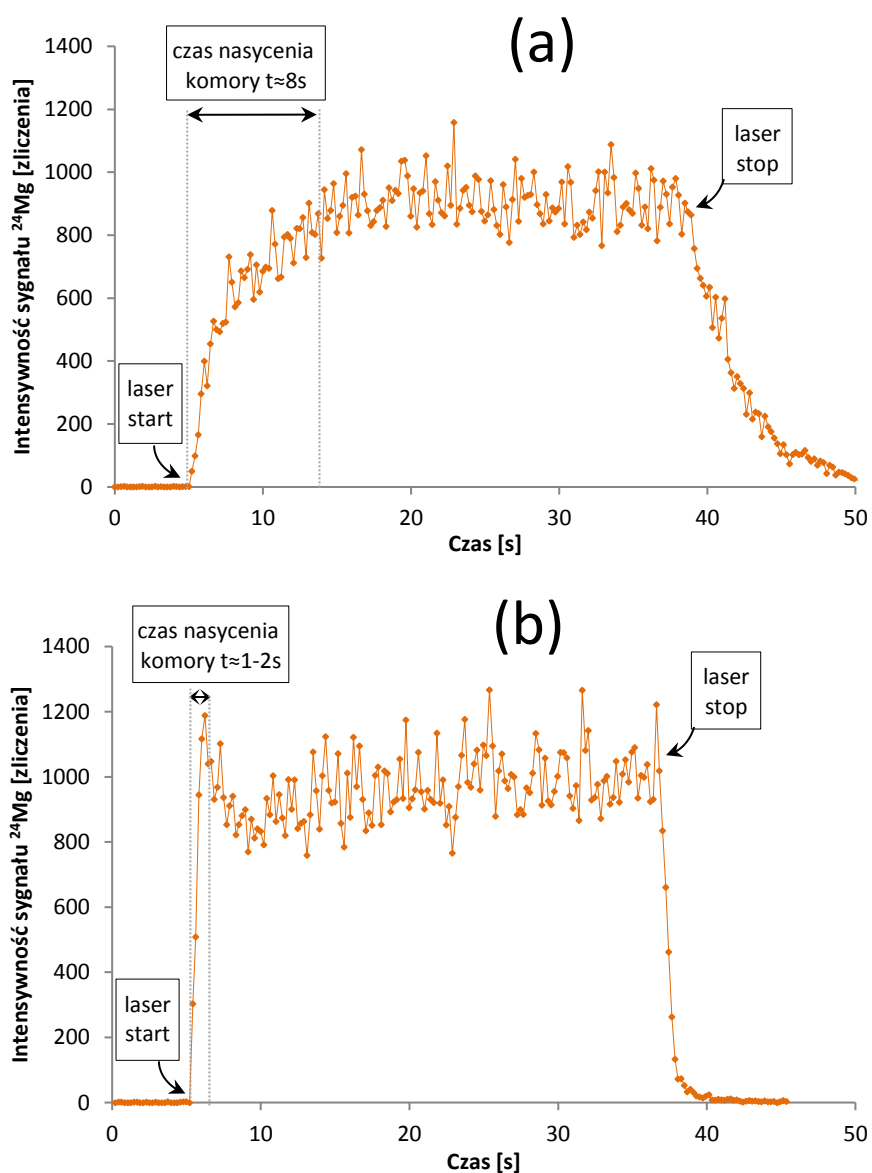
Na rysunku 19 przedstawiono wyniki optymalizacji częstotliwości impulsów wiązki laserowej. Ablacji poddany został wzorec przez 60 s ustawiając kolejno częstotliwości impulsów: 2 Hz, 5 Hz, 10 Hz i 20 Hz. Pozostałe parametry pozostały niezmiennie podczas eksperymentu i zostały ustawione następująco: energia wiązki 5,4 mJ, średnica wiązki 100  $\mu\text{m}$ , szybkość skanowania, 25  $\mu\text{m s}^{-1}$ . Na wykresie przedstawiona jest zależność uzyskanych intensywności sygnałów  $^{34}\text{S}$  od ustawionej częstotliwości impulsów (wartości uśrednione dla jednej linii ablacyjnej) i odpowiadające im wartości CV. Podobnie jak w przypadku średnicy wiązki, intensywność uzyskiwanych sygnałów rośnie proporcjonalnie wraz ze wzrostem częstotliwości impulsów wiązki. Częstotliwość impulsów nie ma istotnego wpływu na rozdzielczość map zawartości analitów, natomiast wpływa na intensywność sygnałów. Przy częstotliwości 10 Hz zaobserwowano optymalną zależność intensywności sygnałów, precyzji i głębokości penetracji wiązki w głąb próbki. Ponadto, częstotliwość 20 Hz skutkowała bardziej poszarpanymi krawędziami ścieżek poablacyjnych i zwiększonym kruszeniem wzorców.



Rysunek 19 Zależność intensywności i CV sygnału  $^{34}\text{S}$  od częstotliwości impulsów wiązki laserowej

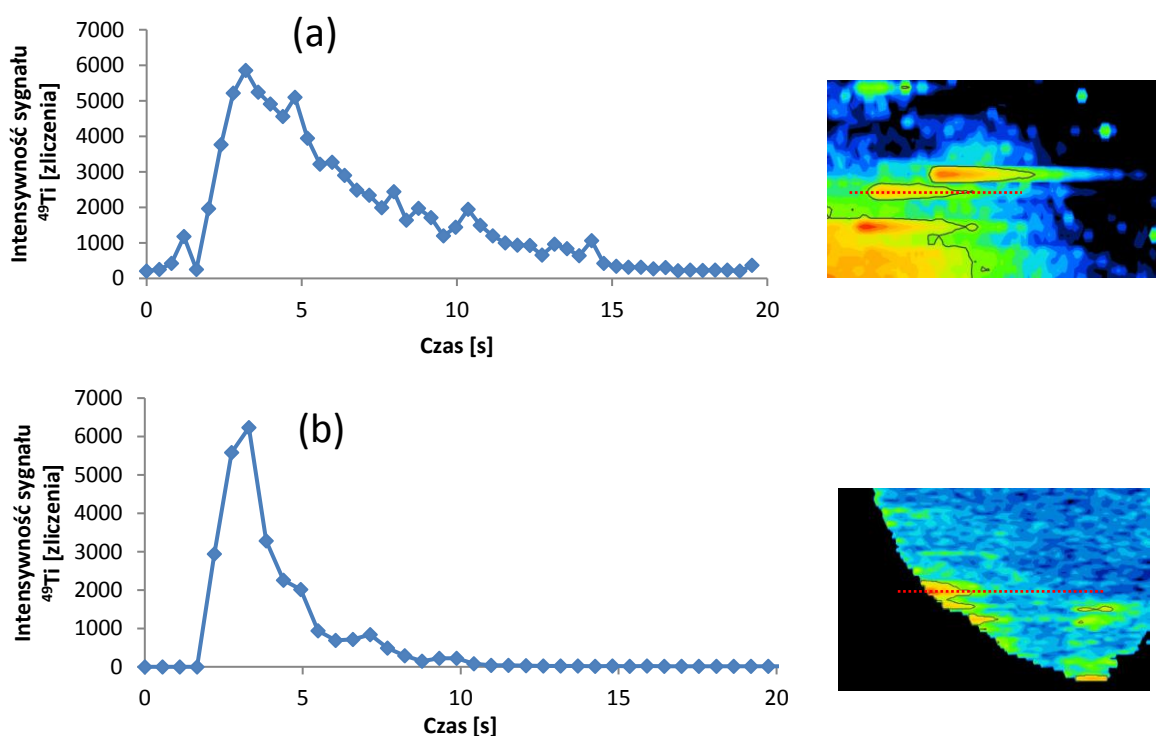
Modyfikacja objętości komory ablacyjnej była jednym z kroków optymalizacji aparatury systemu LA w procedurze nr 3. Mała grubość próbki (30  $\mu\text{m}$ ) powodowała, że wiązka laserowa w całości przenosiła próbkę do aerozolu wraz z podstawką znajdującą się pod próbką. W celu zminimalizowania czasu interakcji wiązki z podstawką zwiększono szybkość skanowania do 100  $\mu\text{m s}^{-1}$ . Natomiast, aby zminimalizować efekt ogonowania podjęto próbę zmniejszenia objętości komory ablacyjnej. W standardowej komorze ablacyjnej umieszczony został dodatkowy krążek teflonowy co spowodowało podwyższenie stolika podtrzymującego próbkę podczas ablacji i

zmniejszenie objętości komory z 78 mL do 31 mL. Modyfikacja komory spowodowała znaczne zmniejszenie efektu ogonowania sygnału i czasu wymywania aerozolu z komory, co jest szczególnie zauważalne podczas ablacji mocno niehomogenicznej próbki. Na rysunku 20 zestawiono sygnał  $^{24}\text{Mg}$  zarejestrowany podczas ablacji CRMu szkła NIST 610 w standardowej komorze ablacyjnej (a) oraz w komorze zmodyfikowanej, o zmniejszonej objętości (b). Czas nasycenia komory niezmodyfikowanej wynosi ok. 8 s, natomiast w komorze o zmniejszonej objętości czas ten jest znacznie skrócony, do ok. 1-2 s.



Rysunek 20 Sygnał intensywności izotopu  $^{24}\text{Mg}$  zarejestrowany podczas ablacji CRMu NIST 610 w standardowej komorze ablacyjnej (a) i w komorze o zmniejszonej objętości (b)

Na rysunku 21 przedstawiono sygnały zarejestrowane podczas ablacji tkanek według procedury nr 2 i 3. Wykresy po lewej stronie rysunku 21 przedstawiają sygnał fragmentu wybranej, pojedynczej linii ablacyjnej wykonanej na tkance, co stanowiło fragment mapy zawartości analitów całej omawianej tkanki. Fragmenty map zawartości Ti na powierzchni omawianych tkanek przedstawiono po prawej stronie na rysunku 21. Prezentowane dane zostały tak wybrane, aby wiązka laserowa poddała ablacji cząstkę metaliczną, znajdującą się na tkance, a zmierzone intensywności sygnału były zbliżone dla obu procedur. Dane przedstawiono w taki sposób aby obejmowały 50 sąsiadujących zliczeń detektora dla obu procedur. W procedurze nr 2 zastosowano standardową komorę ablacyjną, natomiast w procedurze nr 3 zastosowano komorę zmodyfikowaną, o zmniejszonej objętości. Efektem mniejszej objętości komory ablacyjnej jest szybsze wymywanie aerozolu i zmniejszenie efektu ogonowania sygnału.



Rysunek 21 Porównanie sygnałów dla pojedynczej linii ablacyjnej zmierzonych w tkance (a) zgodnie z procedurą nr 2 i (b) zgodnie z procedurą nr 3. Fragment sygnału przedstawiony na wykresie sygnału odpowiada linii ablacyjnej zaznaczonej czerwoną, przerywaną linią na fotografii po prawej stronie.

### 5.5.2. Optymalizacja ICP-MS

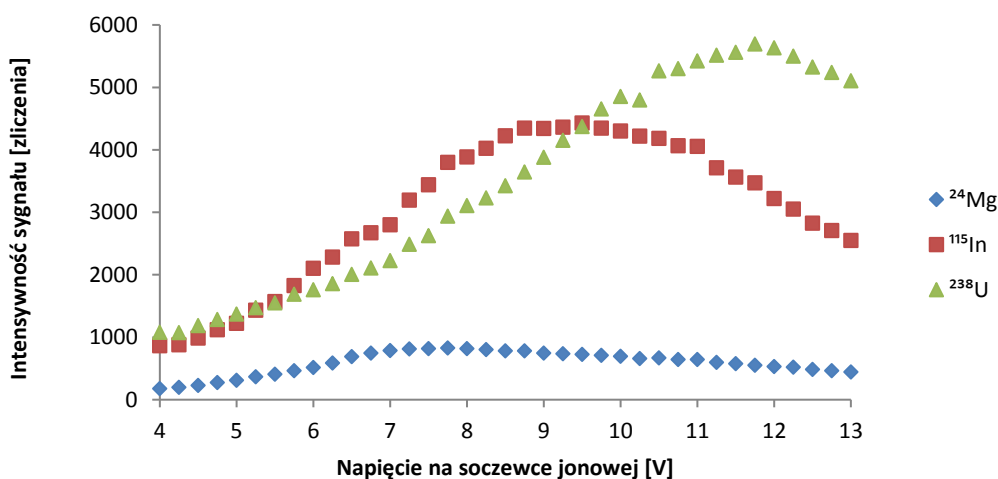
Spektrometr optymalizowano codziennie przed analizami poprzez ablację CRMu szkła NIST SRM 610 i odpowiednie ustawienie przepływu gazu rozpylającego, mocy generatora plazmy i napięcia soczewki jonowej w celu uzyskania maksymalnej intensywności sygnału dla  $^{24}\text{Mg}$ ,  $^{115}\text{In}$ ,  $^{238}\text{U}$  oraz do kontroli i otrzymania stosunku tlenków  $^{232}\text{Th}^{16}\text{O}^+ / ^{232}\text{Th}^+ < 0,2\%$  i jonów naładowanych podwójnie  $^{42}\text{Ca}^{2+} / ^{42}\text{Ca}^+ < 0,5\%$ . Optymalizacja spektrometru przed analizami roztworów wzorców stałych po mineralizacji polegała na analizie roztworu Smart Tune Solution i ustaleniu odpowiedniego przepływu gazu rozpylającego, mocy generatora plazmy i napięcia na soczewce jonowej tak, aby uzyskać maksymalną intensywność sygnału dla  $^{24}\text{Mg}$ ,  $^{115}\text{In}$ ,  $^{238}\text{U}$  oraz otrzymać stosunek tlenków  $^{140}\text{Ce}^{16}\text{O}^+ / ^{140}\text{Ce}^+ < 3\%$  i jonów naładowanych podwójnie  $^{138}\text{Ba}^{2+} / ^{138}\text{Ba}^+ < 3\%$ .

Tabela 4 Zestawienie parametrów aparaturowych detektora ICP-MS dla procedury nr 1, 2 i 3

Parametr	Procedura nr 1	Procedura nr 2	Procedura nr 3
moc generatora plazmy (W)	1100	1050-1100	1100-1150
przepływ gazu rozpylającego (L min <sup>-1</sup> )	1,05-1,10	1,0-1,10	1,10-1,15
przepływ gazu pomocniczego (L min <sup>-1</sup> )	1,2	1,2	1,2
przepływ gazu plazmowego (L min <sup>-1</sup> )	16	16	16
tryb pracy soczewki jonowej	automatyczny ( <i>autolens</i> )	automatyczny ( <i>autolens</i> )	automatyczny ( <i>autolens</i> )
tryb detektora	pulsowy/ analogowy ( <i>dual</i> )	pulsowy/ analogowy ( <i>dual</i> )	pulsowy/ analogowy ( <i>dual</i> )
tryb skanowania	<i>peak hopping</i>	<i>peak hopping</i>	<i>peak hopping</i>
monitorowane izotopy	$^{27}\text{Al}$ , $^{49}\text{Ti}$ , $^{51}\text{V}$	$^{27}\text{Al}$ , $^{49}\text{Ti}$ , $^{51}\text{V}$	
wzorzec wewnętrzny	$^{34}\text{S}$	$^{34}\text{S}$	$^{34}\text{S}$
czas zbierania danych (ms)	- 10 ( $^{34}\text{S}$ ), - 30 ( $^{27}\text{Al}$ , $^{51}\text{V}$ ), - 50 ( $^{49}\text{Ti}$ )	- 10 ( $^{34}\text{S}$ ), - 30 ( $^{27}\text{Al}$ , $^{51}\text{V}$ ), - 50 ( $^{49}\text{Ti}$ )	- 10 ( $^{31}\text{P}$ ), - 20 ( $^{13}\text{C}$ , $^{26}\text{Mg}$ , $^{55}\text{Mn}$ , $^{63}\text{Cu}$ , $^{66}\text{Zn}$ ), - 30 ( $^{57}\text{Fe}$ ), - 50 ( $^{27}\text{Al}$ , $^{34}\text{S}$ , $^{43}\text{Ca}$ ), - 100 ( $^{49}\text{Ti}$ )
liczba przemiatkań	2	2	1

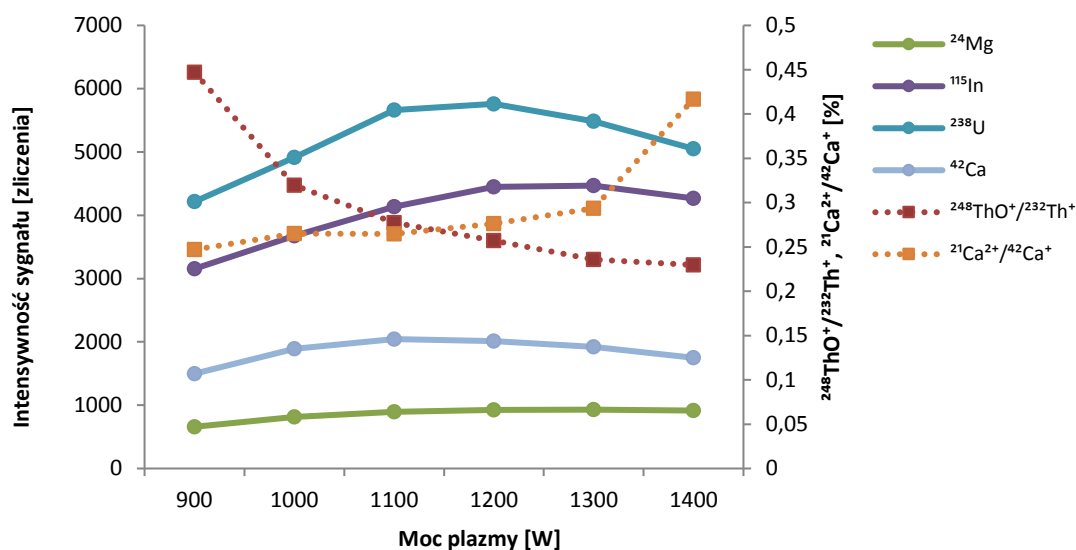
W tabeli 4 zestawiono parametry aparaturowe detektora ICP-MS wybrane dla procedury nr 1, 2 i 3. Przedstawione parametry ustalone były na podstawie optymalizacji (moc plazmy, napięcie na soczewce jonowej, przepływ gazu rozpylającego) oraz wybrane arbitralnie (czasy zbierania danych i liczba przemianań) tak, aby uzyskać pożądane intensywności sygnałów i czas zliczania danych dla wszystkich monitorowanych m/z dla pojedynczego punktu pomiarowego, co przekłada się na zadowalającą jakość i rozdzielczość map zawartości analitów.

Na rysunku 22 przedstawiono zależność intensywności sygnału izotopów z szerokiego zakresu mas ( $^{24}\text{Mg}$ ,  $^{115}\text{In}$  i  $^{238}\text{U}$ ) w zależności od przyłożonego napięcia na soczewce jonowej. Podczas optymalizacji zmieniano napięcie w zakresie od 4 V do 13 V z krokiem co 0,25 V. Na podstawie optymalizacji napięcia, do dalszych analiz wybrany został tryb *autolens*, polegający na dynamicznej zmianie napięcia na soczewce jonowej w zależności od analizowanego m/z. Optymalizacja soczewki jonowej była wykonywana każdego dnia przed rozpoczęciem właściwych analiz.



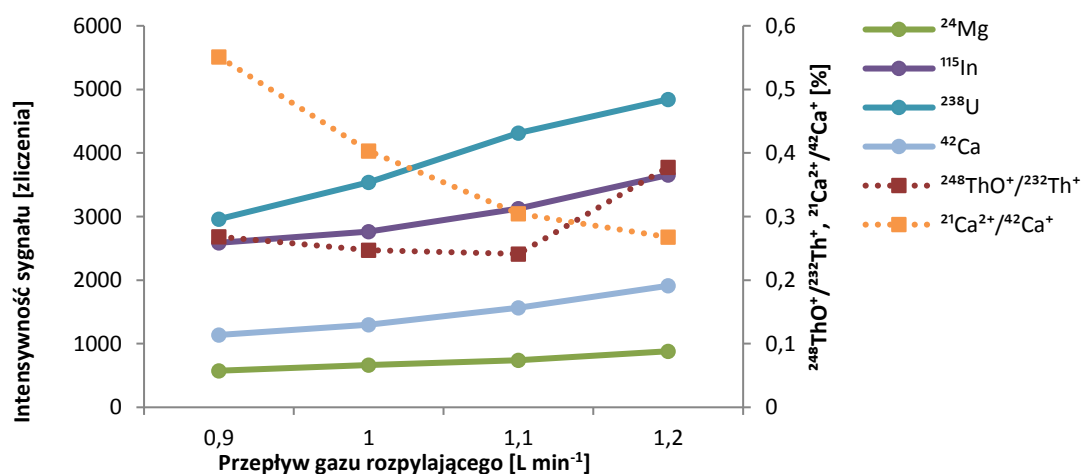
Rysunek 22 Wykresy optymalizacji napięcia na soczewce jonowej dla trzech izotopów z szerokiego zakresu mas:  $^{24}\text{Mg}$ ,  $^{115}\text{In}$  i  $^{238}\text{U}$

Na rysunku 23 przedstawiono zależność intensywności sygnału wybranych izotopów z szerokiego zakresu mas ( $^{24}\text{Mg}$ ,  $^{42}\text{Ca}$ ,  $^{115}\text{In}$  i  $^{238}\text{U}$ ) oraz obliczono stosunek intensywności sygnałów  $^{248}\text{ThO}^+ / ^{232}\text{Th}^+$  i  $^{21}\text{Ca}^{2+} / ^{42}\text{Ca}^+$  oznaczających odpowiednio ilości tlenków i jonów podwójnych tworzących się w plazmie przy danej mocy plazmy. Sprawdzenie osiągnięć aparatury było sprawdzane każdego dnia przed rozpoczęciem właściwych analiz. Optymalizacja mocy plazmy była wykonywana w przypadku osiągnięcia niezadowalających parametrów intensywności sygnału  $^{24}\text{Mg}$ ,  $^{42}\text{Ca}$ ,  $^{115}\text{In}$  i  $^{238}\text{U}$  oraz stosunków  $^{248}\text{ThO}^+ / ^{232}\text{Th}^+$  i  $^{21}\text{Ca}^{2+} / ^{42}\text{Ca}^+$ . W toku wielodniowych analiz, optymalna moc plazmy wahała się w zakresie od 1050 W do 1150 W.



Rysunek 23 Wykresy optymalizacji mocy plazmy dla czterech izotopów z szerokiego zakresu mas ( $^{24}\text{Mg}$ ,  $^{42}\text{Ca}$ ,  $^{115}\text{In}$ ,  $^{238}\text{U}$ ) oraz dla stosunków  $^{248}\text{ThO}^+ / ^{232}\text{Th}^+$  i  $^{21}\text{Ca}^{2+} / ^{42}\text{Ca}^+$

Na rysunku 24 przedstawiono wykresy intensywności sygnału wybranych izotopów z szerokiego zakresu mas ( $^{24}\text{Mg}$ ,  $^{42}\text{Ca}$ ,  $^{115}\text{In}$  i  $^{238}\text{U}$ ) oraz obliczono stosunek intensywności sygnałów  $^{248}\text{ThO}^+ / ^{232}\text{Th}^+$  i  $^{21}\text{Ca}^{2+} / ^{42}\text{Ca}^+$  w zależności od szybkości przepływu gazu rozpylającego próbkę. Optymalizacja szybkości przepływu gazu rozpylającego wykonywana była w przypadku osiągnięcia niezadowolających parametrów intensywności sygnału  $^{24}\text{Mg}$ ,  $^{42}\text{Ca}$ ,  $^{115}\text{In}$  i  $^{238}\text{U}$  oraz stosunków  $^{248}\text{ThO}^+ / ^{232}\text{Th}^+$  i  $^{21}\text{Ca}^{2+} / ^{42}\text{Ca}^+$ . Wartości, szybkości przepływu gazu rozpylającego mieściły się w zakresie  $1,0 - 1,1 \text{ L min}^{-1}$ .



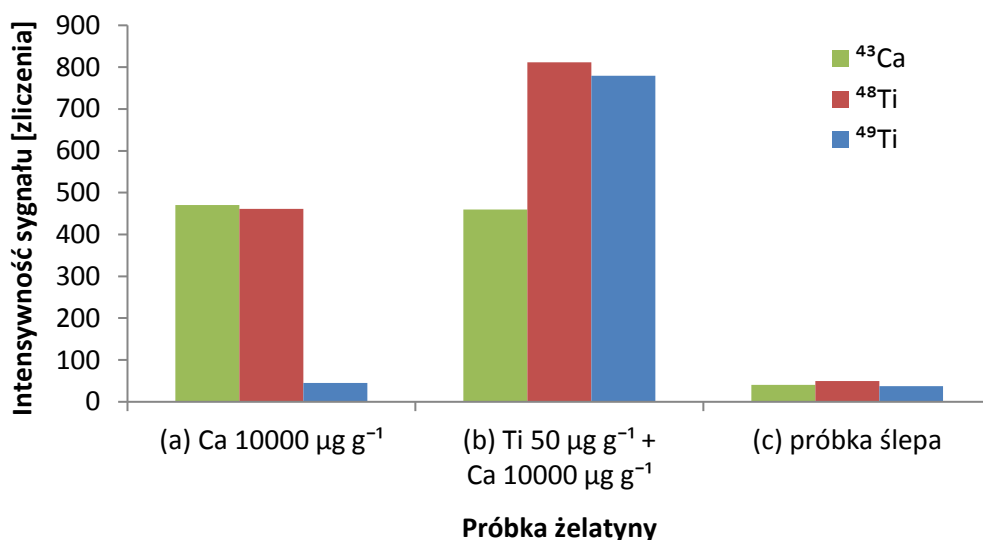
Rysunek 24 Wykresy optymalizacji przepływu gazu rozpylającego dla czterech izotopów z szerokiego zakresu mas ( $^{24}\text{Mg}$ ,  $^{42}\text{Ca}$ ,  $^{115}\text{In}$ ,  $^{238}\text{U}$ ) oraz dla stosunków  $^{248}\text{ThO}^+ / ^{232}\text{Th}^+$  i  $^{21}\text{Ca}^{2+} / ^{42}\text{Ca}^+$

## Wyniki i dyskusja

### 6. Procedury analityczne oznaczania Ti, Al i V w tkankach miękkich

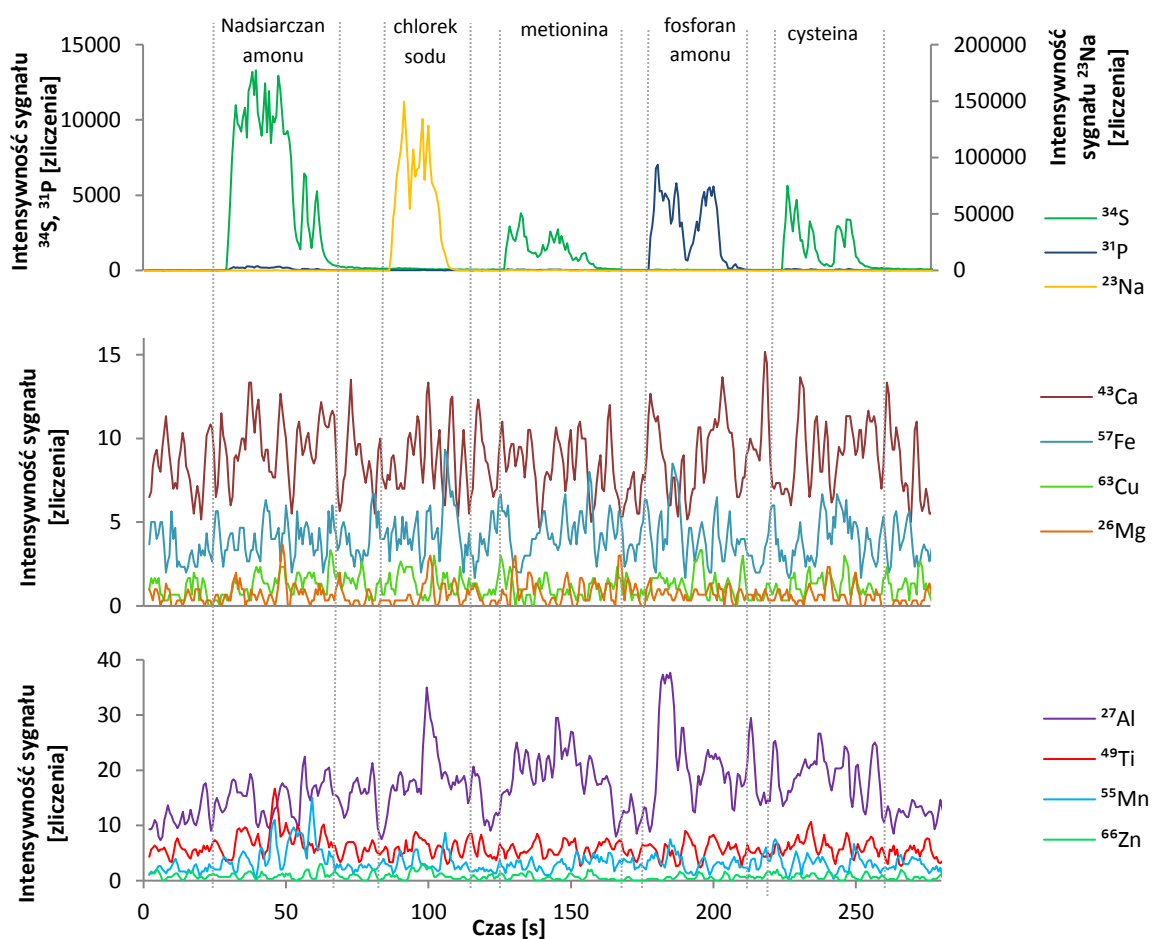
#### 6.1. Wybór izotopu Ti. Interferencje spektralne

Tytan ma pięć trwałych izotopów o liczbach atomowych 46, 47, 48, 49 i 50, gdzie  $^{48}\text{Ti}$  ma najwyższą abudancję równą 73,8%. Jednakże, ze względu na wpływ interferencji izobarycznych pochodzących od jonu  $^{48}\text{Ca}^+$  jon  $^{48}\text{Ti}^+$  nie był monitorowany, gdyż większe ilości Ca w próbce wpływały na wzrost sygnału  $^{48}\text{Ti}$ . Efekt ten został potwierdzony eksperymentalnie poprzez ablację próbek żelatyny o niskiej i wysokiej zawartości Ca a uśrednione wyniki przedstawione są na rysunku 25. Zastosowano odpowiedni dodatek analitów aby osiągnąć następujące zawartości w suchej masie żelatyny: (a) Ca 10 000  $\mu\text{g g}^{-1}$ , (b) Ca 10 000  $\mu\text{g g}^{-1}$  i Ti 50  $\mu\text{g g}^{-1}$  i (c) bez dodatku analitów. Czas zbierania danych w jednym przemiataniu wynosił 10 ms dla  $^{43}\text{Ca}$  i  $^{48}\text{Ti}$  i 50 ms dla  $^{49}\text{Ti}$ . W próbce ślepej (c) intensywności dla wszystkich analitów są na niskim poziomie, jednakże w próbce (a) dodatek samego wapnia spowodował wzrost intensywności sygnału dla  $^{48}\text{Ti}$ , natomiast sygnał  $^{49}\text{Ti}$  pozostał na poziomie próbki ślepej. W dalszych analizach wzorców i próbek monitorowany był wyłącznie izotop  $^{49}\text{Ti}$ .



Rysunek 25 Wpływ zawartości wapnia w próbce na sygnały odpowiadające izotopom  $^{43}\text{Ca}$ ,  $^{48}\text{Ti}$ ,  $^{49}\text{Ti}$ . Uśrednione sygnały w próbce żelatyny (a) z dodatkiem Ca, (b) z dodatkiem Ca i Ti, (c) bez dodatku

Przed przystąpieniem do pomiarów wzorców i tkanek wg. procedury nr 3 sprawdzony został wpływ pierwiastków, mogących mieć udział w powstawaniu interferencji wieloatomowych. Ablacji poddano czyste sole i aminokwasy bogate w C, N, O, Na, P i Cl, tj. nadsiarczan amonu, chlorek sodu, metioninę, fosforan amonu i cysteinę. Stężone roztwory wspomnianych substancji umieszczono na podstawce PET, po odparowaniu wody powstały kryształy, które poddano ablacji, monitorując intensywności izotopów, będących składnikami analizowanych substancji, oraz analitów będących przedmiotem badań:  $^{23}\text{Na}$ ,  $^{26}\text{Mg}$ ,  $^{27}\text{Al}$ ,  $^{31}\text{P}$ ,  $^{34}\text{S}$ ,  $^{43}\text{Ca}$ ,  $^{55}\text{Mn}$ ,  $^{57}\text{Fe}$ ,  $^{63}\text{Cu}$ ,  $^{66}\text{Zn}$ . Czas zbierania danych w jednym przemiataniu ustawiono na 5 ms dla  $^{23}\text{Na}$  i 10 ms dla  $^{31}\text{P}$ .



Rysunek 26 Sygnały zmierzone podczas ablacji nadsiarczanu amonu, chlorku sodu, metioniny, fosforanu amonu i cysteiny w celu wykazania wpływu na powstawanie interferencji wieloatomowych

Wyniki pomiaru, przedstawione na rysunku 26, wskazują, że tylko sygnały  $^{27}\text{Al}$  i  $^{55}\text{Mn}$  zwiększyły się nieznacznie i w sposób nieregularny, co mogło być spowodowane przez zanieczyszczenia analizowanych soli i aminokwasów, natomiast sygnały pozostałych izotopów pozostały na poziomie

linii bazowej. Sugeruje to, że interferencje wieloatomowe o m/z równym analitom będącym przedmiotem badań, występują na poziomie poniżej możliwości wykrycia przez detektor, a przez to nie mają istotnego wpływu na wyniki pomiarów.

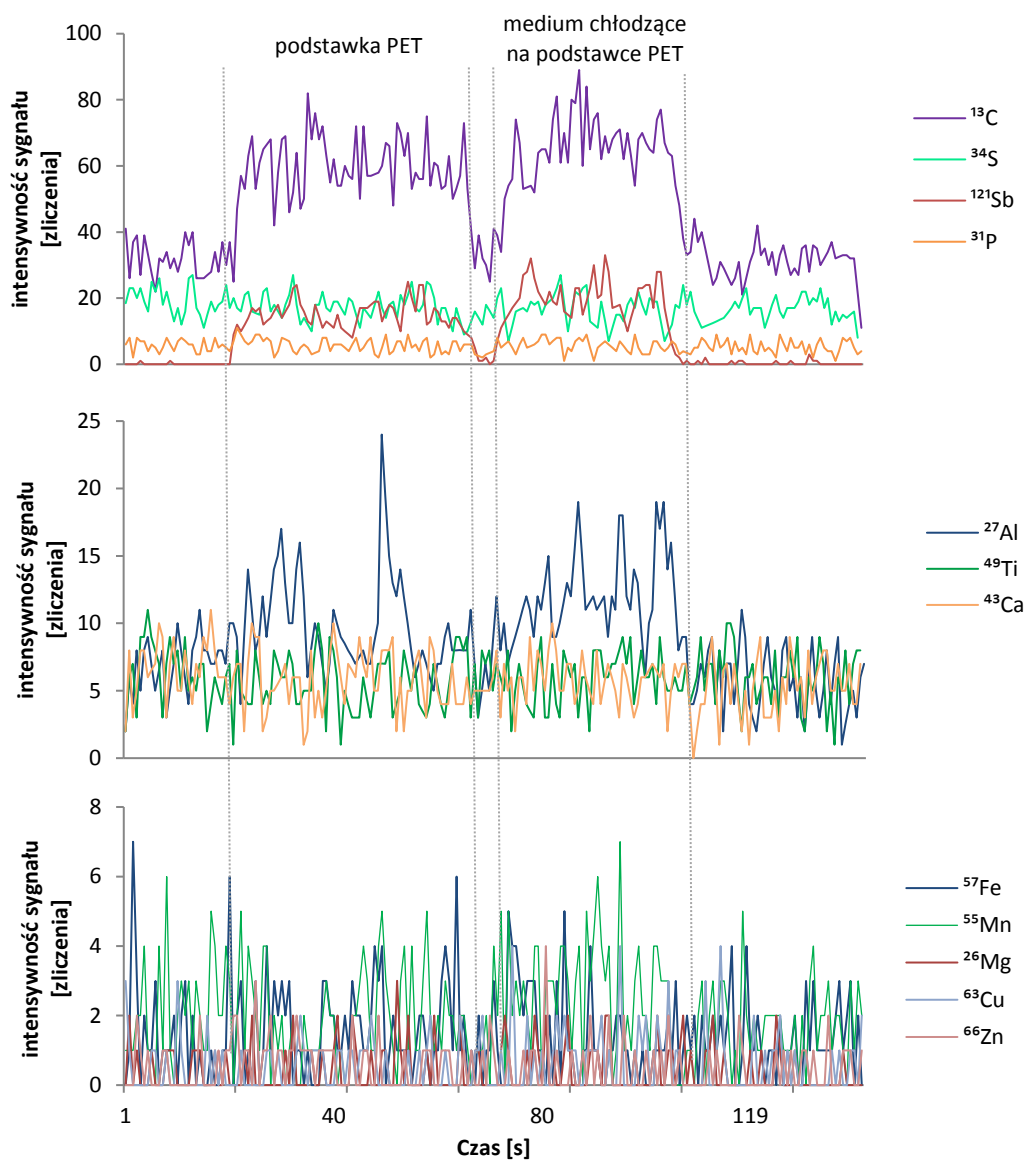
## **6.2. Analiza podstawki z tworzywa sztucznego**

Do każdej z trzech omawianych w niniejszej pracy procedur analitycznych każdorazowo przygotowano serię wzorców stałych i wykonano krzywe kalibracyjne. Wzorce i próbki przygotowane zgodnie z procedurą nr 1 i 2 cechowały się dużą grubością, w zakresie od 0,5 mm do 2 mm, przez co wiązka laserowa oddziaływała wyłącznie z powierzchnią wzorców i próbek, nie przebijając się na wylot i nie powodując ablacji podstawki polimerowej. Jednakże, grubość wzorców i próbek przygotowanych wg. procedury nr 3, a także parametry aparaturowe systemu LA zostały tak dobrane, aby próbki i wzorce w całości zostały przeniesione do aerozolu, przez co ablacji poddana została częściowo również podstawa polimerowa. Medium chłodzące zastosowane do unieruchomienia wzorców i próbek w kriomikrotomie zostało umieszczone na podstawie z tworzywa PET, po uprzednim pocięciu na plastry o grubości 30  $\mu\text{m}$ , i poddane ablacji w celu sprawdzenia poziomu sygnałów analizowanych pierwiastków. Wyniki analizy wskazują, że medium chłodzące nie powoduje zwiększenia sygnałów analitów w porównaniu do sygnałów pochodzących od samej podstawki z tworzywa PET, co przedstawiono na rysunku 27. Podstawki na bazie PET zawierają antymon, dzięki czemu możliwe było monitorowanie izotopu  $^{121}\text{Sb}$  w celu stwierdzenia czy próbka lub wzorzec zostały w całości poddane ablacji. Czas zbierania danych izotopu  $^{121}\text{Sb}$  ustawiono na 5 ms.

## **6.3. Kalibracja (aspekty ilościowe)**

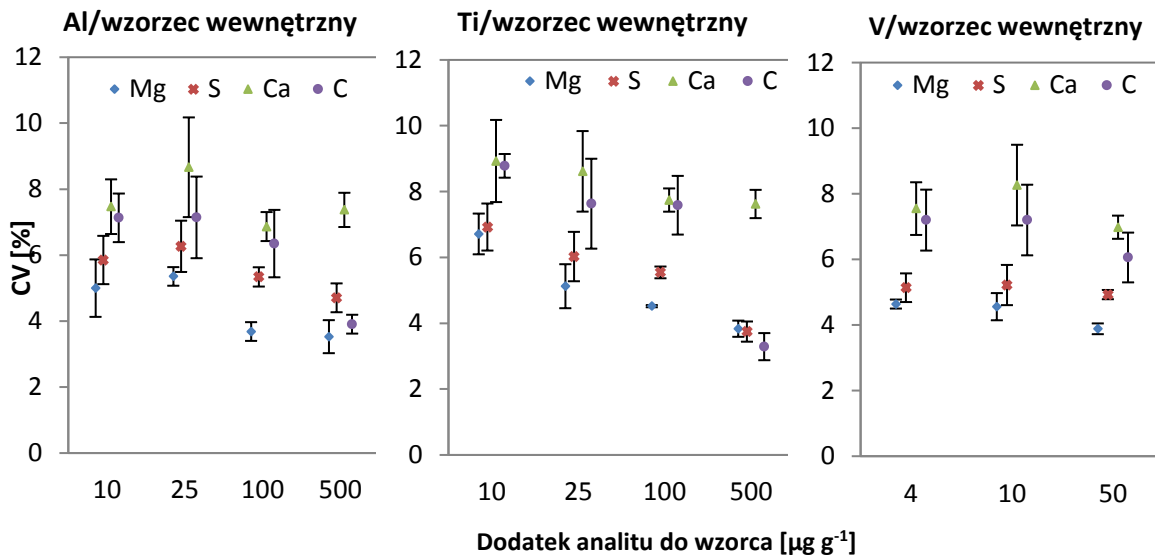
### **6.3.1. Wybór wzorca wewnętrznego**

W celu normalizacji sygnału analitycznego zastosowano wzorzec wewnętrzny. Dlatego, w ramach procedury nr 1 sprawdzono 4 izotopy ( $^{13}\text{C}$ ,  $^{34}\text{S}$ ,  $^{26}\text{Mg}$  i  $^{43}\text{Ca}$ ), mogące potencjalnie spełniać tę funkcję w analizie wzorców i tkanek metodą LA-ICP-MS. W tym celu ablacji poddano tabletki CRMu ERM-BB184 mięśnia wołowego z dodatkiem 10  $\mu\text{L}$  Triton® X-100 na różnych poziomach zawartości analitów: 10, 25, 100, 500  $\mu\text{g g}^{-1}$  dla Ti i Al oraz 4, 10, 50  $\mu\text{g g}^{-1}$  dla V. Wykonano 5 linii ablacyjnych o długości około 5 mm, pomiary wykonano w ciągu trzech kolejnych dni, a uzyskane sygnały dla  $^{49}\text{Ti}$ ,  $^{27}\text{Al}$  i  $^{51}\text{V}$  znormalizowano względem sygnałów potencjalnych wzorców wewnętrznych i obliczono CV.



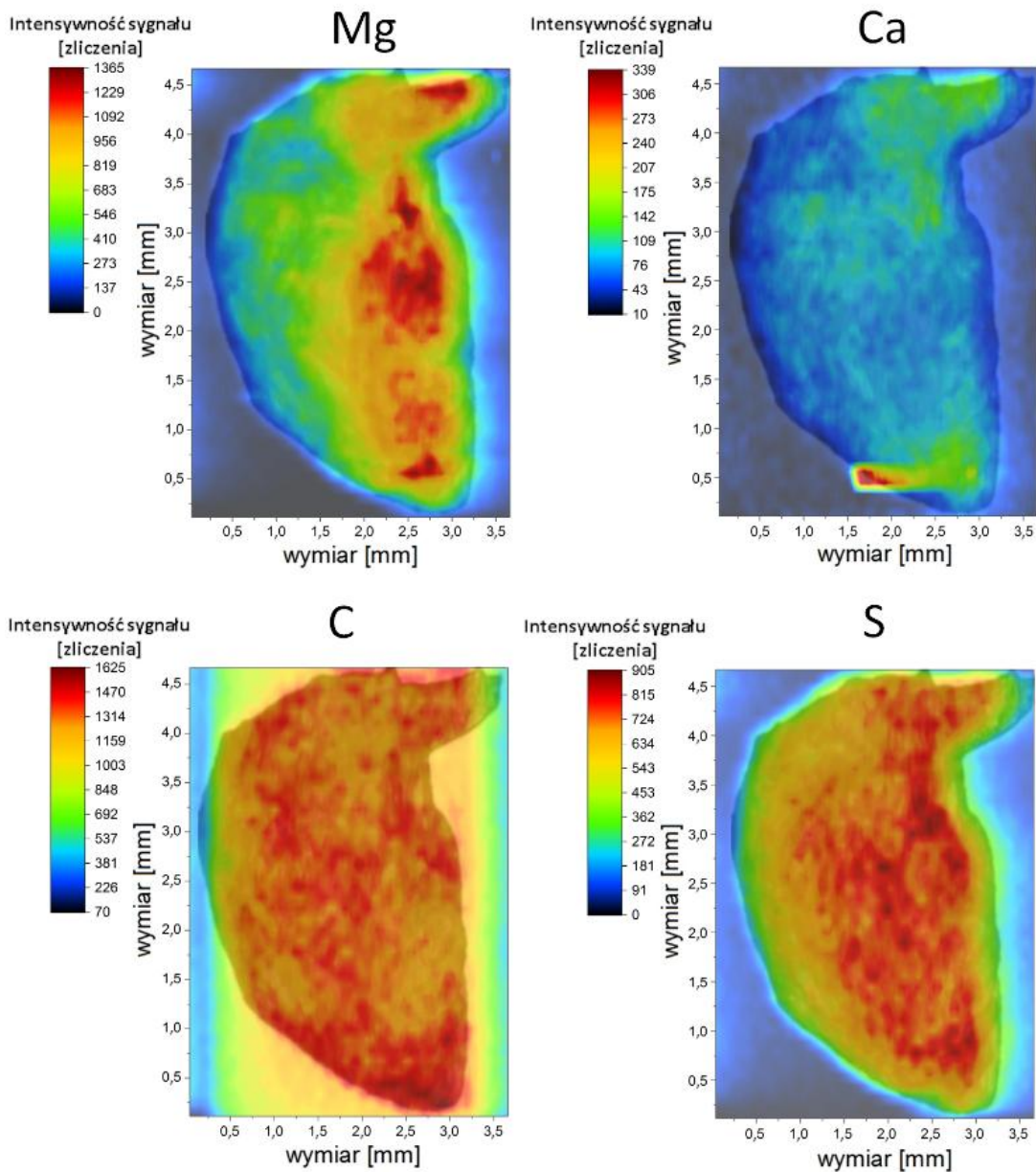
Rysunek 27 Sygnały zmierzone po ablacji czystej podstawki PET i warstwy medium chłodzącego naniesionego na podstawkę PET. Sygnał  $^{121}\text{Sb}$  posłużył jako wskaźnik całkowitej ablacji analizowanej próbki i wzorców.

Uzyskane dane zestawiono w formie wykresu zależności CV znormalizowanych sygnałów od dodatku analitu we wzorcach, które przedstawiono na rysunku 28. Punkty i słupki pionowe oznaczają wartość średnią oraz SD uzyskanych wartości CV dla pojedynczych linii ablacyjnych w ciągu 3 dni na danym poziomie zawartości.



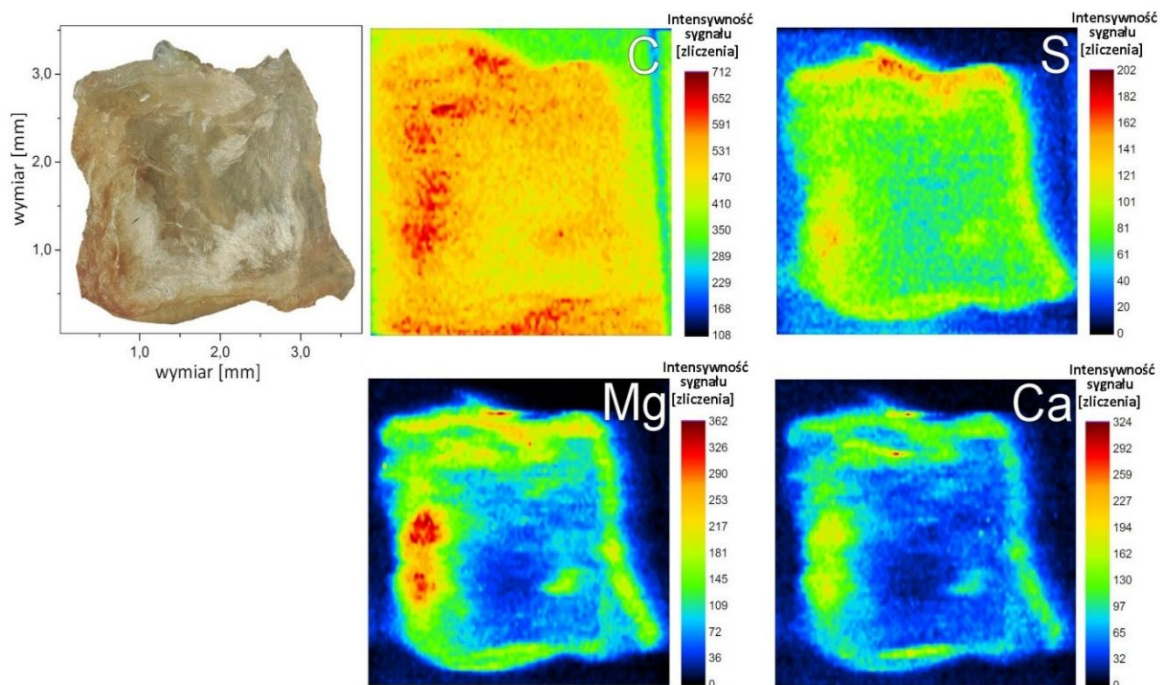
Rysunek 28 Wpływ wzorca wewnętrznego ( $^{26}\text{Mg}$ ,  $^{34}\text{S}$ ,  $^{43}\text{Ca}$  i  $^{13}\text{C}$ ) na precyzję pomiarów sygnału Al, Ti i V we wzorcach stałych na różnych poziomach zawartości analitów

Z rysunku 28 wynika, że izotop  $^{26}\text{Mg}$  ma największy wpływ na obniżenie wartości precyzji znormalizowanych sygnałów analitów, jednakże nie został wybrany jako wzorzec wewnętrzny ponieważ nie był homogenicznie rozmieszczony na powierzchni tkanek. Natomiast izotop  $^{34}\text{S}$  odznaczał się wysoką homogenicznością oraz równie wysokim wpływem na poprawę precyzji sygnałów jak  $^{26}\text{Mg}$ , dlatego został wybrany jako wzorzec wewnętrzny do dalszych analiz w procedurach nr 1, 2 i 3. Na rysunku 29 przedstawiono mapy zawartości pierwiastków budulcowych ( $^{13}\text{C}$  i  $^{34}\text{S}$ ) i fizjologicznych ( $^{26}\text{Mg}$  i  $^{43}\text{Ca}$ ) na powierzchni badanej próbki, zgodnie z procedurą nr 1.



Rysunek 29 Mapy rozmieszczenia  $^{26}\text{Mg}$ ,  $^{43}\text{Ca}$ ,  $^{13}\text{C}$  i  $^{34}\text{S}$ , na powierzchni błony śluzowej jamy ustnej (procedura nr 1)

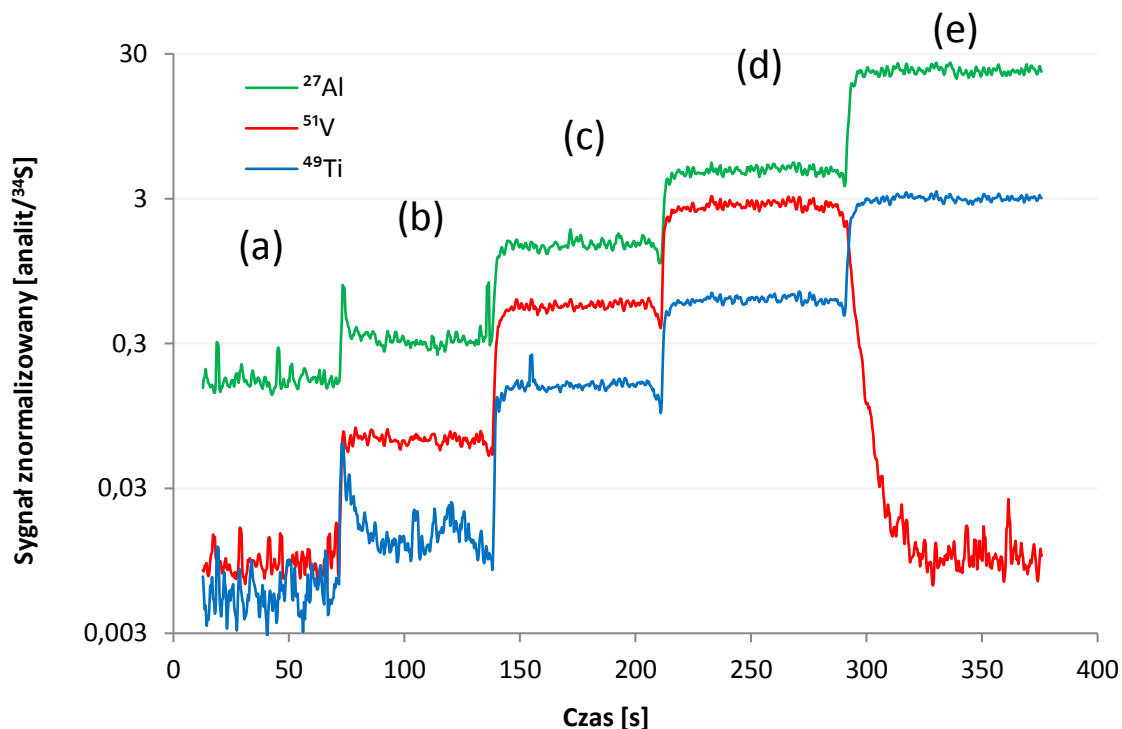
W przypadku procedury nr 2 mapy zawartości  $^{26}\text{Mg}$ ,  $^{34}\text{S}$ ,  $^{43}\text{Ca}$  i  $^{13}\text{C}$  na powierzchni błony śluzowej jamy ustnej przedstawiono na rysunku 30. Pierwiastki budulcowe wykazują bardziej homogeniczne rozmieszczenie niż pierwiastki fizjologiczne, co jest widoczne na przykładowych mapach omawianych pierwiastków na rysunkach 29 i 30.



Rysunek 30 Mapy rozmieszczenia  $^{13}\text{C}$ ,  $^{34}\text{S}$ ,  $^{26}\text{Mg}$  i  $^{43}\text{Ca}$  na powierzchni błony śluzowej jamy ustnej (procedura nr 2)

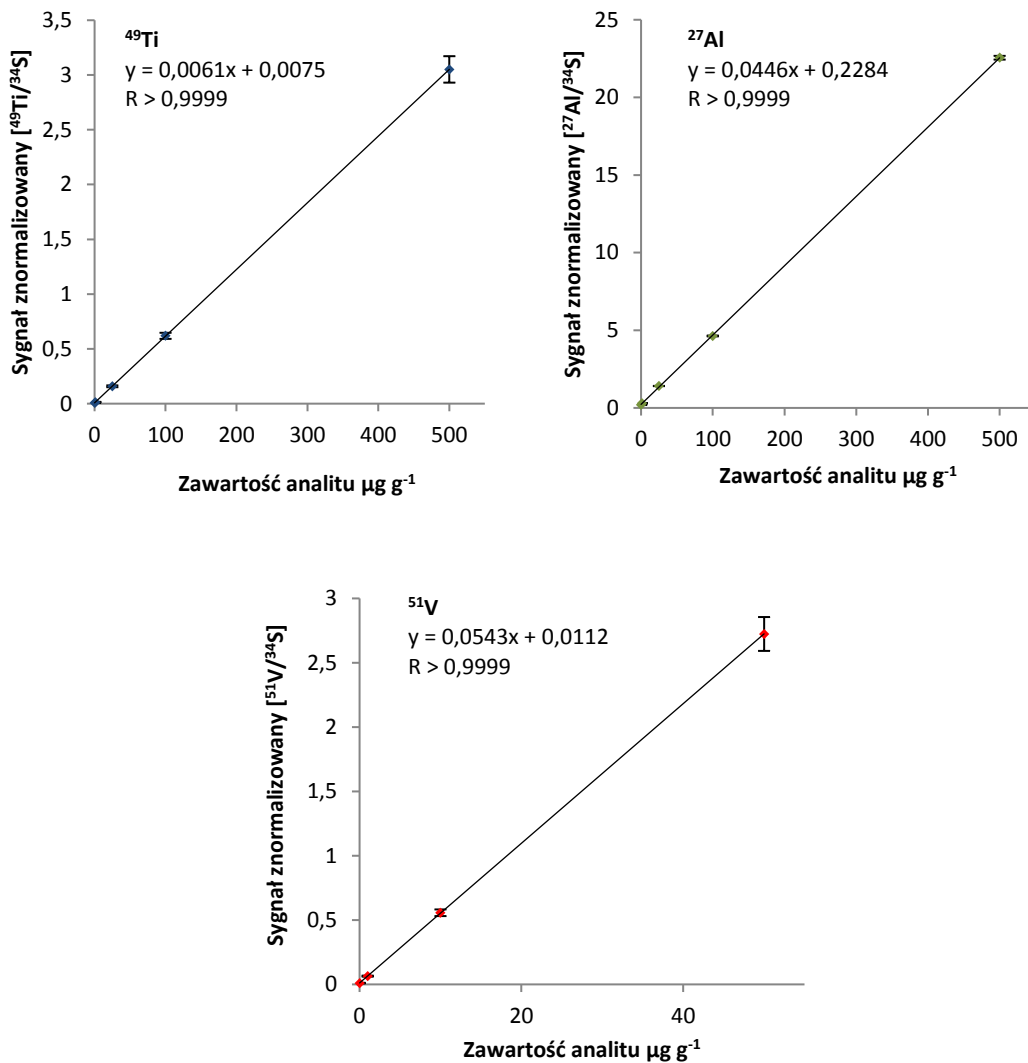
### 6.3.2. Krzywe kalibracyjne

Wzorce stałe, służące do sporządzenia krzywych kalibracyjnych, zostały przygotowane z materiałów o zbliżonym składzie do matrycy błony śluzowej jamy ustnej, składającej się głównie z białek – kolagenu i elastyny [138]. Z tego powodu, w procedurze nr 1 i 2 zastosowano sproszkowane białko jaja kurzego, cechujące się wysoką zawartością białka, w celu sporządzenia serii wzorców stałych z dodatkiem analitów o wzrastających zawartościach. Wzorce zostały poddane ablacji zgodnie z parametrami systemu LA i ICP-MS przedstawionych w tabeli 3 i 4. Pierwsze eksperymenty wykazały, że ablacja sprasowanych materiałów na bazie proszków pod postacią tabletki, np. białka jaja i CRMów, powoduje łatwe kruszenie się wzorców podczas ablacji i odrywanie dużych fragmentów tabletki, pozostawiając bardzo nieregularny krater poablacyjny i charakteryzujący się niską precyzją sygnałów. Dodatek środka powierzchniowo czynnego w procedurze nr 1 i 2, Tritonu® X-100, spowodowało poprawę spójności i twardości wzorców i ograniczyło kruszenie powierzchni wzorców podczas ablacji. W celu wizualizacji sygnałów zmierzonych dla każdego wzorca przeprowadzono ablację wzorców stałych o wzrastających stężeniach, zaczynając od próbki ślepej, co przedstawiono na rysunku 31.



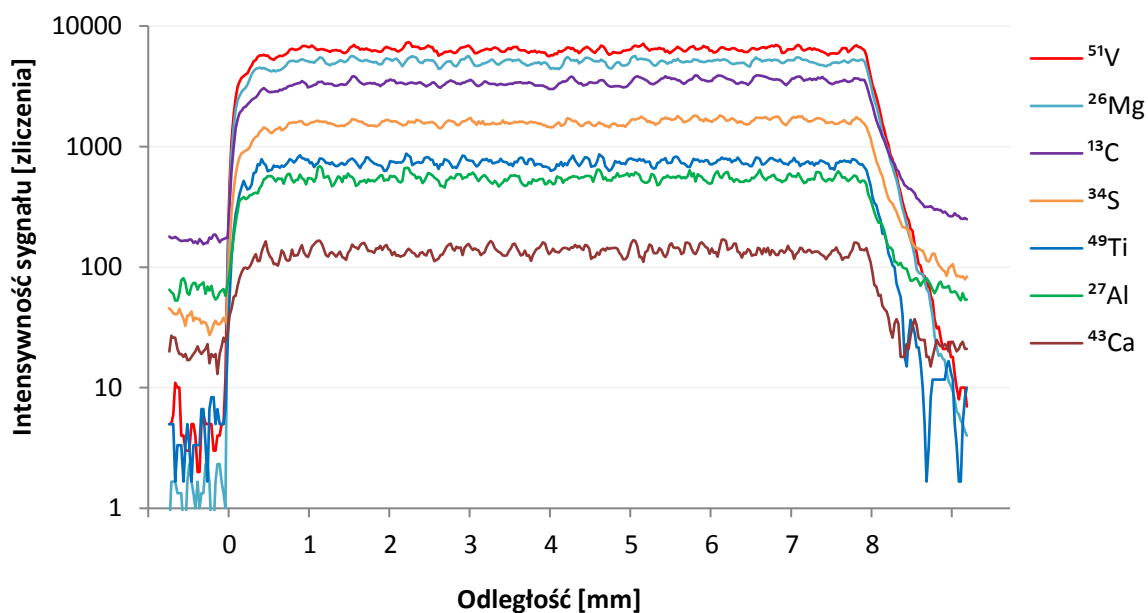
Rysunek 31 Znormalizowane sygnały <sup>49</sup>Ti, <sup>27</sup>Al i <sup>51</sup>V uzyskane po ablacji wzorców stałych ze wzrastającą zawartością analitów, zgodnie z procedurą nr 1: (a) bez dodatku - próbka ślepa, (b) 1  $\mu\text{g g}^{-1}$  Ti, Al i 1  $\mu\text{g g}^{-1}$  V, (c) 25  $\mu\text{g g}^{-1}$  Ti, Al i 10  $\mu\text{g g}^{-1}$  V, (d) 100  $\mu\text{g g}^{-1}$  Ti, Al i 50  $\mu\text{g g}^{-1}$  V i (e) 500  $\mu\text{g g}^{-1}$  Ti, Al

Pomiary powtórzone pięciokrotnie dla każdego wzorca, uśrednione wartości dla wszystkich powtórzeń posłużyły do wykreślenia krzywej kalibracyjnej, które dla procedury nr 1 przedstawione są na rysunku 32. Krzywe kalibracyjne przedstawiają zależność między sygnałem analitu, znormalizowanym przez sygnał wzorca wewnętrznego <sup>34</sup>S, a zawartością analitu danego wzorca stałego po dodatku roztworu analitu. Słupki błędów oznaczają SD pięciu powtórzeń pomiaru wzorca.

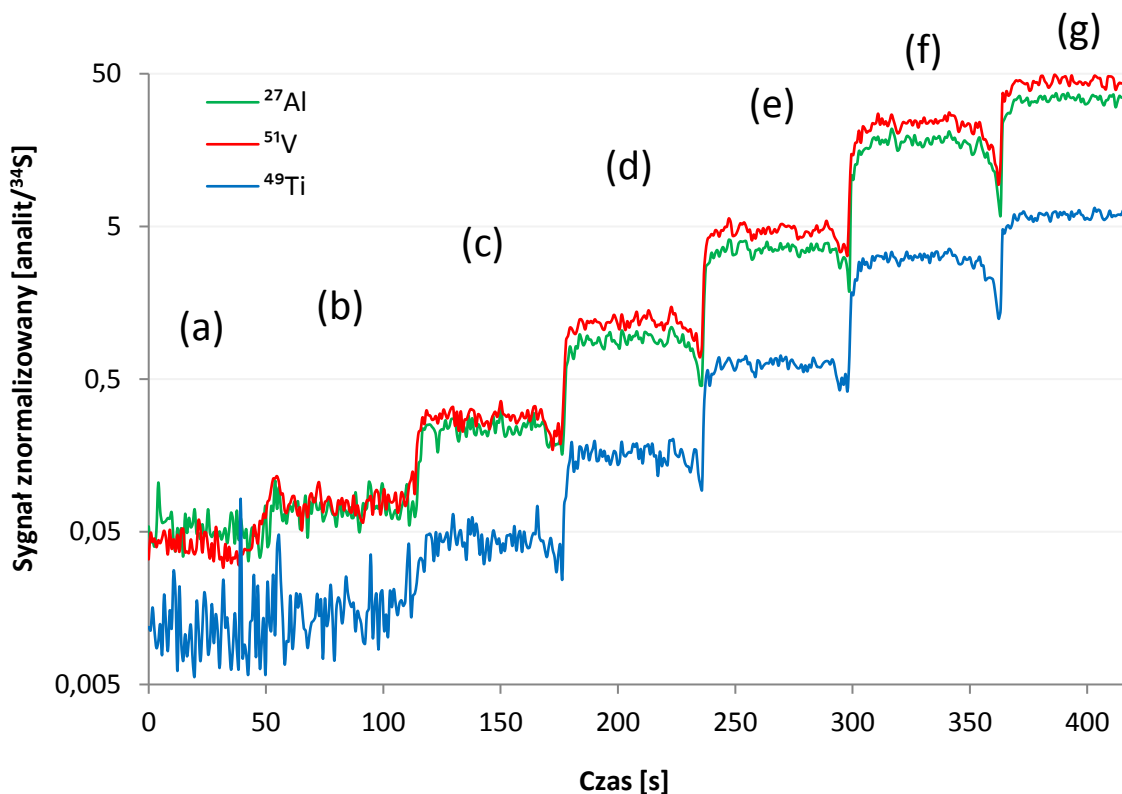


Rysunek 32 Krzywe kalibracyjne dla <sup>49</sup>Ti, <sup>27</sup>Al i <sup>51</sup>V w oparciu o sygnały znormalizowane, zmierzone we wzorcach stałych – procedura nr 1

Homogeniczność wzorców została sprawdzona poprzez wykonanie ablacji wzorca o długości linii ablacyjnej ok. 8 mm. Przykładowe sygnały dla izotopów analizowanych pierwiastków, jak również potencjalnych wzorców wewnętrznych, zarejestrowanych podczas ablacji wzorca o zawartości 100 µg g<sup>-1</sup> Ti, Al i 50 µg g<sup>-1</sup> V zaprezentowano na rysunku 33. Ponadto, homogeniczność wzorców została dodatkowo sprawdzona wykonując ablację trzech linii w różnych miejscach wzorca. Zastosowanie testu statystycznego t-Studenta nie wskazała statystycznie istotnych różnic w sygnałach zmierzonych dla oddalonych od siebie linii ablacyjnych.

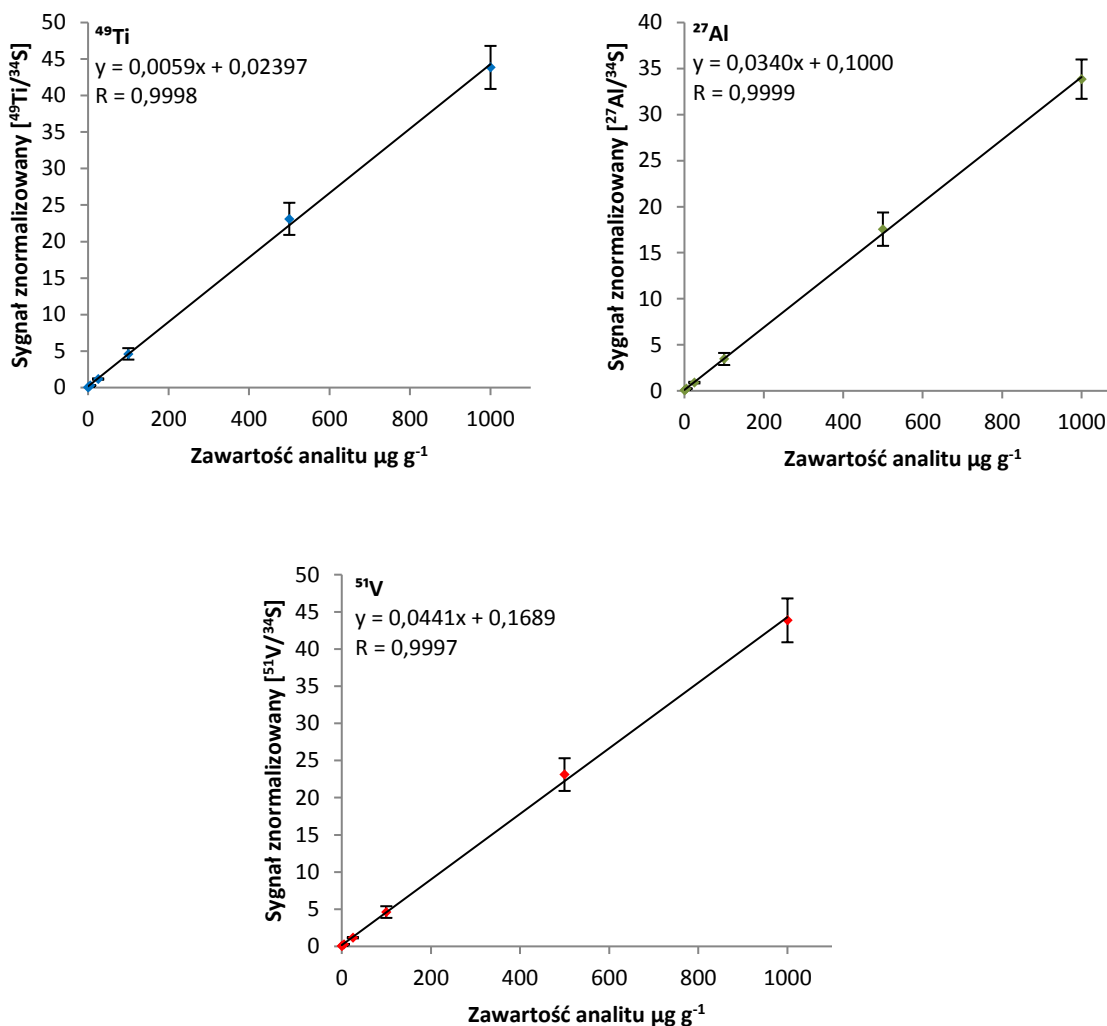


Rysunek 33 Homogeniczność sygnałów wzorca o zawartości  $100 \mu\text{g g}^{-1}$  Ti, Al i  $50 \mu\text{g g}^{-1}$  V



Rysunek 34 Znormalizowane sygnały  $^{49}\text{Ti}$ ,  $^{27}\text{Al}$  i  $^{51}\text{V}$  uzyskane po ablacji wzorców stałych ze wzrastającą zawartością Ti, Al i V, zgodnie z procedurą nr 2: (a) bez dodatku - próbka ślepa, (b)  $1 \mu\text{g g}^{-1}$  (c)  $5 \mu\text{g g}^{-1}$  (d)  $25 \mu\text{g g}^{-1}$  (e)  $100 \mu\text{g g}^{-1}$  (f)  $500 \mu\text{g g}^{-1}$  i (g)  $1000 \mu\text{g g}^{-1}$

Na rysunku 34 przedstawiono wizualizację sygnałów znormalizowanych przez  $^{34}\text{S}$ , zmierzonych dla wzorców stałych o wzrastających zawartościach analitów, zgodnie z procedurą nr 2. Podobnie jak powyżej, w celu wykreślenia krzywych kalibracyjnych w procedurze nr 2 przeprowadzono 5 powtórzeń dla każdego wzorca i obliczono wartości średnie i SD, które przedstawiono na rysunku 35.

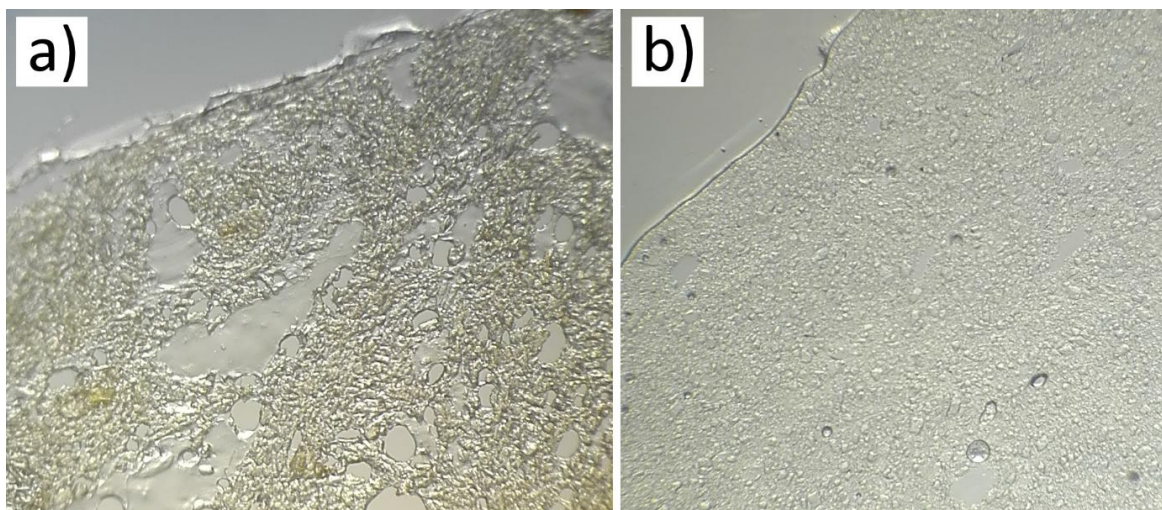


Rysunek 35 Krzywe kalibracyjne dla  $^{49}\text{Ti}$ ,  $^{27}\text{Al}$  i  $^{51}\text{V}$  w oparciu o sygnały znormalizowane, zmierzone we wzorcach stałych – procedura nr 2

Krzywe kalibracyjne sporządzone w oparciu o procedurę nr 1 i 2 odznaczają się bardzo dobrą liniowością,  $R > 0,9997$  dla wszystkich mierzonych pierwiastków oraz niskimi wartościami SD na każdym poziomie zawartości. Homogeniczność sygnałów dla wzorców stałych pod postacią tabletki, sporządzonych w oparciu o procedurę nr 1 i 2 jest względnie dobra, a sygnały są stabilne w czasie ablacji pojedynczej linii na danym wzorcu, co jest widoczne na rysunkach 31 i 34. W celu

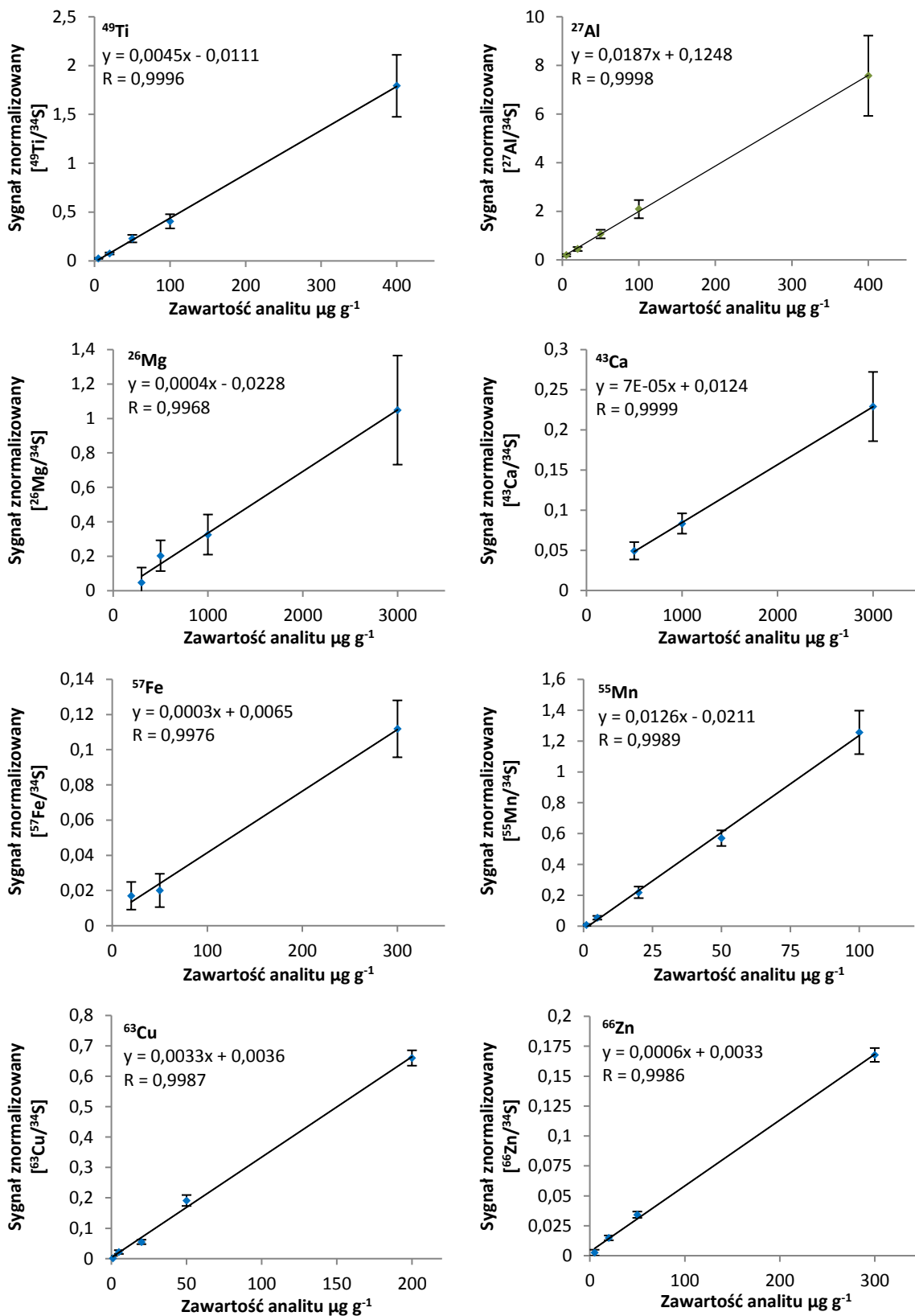
potwierdzenia, że wartość parametru R jest wynikiem istnienia rzeczywistej korelacji zastosowano test istotności stosując statystykę rozkładu t-Studenta. Obliczoną wartość  $t_R$  porównano z wartością krytyczną  $t_{kryt}$  rozkładu Studenta dla poziomu ufności 95%. We wszystkich analizowanych przypadkach korelacja zmiennych była istotna  $t_R > t_{kryt}$ .

Podejście do kalibracji w procedurze nr 3 było zbliżone do procedury nr 1 i 2 pod względem zastosowania materiału matrycowego o matrycy zbliżonej do matrycy próbki badanej, natomiast zasadnicza różnica polegała na przygotowaniu wzorców do analizy. Jako materiał matrycowy zastosowano CRM MODAS-4 CormTis, sproszkowana tkanka kormorana, z dodatkiem roztworu analitów. W celu polepszenia spójności wzorców stałych, do CRMu dodano sproszkowaną żelatynę pełniącą funkcję środka wiążącego i materiału matrycowego ze względu na fakt, że głównymi składnikami żelatyny są białka zwierzęce, kolagen i elastyna. Mięsień kormorana i żelatyna mają podobny skład do błony śluzowej jamy ustnej, co zapewniło podobne zachowanie wzorców i tkanki podczas ablacji. Ponadto, dodanie żelatyny istotnie poprawiło właściwości mechaniczne i zachowanie wzorców podczas przygotowywania cienkich plastrów. Na rysunku 36 przedstawiono fotografie wzorca na bazie CRMu MODAS-4 CormTis bez dodatku i z dodatkiem żelatyny, wykonane pod mikroskopem optycznym.



Rysunek 36 Porównanie wzorców na bazie CRM MODAS-4 CormTis tkanka ciętych na plastry o grubości 30  $\mu\text{m}$ : a) bez dodatku żelatyny i b) z dodatkiem żelatyny, zgodnie z procedurą nr 3

Krzywe kalibracyjne w procedurze nr 3 zostały sporządzone w oparciu o wartości średnie i SD obliczone dla 5 powtórzeń pomiarów każdego wzorca i przedstawione na rysunku 37.



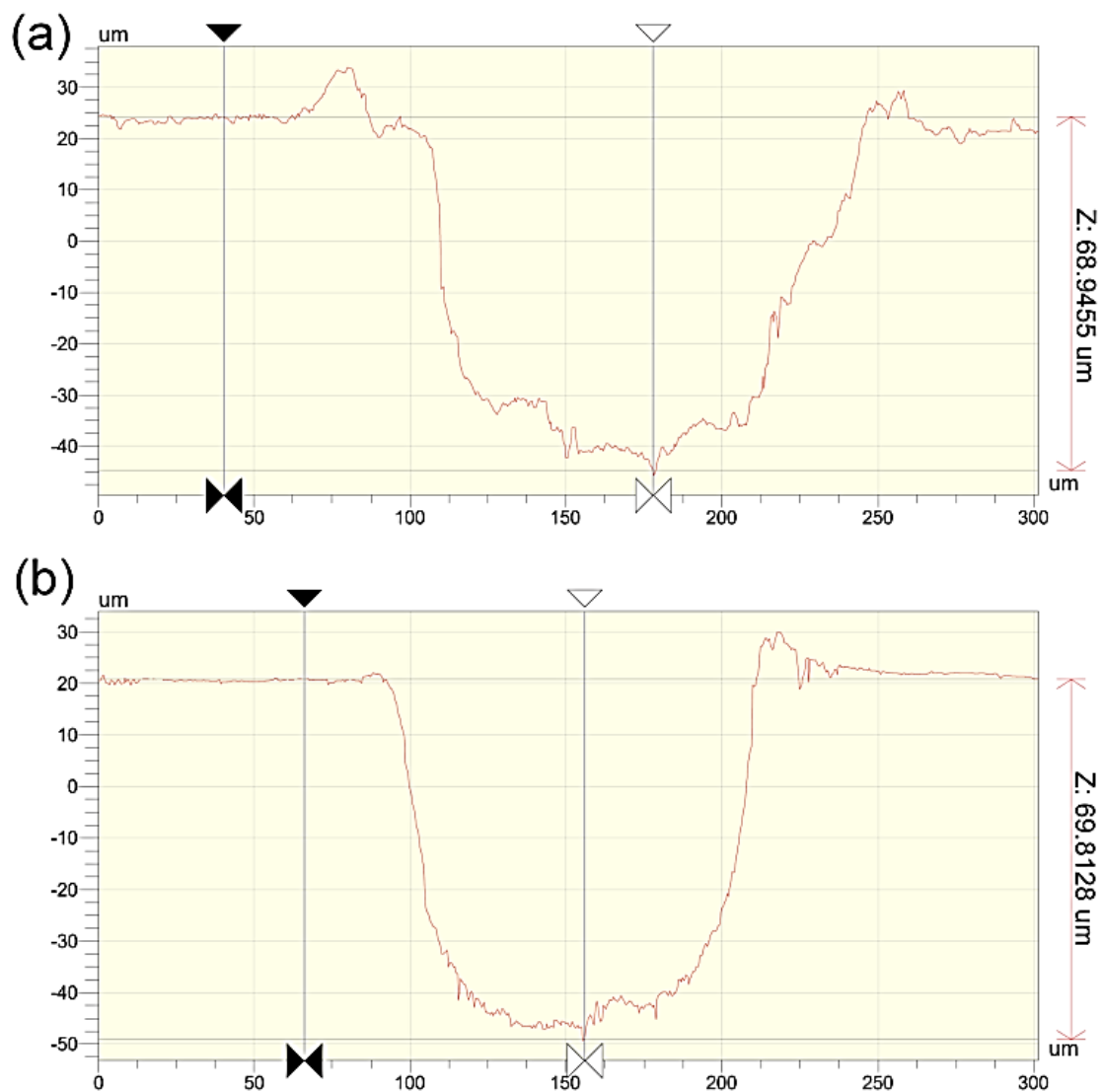
Rysunek 37 Krzywe kalibracyjne dla  $^{49}\text{Ti}$ ,  $^{27}\text{Al}$ ,  $^{26}\text{Mg}$ ,  $^{43}\text{Ca}$ ,  $^{57}\text{Fe}$ ,  $^{55}\text{Mn}$ ,  $^{63}\text{Cu}$  i  $^{66}\text{Zn}$  w oparciu o sygnały znormalizowane, zmierzone we wzorcach stałych – procedura nr 3

#### **6.4. Analiza ścieżek poablacyjnych z użyciem profilometrii optycznej i SEM**

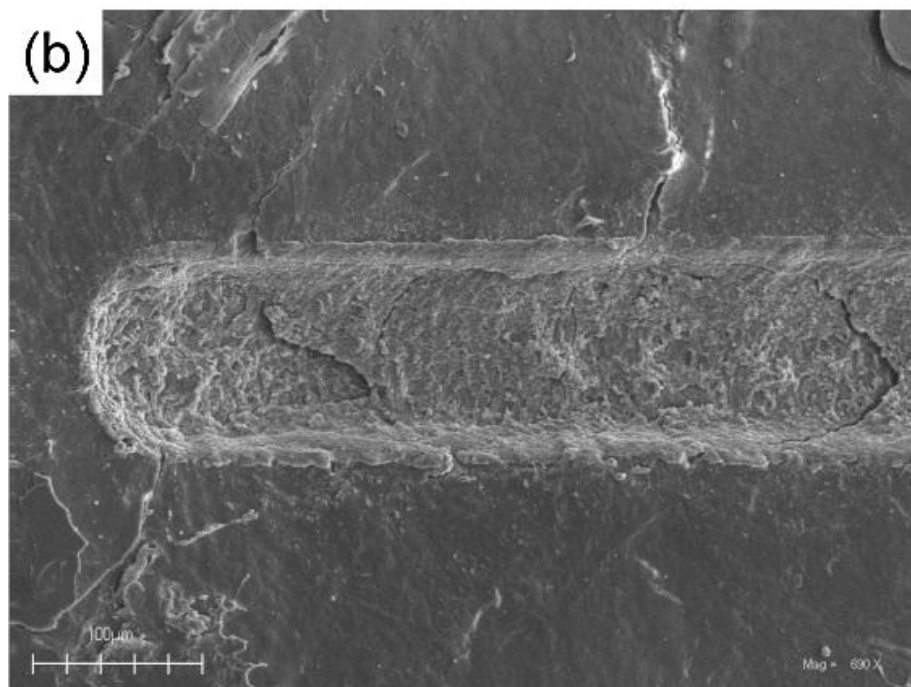
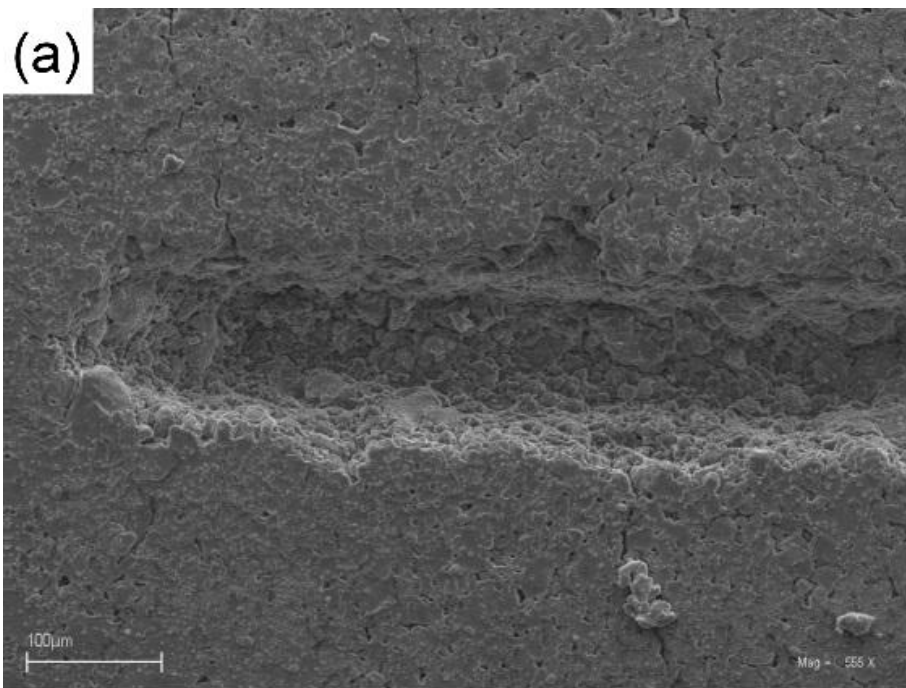
Jednym z warunków uzyskania poprawnych wyników ilościowych jest zachowanie zbliżonych warunków ablacji próbki badanej i wzorców stałych, co jest możliwe stosując wzorce podobne do badanej próbki pod względem struktury i składu. W celu określenia objętości materiału oderwanego z powierzchni poddanej ablacji laserowej można zastosować techniki mikroskopowe i profilometrię [63]. Skaningowy mikroskop elektronowy, SEM (ang. *scanning electron microscope*), umożliwia podgląd powierzchni próbki w wysokiej rozdzielczości oraz wykonuje pomiar szerokości krateru poablacyjnego. Profilometr, działający na zasadzie interferometrii optycznej lub kontaktowy, wykonuje dwuwymiarowy profil lub trzywymiarową mapę względnych różnic wysokości na małej powierzchni z dokładnością do kilku nm w pionie. Techniki te umożliwiają pomiar szerokości i głębokości kraterów i ścieżek poablacyjnych we wzorcach i w próbkach badanych, a także ukazują strukturę powierzchni próbki i dna krateru, co pozwala na ocenę twardości i spójności wykonanych wzorców stałych oraz porównanie kształtu i wymiarów kraterów i ścieżek poablacyjnych w próbce i we wzorcach [139,140]. W przypadku ablacji sprasowanych materiałów proszkowych jako wzorców istnieje ryzyko, że większa objętość materiału wzorca zostanie oderwana niż w przypadku zwartej próbki badanej. Jednakże, nie oznacza to, że większa ilość aerozolu trafiła do plazmy, gdyż materiały proszkowe mają tendencję do kruszenia się i tworzenia większych cząstek stałych, które opadają wokół miejsca ablacji i w przewodach transportujących. W celu zminimalizowania kruszenia wzorców można zastosować środki wiążące takie jak tlenek cynku, 2-metoksy-4-(2-propenylo)fenol i proszek polietylenowy [29,141] lub żelatynę w przypadku CRMów na bazie sproszkowanych tkanek miękkich [64].

Wyniki analizy z użyciem profilometru optycznego i SEM wykazały, że głębokość ścieżek poablacyjnych jest podobna we wzorcach o dopasowanej matrycy i w badanej tkance, co wskazuje, że porównywalne ilości materiału zostały pobrane z powierzchni wzorców i tkanek i przeniesione do aerozolu. Wyniki analizy wzorca i tkanki z użyciem profilometru i SEM, przygotowanych wg. procedury nr 1, przedstawiono odpowiednio na rysunku 38 i 39. W części (a) rysunku 38 przedstawiono wyniki pomiaru w postaci dwuwymiarowego profilu głębokości ścieżek poablacyjnych we wzorcu, natomiast w części (b) wyniki pomiaru głębokości ścieżki w błonie śluzowej, które w obu próbkach wynoszą ok. 70  $\mu\text{m}$ . W części (a) rysunku 39 przedstawiono fotografię SEM powierzchni wzorca, w części (b) błony śluzowej, z widocznymi ścieżkami poablacyjnymi, których szerokość wynosi ok. 100  $\mu\text{m}$ , wg skali załączonej na fotografii. Krawędzie

oraz dno ścieżki poablacyjnej są bardziej regularne w tkance, ze względu na bardziej zwartą strukturę w porównaniu do wzorców na bazie sprasowanego materiału proszkowego.



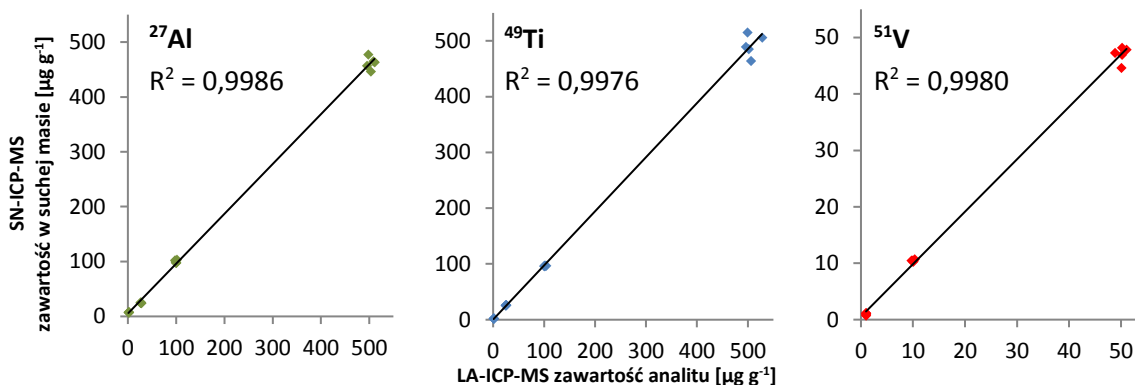
Rysunek 38 Profile ścieżek poablacyjnych, zmierzone profilometrem optycznym: (a) na powierzchni wzorca na bazie jaja kurzego i (b) na powierzchni błony śluzowej jamy ustnej



Rysunek 39 Fotografie SEM ścieżek poablacyjnych: (a) na powierzchni wzorca na bazie jaja kurzego i (b) na powierzchni błony śluzowej jamy ustnej

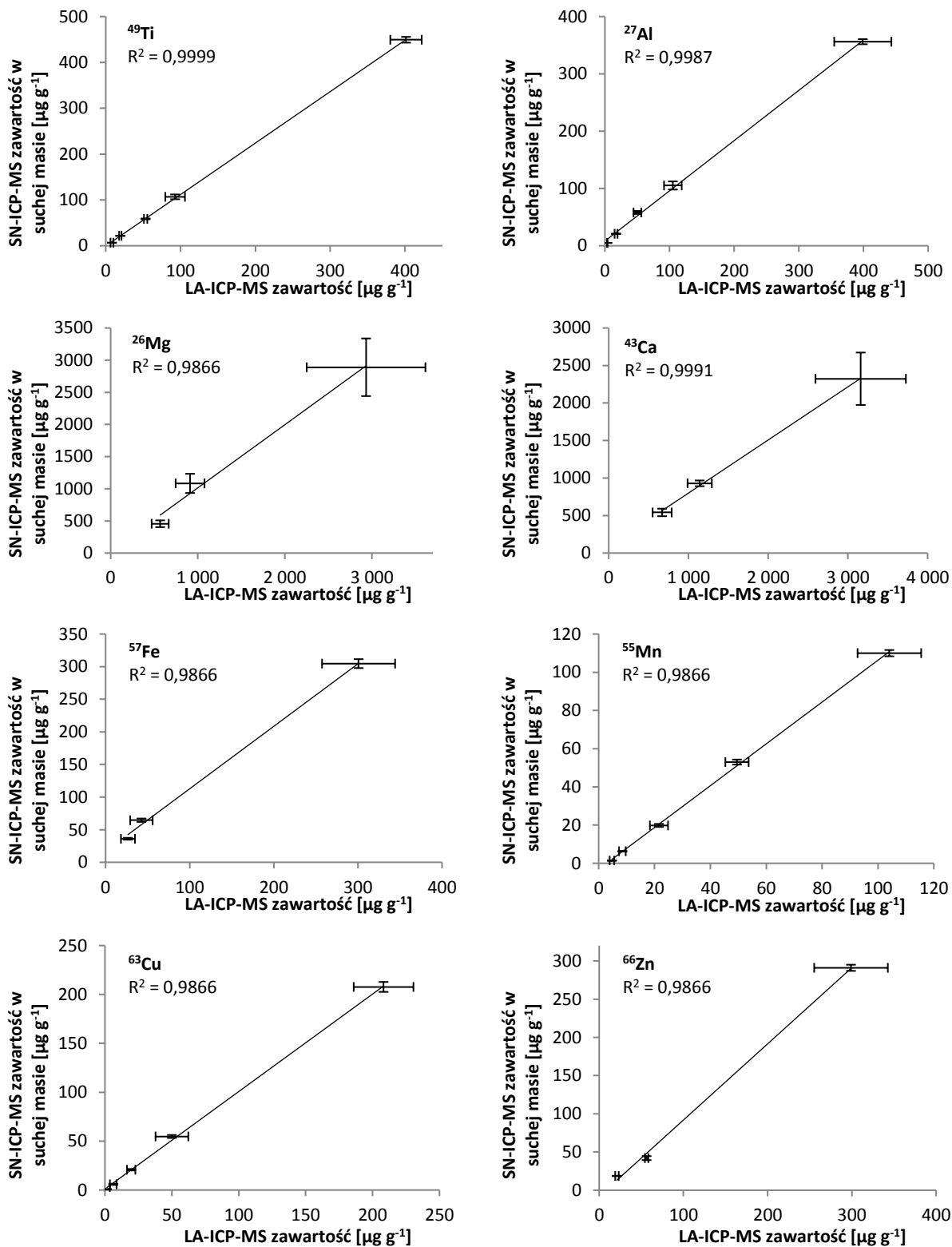
### 6.5. Mineralizacja wzorców

Wzorce stałe, przygotowane według procedury nr 1 i 3 poddano mineralizacji wspomaganą promieniowaniem mikrofalowym. Roztwory uzyskane po mineralizacji poddano analizie metodą referencyjną SN-ICP-MS w celu sprawdzenia zawartości analitów dodanych do materiału matrycowego. Wzorce stałe przygotowane według procedury nr 1 przygotowano w pięciu powtórzeniach, z których każdy został poddany ablacji. Wykonano po 3 linie ablacyjne na jeden wzorzec, uzyskane wartości uśredniono i przedstawiono na osi x na rysunku 40. Te same wzorce stałe, po ablacji poddano mineralizacji zgodnie z opisem w rozdziale 5.3.3, a następnie analizie metodą SN-ICP-MS. Uzyskane wartości stężeń analitów, przeliczono na suchą masę wzorca stałego użytego do mineralizacji i przedstawiono na osi y na rysunku 40. Każdy punkt na wykresie na rysunku 40 przedstawia wynik analizy jednej tabletki wzorca analizowanego dwoma różnymi metodami analitycznymi. Uzyskane dane wykazują dobrą korelację, wyrażoną przez współczynnik determinacji  $R^2 > 0,99$ . Wyniki uzyskane metodami LA-ICP-MS i SN-ICP-MS wskazują na prawidłowe wykonanie wzorców stałych oraz prawidłowo przeprowadzoną kalibrację metody LA-ICP-MS.



Rysunek 40 Porównanie zawartości analitów we wzorcach stałych uzyskanych metodą LA-ICP-MS i metodą referencyjną, SN-ICP-MS, po uprzedniej mineralizacji wzorców – procedura nr 1

Na rysunku 41 przedstawiono wyniki analizy wzorców stałych, przygotowanych zgodnie z procedurą nr 3, metodami LA-ICP-MS i SN-ICP-MS. Procedura mineralizacji i analizy uzyskanych roztworów została opisana w rozdziale 5.3.3 i polegała na przyrządzeniu porcji wzorca stałego i przeznaczaniu jednej części do mineralizacji a drugiej części do cięcia na plastry przy użyciu kriomikrotomu. Roztwory uzyskane po mineralizacji poddano analizie metodą SN-ICP-MS, wykonując 5 powtórzeń pomiaru, a uzyskane wyniki przedstawiono na osi y na rysunku 41.



Rysunek 41 Porównanie zawartości analitów we wzorcach stałych uzyskanych metodą LA-ICP-MS i metodą referencyjną, SN-ICP-MS, po uprzedniej mineralizacji wzorców – procedura nr 3

Plastry po cięciu kriomikrotomem poddano analizie metodą LA-ICP-MS zgodnie z parametrami procedury nr 3, używając do tego celu 5 losowo wybranych plastrów dla każdego wzorca stałego. Wyniki z pięciu pomiarów dla każdego wzorca uśredniono i przedstawiono na osi x na rysunku 41. Pionowe i poziome słupki błędów przedstawiają wartości SD pięciu pomiarów danego wzorca odpowiednio metodą SN-ICP-MS i LA-ICP-MS. Uzyskane dane wykazują dobrą korelację, wyrażoną przez współczynnik  $R^2 > 0,98$  dla wszystkich analizowanych pierwiastków.

### **6.6. Parametry walidacyjne**

Aspekty metrologiczne metody analitycznej oparte są na trzech filarach, które wpływają na jakość wyników pomiaru: (i) walidacja procedury analitycznej, (ii) zapewnienie spójności pomiarowej wyników pomiaru i (iii) oszacowanie niepewności wyników pomiaru. Zastosowanie prawidłowo skalibrowanego instrumentu pomiarowego oraz wdrożenie znormalizowanych procedur nie gwarantuje, że uzyskane wyniki pomiarów są miarodajne. Niezbędne jest przeprowadzenie walidacji procedury analitycznej z uwzględnieniem istotnych parametrów metody analitycznej, w zależności od założonego celu stosowania danej procedury, jak również etapu pobrania i przygotowania próbki [142]. Wg. normy ISO/IEC 17025, walidacja jest potwierdzeniem, przez zbadanie i przedstawienie obiektywnego dowodu, że zostały spełnione szczególne wymagania dotyczące konkretnie zamierzonego zastosowania. Celem walidacji nie jest osiągnięcie jak najlepszych parametrów metody analitycznej, tylko wykazanie faktycznie zmierzonych i wyznaczonych wartości parametrów w celu potwierdzenia, że opracowana i zastosowana metoda analityczna nadaje się do założonego celu – oznaczania analitów w analizowanych próbkach przy użyciu danej procedury i techniki analitycznej. Zaleca się stosować jednostki z układu SI lub inne, które zostały uzgodnione przez zainteresowane strony, ujednoliconą terminologię i skróty oraz uznane procedury i normy.

W przypadku próbek klinicznych udowodnienie kompetencji laboratorium jest szczególnie istotne, gdyż wyniki pomiarów wpływają na decyzje dotyczące badanej osoby podejmowane przez lekarzy, instytucje sanitarno-epidemiologiczne lub instytucje prawne w przypadku zażycia nielegalnych substancji lub w kontroli dopingowej w sporcie. Należy zwrócić uwagę, które parametry metody analitycznej są istotne i wymagają sprawdzenie w szerszym zakresie. Procedura analityczna jest charakteryzowana przez parametry, które podlegają ocenie w procesie walidacji: (i) liniowość, (ii) granica wykrywalności i oznaczalności, (iii) poprawność, (iv) precyzja. Powyższe parametry wyznacza się na podstawie analizy szeregu wzorców, próbki ślepej i CRMów z określoną

liczbą powtórzeń oraz w określonych interwałach czasowych [143,144]. Parametry walidacyjne zostały obliczone dla trzech omawianych procedur analizy tkanek metodą LA-ICP-MS i zestawione w tabeli 5 dla procedury nr 1, w tabeli 6 dla procedury nr 2 i w tabeli 8 dla procedury nr 3. W przypadku procedury nr 3 w osobnych tabelach zestawiono wartości odzysku dodatku analitu do CRMu (tabela 9) i wartości poprawności zmierzonych zawartości analitów względem wartości certyfikowanych dla CRMu (tabela 10). Parametry systemu LA i detektora ICP-MS zostały ustawione zgodnie z daną procedurą, co zostało przedstawione w tabeli 3 i tabeli 4.

Tabela 5 Parametry walidacyjne metody analitycznej – procedura nr 1

Parametr	Al	Ti	V
Zakres krzywej kalibracyjnej ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	1-500	1-500	1-50
Współczynnik korelacji, R	>0,9999	>0,9999	>0,9999
Powtarzalność (%)	4,8	4,6	4,4
Precyzja pośrednia (%)	4,8	4,6	4,5
IDL ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	0,24	0,55	0,10
MDL ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	1,8	1,5	0,82
Odzysk dodatku analitu (%)	115	80	119

Tabela 6 Parametry walidacyjne metody analitycznej – procedura nr 2

Parametr	Al	Ti	V
Zakres krzywej kalibracyjnej ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	5-1000	5-1000	5-1000
Współczynnik korelacji, R	0,9999	0,9998	0,9997
Powtarzalność (%)	8,0	7,3	6,1
Precyzja pośrednia (%)	11,6	8,3	7,9
IDL ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	2,2	1,1	0,8
MDL ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	6,9	8,1	4,6
Odzysk dodatku analitu (%)	124	94	81

Tabela 7 Wartości poprawności dla pierwiastków o zawartości certyfikowanej i informacyjnej w CRMie ERM-BB422 Fish Muscle – procedura nr 1 i 2

Procedura/CRM	Parametr	Mg	Ca	Zn	Cu
ERM-BB422 Fish Muscle	Wartość certyfikowana [ $\mu\text{g g}^{-1}$ ]	1370 <sup>1)</sup>	342 <sup>1)</sup>	16,0±1,1	1,67±0,16
	Wartość zmierzona [ $\mu\text{g g}^{-1}$ ]	1438±89	539±149	19,8±3,1	2,48±0,8
Procedura nr 1	Poprawność [%]	105	158	124	149
	Wartość zmierzona [ $\mu\text{g g}^{-1}$ ]	1233±98	316±48	18,9±3,9	1,74±0,63
Procedura nr 2	Poprawność [%]	90	92	118	104

<sup>1)</sup> wartość informacyjna

Tabela 8 Parametry walidacyjne metody analitycznej – procedura nr 2

Parametr walidacyjny	Dodatek analitu	Ti	Al	Cu	Zn	Fe	Mn	Dodatek analitu	Mg	Ca
Zakres krzywej [µg g <sup>-1</sup> ]		5-400	5-400	1-200	20-300	20-300	1-100		300-3000	500-3000
Równanie krzywej		y=0,004494-0,0111	y=0,01867+0,1248	y=0,00330+0,0036	y=0,00055+0,0033	y=0,000316+0,01673	y=0,01257-0,0211		y=0,000358-0,0228	y=0,0000721+0,0124
SD współczynnika a		0,000061	0,00020	0,000097	0,00015	0,000014	0,00034		0,000020	8,1E-7
SD współczynnika b		0,0129	0,0373	0,0089	0,0022	0,0025	0,0173		0,0324	0,0015
Współczynnik korelacji; R		0,9996	0,9998	0,9987	0,9993	0,9989	0,9989		0,9968	0,9999
IDL [µg g <sup>-1</sup> ]		14	4,1	2,4	18	43	1,8		14	450
MDL [µg g <sup>-1</sup> ]		21	14	6,5	61	98	4,7		419	1174
Precyzja pojedynczej linii ablacyjnej [%]	5 µg g <sup>-1</sup>	30,9	24,7	33,6	2)	2)	27,1	500 µg g <sup>-1</sup>	21,0	27,4
	20 µg g <sup>-1</sup>	27,9	18,4	31,5	41,6	35,1	22,8	1000 µg g <sup>-1</sup>	21,4	23,7
	50 µg g <sup>-1</sup>	21,0	16,7	21,2	30,7	26,3	17,1	3000 µg g <sup>-1</sup>	21,7	22,7
	najwyższy wzorzec <sup>1)</sup>	18,9	21,8	23,9	26,3	25,4	19,0			
Powtarzalność [%]	5 µg g <sup>-1</sup>	17,9	9,2	16,7	14,5	21,9	16,6	500 µg g <sup>-1</sup>	23,4	16,0
	20 µg g <sup>-1</sup>	13,8	11,1	25,1	19,4	18,5	20,4	1000 µg g <sup>-1</sup>	25,2	19,0
	50 µg g <sup>-1</sup>	16,9	24,5	21,2	13,0	18,2	18,2	3000 µg g <sup>-1</sup>	16,1	12,3
	najwyższy wzorzec <sup>1)</sup>	17,7	18,9	17,6	14,0	14,7	17,7			
Precyzja pośrednia [%]	5 µg g <sup>-1</sup>	14,4	20,1	17,1	14,2	16,9	13,3	500 µg g <sup>-1</sup>	23,2	15,7
	20 µg g <sup>-1</sup>	12,3	19,2	9,6	9,4	10,7	14,7	1000 µg g <sup>-1</sup>	20,8	11,2
	50 µg g <sup>-1</sup>	11,7	13,1	11,0	11,4	10,8	11,1	3000 µg g <sup>-1</sup>	17,5	12,3
	najwyższy wzorzec <sup>1)</sup>	8,7	7,3	9,1	10,2	8,6	8,2			

<sup>1)</sup> Ti, Al (400 µg g<sup>-1</sup>), Cu (200 µg g<sup>-1</sup>), Zn, Fe (300 µg g<sup>-1</sup>), Mn (100 µg g<sup>-1</sup>)

<sup>2)</sup> zbyt mały dodatek wzorca

Tabela 9 Wartości odzysku dodatku analitu do wzorców dopasowanych matrycowo na bazie CRMu ERM-BB184 Bovine Muscle. Wzorce zostały przygotowane według procedury nr 3.

Parametr	Dodatek analitu	Ti	Al	Cu	Zn	Fe	Mn	Dodatek analitu	Mg	Ca
Zawartość [ $\mu\text{g g}^{-1}$ ]	5 $\mu\text{g g}^{-1}$	2)	7,2	7,7	2)	2)	4,5	500 $\mu\text{g g}^{-1}$	586	641
Odzysk [%]		2)	144	153	2)	2)	91		117	128
Zawartość [ $\mu\text{g g}^{-1}$ ]	20 $\mu\text{g g}^{-1}$	18,5	18,8	19,4	27,8	2) 37,3	18,3	1000 $\mu\text{g g}^{-1}$	939	1082
Odzysk [%]		93	94	97	139	2) 187	91		94	108
Zawartość [ $\mu\text{g g}^{-1}$ ]	50 $\mu\text{g g}^{-1}$	50,6	50,2	67,3	42,2	53	41,3	3000 $\mu\text{g g}^{-1}$	3020	2973
Odzysk [%]		101	101	135	84	107	83		101	99
Zawartość [ $\mu\text{g g}^{-1}$ ]	najwyższy	413	391	232	298	292	102			
Odzysk [%]	wzorzec <sup>1)</sup>	103	98	116	99	97	102			

<sup>1)</sup> Ti, Al (400  $\mu\text{g g}^{-1}$ ), Cu (200  $\mu\text{g g}^{-1}$ ), Zn, Fe (300  $\mu\text{g g}^{-1}$ ), Mn (100  $\mu\text{g g}^{-1}$ )

<sup>2)</sup> zbyt mały dodatek wzorca

Tabela 10 Wartości poprawności dla pierwiastków o zawartości certyfikowanej i informacyjnej w CRMie ERM-BB184 Bovine Muscle – procedura nr 3

CRM	Parametr	Mg	Ca	Fe	Zn	Cu
ERM-BB184 Bovine Muscle	Wartość certyfikowana [ $\mu\text{g g}^{-1}$ ]	1000 <sup>1)</sup>	155 <sup>1)</sup>	75±4	146±7	2,31±0,09
	Wartość zmierzona [ $\mu\text{g g}^{-1}$ ]	875±115	168±51	83±26	192±47	3,29±0,41
	Poprawność [%]	87,5	108,5	110,0	131,8	142,3

<sup>1)</sup> wartość informacyjna

### 6.6.1. Liniowość

Liniowość jest wyznaczana statystycznie na podstawie analizy wzorców użytych do kalibracji i wyrażana jako współczynnik korelacji R. Zakłada się, że krzywa kalibracyjna jest liniowa gdy  $R > 0,999$  [144]. Ponadto, z równania regresji krzywej kalibracyjnej odczytuje się wartość współczynnika kierunkowego i przecięcia z osią y wraz z ich odchyleniami standardowymi, na podstawie których określa się ich istotność, przy użyciu odpowiednich testów statystycznych (np. test t-studenta) [144]. Dla trzech omawianych procedur liniowość krzywej kalibracyjnej została obliczona na podstawie znormalizowanych intensywności sygnałów wykonanych w pięciu powtórzeniach dla każdego wzorca i wyrażona jako współczynnik korelacji R. Wartości współczynników korelacji dla procedury nr 1, 2 i 3 przedstawiono odpowiednio w tabeli 5, 6 i 8. Najlepszą liniowością charakteryzowała się procedura nr 1 gdzie wartości parametru R były większe od 0,9999. Równie dobre wartości

stwierdzono dla procedury nr 2, gdzie wartości parametru R mieściły się w zakresie 0,9997-0,9999. Liniowość krzywych kalibracyjnych w procedurze nr 3 była nieco gorsza, ale akceptowalna, i mieściła się w zakresie 0,9968-0,9999 dla wszystkich analizowanych pierwiastków.

#### 6.6.2. Granica wykrywalności

Granica wykrywalności LOD (ang. *limit of detection*) określa najniższe stężenie/zawartość analitu, która da sygnał analityczny dający się odróżnić od sygnału próbki ślepej lub linii bazowej z założonym prawdopodobieństwem. Parametr ten określa najniższą ilość analitu, którą można wykryć przy użyciu danej metody analitycznej. Najczęściej stosowaną metodą wyznaczania LOD jest trzykrotność odchylenia standardowego zmierzonego dla próbki ślepej i jest uproszczeniem metody opracowanej przez Międzynarodową Unię Chemii Czystej i Stosowanej, IUPAC (ang. *International Union of Pure and Applied Chemistry*) z uwzględnieniem teorii testowania hipotez Neymana-Pearsona [145].

We wszystkich omawianych procedurach parametr LOD został dodatkowo podzielony w zależności od zastosowanej metody oszacowania: instrumentalna granica wykrywalności, IDL (ang. *instrumental detection limit*) i granica wykrywalności metody analitycznej, MDL (ang. *method detection limit*). Wartości IDL obliczono jako 3-krotność SD sygnału tła, zmierzonego w pięciu powtórzeniach w czasie ok. 60 s przy wyłączonej wiązce laserowej. Wartości MDL zostały obliczone jako suma uśrednionej wartości sygnału dla próbki ślepej oraz wartości SD sygnału, zmierzonych dla pięciu powtórzeń próbki ślepej. Wartości IDL są oparte wyłącznie na sygnale tła generowanego przez argon przepływający przez komorę ablacyjną do plazmy, podczas gdy parametr MDL uwzględnia wpływ matrycy i potencjalnych interferencji wywołanych jej składnikami. Wpływ składników matrycy skutkuje wyższymi wartościami MDL niż IDL w danej procedurze pomiarowej. Jednakże, ponieważ powyższe parametry oparte są na sygnałach rzeczywiście pochodzących od analitu zawartego naturalnie w materiale matrycowym i generowanym przez potencjalne interferencje, dostarczają bardziej miarodajnych informacji na temat możliwości wykrywania analitów przez walidowaną metodę analityczną. Obliczone wartości IDL i MDL są najniższe w procedurze nr 1 a największe w procedurze nr 2. Wynika to z faktu, że średnica wiązki lasera była największa w procedurze nr 1, mniejsza w procedurze nr 2 i najmniejsza w procedurze nr 3, częstotliwość impulsów lasera wynosiła zawsze 10 Hz. Następstwem zmniejszania średnicy wiązki jest ablacja coraz mniejszej ilości materiału z powierzchni próbki, przez co mniej aerozolu trafia do plazmy i do detektora, generując słabsze sygnały o gorszej precyzji, co przekłada się na większe granice

wykrywalności w danej procedurze. Ponadto, w procedurze nr 3 wzorce i próbki miały postać cienkich plastrów, przez co mniej materiału trafiało do detektora, w porównaniu do pozostałych procedur. Obliczone wartości IDL i MDL przedstawiono w tabeli 5 (procedura nr 1), tabeli 6 (procedura nr 2) i tabeli 8 (procedura nr 3).

### 6.6.3. *Poprawność*

Poprawność metody analitycznej oznacza zgodność wartości średniej otrzymanej z serii pomiarów z wartością ustaloną lub spodziewaną przypisaną do analizowanej próbki i interpretowana jest jako wartość błędu systematycznego metody. Do wyznaczenia dokładności stosuje się materiały odniesienia, w tym CRMy, ze znaną wartością stężenia/zawartości analitu. W przypadku braku materiałów odniesienia lub w celu rozszerzenia zakresu certyfikowanego analizowanego materiału stosuje się dodatek wzorca i wyznacza się wartość odzysku dodatku analitu. Ponadto, do badania poprawności metody można zastosować inną metodę analityczną, zwaną metodą odniesienia. W przypadku metody LA-ICP-MS często stosuje się metodę SN-ICP-MS z wcześniejszą mineralizacją próbki lub wzorców stałych. O ile dobre wartości odzysku (bliskie 100%) nie gwarantują braku błędów systematycznych i wysokiej poprawności metody analitycznej, to zbyt odstające wartości odzysku z pewnością wskazują na występowanie błędów systematycznych i konieczność sprawdzenia procedury analitycznej [146].

W celu sprawdzenia poprawności procedury nr 1 i 3 zastosowano metodę odniesienia, polegającą na mineralizacji przygotowanych wzorców i analizie uzyskanych roztworów metodą SN-ICP-MS. Wyniki doświadczenia z mineralizacją wzorców zostały szczegółowo opisane w rozdziale 6.5. Uzyskano dobrą korelację wartości uzyskanych po analizie tych samych wzorców stałych dwiema różnymi metodami analitycznymi. Ponadto, poprawność sprawdzono również poddając ablacji sprasowane tabletki przygotowane z CRMu z dodatkiem analitu, obliczając odzysk dodatku analitu. Ze względu na brak CRMów z certyfikowaną lub informacyjną zawartością Ti, Al lub V w materiałach na bazie tkanek miękkich i na poziomach zawartości możliwych do wykrycia opracowaną procedurą, oznaczono inne pierwiastki, których zawartość została przedstawiona w certyfikacie CRMu. Do tego celu wybrano pierwiastki fizjologiczne o masach zbliżonych do mas Ti, Al i V, obecne w CRMie na wystarczająco wysokim poziomie, aby możliwe było ich oznaczenie metodą LA-ICP-MS: Mg, Ca, Cu, Zn (procedura nr 1 i 2) oraz Mg, Ca, Fe, Mn, Cu, Zn (procedura nr 3). Ponadto, w przypadku procedury nr 1 i 2 wyznaczono wartości odzysku dodatku analitów do materiału matrycowego na poziomie: 25  $\mu\text{g g}^{-1}$  Ti, Al i 10  $\mu\text{g g}^{-1}$  V (procedura nr 1), 25  $\mu\text{g g}^{-1}$  Ti, Al i V (procedura nr 2). Wartości odzysku

dotatku analitów w procedurze nr 1 i 2 przedstawiono odpowiednio w tabeli 5 i 6. W procedurze nr 3 wyznaczono parametry odzysku dodatku analitu na kilku poziomach zawartości, co zostało przedstawione w tabeli 9. W procedurze nr 1 i 2 jako materiał matrycowy wzorca służącego do oszacowania poprawności i odzysku zastosowano CRM ERM-BB422 Fish Muscle, natomiast w procedurze nr 3 zastosowano CRM ERM-BB184 Bovine Muscle. Posłużono się krzywymi kalibracyjnymi wykreślonymi przy użyciu innego CRMu o matrycy zbliżonej do matrycy analizowanego wzorca: ERM-BB184 Bovine Muscle (procedura nr 1 i 2) i MODAS-4 CormTis (procedura nr 3). Zmierzone wartości poprawności względem wartości certyfikowanej lub informacyjnej zestawiono w tabeli 7 (procedura nr 1 i 2) i w tabeli 10 (procedura nr 3). Dla większości analitów obliczone wartości poprawności i odzysku mieszczą się w zakresie 80%-120%.

#### 6.6.4. Precyzja

Precyzja wyników pomiaru oznacza rozrzut zmierzonych wartości wokół wartości średniej i wyrażana jest jako odchylenie standardowe, SD (ang. *standard deviation*), względne odchylenie standardowe, RSD (ang. *relative standard deviation*) lub CV. Wartości precyzji wyrażają w sposób matematyczny błędy przypadkowe pomiaru przy użyciu danej metody. W zależności od interwału czasowego między pomiarami, precyzję wyraża się jako: (i) powtarzalność (ii) precyzję pośrednią i (iii) odtwarzalność [144]. Wyznaczanie poprawności metody powinno być przeprowadzane dla próbek na różnych poziomach stężeń/zawartości. Do wyznaczania precyzji powinno się użyć próbki typowej, która ma być oznaczana daną metodą, zawierającą analit na podobnym poziomie stężeń oraz podobną matrycę.

W celu wyznaczenia powtarzalności metody zastosowano wzorec służący do kalibracji w danej procedurze. Wykonano pięciokrotnie linię ablacyjną o długości ok. 5 mm na każdym wzorcu i obliczono wartości średnie i SD, a następnie wartość CV dla 5 powtórzeń w krótkim odstępie czasu; pomiary wykonano w ciągu ok. 10 minut. W procedurze nr 1 i 2 zastosowano wzorec na bazie sprasowanego białka jaja kurzego o zawartości odpowiednio 25  $\mu\text{g g}^{-1}$  Ti, Al, 10  $\mu\text{g g}^{-1}$  V (tabela 5) oraz 100  $\mu\text{g g}^{-1}$  Ti, Al, 50  $\mu\text{g g}^{-1}$  V (tabela 6). W procedurze nr 3 zastosowano wzorec w postaci cienkiego plastra na bazie CRMu tkanki kormorana na różnych poziomach zawartości (tabela 8). Pomiary tego samego wzorca powtarzano przez kolejne trzy dni, obliczono wartości średnie i CV, które przedstawiono jako precyzję pośrednią w tabelach 5, 6 i 8, odpowiednio dla procedury nr 1, 2 i 3. Precyzja pośrednia wyraża w sposób matematyczny rozrzut zmierzonych sygnałów w dłuższym okresie czasu. Ponadto, w ramach walidacji procedury nr 3 obliczono precyzję pojedynczej linii

ablacyjnej, poprzez obliczenie wartości średniej, SD i CV danych z punktów pomiarowych zebranych podczas ok. 60 s ablacji wzorców na różnym poziomie zawartości analitów (tabela 8). Dane na początku i na końcu ablacji, wygenerowane podczas nasycania i wymywania komory ablacyjnej zostały pominięte.

## **6.7. Właściwości wyniku pomiaru**

### **6.7.1. Spójność pomiarowa w badaniu próbek klinicznych metodą LA-ICP-MS**

Aby wyniki pomiarów chemicznych były miarodajne i porównywalne ze sobą, bez względu na zastosowaną metodę analityczną czy miejsce przeprowadzenia pomiaru, należy zapewnić spójność pomiarową wyniku z jednostkami SI oraz z odpowiednim wzorcem i materiałem odniesienia. Międzynarodowy Słownik Terminów Metrologicznych, VIM (fr. *Vocabulaire international de Métrologie*) definiuje spójność pomiarową jako właściwość wyniku pomiaru lub wzorca jednostki miary polegająca na tym, że można je powiązać z określonymi odniesieniami, na ogół z wzorcami państwowymi lub międzynarodowymi jednostkami miar, za pośrednictwem nieprzerwanego łańcucha porównań, z których wszystkie mają określone niepewności [143,147]. W praktyce, spójność pomiarowa wyniku jest zachowana poprzez zwalidowanie procedury analitycznej przy użyciu CRMu i uwzględnienie wartości niepewności wartości certyfikowanej, jak również wszystkich parametrów wpływających na ostateczny wynik, do całkowitego budżetu niepewności. W przypadku, gdy nie można odnieść się bezpośrednio do jednostek układu SI, stosuje się ustaloną i powszechnie akceptowaną przez wszystkie zainteresowane strony skalę, np. skala pH lub liczba oktanowa, oraz uznane na świecie materiały odniesienia, zgodnie z zaleceniami Komitetu Liczności Materii, CCQM (fr. *Comité Consultatif pour la Quantité de Matière*).

Porównanie wyniku pomiaru dla próbki przy użyciu metody odniesienia, w której zapewniono spójność pomiarową jest szeroko stosowane w przypadku metody LA-ICP-MS, ze względu na ograniczoną ofertę stałych materiałów odniesienia przeznaczonych do bezpośredniej analizy. Jest to szczególnie problematyczne w przypadku próbek biologicznych, cechujących się zróżnicowanymi matrycami i niehomogeniczną strukturą. Jest to główny problem, przez który metoda LA-ICP-MS nie znalazła jeszcze zastosowania w rutynowych analizach próbek klinicznych, ponieważ próbki tkanek mają zróżnicowaną strukturę i skład (białka, tłuszcze, zmienna zawartość wody), a często również bardzo małe wymiary i masę, co sprawia, że trudno jest przewidzieć wpływ wszystkich czynników na wynik analizy i zapewnić odpowiednią powtarzalność wyników. Jednakże, w przypadku analizy krwi pod kątem zawartości pierwiastków metalicznych, zaproponowano szybką metodę, polegającą

na ablacji suchej kropli krwi, która została zwalidowana przy użyciu CRMów na bazie krwi z dobrym rezultatem, co sprawia, że może być używana w rutynowym oznaczaniu 13 pierwiastków [50].

W opracowanych procedurach oznaczania pierwiastków w tkankach miękkich spójność pomiarową zapewniono poprzez: (1) walidację istotnych parametrów metody analitycznej z użyciem CRMów; (2) zastosowanie metody odniesienia SN-ICP-MS do analizy wzorców stałych po mineralizacji i porównanie wyników uzyskanych dwiema różnymi metodami, (3) stosowanie metody dodatku wzorca.

### 6.7.2. Niepewność

Niepewność jest istotną cechą wyniku pomiaru analitycznego, oznaczająca przedział wokół wartości średniej, w której z określonym prawdopodobieństwem można spodziewać się wystąpienia wartości oczekiwanej [144]. Podanie wyniku wraz ze złożoną niepewnością, uwzględniającą wszystkie czynniki wpływające na wynik, jest konieczne w celu zachowania spójności pomiarowej. Niepewność wyniku, w przypadku analiz metodą LA-ICP-MS, wyrażana jest często jako odchylenie standardowe powtórzeń pomiaru i nazywana jest niepewnością standardową. W niektórych pracach, niepewność standardowa przemnożona jest przez czynnik rozszerzenia i podawana jako niepewność rozszerzona z uwzględnieniem założonego poziomu ufności [47,49]. Podawanie niepewności w przypadku metody LA-ICP-MS jest zasadne podczas analizy CRMów i próbek homogenicznych, np. po sprasowaniu, stopieniu lub w przypadku analizy suchej kropli.

Niepewność wyniku pomiaru w procedurach nr 1, 2 i 3 została wyrażona jako niepewność standardowa, czyli jednokrotna wartość SD serii pomiarów wzorców stałych oraz CRMów. Zakładając normalny rozkład danych, 68% zmierzonych wartości znajduje się w odległości jednokrotności SD od wartości średniej. W wyniku analiz CRMów pod postacią sprasowanych tabletek lub cienkich plastrów uzyskiwano z reguły większe niepewności dla zmierzonych pierwiastków niż niepewności odczytane z certyfikatu. Wynika to między innymi z faktu, że podczas certyfikacji materiału odniesienia stosuje się przeważnie techniki analizujące roztwory, do przygotowania których używa się względnie dużej odważki materiału (100 mg - 500 mg) i stosuje się względnie długi czas integracji danych, natomiast w wyniku ablacji laserowej do detektora, w przedziale czasu pojedynczego przemiatania m/z, trafiają ilości próbki rzędu pg – µg, w zależności od parametrów pracy systemu LA.

## 7. Zastosowanie procedur analitycznych oznaczania Ti, Al i V w próbkach rzeczywistych – błonie śluzowej jamy ustnej

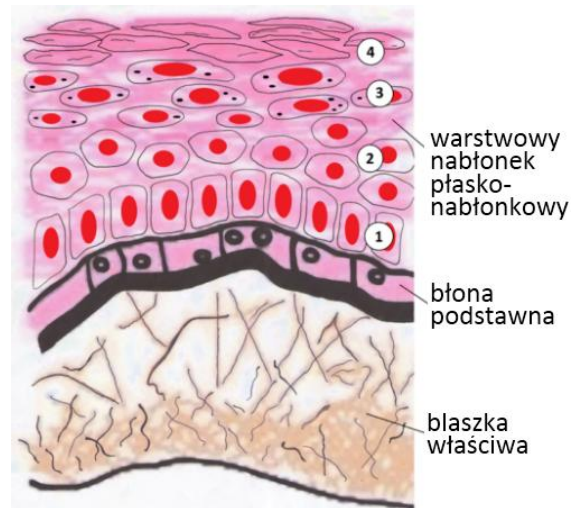
W kolejnych rozdziałach przedstawione zostaną wyniki analizy elementów systemu implantologicznego oraz tkanek pobranych od pacjentów leczonych implantami stomatologicznymi. Badania przeprowadzono według trzech procedur różniących się ustawieniami systemu LA, takimi jak szerokość wiązki laserowej, szybkość skanowania, oraz sposobem przygotowania wzorców i próbki do analizy. Szerokość wiązki laserowej ma duży wpływ na rozdzielczość przestrzenną uzyskanych map zawartości pierwiastków na powierzchni analizowanej próbki. Większa szerokość wiązki i większa szybkość skanowania generuje mapy o mniejszej rozdzielczości.

Tytan i inne metale są poddane działaniu korozji elektrochemicznej, zależnej od pH środowiska jamy ustnej. Niskie wartości pH ( $\leq 4$ ) a także obecność jonów fluorkowych wywierają wpływ na uwalnianie metali z implantów poprzez uszkodzenie powierzchniowej warstwy ochronnej złożonej z tlenków metali [74]. Kolejnym czynnikiem podejrzewanym o wpływ na procesy korozyjne implantów jest korozja z udziałem mikroorganizmów.

Aktywność enzymatyczna bakterii może przyczyniać się do procesów korozyjnych, jednakże potrzebne są dalsze badania w tym kierunku [149,150]. Błona śluzowa jamy ustnej zbudowana jest z dwóch podstawowych warstw: wielowarstwowy, rogowacjący nabłonek oraz blaszka właściwa, która jest w bezpośrednim kontakcie z implantem (rysunek 42).

Błona śluzowa spełnia funkcje czuciowe, osłaniające i ochronne dla głębiej położonych tkanek. Blaszka właściwa

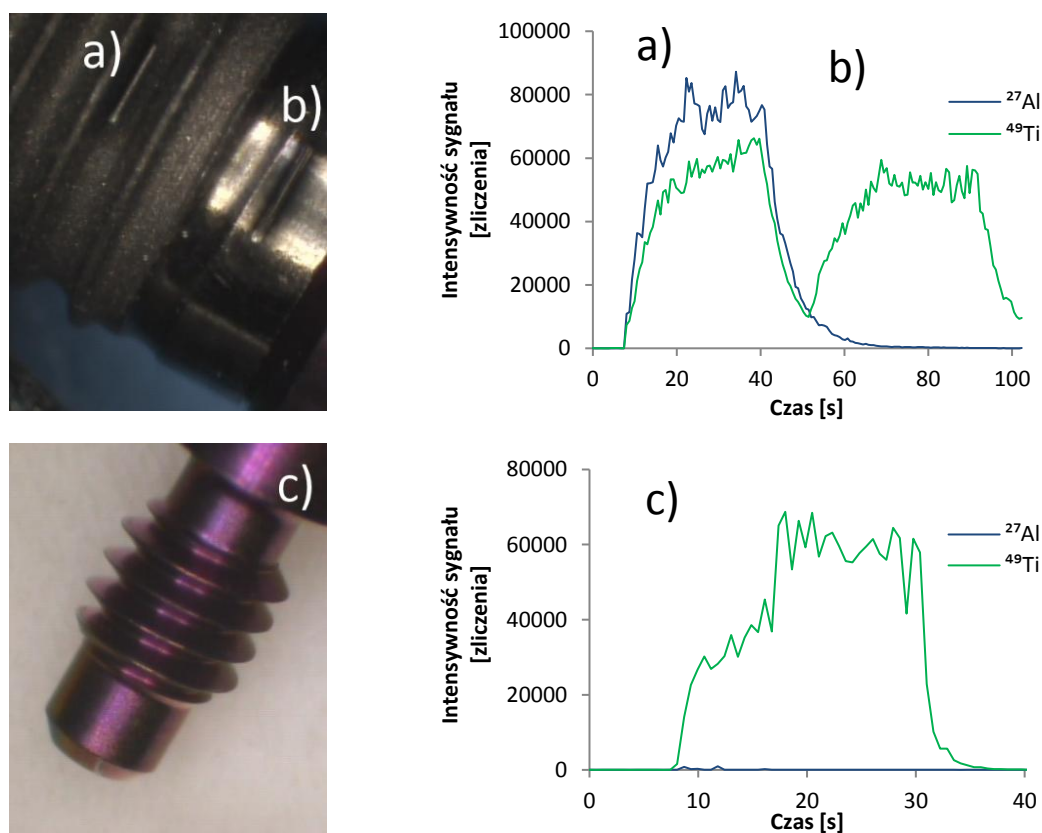
służy jako bariera dla ciał obcych, takich jak cząstki metaliczne i jony pochodzące z implantów. Pierwiastki metaliczne obecne w tkankach mogą mieć formę wolnych jonów, ale częściej są związane z określonymi białkami, które ułatwiają ich identyfikację przez system immunologiczny i eliminację z ustroju [151].



Rysunek 42 Schematyczne przedstawienie budowy błony śluzowej jamy ustnej (źródło: [148])

### 7.1. Analiza elementów systemu implantologicznego

W celu sprawdzenia składu jakościowego implantu, elementy systemu implantologicznego, czyli wszczep śródkostny i śrubę zamykającą, poddano analizie metodą LA-ICP-MS. Do tego celu użyto takich samych parametrów pracy systemu LA jak podczas analizy tkanek zgodnie z procedurą nr 3. Wyniki analizy przedstawiono na rysunku 43. Analiza polegała na przeprowadzeniu ablacji w trzech miejscach: (a) na powierzchni wszczepu śródkostnego, (b) na powierzchni elementu łączącego wszczep i koronę implantu i (c) na powierzchni tymczasowej śruby zamykającej. Analiza została przeprowadzona w celu sprawdzenia składu zastosowanego systemu implantologicznego, a uzyskane dane mają charakter jakościowy. Wszystkie elementy wykonane były z czystego Ti, jednakże wszczep śródkostny został dodatkowo poddany piaskowaniu proszkiem  $Al_2O_3$  w celu zwiększenia porowatości wszczepu, poprawy i przyspieszenia osseointegracji w ciele pacjenta. Intensywności sygnałów Mg, Ca, Fe, Zn, Cu, Mn były na poziomie tła. Tkanki analizowane

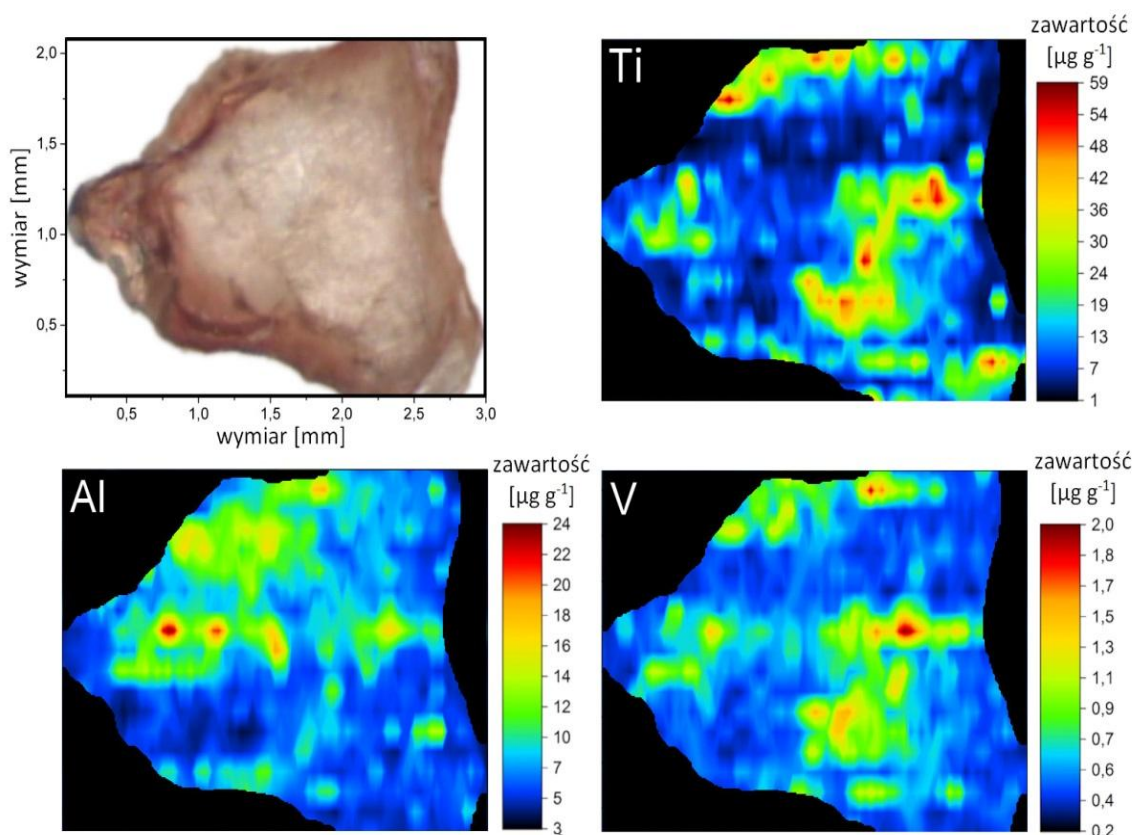


Rysunek 43 Analiza elementów implantu metodą LA-ICP-MS: a) wszczep śródkostny wykonany z czystego Ti i piaskowany proszkiem  $Al_2O_3$ , b) element łączący wszczep śródkostny i koronę implantu wykonany z czystego Ti i c) śruba zamykająca umieszczona we wszczepie śródkostnym na czas gojenia, wykonana z czystego Ti

według procedury 1 i 2 zostały pobrane od pacjentów, których leczono systemami implantologicznymi, których elementy składały się zarówno z czystego Ti jak i stopu Ti6Al4V. W wyniku zabiegu implantacji z implantu mogą zostać uwolnione drobiny metaliczne z każdego elementu systemu implantologicznego: ze wszczepu śródkostnego, z elementu łączącego oraz ze śruby zamykającej.

### 7.2. Analiza błony śluzowej jamy ustnej – procedura nr 1

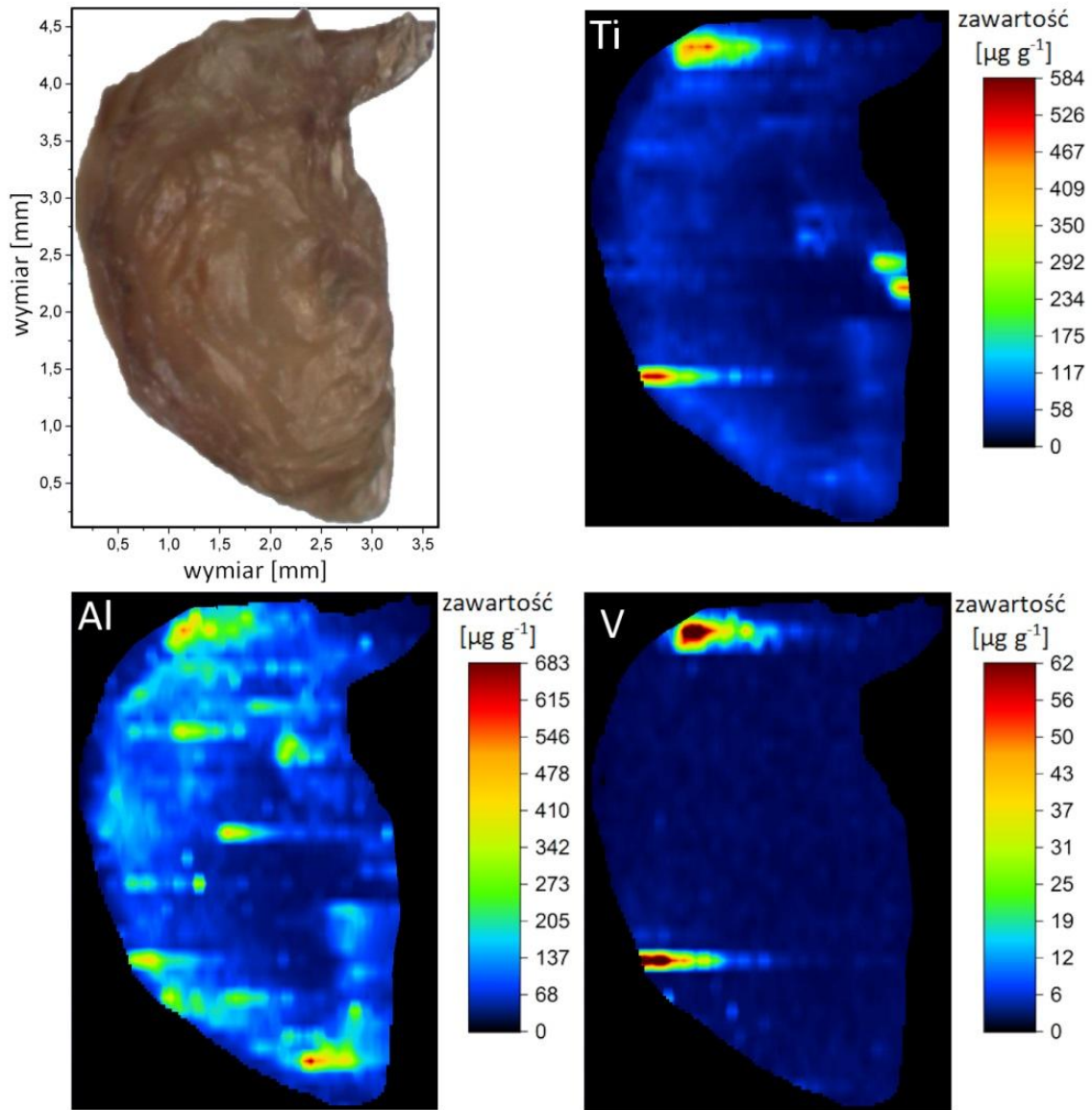
W celu uzyskania ilościowej informacji o zawartości pierwiastków będących składnikami implantów na powierzchni błony śluzowej jamy ustnej, przeprowadzono analizę tkanek, pobranych od pacjentów leczonych implantami, z użyciem metody LA-ICP-MS. Pierwiastki wybrane do analizy, Ti, Al i V, stanowią składniki wszczepu śródkostnego i śruby zamykającej, umieszczonych w kości szczęki lub żuchwy pacjenta. Proces gojenia następuje przez 4-6 miesięcy, w czasie którego implant i śruba zamykająca zarastają świeżą błoną śluzową.



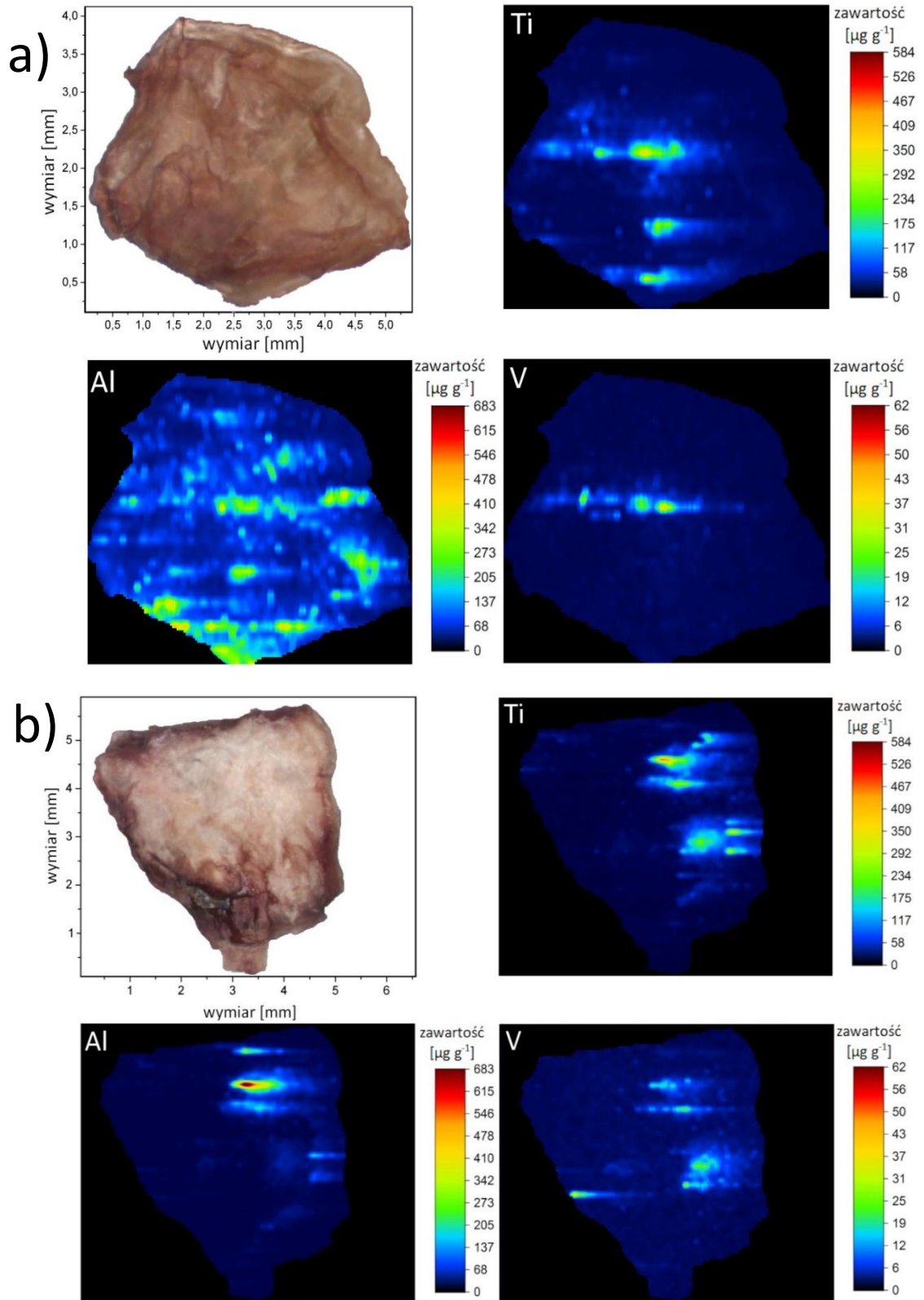
Rysunek 44 Mapy zawartości Ti, Al i V na powierzchni błony śluzowej jamy ustnej pobranej od pacjentów przed zabiegiem implantacji (grupa kontrolna)

W procedurze nr 1 analizie poddano tkanki przemyte wodą demineralizowaną i pozostawiono do wyschnięcia. Tkanki nie były cięte kriomikrotomem na plastry i pozostały praktycznie nienaruszone od momentu pobrania z ciała pacjenta. Na rysunku 44 przedstawiono mapy zawartości analitów w próbce pobranej od pacjenta przed zabiegiem implantacji, stanowiącej grupę kontrolną.

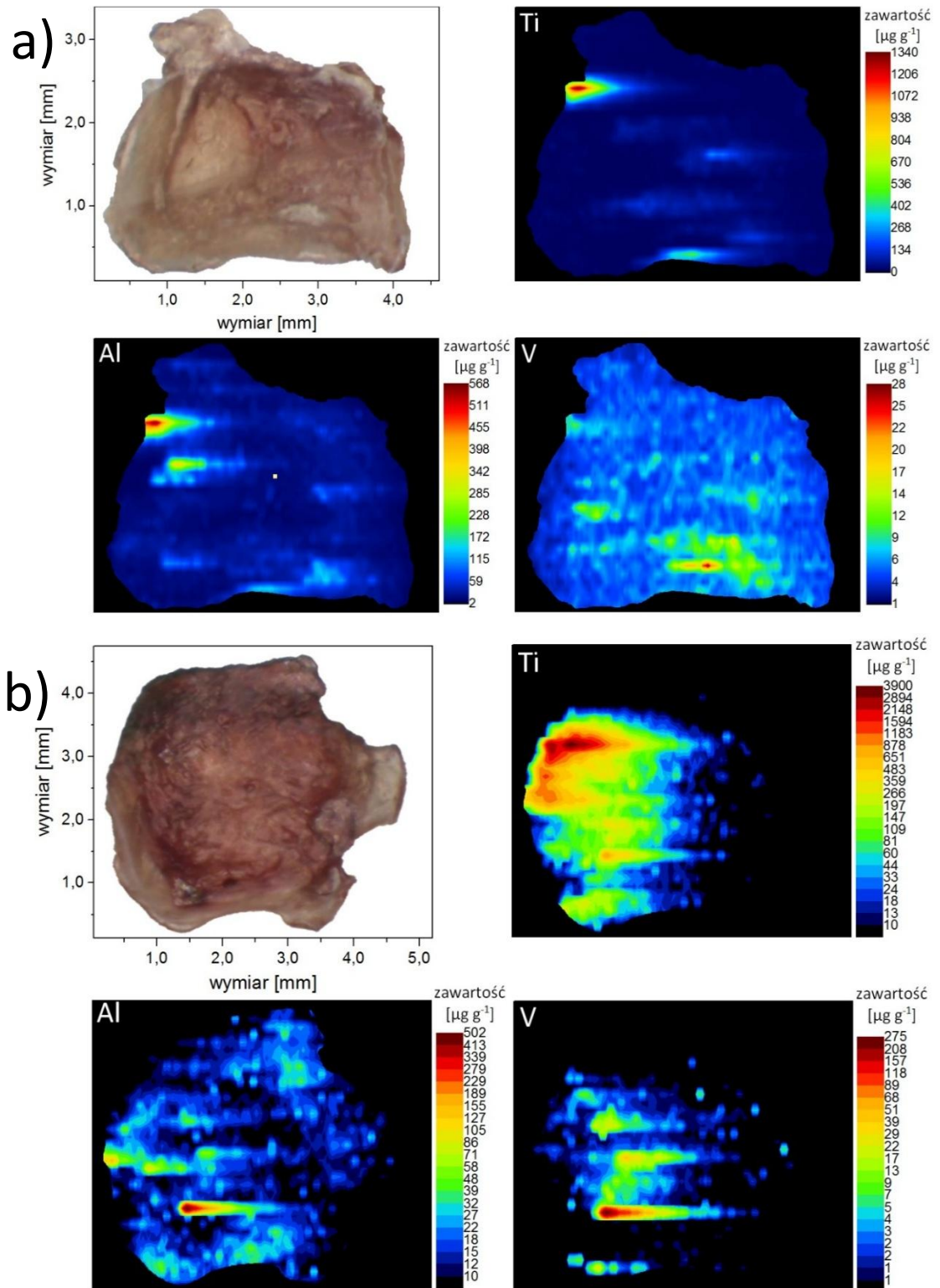
Na rysunkach 45 i 46 a) i b) przedstawiono mapy zawartości Ti, Al i V na powierzchni błony śluzowej pobranej od pacjenta, u którego umieszczono implant ze śrubą zamykającą wykonaną ze stopu Ti6Al4V. W celu porównania zmierzonych zawartości analitów w kolejnych trzech próbkach, ustawiono jedną skalę dla każdego analizowanego pierwiastka. W wyniku zabiegu implantacji, pod wpływem działania sił mechanicznych, a także pod wpływem działania środowiska jamy ustnej, z implantu mogą uwalniać się drobiny metaliczne oraz jony metali, będące składnikami implantów, które przenikają do okolicznych tkanek. Skutkiem tych procesów jest podwyższona zawartość analizowanych pierwiastków na powierzchni badanych tkanek. Sygnały są rozmieszczone niehomogenicznie, ostre, o wyraźnych krawędziach oraz o wysokiej intensywności, często przekraczającej zakres krzywej kalibracyjnej. Sugeruje to, że sygnały te mogą być spowodowane obecnością mikroskopijnych drobin metalicznych pochodzących z zabiegu implantacji. Drobiny mogły zostać uwolnione podczas wiercenia otworu w kości i umieszczania w niej wszczepu śródkostnego, ale także podczas umieszczania śruby zamykającej we wszczepie śródkostnym. Szerokość obszarów, na których wykryto podwyższone zawartości analitów jest determinowana przez szerokość wiązki laserowej użytej do ablacji próbki, w przypadku procedury nr 1 szerokość wiązki wynosiła 100  $\mu\text{m}$ . Zawartość Ti, Al i V w próbce z grupy kontrolnej jest ok. 1-2 rzędów wielkości niższa niż w próbkach po implantacji, zatem obserwowana w nich podwyższona zawartość analitów jest niewątpliwie skutkiem zabiegu implantacji przeprowadzonej u pacjenta. W literaturze znajdują się badania przeprowadzone z udziałem metody LA-ICP-MS, które wskazują, że pierwiastki mogą migrować z metalowych obiektów umieszczonych w organizmie zwierząt do okolicznych tkanek [152,153]. Ponadto, istnieją również badania, w których wykazano, że cząstki o wymiarach nano- i mikrometrów, pochodzące z implantów umieszczonych w ciele psów mogą przechodzić do okolicznych tkanek [154].



Rysunek 45 Mapy zawartości Ti, Al i V na powierzchni błony śluzowej jamy ustnej pobranej od pacjentów po zabiegu implantacji z użyciem wszczepów śródkostnych wykonanych z czystego Ti i śruby zamykającej ze stopu Ti6Al4V



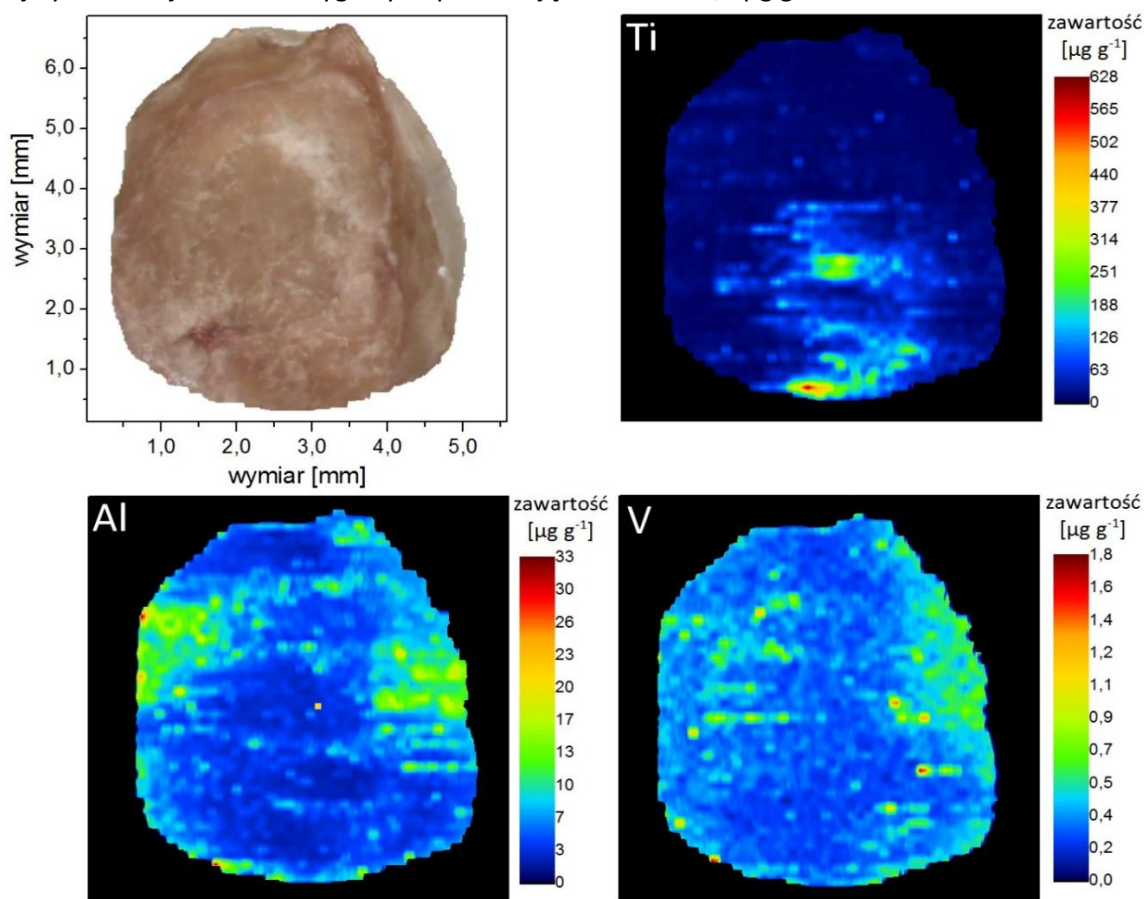
Rysunek 46 a) i b) Mapy zawartości Ti, Al i V na powierzchni dwóch fragmentów błony śluzowej jamy ustnej pobranej od pacjentów po zabiegu implantacji z użyciem wszczepów śródkostnych wykonanych z czystego Ti i śruby zamykającej ze stopu Ti6Al4V



Rysunek 47 a) i b) Mapy zawartości Ti, Al i V na powierzchni błony śluzowej jamy ustnej pobranej od pacjentów po zabiegu implantacji z użyciem wszczepów śródkostnych wykonanych z czystego Ti i śruby zamykającej ze stopu Ti6Al4V. Zarejestrowane znacznie zwiększone zawartości analitów. Dane na rysunku b) przedstawione są w skali logarytmicznej.

W przypadku dwóch próbek, przedstawionych na rysunku 47 a) i b), zarejestrowano znacznie większe zawartości Ti niż w innych próbkach w ramach procedury nr 1. Na mapach próbki b) można wskazać obszary, na których zarejestrowano sygnał dla wszystkich analitów, co potwierdza fakt, że zwiększona zawartość Ti, Al i V w tych miejscach spowodowana jest wpływem elementów implantu. Zakresy krzywych kalibracyjnych zostały przekroczone również dla V w próbce na rysunku 47 b).

Na rysunku 48 przedstawiono mapy zawartości Ti, Al i V na powierzchni tkanki pobranej od pacjenta, u którego zastosowano system implantologiczny wykonany w całości z czystego Ti. Na uzyskanych mapach zawartości widać podwyższoną zawartość Ti, zlokalizowaną na małych obszarach, co mogło być spowodowane obecnością drobin metalicznych. Natomiast zmierzone zawartości Al i V są niskie i znajdują się na poziomie zarejestrowanym w tkankach z grupy kontrolnej. Zawartości V oscylują na poziomie granicy wykrywalności metody analitycznej ( $MDL=0,82 \mu\text{g g}^{-1}$ ), a najwyższe zarejestrowane sygnały odpowiadają zawartości  $1,8 \mu\text{g g}^{-1}$ .



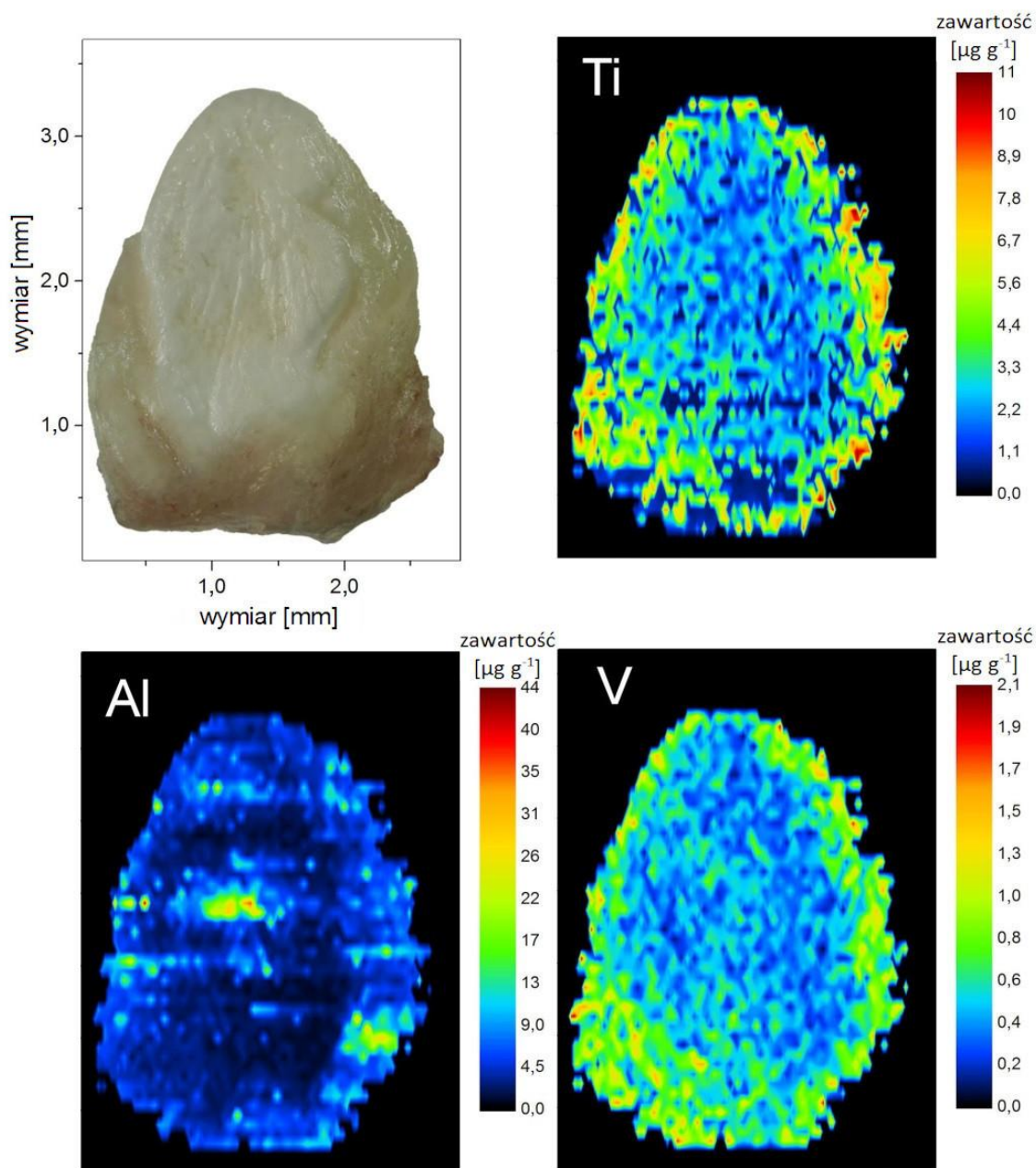
Rysunek 48 Mapy zawartości Ti, Al i V na powierzchni błony śluzowej jamy ustnej pobranej od pacjentów po zabiegu implantacji z użyciem wszczepów śródkostnych i śruby zamykającej wykonanych z czystego Ti

### **7.3. Analiza błony śluzowej jamy ustnej – procedura nr 2**

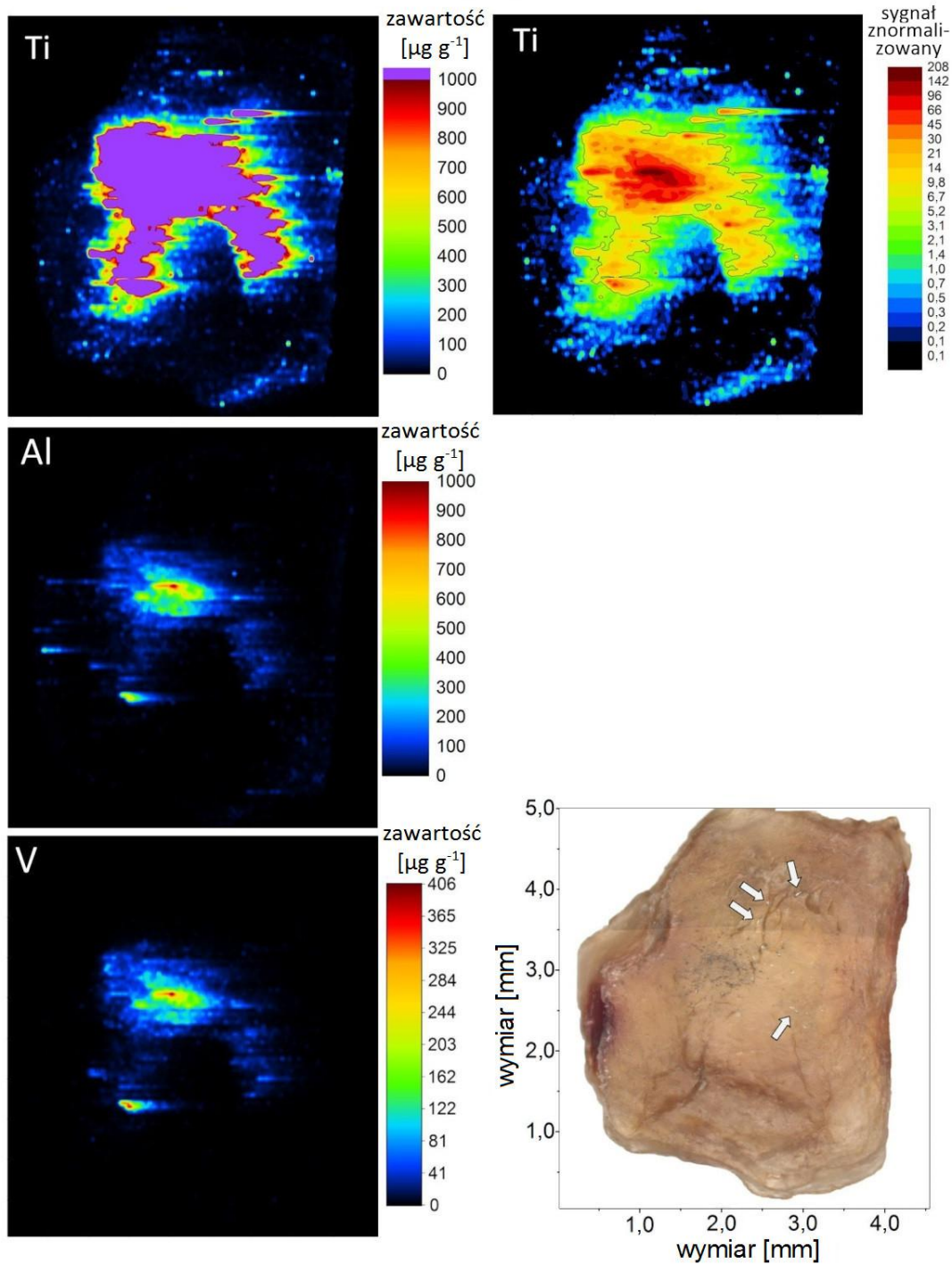
Mapy zarejestrowane w wyniku analiz według procedury nr 1 sugerują, że drobiny metaliczne mogą być bardzo liczne na powierzchni tkanek i przez to mogą istotnie wpływać na intensywność zarejestrowanych sygnałów. W procedurze nr 2 tkanki i wzorce zostały przygotowane do analizy w taki sam sposób jak w przypadku procedury nr 1, jednakże zastosowano wiązkę laserową o mniejszej średnicy (50  $\mu\text{m}$ ) przez co uzyskane mapy mają lepszą rozdzielczość przestrzenną. Tkanki wybrane do analizy według procedury nr 2 zostały poddane wstępnej ocenie obecności drobin metalicznych na powierzchni, przy zużyciu mikroskopu optycznego. Zastosowane systemy implantologiczne składały się ze wszczepu śródkostnego wykonanego z czystego Ti oraz z tymczasowej śruby zamykającej wykonanej ze stopu Ti6Al4V lub czystego Ti. Wyniki analiz tkanek po implantacji zgodnie z procedurą nr 2 zaprezentowano na rysunkach 50 - 55. W celu porównania wykonano analizy i następnie mapy zawartości analitów na powierzchni tkanki z grupy kontrolnej, przykładową mapę przedstawiono na rysunku 49. W przypadku gdy zawartość analitu przekroczyła zakres krzywej kalibracyjnej (1000  $\mu\text{g g}^{-1}$ ) dane zostały ucięte i oznaczone kolorem fioletowym, natomiast obok mapy zawartości przedstawiono mapę z sygnałami znormalizowanymi w skali logarytmicznej, aby zobrazować kształt i intensywność uzyskanych sygnałów, jednocześnie niskich i wysokich na tej samej mapie.

Sygnały zarejestrowane w tkance z grupy kontrolnej (rysunek 49) są o wiele niższe w porównaniu do tkanek po implantacji (różnica 2-4 rzędów wielkości) i oscylują na poziomie LOD. Wyniki analiz tkanek po implantacji zostały podzielone ze względu na kształty uzyskanych sygnałów oraz wynik oceny wizualnej przeprowadzonej przy użyciu mikroskopu optycznego. Na rysunkach 50 i 51 można wyraźnie wskazać cząstki metaliczne o wymiarach do ok. 100  $\mu\text{m}$ , będące pozostałością po zabiegu implantacji, na powierzchni badanej próbki. Natomiast na rysunku 53 na fotografii tkanki widoczny jest obszar o szarym zabarwieniu, pochodzącym z licznych cząstek o bardzo małych wymiarach (>1  $\mu\text{m}$ ), na którym nie można wyróżnić pojedynczych cząstek metalicznych. Mapy zawartości analitów przedstawione na rysunku 50 powstały po analizie tkanki, w których zastosowano śrubę zamykającą wykonaną ze stopu Ti6Al4V. Na mapach można wskazać liczne sygnały na tych samych obszarach dla wszystkich analizowanych pierwiastków, co sugeruje, że drobiny metaliczne w tych miejscach pochodzą ze śruby zamykającej wykonanej ze stopu Ti6Al4V. Strzałkami na fotografii oznaczono drobiny metaliczne pochodzące ze wszczepu śródkostnego wykonanego z czystego Ti, co wynika z faktu, że w tych obszarach zarejestrowano wyłącznie sygnały Ti. Dodatkowo, efekt ogonowania sygnału w kierunku przesuwania wiązki laserowej wzdłuż próbki

wynika z ablacji obszaru o bardzo wysokiej zawartości analizowanego pierwiastka, co potwierdza ich metaliczną formę w badanych tkankach.

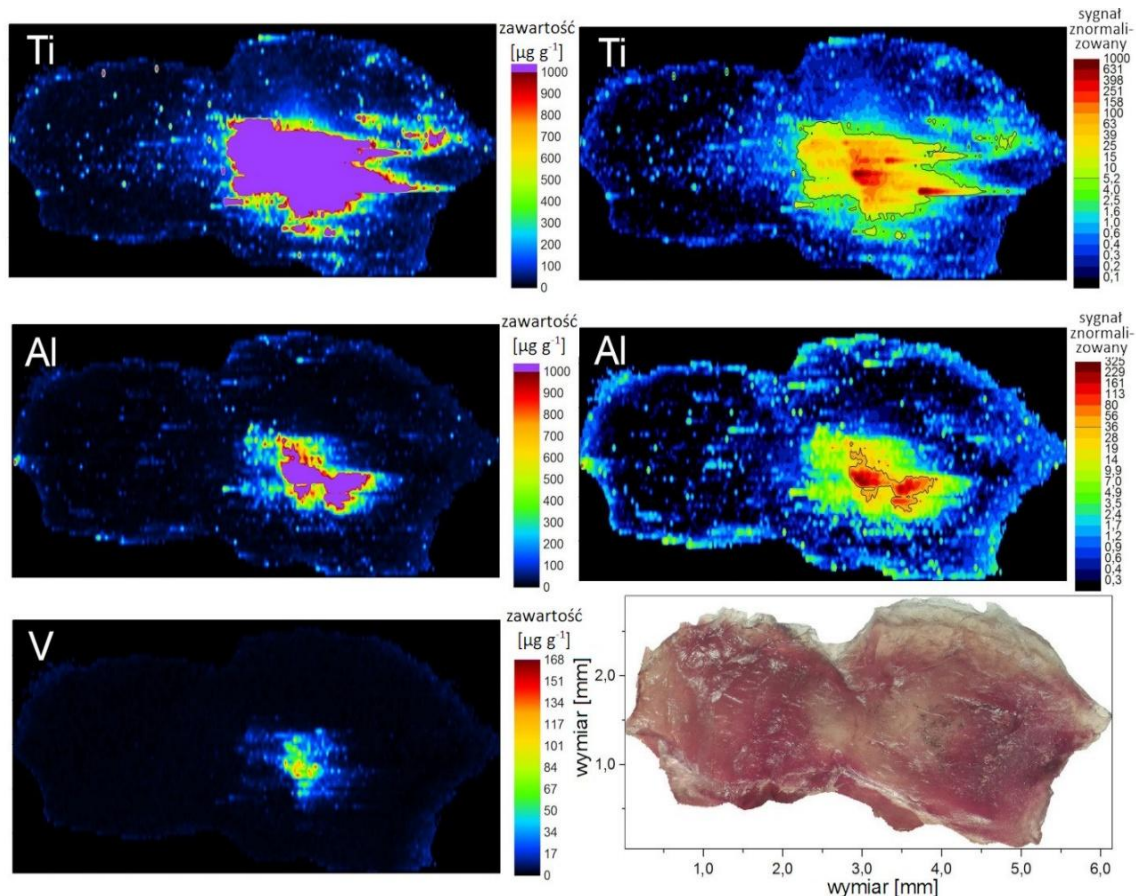


Rysunek 49 Fotografia i mapy zawartości Ti, Al i V na powierzchni tkanki z grupy kontrolnej – procedura nr 2



Rysunek 50 Fotografia i mapy zawartości Ti, Al i V na powierzchni błony śluzowej pobranej od pacjenta, u którego zastosowano wszczep śródkostny wykonany z czystego Ti i śrubę zamykającą wykonaną ze stopu Ti6Al4V – procedura nr 2. Wyraźnie zarysowane są pojedyncze cząstki metaliczne na fotografii tkanki.

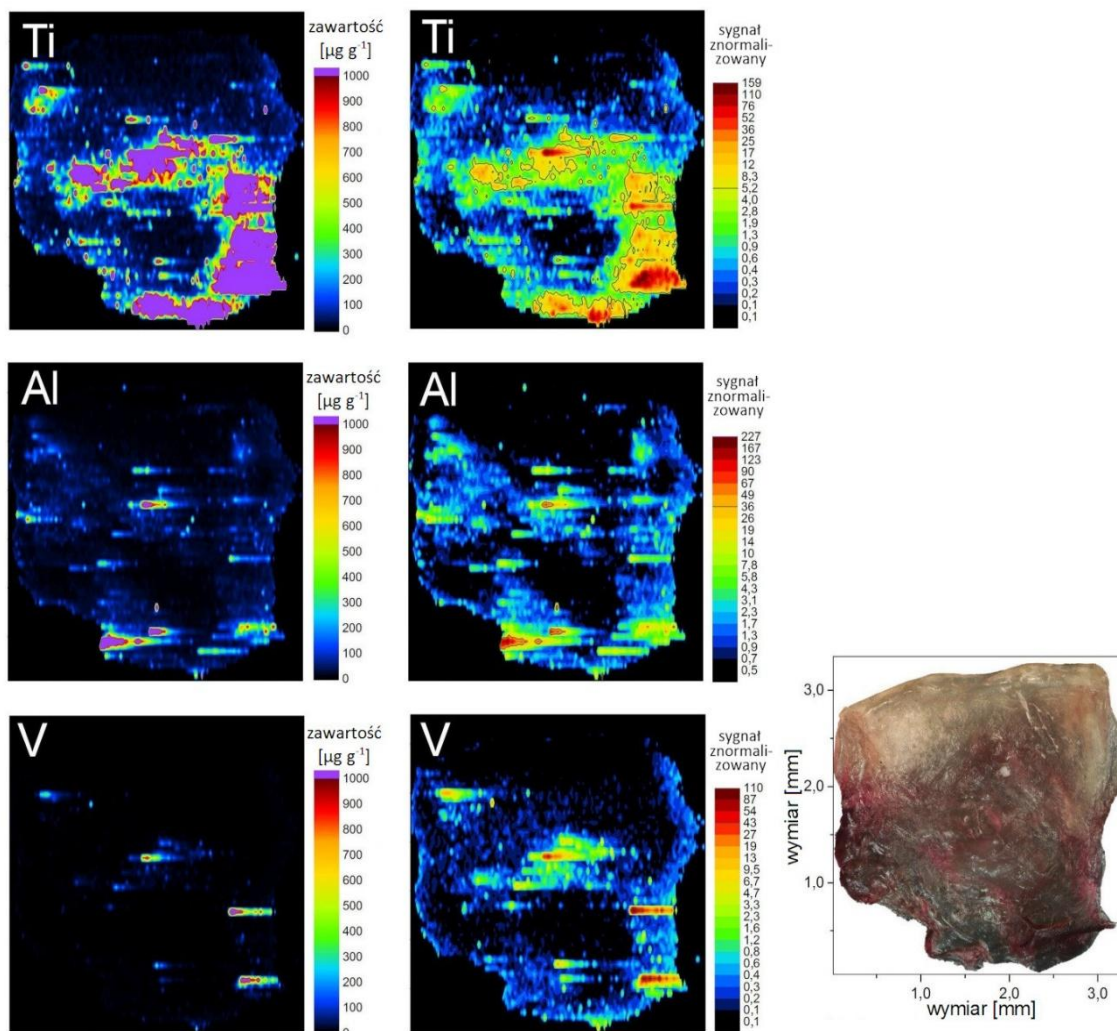
Na rysunku 51 przedstawiono mapy zawartości Ti, Al i V na powierzchni błony śluzowej. Podobnie jak w przypadku próbki na rysunku 50 zastosowano tu system implantologiczny, w którym śruba gojąca wykonana była ze stopu Ti6Al4V, a wszczep wykonany był z czystego Ti. Na fotografii tkanki wyraźnie widać liczne cząstki metaliczne, które na mapach zawartości analityków manifestują się jako wysokie sygnały dla wszystkich mierzonych pierwiastków.



Rysunek 51 Fotografia i mapy zawartości Ti, Al i V na powierzchni błony śluzowej pobranej od pacjenta, u którego zastosowano wszczep śródkostny wykonany z czystego Ti i śrubę zamykającą wykonaną ze stopu Ti6Al4V – procedura nr 2. Wyraźnie zarysowane są pojedyncze cząstki metaliczne na fotografii tkanki.

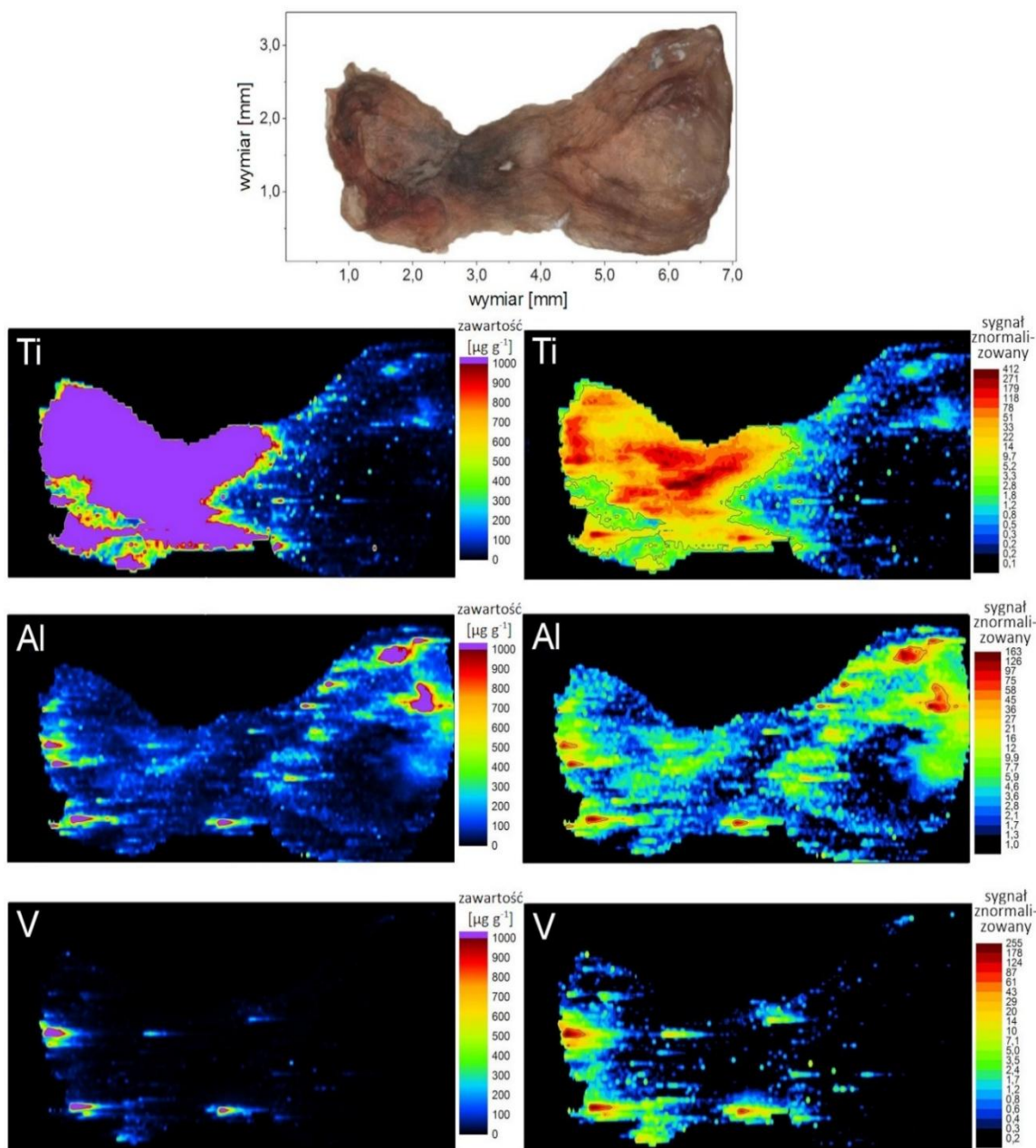
Na rysunku 52 przedstawiono wyniki analizy tkanki mającej kontakt zarówno z czystym Ti jak i ze stopem Ti6Al4V. Podobnie jak w poprzednich przykładach, widoczne są liczne sygnały o wysokich intensywnościach dla wszystkich mierzonych pierwiastków. Na fotografii tkanki nie można wyróżnić pojedynczych drobin metalicznych na powierzchni, co może być spowodowane bardzo małymi rozmiarami drobin (poniżej zdolności rozdzielczej mikroskopu optycznego) lub drobin znajdujących się pod powierzchnią tkanki. Nie jest wykluczone, że drobin znajdują się pod powierzchnią

tkanki, gdyż od momentu implantacji i uwolnienia drobin do pobrania próbki od pacjenta mija od 4 do 6 miesięcy i w tym czasie następuje gojenie, w wyniku czego tworzą się nowe warstwy błony śluzowej.



Rysunek 52 Fotografia i mapy zawartości Ti, Al i V na powierzchni błony śluzowej pobranej od pacjenta, u którego zastosowano wszczep śródkostny wykonany z czystego Ti i śrubę zamykającą wykonaną ze stopu Ti6Al4V – procedura nr 2. Na fotografii nie ma widocznych cząstek metalicznych na powierzchni tkanki.

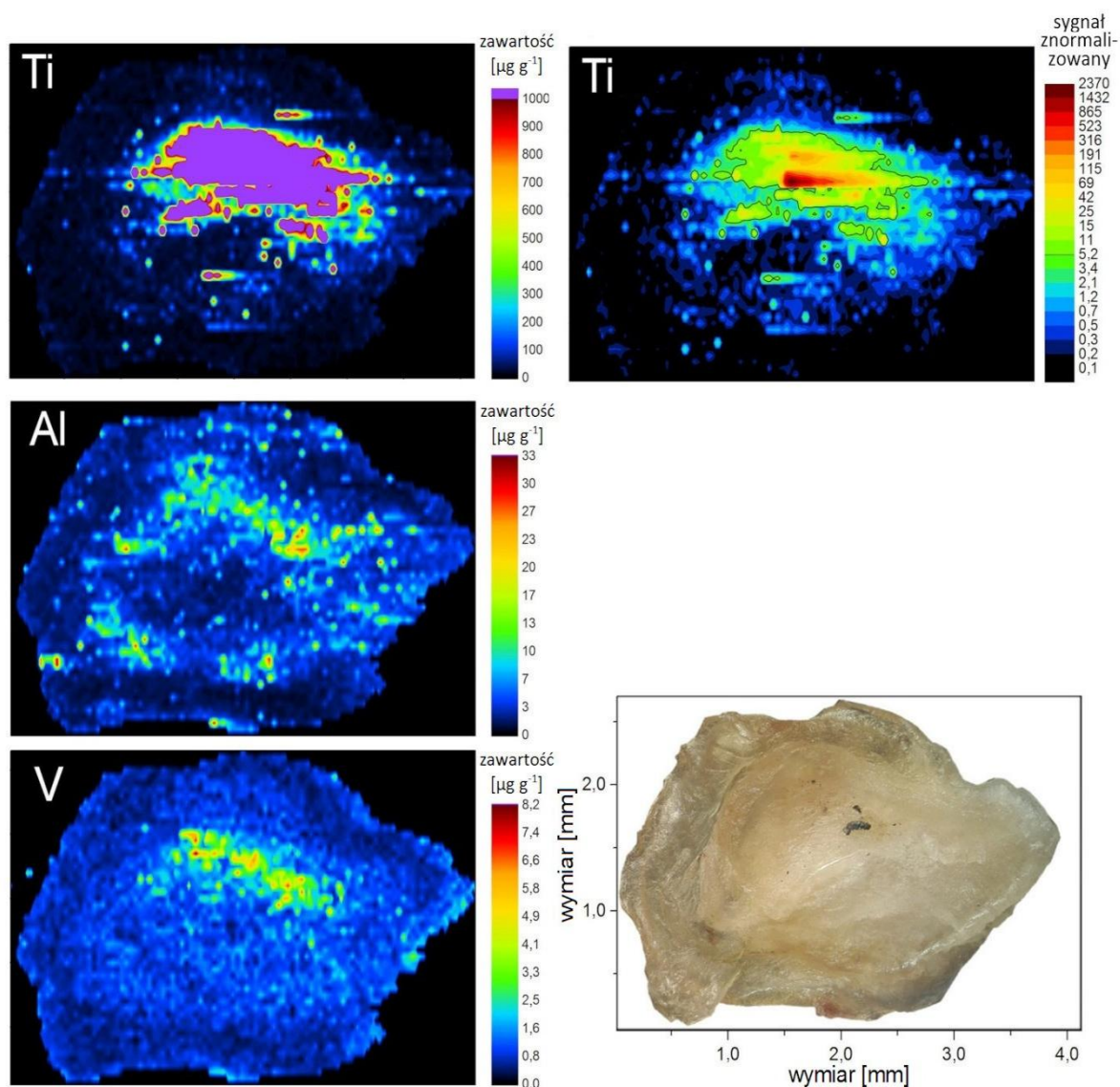
Na rysunku 53 przedstawiono mapy zawartości analitów oraz fotografię tkanki, pochodzącej od pacjenta, któremu wszczepiono implant z czystego Ti oraz śrubę zamykającą wykonaną ze stopu Ti6Al4V. Na fotografii tkanki widoczny jest jeden rozległy obszar o szarym zabarwieniu i kilka mniejszych z lewej strony tkanki, którym odpowiadają szerokie sygnały o bardzo dużej intensywności. Drobin są bardzo małe i liczne, dając efekt szarego przebarwienia tkanki, a pojedyncze drobin są niedostrzegalne.



Rysunek 53 Fotografia i mapy zawartości Ti, Al i V na powierzchni błony śluzowej pobranej od pacjenta, u którego zastosowano wszczep śródkostny wykonany z czystego Ti i śrubę zamykającą wykonaną ze stopu Ti6Al4V – procedura nr 2. Na fotografii wyraźnie widoczny jest obszar o szarym zabarwieniu, spowodowany obecnością licznych drobni o wymiarach rzędu  $\mu\text{m}$  i mniejszych, natomiast nie ma widocznych pojedynczych cząstek metalicznych na powierzchni tkanki.

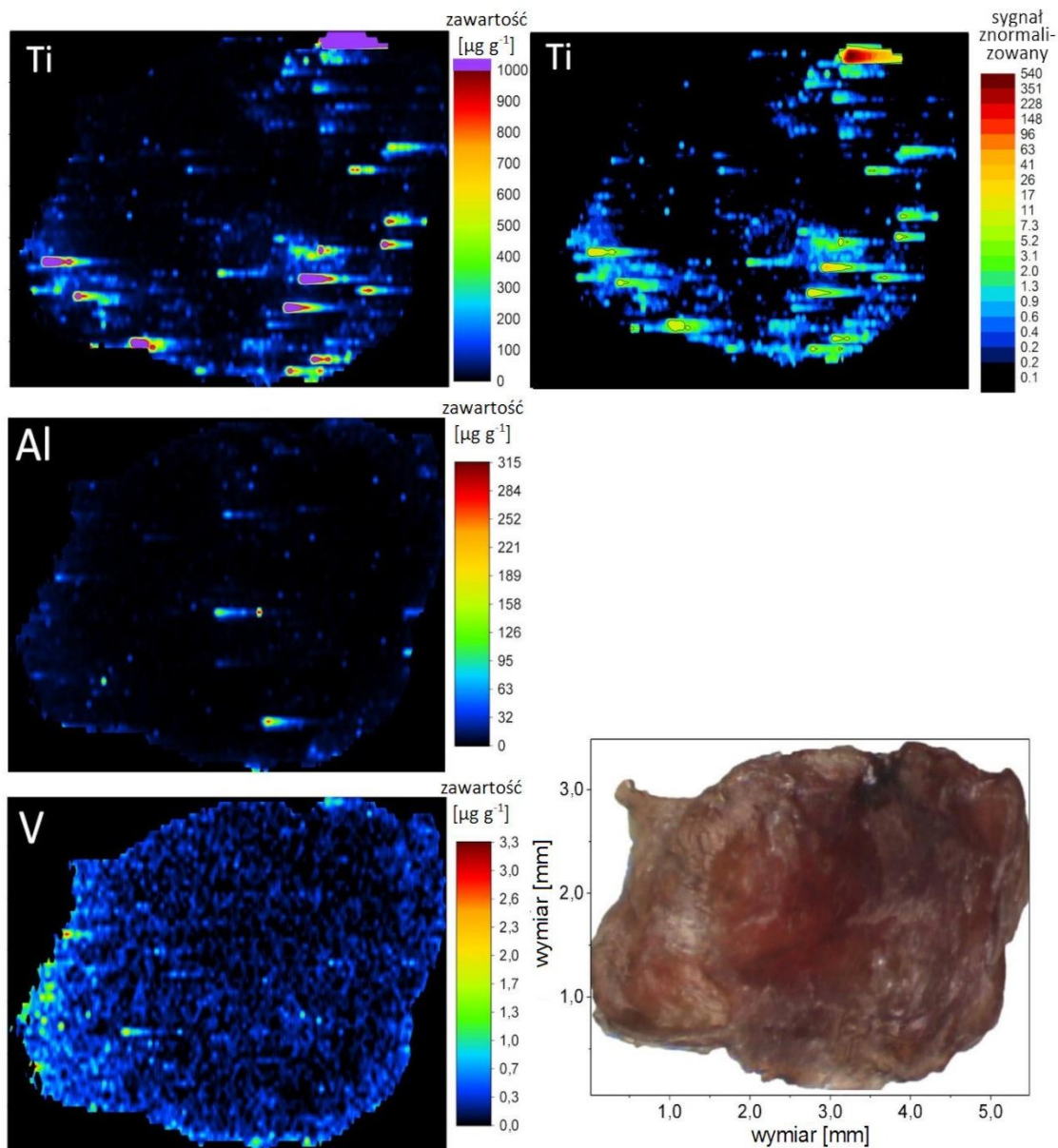
Z kolei na rysunku 54 przedstawiono fotografię i mapy zawartości Ti, Al i V na powierzchni błony śluzowej mającej kontakt z systemem implantologicznym, w którym zarówno wszczep śródkostny, jak i śruba zamykająca wykonana została z czystego Ti. Na fotografii wyraźnie widoczne są cząstki metaliczne o ciemnej barwie, którym odpowiadają wysokie sygnały Ti, natomiast

zawartości Al i V są bardzo niskie na całej powierzchni tkanki, na poziomie zbliżonym do grupy kontrolnej. W omawianej na rysunku 54 tkance zarejestrowano najwyższy sygnał Ti ze wszystkich próbek analizowanych w niniejszej pracy. Najbardziej intensywny sygnał Ti pokrywa się z dużym ciemnym obszarem na fotografii, będącym drobiną metaliczną oderwaną od implantu. Poprzez ekstrapolację krzywej kalibracyjnej orientacyjnie oszacowano zawartość Ti w najwyższym zmierzonym punkcie na mapie intensywności sygnału znormalizowanego, po prawej stronie na rysunku 54, która mieści się w zakresie dziesiątek %.



Rysunek 54 Fotografia i mapy zawartości Ti, Al i V na powierzchni błony śluzowej pobranej od pacjenta, u którego zastosowano wszczep śródkostny i śrubę zamykającą wykonane z czystego Ti – procedura nr 2. Na fotografii wyraźnie widoczne są drobinny metaliczne na powierzchni tkanki.

Podobnie jak w powyższym przykładzie, na rysunku 55 przedstawiono wyniki analizy tkanki mającej kontakt z elementami systemu implantologicznego wykonanych z czystego Ti. Na mapach zawartości widoczne są liczne, wyraźnie zarysowane sygnały Ti, które ze względu na małe rozmiary nie są widoczne na fotografii, poza ciemnym obszarem w górnej części tkanki, gdzie zarejestrowano najwyższy sygnał Ti. Sygnały V są na niskim poziomie, podobnie jak w grupie kontrolnej, zarejestrowano nieliczne sygnały o podwyższonej intensywności dla Al.



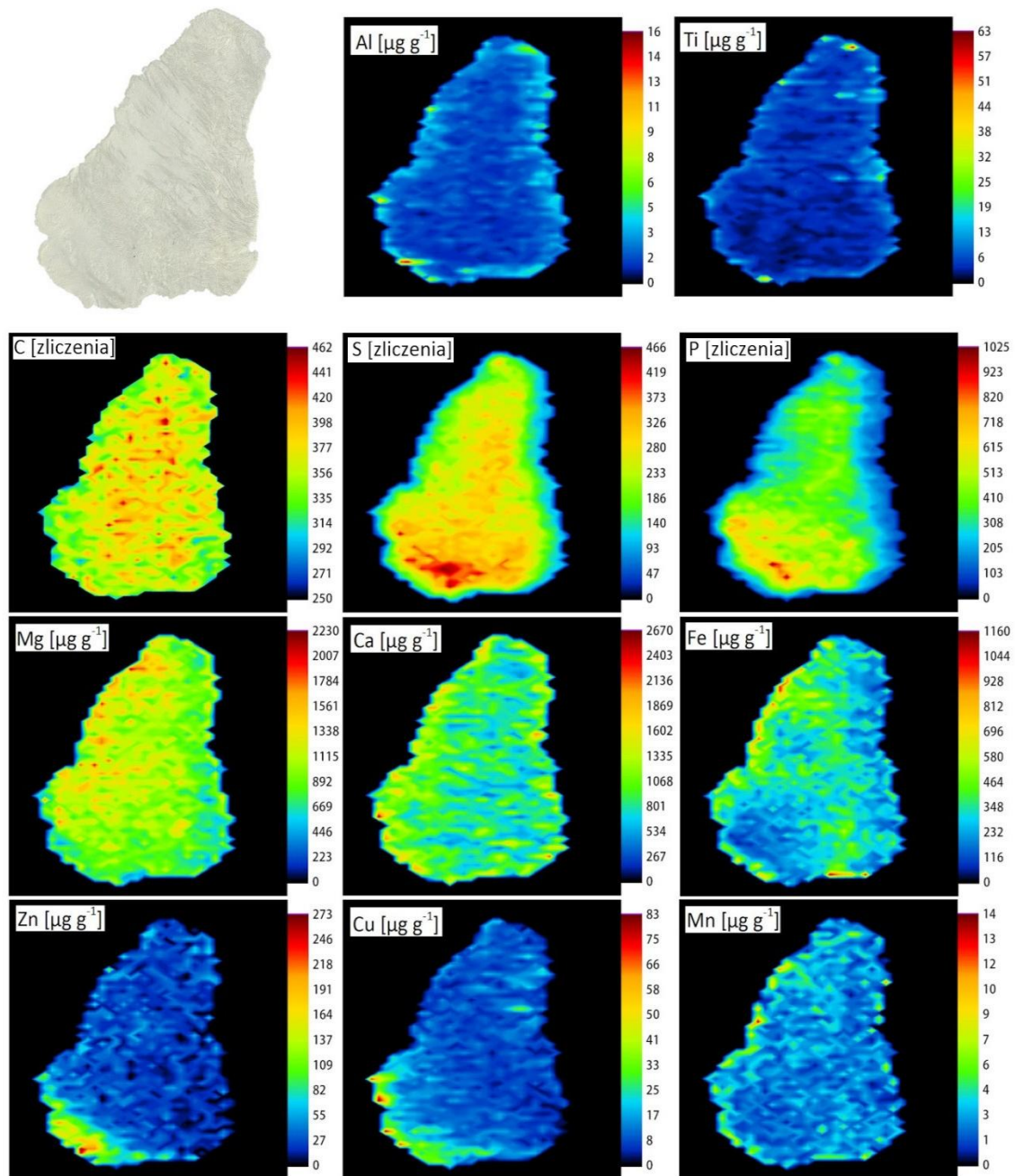
Rysunek 55 Fotografia i mapy zawartości Ti, Al i V na powierzchni błony śluzowej pobranej od pacjenta, po zastosowaniu wszczepu środkowego i śruby zamykającej z czystego Ti – procedura nr 2

Na rysunku 55 można dostrzec niepożądany efekt ogonowania sygnału Ti w kierunku przesuwania wiązki laserowej spowodowane między innymi wydłużonym czasem wymywania aerozolu z komory ablacyjnej. Jednakże, ten niepożądany efekt jest spowodowany przede wszystkim obecnością ogromnych różnic zawartości analizowanego pierwiastka w kolejnych porcjach materiału poddawanego ablacji, co jest możliwe w przypadku obecności cząstek metalicznych. Ze względu na mikroskopijny rozmiar cząstek, ich licznosc i głębokie osadzenie w tkankach (także poniżej powierzchni tkanki) nie jest możliwe ich usunięcie przez płukanie wodą. Cząsteczki pozostają w miękkich tkankach ciała pacjenta podczas i po okresie gojenia, w dalszym ciągu uwalniając jony do otaczających tkanek. W badanych tkankach, także po długotrwałym płukaniu wodą, w dalszym ciągu pozostawały cząstki metaliczne. We wszystkich analizowanych próbkach zawartość Ti przekroczyła zakres krzywej kalibracyjnej. Wśród analizowanych pierwiastków w tkankach po zastosowaniu systemów implantologicznych ze stopem Ti6Al4V największe wartości sygnałów zarejestrowano dla Ti, niższe dla Al, podczas gdy najniższe dla V. Wynika to z użycia czystego Ti jako materiału największego elementu implantu, wszczepu śródkostnego, i wysokiej zawartości Ti w stopie Ti6Al4V (około 90%). Zmierzone poziomy zawartości Ti, Al i V są w przybliżeniu zgodne z składem stopu Ti6Al4V. Na powyższą obserwację wpływa również fakt, że najwięcej elementów systemu implantologicznego (wszczep, łącznik i śruba) ma w swoim składzie Ti. Sygnały Al można zarejestrować w drobinach mogących pochodzić ze wszczepu śródkostnego, który został poddany piaskowaniu proszkiem  $Al_2O_3$ , oraz pochodzących ze stopu Ti6Al4V. Natomiast jedynym źródłem V jest śruba gojąca wykonana ze stopu Ti6Al4V.

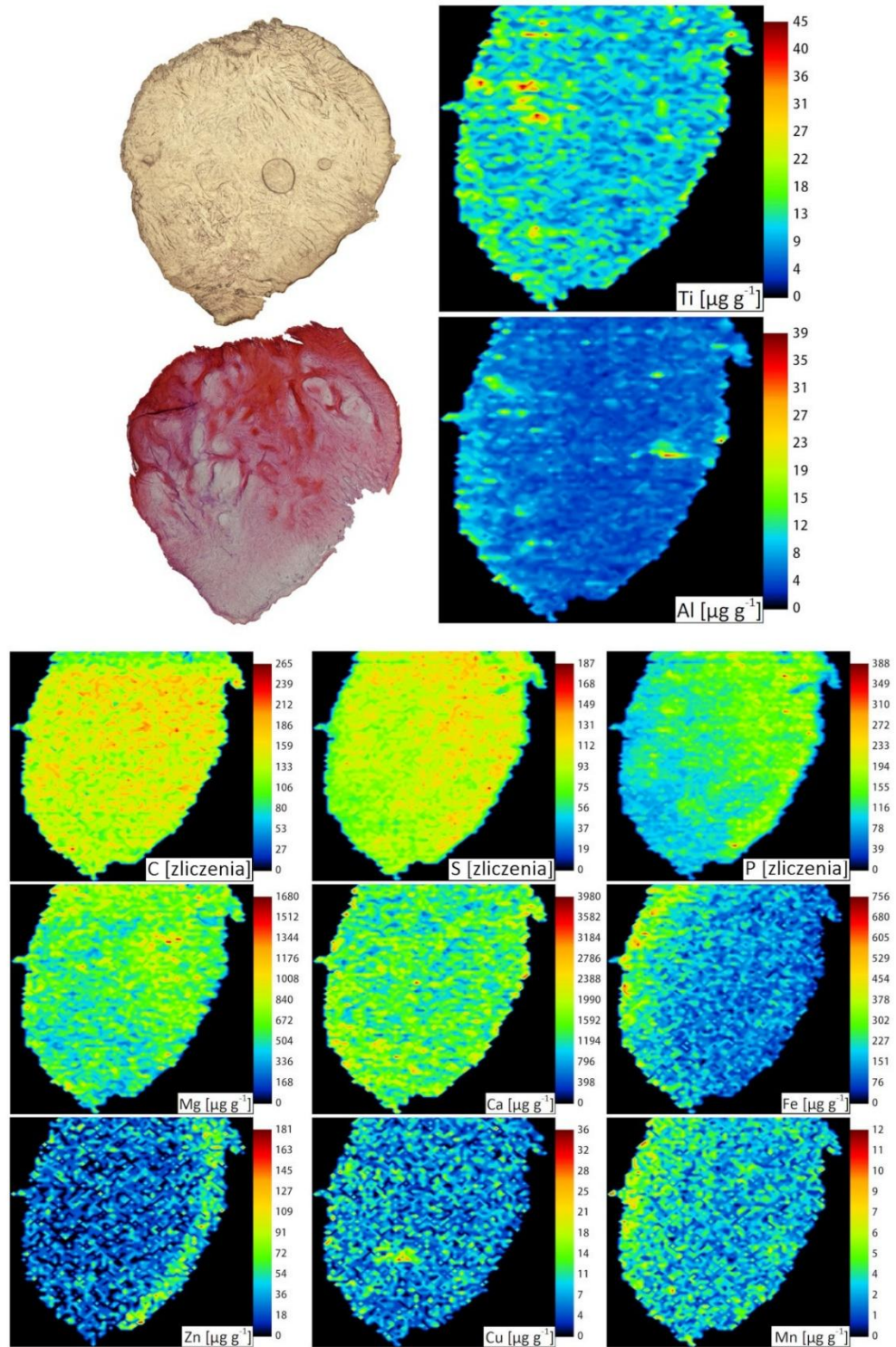
#### **7.4. Analiza błony śluzowej jamy ustnej – procedura nr 3**

W procedurze nr 3 tkanki zostały pocięte za pomocą kriomikrotomu na plastry o grubości 30  $\mu\text{m}$ , pozostawione na podstawce z tworzywa PET do wyschnięcia i analizowane metodą LA-ICP-MS. Taki sposób przygotowania próbki do analizy zapewnia przeniesienie całej masy analizowanej próbki do aerozolu pod wpływem działania lasera. Szerokość wiązki laserowej została zmniejszona w stosunku do poprzednio omawianych procedur (25  $\mu\text{m}$ ) przez co poprawiła się rozdzielczość przestrzenna uzyskanych map. Analizie została poddana tkanka z grupy kontrolnej oraz 4 tkanki pobrane od pacjentów po implantacji. Zastosowane systemy implantologiczne składały się z elementów wykonanych z czystego Ti, dlatego V nie był oznaczany w tej części pracy. Poza pierwiastkami pochodzącymi z implantów oznaczono również pierwiastki fizjologiczne: Ca, Mg, Fe, Mn, Cu i Zn. Ponadto, przedstawiono jakościowe mapy rozmieszczenia pierwiastków budulcowych, C, S i P, w jednostkach surowych zliczeń detektora. Cienkie odcinki błony śluzowej jamy ustnej barwiono metodą HE, co pozwoliło na zobrazowanie histopatologicznej struktury analizowanej tkanki. Fragmenty tkanek, które były barwione metodą HE, nie były analizowane metodą LA-ICP-MS i posłużyły wyłącznie do wykonania fotografii, stąd nie zawsze fragment zabarwiony i analizowany mają taki sam kształt, ale zawsze pochodzą z tej samej próbki. W celu lepszego zobrazowania sygnałów niskich i wysokich na jednej mapie, czyli gdy zakres zmierzonych intensywności był bardzo duży, zastosowano skalę logarytmiczną.

Na rysunkach 56 i 57 przedstawiono fotografie i mapy zawartości analityków w tkankach z grupy kontrolnej. Zawartości pierwiastków pochodzących od implantów, Ti i Al, są niższe o ok. 1-3 rzędy wielkości w porównaniu do tkanek mających kontakt z implantami. Zawartości pierwiastków fizjologicznych są na zbliżonym poziomie zawartości we wszystkich analizowanych tkankach.



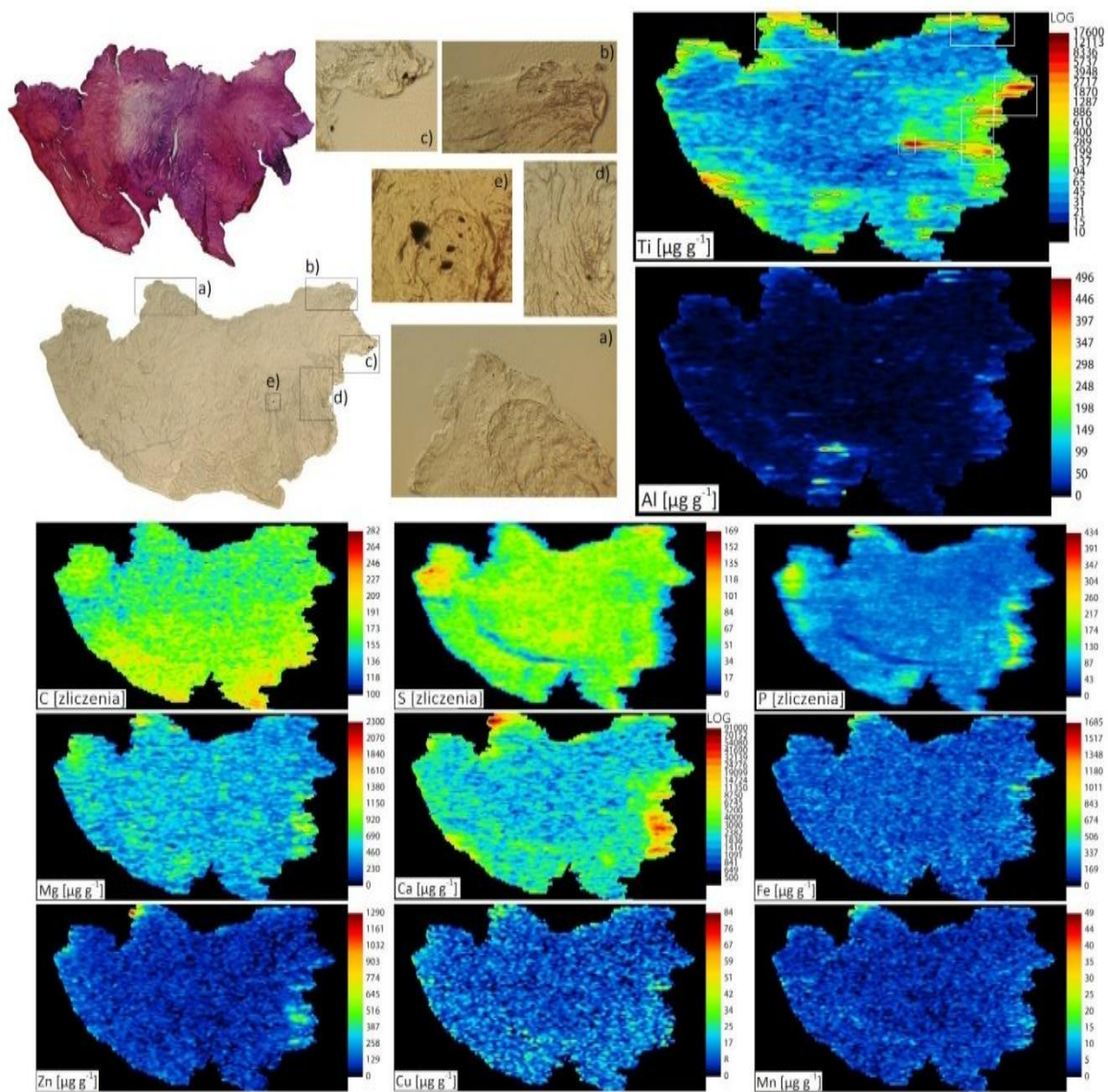
Rysunek 56 Fotografia i mapy zawartości Ti, Al, Mg, Ca, Fe, Zn, Cu, Mn i mapy rozmieszczenia C, S i P na powierzchni tkanki z grupy kontrolnej – procedura nr 3



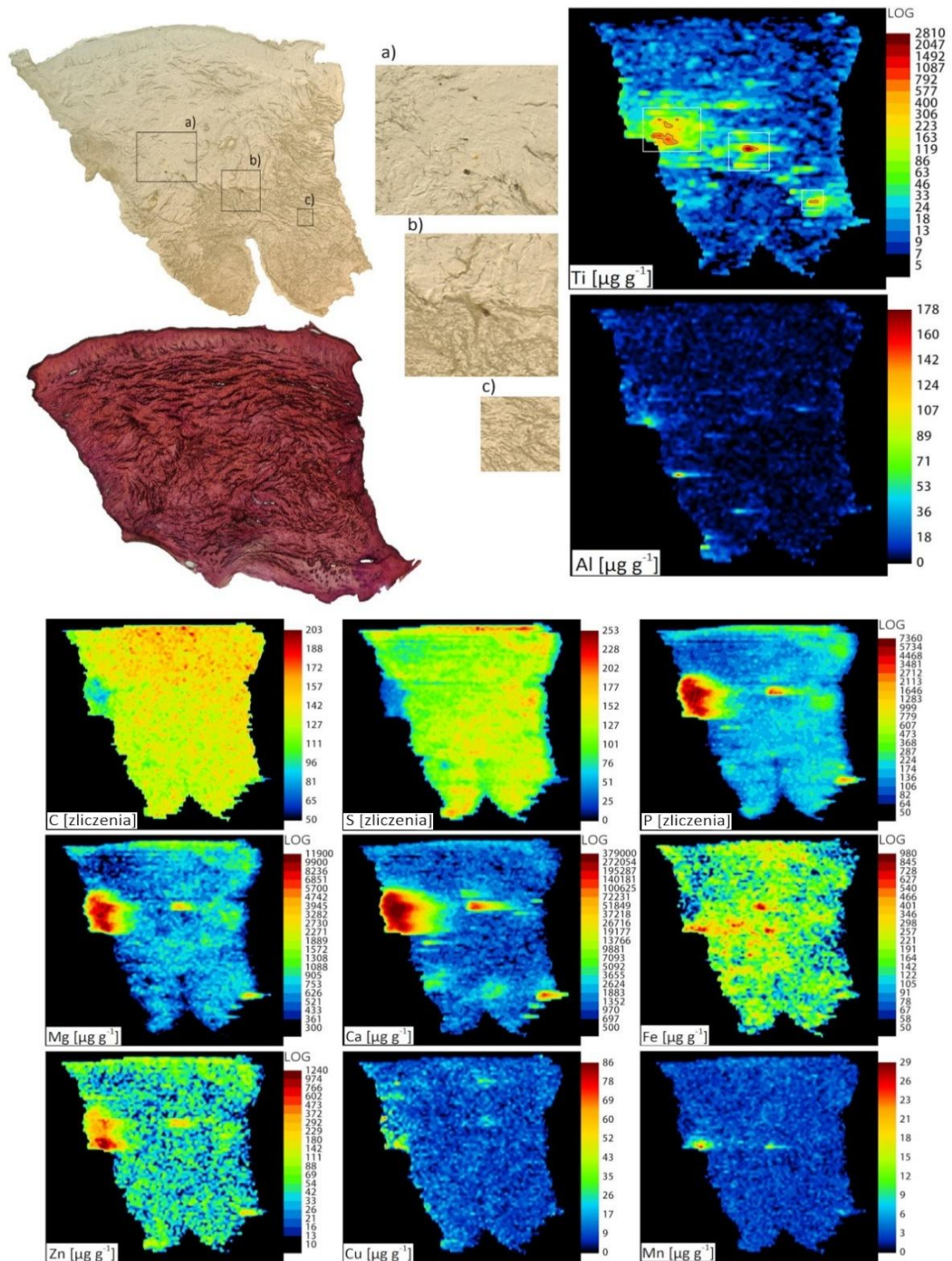
Rysunek 57 Fotografia i mapy zawartości Ti, Al, Mg, Ca, Fe, Zn, Cu, Mn i mapy rozmieszczenia C, S i P na powierzchni tkanki z grupy kontrolnej – procedura nr 3. Zaprezentowano fotografię tkanki po barwieniu metodą HE

Na rysunkach 58 - 61 przedstawiono wyniki analiz fragmentów tkanek, mających kontakt z implantami, pobranych od pacjentów. Podobnie jak przy poprzednich procedurach, mapy zawartości Ti i Al w błonie śluzowej jamy ustnej u pacjentów po implantacji wykazały podwyższoną zawartość analitów, zwykle na krawędziach analizowanego fragmentu tkanki. Zmierzone sygnały charakteryzują się wysoką intensywnością i znajdują się w miejscach o małym obszarze, często o szerokości pojedynczej linii ablacyjnej. Obserwuje się efekt ogonowania w kierunku skanowania wiązki lasera, który powstaje wskutek szybkiej zmiany zawartości analitów na bardzo małych powierzchniach. Wyjaśnieniem powyższych efektów, podobnie jak to było w powyżej prezentowanych wynikach, jest obecność cząstek metalicznych pochodzących z implantów i uwalnianych podczas zabiegu umieszczania implantu w ciele pacjenta, a także w wyniku korozji elektrochemicznej. Wysoka zawartość Al w analizowanych próbkach jest spowodowana obecnością mikroskopijnych ziaren  $Al_2O_3$ , stosowanych do piaskowania wszczepu śródkostnego.  $Al_2O_3$  pozostaje w porach i szczelinach implantu o wymiarach  $\mu m$  i mniejszych, i może być uwalniany do tkanek podczas implantacji wraz z drobinami tytanu.

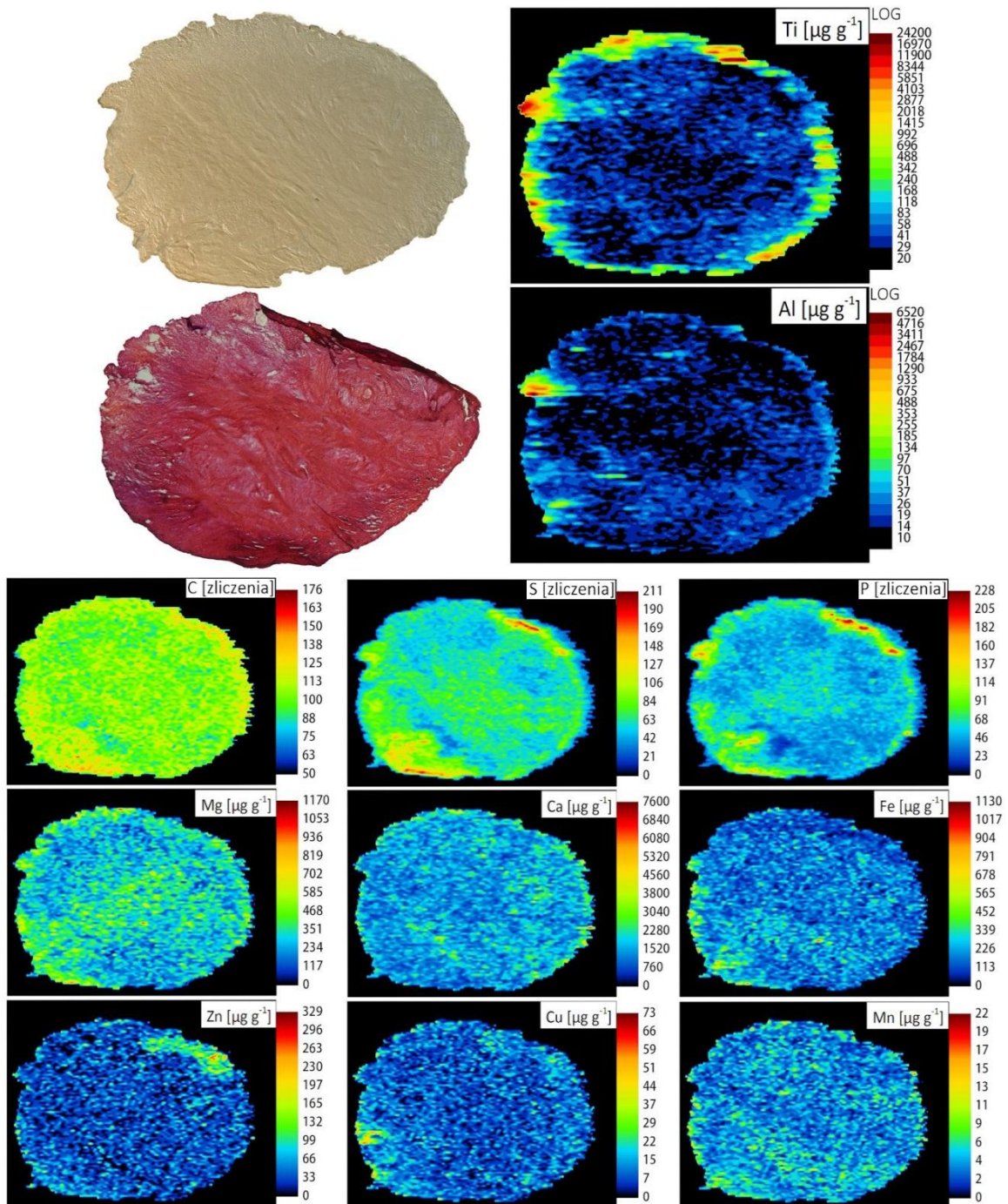
Na rysunkach 58 i 59 wyraźnie widoczne są drobinny metaliczne, zaprezentowane dodatkowo w powiększeniu na zdjęciach wykonanych z użyciem mikroskopu optycznego. Pozycje drobin na fotografii (oznaczone czarnymi prostokątami) dobrze korelują ze zmierzonymi sygnałami Ti (zaznaczonymi na mapie białymi prostokątami). Rozmieszczenie pierwiastków budulcowych (C, S, P) na mapach jest w przybliżeniu homogeniczne we wszystkich analizowanych próbkach, natomiast rozkład pierwiastków fizjologicznych (Mg, Ca, Fe, Zn, Cu, Mn) jest zmienny. Przyczyną powyższej obserwacji może być pochodzenie próbek od różnych pacjentów, miejsce pobrania (głębokość nacięcia tkanki) oraz stopień keratynizacji tkanki. Na rysunkach 58 i 59 w analizowanych próbkach błony śluzowej jamy ustnej zarejestrowano lokalnie wysokie sygnały Ca, Mg i P o bardzo ostrych krawędziach i nieregularnym kształcie. Obszary o podwyższonej zawartości Ca i P (i w mniejszym stopniu Mg) mają szerokość rzędu od dziesiątek do setek  $\mu m$  i znajdują się zwykle na krawędziach tkanki. Sygnały te zostały zmierzone wyłącznie w próbkach pobranych od pacjentów po implantacji. Przyczyną powyższych sygnałów mogą być mikroskopijnej wielkości fragmenty i odłamki kości, pozostałe w ciele pacjenta po wierceniu otworu pod implant. Podwyższona zawartość Mg została zmierzona równocześnie z Ca i P, które są obecne w dużych ilościach w tkance kostnej. Ponadto, podwyższone ilości Zn zostały zaobserwowane w tych samych obszarach co Ca, P i Mg. Dla porównania, zawartości P, Ca, Mg i Zn w kościach, według danych literaturowych, wynoszą odpowiednio  $79,7 \text{ g kg}^{-1}$ ,  $183 \text{ g kg}^{-1}$ ,  $2137 \text{ mg kg}^{-1}$  i  $90 \text{ mg kg}^{-1}$  [155].



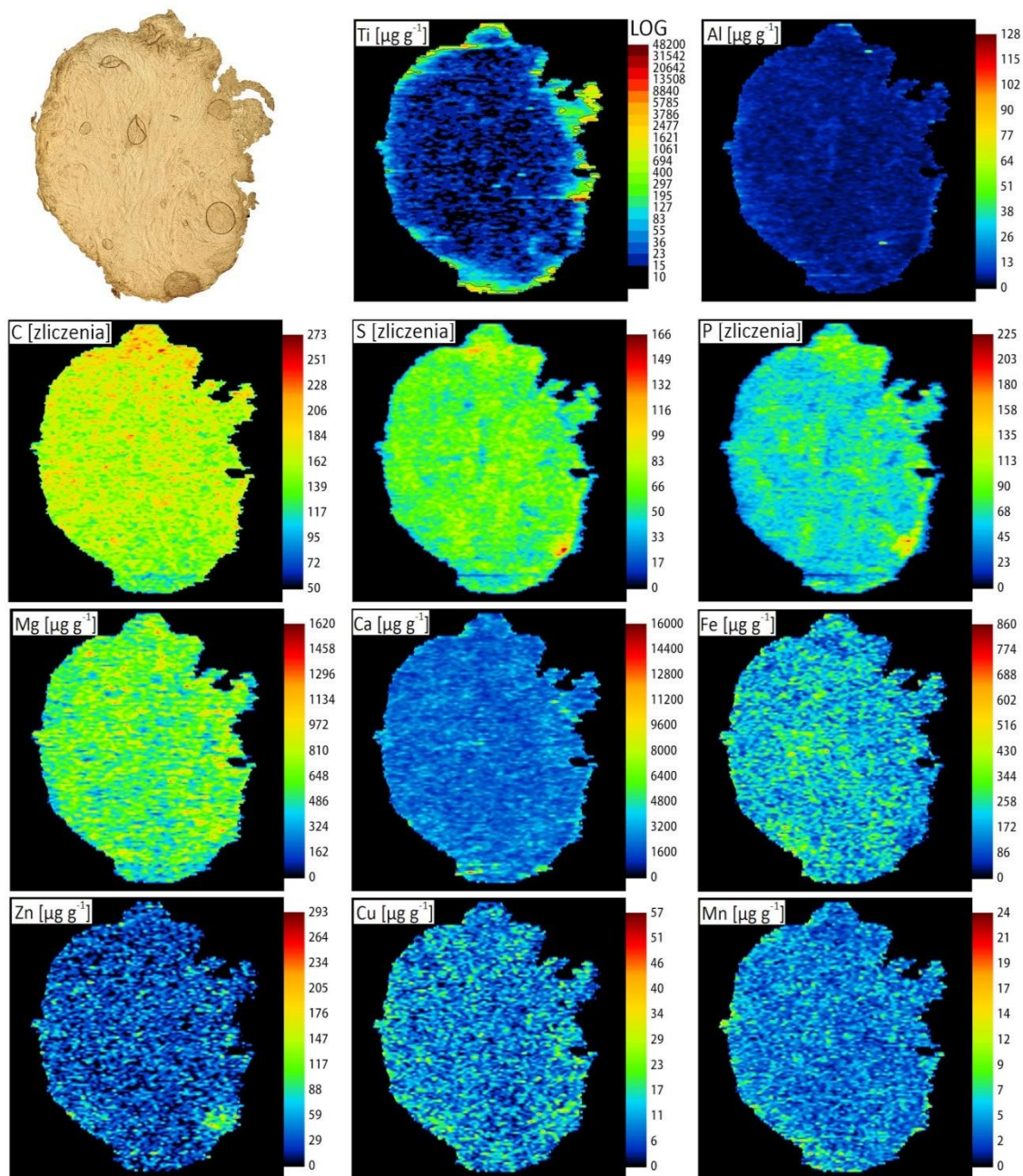
Rysunek 58 Fotografia i mapy zawartości Ti, Al, Mg, Ca, Fe, Zn, Cu, Mn i mapy rozmieszczenia C, S i P na powierzchni błony śluzowej pobranej od pacjenta, u którego zastosowano wszczep śródkostny i śrubę zamykającą wykonane z czystego Ti – procedura nr 3. Zaprezentowano fotografię tkanki po barwieniu metodą HE oraz powiększone fragmenty fotografii, na których znajdują się drobinny metaliczne. Na mapach P, Ca, Mg i Zn zaobserwowano sygnały mogące pochodzić od fragmentów kości



Rysunek 59 Fotografia i mapy zawartości Ti, Al, Mg, Ca, Fe, Zn, Cu, Mn i mapy rozmieszczenia C, S i P na powierzchni błony śluzowej pobranej od pacjenta, u którego zastosowano wszczep śródkostny i śrubę zamykającą wykonane z czystego Ti – procedura nr 3. Zaprezentowano fotografię tkanki po barwieniu metodą HE oraz powiększone fragmenty fotografii, na których znajdują się drobiny metaliczne. Na mapach P, Ca, Mg i Zn zaobserwowano sygnały mogące pochodzić od fragmentów kości



Rysunek 60 Fotografia i mapy zawartości Ti, Al, Mg, Ca, Fe, Zn, Cu, Mn i mapy rozmieszczenia C, S i P na powierzchni błony śluzowej pobranej od pacjenta, u którego zastosowano wszczep śródkostny i śrubę zamykającą wykonane z czystego Ti – procedura nr 3. Zaprezentowano fotografię tkanki po barwieniu metodą HE.



Rysunek 61 Fotografia i mapy zawartości Ti, Al, Mg, Ca, Fe, Zn, Cu, Mn i mapy rozmieszczenia C, S i P na powierzchni błony śluzowej pobranej od pacjenta, u którego zastosowano wszczep śródkostny i śrubę zamykającą wykonane z czystego Ti – procedura nr 3

## 8. Podsumowanie i wnioski

Warunkiem prawidłowego funkcjonowania organizmu jest zachowanie homeostazy. Dotyczy to również usuwania substancji obcych, ksenobiotyków, które mogą oddziaływać toksycznie na organizm. Błony śluzowe wyścielają wiele organów i stanowią pierwszą barierę ochronną przed ksenobiotykami i urazami mechanicznymi dla głębiej położonych tkanek i narządów. Ich warstwowa budowa i szybkie tempo regeneracji umożliwia sprawne pozbywanie się większości substancji niepożądanych w organizmie. Błona śluzowa jamy ustnej jest szczególnie narażona na obecność rozmaitych substancji obcych w wyniku kontaktu z różnorodnymi produktami spożywanymi na co dzień oraz stosowanymi w leczeniu stomatologicznym, jak wypełnienia czy implanty.

Implanty stomatologiczne stosowane są w celu leczenia ubytków w uzębieniu. Najczęściej stosuje się implanty tytanowe ze względu na dobre właściwości mechaniczne, wysoką odporność na korozję i dobrą biokompatybilność. Jednakże, implanty mogą ulegać powolnej degradacji w wyniku działania sił mechanicznych i kontaktu ze środowiskiem jamy ustnej, uwalniając jony i cząstki metaliczne do okolicznych tkanek. Zwiększona zawartość pierwiastków metalicznych w organizmie pacjenta może być przyczyną niepożądanych reakcji, takich jak alergie, stany zapalne, zatrucia czy odrzucenie implantu.

Aby zbadać jaki wpływ na okoliczne tkanki wywierają implanty konieczne może być nie tylko ilościowe określenie w nich zawartości pierwiastków pochodzących z implantu, ale także poznanie przestrzennego rozmieszczenia analitów na powierzchni tkanki oraz stwierdzenie formy występowania pierwiastków. Ponadto otrzymywane wyniki powinny być miarodajne i muszą opierać się na prawidłowo opracowanej procedurze przygotowania i pomiarów próbki i wzorców, z uwzględnieniem zasad metrologii chemicznej oraz z zastosowaniem zwalidowanych metod opartych na analizie CRMów zapewniającymi spójność pomiarową wyników pomiarów próbki badanej. Do takich metod należy zastosowana w przedstawionych badaniach w pracy doktorskiej zaawansowana technika analityczna ablacja laserowa z detekcją ICP-MS. Pozwala ona na wizualizację rozmieszczenia analitów na powierzchni badanej próbki, poprzez mapowanie pierwiastków w sposób ilościowy. W niniejszej dysertacji przedstawiono najważniejsze wyniki badań, a także osiągnięcia z uwzględnieniem tych, które zawierały elementy nowości naukowej. Uzyskane wyniki podsumowano w punktach wyszczególnionych poniżej:

1. Ustalono warunki fizykochemiczne ablacji laserowej w celu uzyskania stabilnych w czasie sygnałów o dużej intensywności i niskich wartościach odchylenia standardowego w analizie klinicznych tkanek miękkich. Efekty optymalizacji zostały zweryfikowane poprzez pomiar głębokości i szerokości ścieżek poablacyjnych technikami SEM i profilometrii optycznej. Zmodyfikowana została standardowa komora ablacyjna, dzięki czemu usprawniono czasy wymywania aerozolu próbki z komory, co poprawiło jakość uzyskiwanych map;
2. Opracowano nowe homogeniczne i dopasowane matrycowo wzorce stałe w postaci tabletek i cienkich plastrów wykorzystując: (a) sprasowany certyfikowany materiał odniesienia, wzbogacony roztworem wzorcowym oznaczanych analitów; matrycę stanowiła mieszanina CRMu i żelatyny (ii) stały materiał dopasowany matrycowo do analizowanych próbek, wzbogacony roztworem wzorcowym - sproszkowane białko jaja kurzego z dodatkiem środka powierzchniowo czynnego. Zgodnie z literaturą naukową, powyższe mieszaniny materiałów matrycowych zostały po raz pierwszy użyte w celu stworzenia wzorców dopasowanych matrycowo w analizie metodą LA-ICP-MS;
3. Zaproponowano strategię kalibracji, wyznaczono krzywe kalibracyjne oznaczania *in situ* pierwiastków w tkankach miękkich ustrojowych (błona śluzowa jamy ustnej). Efektem tych prac było uzyskanie stabilnych sygnałów analitycznych oznaczanych pierwiastków i wysoka precyzja oznaczeń. Jest to pierwsza praca, w której oznaczone były jednocześnie trzy pierwiastki pochodzące z implantów (Ti, Al, V) oraz fizjologiczne (Ca, Mg, Fe, Mn, Cu, Zn) na powierzchni błony śluzowej jamy ustnej;
4. W celu kompensacji interferencji niespektralnych podczas oznaczania pierwiastków *in situ* w tkankach miękkich sprawdzono przydatność czterech izotopów potencjalnych wzorców wewnętrznych –  $^{13}\text{C}$ ,  $^{26}\text{Mg}$ ,  $^{34}\text{S}$  i  $^{43}\text{Ca}$ . Zastosowano wzorzec wewnętrzny, izotop  $^{34}\text{S}$ , który odznaczał się homogenicznym rozmieszczeniem w próbce i poprawiał precyzję sygnałów mierzonych pierwiastków. Zgodnie z literaturą naukową, jest to pierwsza praca, w której do analizy miękkich tkanek klinicznych użyty został izotop siarki jako wzorzec wewnętrzny;
5. Ważnym etapem badań było zapewnienie jakości wyników analitycznych poprzez wprowadzenie zasad metrologii. Procedury analityczne zostały zwalidowane poprzez wyznaczenie parametrów metody: liniowość krzywych kalibracyjnych, granice wykrywalności, precyzja, poprawność i odzyski dodatku analitu. Spójność wyników

pomiarów z wzorcami wyższego rzędu została ustalona stosując CRMy i dodatek roztworu analitów, opatrzonych certyfikatem zapewniającym spójność pomiarową, oraz poprzez analizę metodą odniesienia (SN-ICP-MS) wzorców stałych, po przekształceniu ich do postaci roztworu na drodze mineralizacji;

6. Zaprojektowano i przygotowano trzy nowe procedury analityczne umożliwiające oznaczanie zawartości pierwiastków *in situ* na powierzchni próbki stałej w całości, czyli w postaci, w jakiej została pobrana od pacjenta, oraz po cięciu kriomikrotomem na cienkie plastry. Ponadto, każda z procedur różni się zastosowanymi parametrami systemu ablacji laserowej i detekcji ICP-MS, oferując różne wartości parametrów metody analitycznej oraz generując obrazy o określonej rozdzielczości, w zależności od wybranej procedury;
7. Uzyskano mapy rozmieszczenia i zawartości analizowanych pierwiastków pochodzących z implantów i fizjologicznych na powierzchni tkanek mających kontakt z implantami. Analizie poddano 20 tkanek, w tym 4 tkanki pobrane przed implantacją, stanowiące grupę kontrolną. We wszystkich tkankach po implantacji stwierdzono zwiększoną zawartość tytanu, stanowiącego główny składnik implantów, oraz zwiększoną zawartość glinu i wanadu, jeżeli w implantach zastosowano stop Ti6Al4V. Na powierzchni tkanek stwierdzono obecność dużej ilości drobin metalicznych, co potwierdzono dodatkowo stosując mikroskop optyczny, będących pozostałością po zabiegu implantacji lub mogących uwalniać się z implantu w wyniku użytkowania i kontaktu ze środowiskiem jamy ustnej.

Podsumowując, badania podstawowe i interdyscyplinarne przedstawione w rozprawie doktorskiej związane były z rozwojem nowej zaawansowanej metody analitycznej, LA-ICP-MS, a poprzez współpracę ze stomatologami możliwe było praktyczne zastosowanie zaprojektowanych metod do wizualizacji rozmieszczenia i zawartości pierwiastków znajdujących się na powierzchni tkanek miękkich pobranych od pacjentów. Badania nad opracowaniem i wdrożeniem procedur analitycznych w niniejszej dysertacji, przeprowadzone zgodnie z zasadami metrologii w chemii, uzupełniają lukę i wzbogacają wiedzę dotyczącą możliwości uzyskania miarodajnych wyników, co jest niezwykle istotne w badaniach związanym ze zdrowiem ludzi. Ze względu na interdyscyplinarny charakter pracy dostarcza ona wiedzy wartościowej zarówno dla chemików analityków, jak również dla naukowców z dziedziny stomatologii.

## Literatura

- [1] M. Nelms, *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry Handbook*, Blackwell Publishing Ltd., Oxford, UK, 2005. doi:10.1002/9781444305463.
- [2] J.R. Dean, *PRACTICAL INDUCTIVELY COUPLED PLASMA SPECTROSCOPY*, John Wiley & Sons Ltd, 2005.
- [3] M. Jarošová, D. Walaszek, B. Wagner, D. Milde, E. Bulska, Influence of temperature on laser ablation fractionation during ICP-MS analysis for 213 nm and 266 nm laser wavelength micro-sampling, *J. Anal. At. Spectrom.* 31 (2016) 2089–2093. doi:10.1039/C6JA00182C.
- [4] R. Russo, Laser ablation in analytical chemistry—a review, *Talanta.* 57 (2002) 425–451. doi:10.1016/S0039-9140(02)00053-X.
- [5] Diane Beauchemin, D. Matthews, *The Encyclopedia of Mass Spectrometry. Vol. 5 Elemental and Isotope Ratio Mass Spectrometry*, Elsevier Science, 2010.
- [6] R. Glaus, J. Koch, D. Günther, Portable laser ablation sampling device for elemental fingerprinting of objects outside the laboratory with laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry, *Anal. Chem.* 84 (2012) 5358–5364. doi:10.1021/ac3008626.
- [7] S.S. Harilal, J.R. Freeman, P.K. Diwakar, A. Hassanein, *Laser-Induced Breakdown Spectroscopy*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2014. doi:10.1007/978-3-642-45085-3.
- [8] A.S. Darke, F.J. Tyson, Interaction of laser radiation with solid materials and its significance to analytical spectrometry. A review, *J. Anal. At. Spectrom.* 8 (1993) 145–209. doi:10.1039/ja9930800145.
- [9] S.J. Hill, *Inductively Coupled Plasma Spectrometry and its Applications*, Blackwell Publishing, 2007. doi:10.1002/9780470988794.
- [10] M. Guillong, H.R. Kuhn, D. Günther, Application of a particle separation device to reduce inductively coupled plasma-enhanced elemental fractionation in laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry, *Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc.* 58 (2003) 211–220. doi:10.1016/S0584-8547(02)00257-4.
- [11] R.S. Houk, Mass spectrometry of inductively coupled plasmas, *Anal. Chem.* 58 (1986) 97A–105A.
- [12] Polska Norma, PN-ISO (PN-EN-ISO) 17294-1:2003. Jakość wody - Zastosowanie spektrometrii mas z plazmą wzbudzoną indukcyjnie (ICP-MS) – Część 1: Wytyczne ogólne.
- [13] R. Thomas, *Practical Guide to ICP-MS. A tutorial for beginners*, Taylor & Francis Group, LLC, 2013.
- [14] G. Audi, A.H. Wapstra, Table of Isotopic Masses and Natural Abundances, *Nucl. Phys. A.* 565 (1993) 1–65.
- [15] T.W. May, R.H. Wiedmeyer, M. Chaudhary-webb, D.C. Paschal, W.C. Elliott, H.P. Hopkins, a M. Ghazi, B.C. Ting, I. Romieu, O. Vicente, E. Pelfort, L. Martinez, R. Olsina, E. Marchevsky, H.P. Chen, D.T. Miller, J.C. Morrow, A table of polyatomic interferences in ICP-MS, *At. Spectrosc.* 19 (1998) 150–155.
- [16] R.E. Russo, X. Mao, J.J. Gonzalez, V. Zorba, J. Yoo, Laser ablation in analytical chemistry, *Anal. Chem.* 85 (2013) 6162–6177. doi:10.1021/ac4005327.
- [17] D.A. Frick, D. Günther, Fundamental studies on the ablation behaviour of carbon in LA-ICP-

- MS with respect to the suitability as internal standard, *J. Anal. At. Spectrom.* 27 (2012) 1294. doi:10.1039/c2ja30072a.
- [18] D. Günther, S.E. Jackson, H.P. Longerich, Laser ablation and arc r spark solid sample introduction into inductively coupled plasma mass spectrometers, 54 (1999) 381-409. doi:10.1016/S0584-8547(99)00011-7.
- [19] A. Hanć, A. Olszewska, D. Barańkiewicz, Quantitative analysis of elements migration in human teeth with and without filling using LA-ICP-MS, *Microchem. J.* 110 (2013) 61–69. doi:10.1016/j.microc.2013.02.006.
- [20] M. Kępa, T. Kozłowski, K. Szostek, A. Drozd, S. Walas, H. Mrowiec, B. Stepańczak, H. Głąb, M. Grupa, Analysis of mercury levels in historical bone material from syphilitic subjects – pilot studies (short report), *Anthropol. Anzeiger.* 69 (2012) 367–377. doi:10.1127/0003-5548/2012/0163.
- [21] A.T. Phung, W. Baeyens, M. Leermakers, S. Goderis, F. Vanhaecke, Y. Gao, Reproducibility of laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry (LA-ICP-MS) measurements in mussel shells and comparison with micro-drill sampling and solution ICP-MS, *Talanta.* 115 (2013) 6–14. doi:10.1016/j.talanta.2013.04.019.
- [22] P. Cheajesadagul, W. Wananukul, A. Siripinyanond, J. Shioatana, Metal doped keratin film standard for LA-ICP-MS determination of lead in hair samples, *J. Anal. At. Spectrom.* 26 (2011) 493–498. doi:10.1039/C0JA00082E.
- [23] I. Rodushkin, M.D. Axelsson, Application of double focusing sector field ICP-MS for multielemental characterization of human hair and nails. Part III. Direct analysis by laser ablation, *Sci. Total Environ.* 305 (2003) 23–39. doi:10.1016/S0048-9697(02)00463-1.
- [24] A. Hanć, P. Zduniak, K. Erciyas-Yavuz, A. Sajnóg, D. Barańkiewicz, Laser ablation-ICP-MS in search of element pattern in feathers, *Microchem. J.* 134 (2017) 1–8. doi:10.1016/j.microc.2017.04.043.
- [25] A. Hanć, A. Piechalak, B. Tomaszewska, D. Barańkiewicz, Laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry in quantitative analysis and imaging of plant's thin sections, *Int. J. Mass Spectrom.* 363 (2014) 16–22. doi:10.1016/j.ijms.2014.01.020.
- [26] A. Hanć, D. Barańkiewicz, A. Piechalak, B. Tomaszewska, B. Wagner, E. Bulska, An analysis of long-distance root to leaf transport of lead in *Pisum sativum* plants by laser ablation-ICP-MS, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 89 (2009) 651–659. doi:10.1080/03067310802559366.
- [27] A. Hanć, I. Komorowicz, M. Iskra, W. Majewski, D. Barańkiewicz, Application of spectroscopic techniques: ICP-OES, LA-ICP-MS and chemometric methods for studying the relationships between trace elements in clinical samples from patients with atherosclerosis obliterans, *Anal. Bioanal. Chem.* 399 (2011) 3221–3231. doi:10.1007/s00216-011-4729-5.
- [28] C. Austin, F. Fryer, J. Lear, D. Bishop, D. Hare, T. Rawling, L. Kirkup, A. McDonagh, P. Doble, Factors affecting internal standard selection for quantitative elemental bio-imaging of soft tissues by LA-ICP-MS, *J. Anal. At. Spectrom.* 26 (2011) 1494. doi:10.1039/c0ja00267d.
- [29] N. Miliszkiewicz, S. Walas, A. Tobiasz, Current approaches to calibration of LA-ICP-MS analysis, *J. Anal. At. Spectrom.* 30 (2015) 327–338. doi:10.1039/C4JA00325J.
- [30] D. Hare, C. Austin, P. Doble, Quantification strategies for elemental imaging of biological samples using laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry, *Analyst.* 137 (2012) 1527. doi:10.1039/c2an15792f.
- [31] O. Reifschneider, C.A. Wehe, I. Raj, J. Ehmcke, G. Ciarimboli, M. Sperling, U. Karst, Quantitative bioimaging of platinum in polymer embedded mouse organs using laser ablation ICP-MS, *Metallomics.* 5 (2013) 1440. doi:10.1039/c3mt00147d.

- [32] C. O' Connor, B.L. Sharp, P. Evans, On-line additions of aqueous standards for calibration of laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry: theory and comparison of wet and dry plasma conditions, *J. Anal. At. Spectrom.* 21 (2006) 556. doi:10.1039/b600916f.
- [33] H.-J. Stärk, R. Wennrich, A new approach for calibration of laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry using thin layers of spiked agarose gels as references, *Anal. Bioanal. Chem.* 399 (2011) 2211–2217. doi:10.1007/s00216-010-4413-1.
- [34] A. Izmer, D. Gholap, K. De Houwer, F. Cuyckens, F. Vanhaecke, A pilot study on the use of laser ablation-ICP-mass spectrometry for assessing/mapping the distribution of a drug and its metabolites across the body compartments of rats, *J. Anal. At. Spectrom.* 27 (2012) 413. doi:10.1039/c2ja10343e.
- [35] C. Austin, D. Hare, T. Rawling, A.M. McDonagh, P. Doble, Quantification method for elemental bio-imaging by LA-ICP-MS using metal spiked PMMA films, *J. Anal. At. Spectrom.* 25 (2010) 722. doi:10.1039/b911316a.
- [36] M. Bonta, B. Hegedus, A. Limbeck, Application of dried-droplets deposited on pre-cut filter paper disks for quantitative LA-ICP-MS imaging of biologically relevant minor and trace elements in tissue samples, *Anal. Chim. Acta.* 908 (2016) 54–62. doi:10.1016/j.aca.2015.12.048.
- [37] M. Bonta, H. Lohninger, M. Marchetti-Deschmann, A. Limbeck, Application of gold thin-films for internal standardization in LA-ICP-MS imaging experiments, *Analyst.* 139 (2014) 1521. doi:10.1039/c3an01511d.
- [38] C. Pickhardt, A. V. Izmer, M. V. Zoriy, D. Schaumlöffel, J. Sabine Becker, On-line isotope dilution in laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry using a microflow nebulizer inserted in the laser ablation chamber, *Int. J. Mass Spectrom.* 248 (2006) 136–141. doi:10.1016/j.ijms.2005.11.001.
- [39] K. Jurowski, M. Szewczyk, W. Piekoszewski, M. Herman, B. Szewczyk, G. Nowak, S. Walas, N. Miliszkiwicz, A. Tobiasz, J. Dobrowolska-Iwanek, A standard sample preparation and calibration procedure for imaging zinc and magnesium in rats' brain tissue by laser ablation-inductively coupled plasma-time of flight-mass spectrometry, *J. Anal. At. Spectrom.* 29 (2014) 1425. doi:10.1039/C3JA50378J.
- [40] J. Draxler, A. Zitek, M. Meischel, S.E. Stranzl-Tschegg, B. Mingler, E. Martinelli, A.M. Weinberg, T. Prohaska, Regionalized quantitative LA-ICP-MS imaging of the biodegradation of magnesium alloys in bone tissue, *J. Anal. At. Spectrom.* 30 (2015) 2459–2468. doi:10.1039/C5JA00354G.
- [41] C. Köppen, O. Reifschneider, I. Castanheira, M. Sperling, U. Karst, G. Ciarimboli, Quantitative imaging of platinum based on laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry to investigate toxic side effects of Cisplatin, *Metallomics.* 7 (2015) 1595–1603. doi:10.1039/C5MT00226E.
- [42] S. Böhme, H.J. Stärk, D. Kühnel, T. Reemtsma, Exploring LA-ICP-MS as a quantitative imaging technique to study nanoparticle uptake in *Daphnia magna* and zebrafish (*Danio rerio*) embryos, *Anal. Bioanal. Chem.* 407 (2015) 5477–5485. doi:10.1007/s00216-015-8720-4.
- [43] D.L. Hamilton, T.C. Hopkins, Preparation of Glasses for Use As Chemical Standards Involving the Coprecipitated Gel Technique, *Analyst.* 120 (1995) 1373–1377. doi:1995\_01CL\_17.
- [44] H. Sela, Z. Karpas, H. Cohen, Y. Zakon, Y. Zeiri, Preparation of stable standards of biological tissues for laser ablation analysis, *Int. J. Mass Spectrom.* 307 (2011) 142–148. doi:10.1016/j.ijms.2011.01.022.
- [45] M. Wang, L.-N. Zheng, B. Wang, H.-Q. Chen, Y.-L. Zhao, Z.-F. Chai, H.J. Reid, B.L. Sharp, W.-Y. Feng, Quantitative Analysis of Gold Nanoparticles in Single Cells by Laser Ablation Inductively

- Coupled Plasma-Mass Spectrometry, *Anal. Chem.* 86 (2014) 10252–10256. doi:10.1021/ac502438n.
- [46] M. Bonta, A. Limbeck, C.D. Quarles Jr, D. Oropeza, R.E. Russo, J.J. Gonzalez, A metric for evaluation of the image quality of chemical maps derived from LA-ICP-MS experiments, *J. Anal. At. Spectrom.* 30 (2015) 1809–1815. doi:10.1039/C5JA00056D.
- [47] M. Aramendía, L. Rello, F. Vanhaecke, M. Resano, Direct trace-elemental analysis of urine samples by laser ablation-inductively coupled plasma mass spectrometry after sample deposition on clinical filter papers, *Anal. Chem.* 84 (2012) 8682–8690. doi:10.1021/ac3018839.
- [48] U. Kumtabtim, A. Siripinyanond, C. Auray-Blais, A. Ntwari, J.S. Becker, Analysis of trace metals in single droplet of urine by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry, *Int. J. Mass Spectrom.* 307 (2011) 174–181. doi:10.1016/j.ijms.2011.01.030.
- [49] M. Aramendía, L. Rello, S. Bérail, A. Donnard, C. Pécheyran, M. Resano, Direct analysis of dried blood spots by femtosecond-laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry. Feasibility of split-flow laser ablation for simultaneous trace element and isotopic analysis, *J. Anal. At. Spectrom.* 30 (2015) 296–309. doi:10.1039/C4JA00313F.
- [50] H.F. Hsieh, W.S. Chang, Y.K. Hsieh, C.F. Wang, Using dried-droplet laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry to quantify multiple elements in whole blood, *Anal. Chim. Acta.* 699 (2011) 6–10. doi:10.1016/j.aca.2011.05.002.
- [51] J.S. Becker, M. V. Zoriy, C. Pickhardt, N. Palomero-Gallagher, K. Zilles, Imaging of copper, zinc, and other elements in thin section of human brain samples (hippocampus) by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry, *Anal. Chem.* 77 (2005) 3208–3216. doi:10.1021/ac040184q.
- [52] D. Pozebon, V.L. Dressler, M.F. Mesko, A. Matusch, J.S. Becker, Bioimaging of metals in thin mouse brain section by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry: novel online quantification strategy using aqueous standards, *J. Anal. At. Spectrom.* 25 (2010) 1739. doi:10.1039/c0ja00055h.
- [53] V.L. Dressler, D. Pozebon, M.F. Mesko, A. Matusch, U. Kumtabtim, B. Wu, J. Sabine Becker, Biomonitoring of essential and toxic metals in single hair using on-line solution-based calibration in laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry, *Talanta.* 82 (2010) 1770–1777. doi:10.1016/j.talanta.2010.07.065.
- [54] K.G. Heumann, Isotope-dilution ICP-MS for trace element determination and speciation: From a reference method to a routine method?, *Anal. Bioanal. Chem.* 378 (2004) 318–329. doi:10.1007/s00216-003-2325-z.
- [55] B. Fernández, F. Claverie, C. Pécheyran, J. Alexis, O.F.X. Donard, Direct determination of trace elements in powdered samples by in-cell isotope dilution femtosecond laser ablation ICPMS, *Anal. Chem.* 80 (2008) 6981–6994. doi:10.1021/ac800862p.
- [56] S.F. Boulyga, K.G. Heumann, Comparative LA-ICP-IDMS determinations of trace elements in powdered samples using laser ablation systems with low and high ablation rates, *J. Anal. At. Spectrom.* 19 (2004) 1501. doi:10.1039/b406586g.
- [57] M. Bonta, H. Lohninger, V. Laszlo, B. Hegedus, A. Limbeck, Quantitative LA-ICP-MS imaging of platinum in chemotherapy treated human malignant pleural mesothelioma samples using printed patterns as standard, *J. Anal. At. Spectrom.* 29 (2014) 2159–2167. doi:10.1039/C4JA00245H.
- [58] A. Sussulini, E. Wiener, T. Marnitz, B. Wu, B. Müller, B. Hamm, J. Sabine Becker, Quantitative imaging of the tissue contrast agent [Gd(DTPA)]<sup>2-</sup> in articular cartilage by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry, *Contrast Media Mol. Imaging.* 8 (2013) 204–

209. doi:10.1002/cmml.1509.
- [59] I. Rodushkin, M.D. Axelsson, Application of double focusing sector field ICP-MS for multielemental characterization of human hair and nails. Part I. Analytical methodology, *Sci. Total Environ.* 250 (2000) 83–100. doi:10.1016/S0048-9697(00)00369-7.
- [60] J.S. Becker, A. Matusch, B. Wu, Bioimaging mass spectrometry of trace elements - recent advance and applications of LA-ICP-MS: A review, *Anal. Chim. Acta.* 835 (2014) 1–18. doi:10.1016/j.aca.2014.04.048.
- [61] I. Konz, B. Fernández, M.L. Fernández, R. Pereiro, A. Sanz-Medel, Design and evaluation of a new Peltier-cooled laser ablation cell with on-sample temperature control, *Anal. Chim. Acta.* 809 (2014) 88–96. doi:10.1016/j.aca.2013.11.040.
- [62] C. Austin, D. Hare, A.L. Rozelle, W.H. Robinson, R. Grimm, P. Doble, Elemental bio-imaging of calcium phosphate crystal deposits in knee samples from arthritic patients, *Metallomics.* 1 (2009) 142. doi:10.1039/b901310p.
- [63] A. Sajnog, A. Hanć, K. Makuch, R. Koczorowski, D. Barańkiewicz, Study on quantitative analysis of Ti, Al and V in clinical soft tissues after placing the dental implants by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry, *Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc.* 125 (2016) 1–10. doi:10.1016/j.sab.2016.09.002.
- [64] A. Sajnog, A. Hanć, R. Koczorowski, D. Barańkiewicz, New procedure of quantitative mapping of Ti and Al released from dental implant and Mg, Ca, Fe, Zn, Cu, Mn as physiological elements in oral mucosa by LA-ICP-MS, *Talanta.* 175 (2017). doi:10.1016/j.talanta.2017.07.058.
- [65] H.-F. Hsieh, W.-S. Chang, Y.-K. Hsieh, C.-F. Wang, Lead determination in whole blood by laser ablation coupled with inductively coupled plasma mass spectrometry, *Talanta.* 79 (2009) 183–188. doi:10.1016/j.talanta.2009.03.027.
- [66] SemiSource 2006: A supplement to Semiconductor International. December 2005. Reference Section: How to Make a Chip. Adapted from Design News., (2005). <https://upload.wikimedia.org/wikiversity/en/5/55/1.Fabrication.20130218.pdf> (ostatnio otwarte 1.09.2017).
- [67] A. Matusch, A. Bauer, J.S. Becker, Element imaging in formalin fixed slices of human mesencephalon, *Int. J. Mass Spectrom.* 307 (2011) 240–244. doi:10.1016/j.ijms.2011.03.006.
- [68] D.J. Hare, J.K. Lee, A.D. Beavis, A. Van Gramberg, J. George, P.A. Adlard, D.I. Finkelstein, P.A. Doble, Three-dimensional atlas of iron, copper, and zinc in the mouse cerebrum and brainstem, *Anal. Chem.* 84 (2012) 3990–3997. doi:10.1021/ac300374x.
- [69] Ł. Budyńko, P. Waszaka, Poradnik Naukowy Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego 2015, (2015). [https://poradnik-naukowy.gumed.edu.pl/attachment/attachment/29059/Pomysl\\_Badanie\\_Publikacja\\_Poradnik\\_naukowy\\_dla\\_studentow\\_kierunkow\\_medycznych.pdf](https://poradnik-naukowy.gumed.edu.pl/attachment/attachment/29059/Pomysl_Badanie_Publikacja_Poradnik_naukowy_dla_studentow_kierunkow_medycznych.pdf) (ostatnio otwarte 1.09.2017).
- [70] Naczelna Izba Lekarska, Kodeks Etyki Lekarskiej. [http://www.nil.org.pl/\\_\\_data/assets/pdf\\_file/0003/4764/Kodeks-Etyki-Lekarskiej.pdf](http://www.nil.org.pl/__data/assets/pdf_file/0003/4764/Kodeks-Etyki-Lekarskiej.pdf) (ostatnio otwarte 7.09.2017).
- [71] Naczelna Izba Lekarska, Deklaracja Helsińska Światowego Stowarzyszenia Lekarzy (WMA). Etyczne zasady prowadzenia badań medycznych 2 z udziałem ludzi. [http://www.nil.org.pl/\\_\\_data/assets/pdf\\_file/0008/93248/Deklaracja-Helsinska-przyjeta-na-64-ZO-WMA\\_pazdziernik-2013\\_pelny-tekst.pdf](http://www.nil.org.pl/__data/assets/pdf_file/0008/93248/Deklaracja-Helsinska-przyjeta-na-64-ZO-WMA_pazdziernik-2013_pelny-tekst.pdf) (ostatnio otwarte 7.09.2017).
- [72] C.M. Abraham, A brief historical perspective on dental implants, their surface coatings and treatments., *Open Dent. J.* 8 (2014) 50–55. doi:10.2174/1874210601408010050.

- [73] M. McCracken, Dental Implant Materials: Commercially Pure Titanium and Titanium Alloys, *J. Prosthodont.* 8 (1999) 40–43. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10356553>.
- [74] Y. Okazaki, E. Gotoh, Comparison of metal release from various metallic biomaterials in vitro, *Biomaterials.* 26 (2005) 11–21. doi:10.1016/j.biomaterials.2004.02.005.
- [75] X. Wang, X. Meng, S. Chu, X. Xiang, Z. Liu, Osseointegration behavior of novel Ti – Nb – Zr – Ta – Si alloy for dental implants : an in vivo study *Biocompatibility Studies, J. Mater. Sci. Mater. Med.* (2016). doi:10.1007/s10856-016-5755-9.
- [76] K. Takahashi, N. Shiraishi, R. Ishiko-uzuka, T. Anada, O. Suzuki, Biomechanical Evaluation of Ti-Nb-Sn Alloy Implants with a Low Young's Modulus, (2015) 5779–5788. doi:10.3390/ijms16035779.
- [77] T. Rae, The biological response to titanium and titanium-aluminium-vanadium alloy particles, *Biomaterials.* 7 (1986) 30–36. doi:10.1016/0142-9612(86)90085-2.
- [78] T. Rae, The biological response to titanium and titanium-aluminium-vanadium alloy particles, *Biomaterials.* 7 (1986) 37–40. doi:10.1016/0142-9612(86)90086-4.
- [79] J.. Babbush, C.A., Hahn, J.A., Krauser, J.T., Rosenlicht, *Dental Implants: The Art and Science*, 2nd ed., Saunders, 2010.
- [80] B.W. Darvell, N. Samman, W.K. Luk, R.K.F. Clark, H. Tideman, Contamination of titanium castings by aluminium oxide blasting, *J. Dent.* 23 (1995) 319–322. doi:10.1016/0300-5712(94)00003-X.
- [81] X. Liu, P.K. Chu, C. Ding, Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications, *Mater. Sci. Eng. R Reports.* 47 (2004) 49–121. doi:10.1016/j.mser.2004.11.001.
- [82] S. Lee, B.T. Goh, S.H. Lai, H. Tideman, P.J.W. Stoelinga, J.A. Jansen, Peri-implant and systemic release of metallic elements following insertion of a mandibular modular endoprosthesis in *Macaca fascicularis*, *Acta Biomater.* 5 (2009) 3640–3646. doi:10.1016/j.actbio.2009.05.028.
- [83] T. Hanawa, Metal ion release from metal implants, 24 (2004) 745–752. doi:10.1016/j.msec.2004.08.018.
- [84] U. Kamachimudali, T.M. Sridhar, B. Raj, Corrosion of bio implants, *Sadhana.* 28 (2003) 601–637. doi:10.1007/BF02706450.
- [85] A. Sicilia, S. Cuesta, G. Coma, I. Arregui, C. Guisasaola, E. Ruiz, A. Maestro, Titanium allergy in dental implant patients: A clinical study on 1500 consecutive patients, *Clin. Oral Implants Res.* 19 (2008) 823–835. doi:10.1111/j.1600-0501.2008.01544.x.
- [86] H. Matusiewicz, Potential release of in vivo trace metals from metallic medical implants in the human body: From ions to nanoparticles - A systematic analytical review, *Acta Biomater.* 10 (2014) 2379–2403. doi:10.1016/j.actbio.2014.02.027.
- [87] L. Balcaen, E. Bolea-Fernandez, M. Resano, F. Vanhaecke, Accurate determination of ultra-trace levels of Ti in blood serum using ICP-MS/MS, *Anal. Chim. Acta.* 809 (2014) 1–8. doi:10.1016/j.aca.2013.10.017.
- [88] V. Stejskal, R. Hudecek, J. Stejskal, I. Sterzl, Diagnosis and treatment of metal-induced side-effects, *Neuroendocrinol. Lett.* 27 (2006) 7–16. doi:NEL270706A09 [pii].
- [89] K. Merritt, J.J. Rodrigo, Immune response to synthetic materials. Sensitization of patients receiving orthopaedic implants., *Clin. Orthop. Relat. Res.* (1996) 71–9. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8620661>.
- [90] G. Nordberg, B. Fowler, M. Nordberg, *Handbook on the Toxicology of Metals II Specific metals*, Elsevier, 2015.

- [91] J. Wang, Y. Hou, L. Dong, X. Niu, Y. Fan, Influence of TiO<sub>2</sub> nanoparticles on glutathione in rat synovial cell line RSC-364, in: 2013: pp. 75–78. doi:10.1007/978-3-642-29305-4\_21.
- [92] K.P. Lee, N.W. Henry, H.J. Trochimowicz, C.F. Reinhardt, Pulmonary response to impaired lung clearance in rats following excessive TiO<sub>2</sub> dust deposition, *Environ. Res.* 41 (1986) 144–167. doi:10.1016/S0013-9351(86)80177-3.
- [93] W. Seńczuk, *Toksykologia współczesna*, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa, 2012.
- [94] C.D. Klaassen, C. Asarett and D. Oull ' S Toxicology., The McGraw-Hill, 2008. doi:10.1036/0071470514.
- [95] W.A. Hayes, *Principles and methods of toxicology*, CRC Press Taylor & Francis Group, 2007.
- [96] D. Pozebon, V. Dressler, G.L. Scheffler, Recent applications of laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS) for biological sample analysis: a follow-up review, *J. Anal. At. Spectrom.* (2017) 890–919. doi:10.1039/C7JA00026J.
- [97] A. Sussulini, J.S. Becker, J.S. Becker, Laser ablation ICP-MS: Application in biomedical research, *Mass Spectrom. Rev.* 36 (2017) 47–57. doi:10.1002/mas.21481.
- [98] D. Pozebon, G.L. Scheffler, V.L. Dressler, M.A.G. Nunes, Review of the applications of laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS) to the analysis of biological samples, *J. Anal. At. Spectrom.* 29 (2014) 2204–2228. doi:10.1039/C4JA00250D.
- [99] A. Limbeck, P. Galler, M. Bonta, G. Bauer, W. Nischkauer, F. Vanhaecke, Recent advances in quantitative LA-ICP-MS analysis: Challenges and solutions in the life sciences and environmental chemistry ABC Highlights: Authored by Rising Stars and Top Experts, *Anal. Bioanal. Chem.* 407 (2015) 6593–6617. doi:10.1007/s00216-015-8858-0.
- [100] K. Jurowski, B. Buszewski, W. Piekoszewski, The analytical calibration in (bio)imaging/mapping of the metallic elements in biological samples - Definitions, nomenclature and strategies: State of the art, *Talanta.* 131 (2015) 273–285. doi:10.1016/j.talanta.2014.07.089.
- [101] J. Pisonero, B. Fernández, D. Günther, Critical revision of GD-MS, LA-ICP-MS and SIMS as inorganic mass spectrometric techniques for direct solid analysis, *J. Anal. At. Spectrom.* 24 (2009) 1145. doi:10.1039/b904698d.
- [102] M. V. Zoriy, M. Dehnhardt, G. Reifenberger, K. Zilles, J.S. Becker, Imaging of Cu, Zn, Pb and U in human brain tumor resections by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry, *Int. J. Mass Spectrom.* 257 (2006) 27–33. doi:10.1016/j.ijms.2006.06.005.
- [103] M. V. Zoriy, J.S. Becker, Imaging of elements in thin cross sections of human brain samples by LA-ICP-MS: A study on reproducibility, *Int. J. Mass Spectrom.* 264 (2007) 175–180. doi:10.1016/j.ijms.2007.04.009.
- [104] J. Dobrowolska, M. Dehnhardt, A. Matusch, M. Zoriy, N. Palomero-Gallagher, P. Koscielniak, K. Zilles, J.S. Becker, Quantitative imaging of zinc, copper and lead in three distinct regions of the human brain by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry, *Talanta.* 74 (2008) 717–723. doi:10.1016/j.talanta.2007.06.051.
- [105] J. Seuma, J. Bunch, A. Cox, C. McLeod, J. Bell, C. Murray, Combination of immunohistochemistry and laser ablation ICP mass spectrometry for imaging of cancer biomarkers, *Proteomics.* 8 (2008) 3775–3784. doi:10.1002/pmic.200800167.
- [106] D. Hare, S. Tolmachev, A. James, D. Bishop, C. Austin, F. Fryer, P. Doble, Elemental bio-imaging of thorium, uranium, and plutonium in tissues from occupationally exposed former nuclear workers, *Anal. Chem.* 82 (2010) 3176–3182. doi:10.1021/ac902650w.
- [107] I. Konz, B. Fernández, M.L. Fernández, R. Pereiro, H. González, L. Alvarez, M. Coca-Prados, A. Sanz-Medel, Gold internal standard correction for elemental imaging of soft tissue sections

- by LA-ICP-MS: Element distribution in eye microstructures, *Anal. Bioanal. Chem.* 405 (2013) 3091–3096. doi:10.1007/s00216-013-6778-4.
- [108] P. M-M, R. Weiskirchen, N. Gassler, A.K. Bosserhoff, J.S. Becker, Novel Bioimaging Techniques of Metals by Laser Ablation Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry for Diagnosis Of Fibrotic and Cirrhotic Liver Disorders, *PLoS One.* 8 (2013). doi:10.1371/journal.pone.0058702.
- [109] I. Konz, B. Fernández, M.L. Fernández, R. Pereiro, H. González-Iglesias, M. Coca-Prados, A. Sanz-Medel, Quantitative bioimaging of trace elements in the human lens by LA-ICP-MS, *Anal. Bioanal. Chem.* 406 (2014) 2343–2348. doi:10.1007/s00216-014-7617-y.
- [110] S.G. Boaru, U. Merle, R. Uerlings, A. Zimmermann, C. Flechtenmacher, C. Willheim, E. Eder, P. Ferenci, W. Stremmel, R. Weiskirchen, Laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry imaging of metals in experimental and clinical Wilson’s disease, *J. Cell. Mol. Med.* 19 (2015) 806–814. doi:10.1111/jcmm.12497.
- [111] M. Birka, K.S. Wentker, E. Lusmöller, B. Arheilger, C.A. Wehe, M. Sperling, R. Stadler, U. Karst, Diagnosis of Nephrogenic Systemic Fibrosis by means of Elemental Bioimaging and Speciation Analysis, *Anal. Chem.* 87 (2015) 3321–3328. doi:10.1021/ac504488k.
- [112] O. Reifschneider, C.L. Schütz, C. Brochhausen, G. Hampel, T. Ross, M. Sperling, U. Karst, Quantitative bioimaging of p-boronophenylalanine in thin liver tissue sections as a tool for treatment planning in boron neutron capture therapy, *Anal. Bioanal. Chem.* (2014) 2365–2371. doi:10.1007/s00216-014-8012-4.
- [113] D.P. Bishop, D. Clases, F. Fryer, E. Williams, S. Wilkins, D.J. Hare, N. Cole, U. Karst, P.A. Doble, Elemental bio-imaging using laser ablation-triple quadrupole-ICP-MS, *J. Anal. At. Spectrom.* 31 (2016) 197–202. doi:10.1039/C5JA00293A.
- [114] O. Hachmöller, M. Aichler, K. Schwamborn, L. Lutz, M. Werner, M. Sperling, A. Walch, U. Karst, Element bioimaging of liver needle biopsy specimens from patients with Wilson’s disease by laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry, *J. Trace Elem. Med. Biol.* 35 (2016) 97–102. doi:10.1016/j.jtemb.2016.02.001.
- [115] D.J. Hare, E.P. Raven, B.R. Roberts, M. Bogeski, S.D. Portbury, C.A. McLean, C.L. Masters, J.R. Connor, A.I. Bush, P.J. Crouch, P.A. Doble, Laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry imaging of white and gray matter iron distribution in Alzheimer’s disease frontal cortex, *Neuroimage.* 137 (2016) 124–131. doi:10.1016/j.neuroimage.2016.05.057.
- [116] H. Gonzalez Iglesias, C. Petrash, S.M. Rodríguez-Menéndez, M. Garcia, L. Alvarez, L. Fernández-Vega Cueto, B. Fernández, R. Pereiro, A. Sanz-Medel, M. Coca-Prados, Quantitative distribution of Zn, Fe and Cu in the human lens and study of the Zn-metallothionein redox system in cultured lens epithelial cells by elemental MS, *J. Anal. At. Spectrom.* (2017). doi:10.1039/C6JA00431H.
- [117] O. Hachmöller, A. Zibert, H. Zischka, M. Sperling, S.R. Groba, I. Grünwald, E. Wardelmann, H.H.J. Schmidt, H.J. Hartmut, Spatial investigation of the elemental distribution in Wilson’s disease liver after D-penicillamine treatment by LA-ICP-MS, *J. Trace Elem. Med. Biol.* 44 (2017) 26–31. doi:10.1016/j.jtemb.2017.05.008.
- [118] A. Mohamad Ghazi, S. Shuttleworth, S.J. Angulo, D.H. Pashley, New applications for laser ablation high resolution ICPMS (LA-HR-ICP-MS): Quantitative measurements of gallium diffusion across human root dentin, *J. Anal. At. Spectrom.* 15 (2000) 1335–1341. doi:10.1039/B001888K.
- [119] A. Mohamad Ghazi, S. Shuttleworth, R. Simmons, S.J. Paul, D.H. Pashley, Nanoleakage at the dentin adhesive interface: a new application for laser ablation-sector field-ICPMS, *J. Anal. At. Spectrom.* 17 (2002) 682–687. doi:10.1039/b200929n.

- [120] T. Uryu, J. Yoshinaga, Y. Yanagisawa, M. Endo, J. Takahashi, Analysis of lead in tooth enamel by laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry., *Anal. Sci.* 19 (2003) 1413–1416. doi:10.2116/analsci.19.1413.
- [121] M. Arora, B.J. Kennedy, S. Elhrou, N.J. Pearson, D.M. Walker, P. Bayl, S.W.Y. Chan, Spatial distribution of lead in human primary teeth as a biomarker of pre- and neonatal lead exposure, *Sci. Total Environ.* 371 (2006) 55–62. doi:10.1016/j.scitotenv.2006.07.035.
- [122] M. Arora, D. Hare, C. Austin, D.R. Smith, P. Doble, Spatial distribution of manganese in enamel and coronal dentine of human primary teeth, *Sci. Total Environ.* 409 (2011) 1315–1319. doi:10.1016/j.scitotenv.2010.12.018.
- [123] D. Hare, C. Austin, P. Doble, M. Arora, Elemental bio-imaging of trace elements in teeth using laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry, *J. Dent.* 39 (2011) 397–403. doi:10.1016/j.jdent.2011.03.004.
- [124] C. Austin, T.M. Smith, A. Bradman, K. Hinde, R. Joannes-Boyau, D. Bishop, D.J. Hare, P. Doble, B. Eskenazi, M. Arora, Barium distributions in teeth reveal early-life dietary transitions in primates, *Nature.* 498 (2013) 216–219. doi:10.1038/nature12169.
- [125] N. Charadram, C. Austin, P. Trimby, M. Simonian, M. V. Swain, N. Hunter, Structural analysis of reactionary dentin formed in response to polymicrobial invasion, *J. Struct. Biol.* 181 (2013) 207–222. doi:10.1016/j.jsb.2012.12.005.
- [126] M. Legrand, R. Lam, M. Jensen-Fontaine, E.D. Salin, H. Man Chan, Direct detection of mercury in single human hair strands by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS), *J. Anal. At. Spectrom.* 19 (2004) 1287. doi:10.1039/b406733a.
- [127] C. Stadlbauer, T. Prohaska, C. Reiter, A. Knaus, G. Stingeder, Time-resolved monitoring of heavy-metal intoxication in single hair by laser ablation ICP-DRCMS, *Anal. Bioanal. Chem.* 383 (2005) 500–508. doi:10.1007/s00216-005-3283-4.
- [128] E. Elish, Z. Karpas, A. Lorber, Determination of uranium concentration in a single hair strand by LAICPMS applying continuous and single pulse ablation, *J. Anal. At. Spectrom.* 22 (2007) 540. doi:10.1039/b617396a.
- [129] H. Sela, Z. Karpas, M. Zoriy, C. Pickhardt, J.S. Becker, Biomonitoring of hair samples by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS), *Int. J. Mass Spectrom.* 261 (2007) 199–207. doi:10.1016/j.ijms.2006.09.018.
- [130] D. Pozebon, V.L. Dressler, A. Matusch, J.S. Becker, Monitoring of platinum in a single hair by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS) after cisplatin treatment for cancer, *Int. J. Mass Spectrom.* 272 (2008) 57–62. doi:10.1016/j.ijms.2008.01.001.
- [131] K. Štěpánková, K. Novotný, M. Vašinová Galiová, V. Kanický, J. Kaiser, D.W. Hahn, Laser ablation methods for analysis of urinary calculi: Comparison study based on calibration pellets, *Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc.* 81 (2013) 43–49. doi:10.1016/j.sab.2012.12.009.
- [132] M. Vašinová Galiová, R. Čopjaková, R. Škoda, K. Štěpánková, M. Vaňková, J. Kuta, L. Prokeš, J. Kynický, V. Kanický, 2D elemental mapping of sections of human kidney stones using laser ablation inductively-coupled plasma-mass spectrometry: Possibilities and limitations, *Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc.* 100 (2014) 105–115. doi:10.1016/j.sab.2014.08.024.
- [133] M.V. Galiová, K. Štěpánková, R. Čopjaková, J. Kuta, L. Prokeš, J. Kynický, V. Kanický, Preparation and testing of phosphate, oxalate and uric acid matrix-matched standards for accurate quantification of 2D elemental distribution in kidney stone sections using 213 nm nanosecond laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry, *J. Anal. At.*

- Spectrom. 30 (2015) 1356–1368. doi:10.1039/C4JA00347K.
- [134] J. V. Cizdziel, Determination of lead in blood by laser ablation ICP-TOF-MS analysis of blood spotted and dried on filter paper: A feasibility study, *Anal. Bioanal. Chem.* 388 (2007) 603–611. doi:10.1007/s00216-007-1242-y.
- [135] W. Nischkauer, F. Vanhaecke, A. Limbeck, Self-aliquoting micro-grooves in combination with laser ablation-ICP-mass spectrometry for the analysis of challenging liquids: quantification of lead in whole blood, *Anal. Bioanal. Chem.* 408 (2016) 5671–5676. doi:10.1007/s00216-016-9717-3.
- [136] M. Resano, M. Aramendía, L. Rello, M.L. Calvo, S. Bérail, C. Pécheyran, Direct determination of Cu isotope ratios in dried urine spots by means of fs-LA-MC-ICPMS. Potential to diagnose Wilson’s disease, *J. Anal. At. Spectrom.* 28 (2013) 98–106. doi:10.1039/C2JA30262D.
- [137] U. Meyer, M. Bühner, A. Büchter, B. Kruse-Lösler, T. Stamm, H.P. Wiesmann, Fast element mapping of titanium wear around implants of different surface structures, *Clin. Oral Implants Res.* 17 (2006) 206–211. doi:10.1111/j.1600-0501.2005.01184.x.
- [138] B.K.B. Berkovitz, R.W.A. Linden, B.J. Moxham, A.J. Sloan, *Master Dentistry Volume 3: Oral Biology*, Churchill Livingstone Elsevier, 2011.
- [139] F. Thil, D. Blamart, C. Assailly, C.E. Lazareth, T. Leblanc, J. Butsher, E. Douville, Development of laser ablation multi-collector inductively coupled plasma mass spectrometry for boron isotopic measurement in marine biocarbonates: New improvements and application to a modern *Porites* coral, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 30 (2016) 359–371. doi:10.1002/rcm.7448.
- [140] A. Kötschau, G. Büchel, J.W. Einax, C. Fischer, W. Von Tümpling, D. Merten, Mapping of macro and micro elements in the leaves of sun flower ( *Helianthus annuus* ) by Laser Ablation – ICP – MS, *Microchem. J.* 110 (2013) 783–789. doi:10.1016/j.microc.2012.12.011.
- [141] M. Pakieła, M. Wojciechowski, B. Wagner, E. Bulska, A novel procedure of powdered samples immobilization and multi-point calibration of LA ICP MS, *J. Anal. At. Spectrom.* 26 (2011) 1539. doi:10.1039/c0ja00201a.
- [142] E. Bulska, P.D.P. Taylor, On the importance of metrology in chemistry, in: *New Horizons Challenges Environ. Anal. Monit.*, 2003: pp. 42–57.
- [143] E. Bulska, *Metrologia Chemiczna, MALAMUT*, Warszawa, 2008.
- [144] J. Namieśnik, P. Konieczka, B. Zygmunt, E. Bulska, A. Świtaj-Zawadka, M. Rompa, E. Kremer, A. Naganowska-Nowak, *Ocena i kontrola jakości wyników pomiarów analitycznych*, Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, Warszawa, 2007.
- [145] M. Belter, A. Sajnog, D. Barańkiewicz, Over a century of detection and quantification capabilities in analytical chemistry - Historical overview and trends, *Talanta.* 129 (2014) 606–616. doi:10.1016/j.talanta.2014.05.018.
- [146] M. Thompson, S.L.R. Ellison, R. Wood, Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report), *Pure Appl. Chem.* 74 (2002). doi:10.1351/pac200274050835.
- [147] Joint Committee For Guides In Metrology, *Vocabulaire international de métrologie, VIM3 Int. Vocab. Metrol.* 3 (2012) 104. doi:10.1016/0263-2241(85)90006-5.
- [148] Schemat budowy błony śluzowej jamy ustnej, [https://en.wikipedia.org/wiki/Oral\\_mucosa](https://en.wikipedia.org/wiki/Oral_mucosa) (ostatnio otwarte 05.09.2017).
- [149] F. Laurent, B. Grosgeat, L. Reclaru, F. Dalard, M. Lissac, Comparison of corrosion behaviour in presence of oral bacteria, *Biomaterials.* 22 (2001) 2273–2282. doi:10.1016/S0142-9612(00)00416-6.

- [150] L. Zhao, P.K. Chu, Y. Zhang, Z. Wu, Antibacterial coatings on titanium implants, *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* 91B (2009) 470–480. doi:10.1002/jbm.b.31463.
- [151] G. Voggenreiter, S. Leiting, H. Brauer, P. Leiting, M. Majetschak, M. Bardenheuer, U. Obertacke, Immuno-inflammatory tissue reaction to stainless-steel and titanium plates used for internal fixation of long bones, *Biomaterials.* 24 (2003) 247–254. doi:10.1016/S0142-9612(02)00312-5.
- [152] A.M. Ghazi, J.C. Wataha, N.L. O’Dell, B.B. Singh, R. Simmons, S. Shuttleworth, Quantitative concentration profiling of nickel in tissues around metal implants: a new biomedical application of laser ablation sector field ICP-MS, *J. Anal. At. Spectrom.* 17 (2002) 1295–1299. doi:10.1039/b201678h.
- [153] D.S. Urgast, D.G. Ellingsen, B. Berlinger, E. Eilertsen, G. Friisk, V. Skaug, Y. Thomassen, J.H. Beattie, I.S. Kwun, J. Feldmann, Multi-elemental bio-imaging of rat tissue from a study investigating the bioavailability of bismuth from shotgun pellets, *Anal. Bioanal. Chem.* 404 (2012) 89–99. doi:10.1007/s00216-012-6101-9.
- [154] F. Blaske, O. Reifschneider, G. Gosheger, C.A. Wehe, M. Sperling, U. Karst, G. Hauschild, S. Höll, Elemental bioimaging of nanosilver-coated prostheses using X-ray fluorescence spectroscopy and laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry, *Anal. Chem.* 86 (2014) 615–620. doi:10.1021/ac4028577.
- [155] V. Zaichick, Chemical elements of human bone tissue investigated by nuclear analytical and related methods, *Biol. Trace Elem. Res.* 153 (2013) 84–99. doi:10.1007/s12011-013-9661-4.

## Streszczenie

W rozprawie doktorskiej przedstawiono podsumowanie wyników badań prowadzonych w okresie 2014 – 2017 w ramach studium doktoranckiego. Prowadzone badania miały na celu opracowanie nowych procedur analitycznych pozwalających na ilościową analizę i wizualizację rozmieszczenia pierwiastków, będących składnikami implantów stomatologicznych, na powierzchni błony śluzowej jamy ustnej, przy użyciu metody LA-ICP-MS.

Intensywny rozwój technik analitycznych umożliwia uzyskanie coraz większej ilości informacji z badanego obiektu. Zasadniczo, w celu określenia zawartości pierwiastków, szczególnie na poziomie śladowym, próbkę stałą najpierw się mineralizuje, a następnie analizuje powstały roztwór technikami spektroskopowymi, jak np. SN-ICP-MS, ICP-OES czy AAS. Procedura mineralizacji prowadzi do utraty informacji o przestrzennym rozmieszczeniu i formie występowania pierwiastków w próbce, zapewniając jedynie uśrednioną zawartość analitu w całej masie próbki. Zastosowanie metody LA-ICP-MS pozwala na pomiar zawartości pierwiastków na powierzchni próbki stałej bez potrzeby mineralizacji próbki, generując przestrzenne mapy rozmieszczenia i zawartości analitów o rozdzielczości do 10  $\mu\text{m}$ . Metoda LA-ICP-MS umożliwia analizę próbek o małych wymiarach, rzędu kilku mm i wadze kilku miligramów, takich jak próbki kliniczne. Metoda charakteryzuje się dwuwymiarową analizą powierzchni lub profilu głębokości próbki stałej in-situ, zwykle minimalnym przygotowaniem próbki przed analizą, działaniem mikroniszczącym na próbkę oraz dobrymi wartościami czułości, precyzji i granicy wykrywalności. LA-ICP-MS jest metodą porównawczą, która opiera się na pomiarze sygnałów serii wzorców i ustaleniu zależności kalibracyjnej przed analizą właściwej próbki. Ze względu na brak wzorców i CRMów dedykowanych do analizy tkanek metodą LA-ICP-MS należy opracowywać i stosować alternatywne strategie kalibracji, tak aby warunki fizykochemiczne ablacji wzorców i badanej próbki były zbliżone, umożliwiając poprawną analizę ilościową próbek.

Przeprowadzone studia literaturowe mające na celu pogłębienie posiadanej wiedzy na temat bezpośredniej analizy próbek klinicznych metodą LA-ICP-MS ukazały szerokie możliwości zastosowania tej nowej zaawansowanej metody analitycznej w mapowaniu pierwiastków we fragmentach organów, badaniu mechanizmów chorobowych, oddziaływaniu materiałów protetycznych z otaczającą tkanką, transportem i miejscem działania leków. Jednocześnie pozwoliły zidentyfikować problemy pojawiające się podczas kreowania nowych procedur analitycznych, takie jak: opracowanie odpowiedniej strategii kalibracji tak, aby zapewnić zgodność wzorców i próbki

badanej, optymalizacja parametrów aparatury w celu uzyskania intensywnych sygnałów w określonym czasie generując mapy zawartości analitów o pożądanej rozdzielczości przestrzennej, zapewnienie jakości wyników pomiarów, co wymaga stosowania zwalidowanych procedur i zapewnienia spójności pomiarowej przy jednoczesnym braku odpowiednich CRMów i wzorców, dedykowanych metodzie LA-ICP-MS. W części literaturowej omówiono następujące zagadnienia: (i) podstawy fizykochemiczne metody LA-ICP-MS oraz możliwości i ograniczenia w analizie próbek stałych, takie jak interferencje, frakcjonowanie, konieczność opracowania indywidualnego podejścia do kalibracji, (ii) wybrane strategie kalibracji, (iii) aspekty analizy próbek klinicznych, (iv) przegląd literatury naukowej, w której do badań nad próbkami klinicznymi metodą LA-ICP-MS wdrożono zasady metrologii. W literaturze naukowej często brakuje elementów metrologii chemicznej w pomiarach lub całkowicie jest ona pomijana. Wprowadzenie metrologii w pomiarach chemicznych stanowi istotne i nieodłączne narzędzie umożliwiające uzyskanie miarodajnych i porównywalnych wyników analiz, których osiągnięcie jest możliwe poprzez przeprowadzenie walidacji procedury analitycznej, zapewnienie spójności pomiarowej do wzorca wyższego rzędu i jednostek układu SI oraz przedstawianie wyniku pomiaru wraz z niepewnością.

W części eksperymentalnej przedstawiono sposób opracowania trzech procedur analitycznych w celu uzyskania informacji o rozmieszczeniu i zawartości analizowanych pierwiastków na powierzchni badanych próbek metodą bezpośredniej analizy próbki stałej, LA-ICP-MS. Procedury różniły się sposobem przygotowania próbek i wzorców, zastosowanym materiałem matrycowym wzorców oraz parametrami wiązki laserowej. Do przygotowania wzorców użyto materiału matrycowego o składzie zbliżonym do badanych próbek błony śluzowej – sproszkowanego białka jaja kurzego oraz CRMu będącego sproszkowaną tkanką kormorana. Po dodaniu roztworu analitu uzyskano serię wzorców, które posłużyły do wykreślenia krzywych kalibracyjnych. Aparatura pomiarowa została zoptymalizowana pod kątem uzyskania sygnałów o wystarczającej intensywności, dobrej precyzji i umożliwiającej stworzenie map zawartości analitów na powierzchni próbki o zadowalającej rozdzielczości. Przeprowadzono walidację istotnych parametrów metody analitycznej, takich jak liniowość, granice wykrywalności, precyzję i poprawność, stosując CRMy na bazie mięśni ryb i wołowych. We wszystkich pomiarach zapewniono i wykazano spójność pomiarową poprzez zastosowanie CRMów i roztworów wzorcowych opatrzonych certyfikatem zapewniającym zachowanie spójności z wzorcami wyższego rzędu oraz analizę wzorców metodą odniesienia SN-ICP-MS, po poprzedniej mineralizacji.

Opracowaną i zwalidowaną procedurę analityczną zastosowano do analizy fragmentów błony śluzowej jamy ustnej mającej kontakt z implantami na bazie tytanu i stopu Ti6Al4V. Uzyskane dwuwymiarowe mapy zawartości pierwiastków będących składnikami elementów implantu (Ti, Al, V) wskazują jednoznacznie na obecność dużej ilości tych pierwiastków na powierzchni badanych tkanek. Zastosowanie procedur z wiązką laserową o zmniejszonej średnicy pozwoliło na poprawę rozdzielczości uzyskiwanych map, a zastosowanie mikroskopii optycznej umożliwiło wykonanie fotografii powierzchni tkanek. Wymienione narzędzia wskazały, że głównym źródłem wysokich sygnałów analizowanych pierwiastków są liczne drobiny metaliczne o wymiarach do ok. 100  $\mu\text{m}$ . Drobiny te są pozostałością po zabiegu implantacji lub uwalniają się podczas użytkowania implantu oraz w wyniku korozji implantu w zmiennym środowisku jamy ustnej.

## Summary

The doctoral dissertation summarizes the results of research conducted in the period 2014 - 2017 within the framework of the doctoral study. The research was aimed at the development of new analytical procedures allowing the quantitative analysis and visualization of the elements of dental implants on the surface of the oral mucosa by the LA-ICP-MS.

The intensive development of analytical techniques allows for obtaining increasing amounts of information from the examined object. Generally, in order to determine the contents of the elements, particularly at trace level, the solid sample is firstly digested and the resulting solution is then analyzed by spectroscopic techniques, such as SN-ICP-MS, ICP-OES, or AAS. Digestion procedure leads to the loss of information about the spatial distribution and form of the elements in the sample, providing only an average content of the analytes in the entire mass of the sample. Applying the LA-ICP-MS allows the measurement of the content of elements on the surface of a solid sample without the need for the digestion of the sample, generating a spatial map of the distribution and content of the analytes to a resolution of 10  $\mu\text{m}$ . The LA-ICP-MS method allows for the analysis of samples with small dimensions, of the order of several mm and a weight of a few milligrams, such as clinical samples. The method is characterized by a two-dimensional analysis of the surface or depth profile of the solid sample *in-situ*, usually minimal sample pretreatment, microdestructive effect on the sample and good values of sensitivity, precision and detection limits. LA-ICP-MS is a comparative method that is based on the measurement of signals for a series of solid standards and determining a calibration relationship between measured signals and content of elements in standards prior to the analysis of the actual sample. Due to the lack of standards and CRMs dedicated to the tissue analysis by LA-ICP-MS, alternative calibration strategies should be developed and applied to ensure that the physicochemical conditions of ablation of the sample and standards were similar, allowing for the correct quantitative analysis of samples.

The literature studies, aimed at deepening the knowledge on the direct analysis of clinical samples using LA-ICP-MS, showed broad application of this new advanced analytical method in the mapping of elements in the parts of human organs, the study of mechanisms of disease, impact of prosthetic materials on the surrounding tissue, transport and effect of drugs. As the result, they identified problems arising from the creation of new analytical procedures, such as: (i) the development of an appropriate calibration strategy to ensure that standards and samples are

matched, (ii) the optimization of instrumental parameters to achieve intense signals at a given time of data acquisition, (iii) generating maps of the content of analytes with the desired spatial resolution, (iv) ensuring the quality of measurement results, which require applying validated procedures and establishing the traceability of the results of measurement, while lacking appropriate CRMs and standards dedicated to the LA-ICP-MS method.

The following topics are discussed in the literature part of the dissertation: (i) physicochemical bases of the LA-ICP-MS, possibilities and limitations in solid sample analysis such as interferences, fractionation, the need to develop an individual calibration approach, (ii) selected calibration strategies, (iii) aspects of clinical specimen analysis, (iv) review of scientific literature in which the principles of metrology were applied to clinical samples analysis using LA-ICP-MS. In scientific literature, the elements of chemical metrology in measurements are often missing or they are completely ignored. Introduction of metrology in chemical measurement is an important and indispensable tool for obtaining reliable and comparable results of analytes that are achievable by validating an analytical procedure, establishing the traceability of the measurement results to the standards of the higher order and to the SI units, and reporting measurement results with stated uncertainty.

In the experimental part, three analytical procedures were developed to obtain information on the distribution and content of the analyzed elements on the surface of the tested samples by direct analysis of the solid sample by the LA-ICP-MS method. The described procedures differed in the way in which samples and standards were prepared, what matrix material was used for preparing the standards, and the selection of laser beam parameters. For the preparation of the solid standards, a matrix material with a composition similar to the oral mucosa samples was used, which was powdered egg white and CRM – powdered cormorant tissue. After addition of analyte solution, a series of standards was obtained which was used to plot the calibration curves. The measuring instrument has been optimized to obtain a signal of sufficient intensity, good precision and the ability to map the content of analytes on a sample surface with the satisfactory resolution. Validation of relevant analytical parameters, such as linearity, detection limits, precision and trueness were performed by using the CRMs based on fish and bovine muscle. In all measurements the traceability was established through the use of standard solutions and CRMs which are traceable to the patterns of higher order and by the analysis of the standards by the reference method, SN-ICP-MS, after the previous mineralization.

The developed and validated analytical procedure was applied in order to analyze fragments of the oral mucosa that were in contact with implants based on titanium and Ti6Al4V alloy. The resulting two-dimensional maps of the content of elements which are constituents of the implant components (Ti, Al, V) clearly show the presence of large amounts of these elements on the surface of the examined tissue. The procedure which involved the laser beam with a reduced diameter has improved the resolution of obtained maps and the use of light microscopy allowed to take images of the zoomed sections of the surface of tissues. These tools showed that the main source of the high signals of the analyzed elements on the surface of oral mucosa are numerous metallic particles to a size of up to about 100  $\mu\text{m}$ . These particles are the remnants of implantation procedure, are released during the use of the implant or as a result of corrosion of the implant in a variable environment of the oral cavity.

## Curriculum Vitae

Imię i nazwisko:	Adam Jarosław Sajnóg
Data i miejsce urodzenia:	08.07.1987, Gryfino
2013 – 2017	studia doktoranckie, Wydział Chemii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu
10-12.2017	staż naukowy w Vrije Universitet Brussels w Brukseli w ramach programu Erasmus+
15.11.2012	Suplement do Dyplomu "Master in Measurement Science in Chemistry", Wydział Chemii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, Uniwersytet Warszawski oraz Institute for Reference Materials and Measurements przyznano w imieniu Międzynarodowego Konsorcjum "Measurement Science in Chemistry".  Kurs obejmował: - Szkołę Letnią w Lepanina, Estonia, 18.07-01.08 2010; - indywidualne zadania analityczne w języku angielskim; - ustne prezentacje i artykuły dotyczące metrologii w języku angielskim; - kurs (obejmujący jeden semestr) „Metrologii w Chemii” zakończony egzaminem w 2009 r.
01.06.2011	tytuł magistra chemii, temat pracy magisterskiej: „Analiza pierwiastkowa zębów z wypełnieniem stomatologicznym metodą próbkowania laserowego z detekcją ICP-MS” , Wydział Chemii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu
2009 – 2011	studia magisterskie, specjalność: chemia środowiska, Wydział Chemii Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu
01.06.2009	tytuł licencjata chemii, temat pracy licencjackiej: „Techniki spektrometrii mas” , Wydział Chemii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu
2006 – 2009	studia licencjackie, specjalność: synteza i analiza chemiczna, Wydział Chemii Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu
2003 – 2006	Liceum profilowane o profilu Kształtowanie Środowiska w Zespole Szkół Ponadgimnazjalnych nr 2 w Gryfinie

## Spis dorobku naukowego

### Wykaz publikacji z listy filadelfijskiej:

1. Sajnog A., Hanć A., Koczorowski R., Barańkiewicz D. New procedure of quantitative mapping of Ti and Al released from dental implant and Mg, Ca, Fe, Zn, Cu, Mn as physiological elements in oral mucosa by LA-ICP-MS. *Talanta* 175 (2017) 370–381.
2. Markiewicz B., Sajnog A., Lorenc W., Hanć A., Komorowicz I., Suliburska J., Kocylowski R., Barańkiewicz D. Multielemental analysis of 18 essential and toxic elements in amniotic fluid samples by ICP-MS: Full procedure validation and estimation of measurement uncertainty. *Talanta* 174 (2017) 122–130.
3. Hanć A., Zduniak P., Erciyas-Yavuz K., Sajnog A., Barańkiewicz D. Laser ablation-ICP-MS in search of element pattern in feathers. *Microchemical Journal* 134 (2017) 1–8.
4. Sajnog A., Hanć A., Makuch K., Koczorowski R., Barańkiewicz D. Study on quantitative analysis of Al, Ti, V in clinical soft tissues after placing the dental implants by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. *Spectrochimica Acta B* 125 (2016) 1–10.
5. Markiewicz B., Komorowicz I., Sajnog A., Belter M., Barańkiewicz D. Chromium and its speciation in water samples by HPLC/ICP-MS – technique establishing metrological traceability: A review since 2000. *Talanta* 132 (2015) 814–823.
6. Belter M., Sajnog A., Barańkiewicz D. Over a century of detection and quantification capabilities in analytical chemistry – Historical overview and trends. *Talanta* 129 (2014) 606–616.

### Wykaz publikacji o zasięgu krajowym:

1. Sajnog A., Hanć A., Barańkiewicz D. Oznaczanie zawartości metali w tkankach miękkich techniką ablacji laserowej z detekcją spektrometrii mas z jonizacją w plazmie sprzężonej indukcyjnie. *Zagadnienia aktualnie poruszane przez młodych naukowców* 5. Creativetime, Kraków (2016) 148-150(3).
2. Sajnog A., Belter M., Barańkiewicz D. Granica wykrywalności CZ. I – Możliwości detekcji metody analitycznej. *Analityka* 1 (2015) 22-25.
3. Sajnog A., Belter M., Barańkiewicz D. Granica wykrywalności CZ. II – Historia LOD. *Analityka* 2 (2015) 12-15.
4. Sajnog A., Belter M., Barańkiewicz D. Granica wykrywalności CZ. III – Trendy w podejściach do szacowania granicy wykrywalności. *Analityka* 3 (2015) 28-32.
5. Sajnog A., Barańkiewicz D. Metody wyznaczania granicy wykrywalności. *Dokonania Młodych Naukowców* 4. Creativetime, Kraków (2014) 11.
6. Sajnog A., Barańkiewicz D. Analiza pierwiastkowa ludzkich tkanek miękkich techniką ablacji laserowej z detekcją w spektrometrii mas z jonizacją w plazmie sprzężonej indukcyjnie. *Dokonania Młodych Naukowców* 4. Creativetime, Kraków (2014) 12-14.

#### **Wykaz międzynarodowych komunikatów konferencyjnych ustnych:**

1. Sajnog A., Hanć A., Makuch K., Koczorowski R., Barańkiewicz D. LA-ICP-MS as a tool for mapping of Ti, Al and V released from dental implants to soft tissue, *European Winter Conference On Plasma Spectrochemistry*, 19-25.02.2017, Sankt Anton, Austria.

#### **Wykaz krajowych komunikatów konferencyjnych ustnych:**

1. Sajnog A., Barańkiewicz D. Nieparametryczne podejście do szacowania granicy wykrywalności, *VI Konferencja Chemometria i Metrologia w Analityce*, 01-03.03.2017, Poznań.
2. Sajnog A., Hanć A., Makuch K., Koczorowski R., Barańkiewicz D. LA-ICP-MS jako narzędzie do obrazowania Ti, Al i V uwalnianych z implantów stomatologicznych do tkanek miękkich, *Konwersatorium Spektrometrii Atomowej*, 19-21.09.2016, Ustroń.
3. Sajnog A., Hanć A., Makuch K., Koczorowski R., Barańkiewicz D., Ilościowa wizualizacja rozmieszczenia pierwiastków na powierzchni błony śluzowej pobranej od pacjentów leczonych implantami stomatologicznymi przy użyciu ablacji laserowej z detekcją w spektrometrze mas z plazmą sprzężoną indukcyjnie, *Jubileuszowe XXV Poznańskie Konwersatorium Analityczne*, 6-8.04.2016, Poznań.
4. Sajnog A., Hanć A., Makuch K., Barańkiewicz D., Mapowanie zawartości pierwiastków w tkankach miękkich pacjentów z implantami stomatologicznymi na bazie stopu Ti, Al i V z użyciem techniki LA-ICP-MS, *Analiza Specjacyjna – możliwości i kierunki rozwoju*, 4-5.03.2016, Poznań.
5. Sajnog A., Hanć A., Barańkiewicz D., Analiza ilościowa pierwiastków migrujących z implantów stomatologicznych do tkanek miękkich za pomocą ablacji laserowej z detekcją w spektrometrze mas z plazmą sprzężoną indukcyjnie, *Wpływ młodych naukowców na osiągnięcia polskiej nauki IX edycja*, 12.12.2015, Poznań.
6. Sajnog A., Hanć A., Barańkiewicz D., Oznaczanie Al, Ti i V techniką LA-ICP-MS w miękkich tkankach klinicznych pobranych od pacjentów leczonych implantami stomatologicznymi, *XX Jubileuszowa Konferencja "Zastosowanie metod AAS, ICP-OES i ICP-MS w analizie środowiskowej"*, 4-6.11.2015, Łódź.
7. Barańkiewicz D., Sajnog A., Belter M., Granica Wykrywalności – Ważny parametr walidacyjny w analizie śladowej, *XXI Sympozjum Spektroskopowe Firmy MS Spektrum*, 11-13.05 2015, Ślesin.
8. Sajnog A., Barańkiewicz D., Strategie kalibracji w analizie pierwiastkowej tkanek miękkich techniką ablacji laserowej z detekcją w spektrometrze mas z plazmą sprzężoną indukcyjnie, *Wpływ Młodych Naukowców na Osiągnięcia Polskiej Nauki VII - Nowe trendy w naukach przyrodniczych*, 17.01.2015, Wrocław.
9. Sajnog A., Barańkiewicz D., Sposoby wyznaczania LOD, *Dokonania naukowe doktorantów II edycja*, 12.04.2014, Kraków.
10. Sajnog A., Barańkiewicz D., Nieparametryczne metody wyznaczania granicy wykrywalności, *Analiza Specjacyjna – możliwości i kierunki rozwoju*, 7-8.03.2014, Poznań.

#### Wykaz międzynarodowych komunikatów konferencyjnych drukowanych:

1. Sajnog A., Hanć A., Koczorowski R., Makuch K., Barańkiewicz D. Mapping Ti, Al and V originated from dental implants in oral mucosa tissue by LA-ICP-MS, *X International Congress of Oral Implantology*, 8-10.06.2017, Kraków.
2. Sajnog A., Hanć A., Makuch K., Koczorowski R., Barańkiewicz D. Mapping Ti, Al and V originated from dental implants in oral mucosa tissue by LA-ICP-MS. *European Winter Conference On Plasma Spectrochemistry*, 19-25.02.2017, Sankt Anton, Austria.
3. Lorenc W., Marcinkowska M., Sajnog A., Barańkiewicz D. Speciation of As, Cr and Sb in bottled water samples using hyphenated technique HPLC/ICP-DRC-MS, *European Winter Conference On Plasma Spectrochemistry*, 19-25.02.2017, Sankt Anton, Austria.
4. Sajnog A., Hanć A., Barańkiewicz D., Calibration strategies in elemental analysis of soft tissues by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry, *Ionization Principles in Organic and Inorganic Mass Spectrometry*, 02-05.03.2015, Longyearbyen, Svalbard, Norwegia.

#### Wykaz krajowych komunikatów konferencyjnych drukowanych:

1. Sajnog A., Hanć A., Makuch K., Barańkiewicz D., Mapowanie pierwiastków pochodzących z implantów ze stopu tytanu na powierzchni błony śluzowej jamy ustnej przy użyciu metody LA-ICP-MS, *Jubileuszowe XXV Poznańskie Konwersatorium Analityczne*, 6-8.04.2016, Poznań.
2. Sajnog A., Hanć A., Barańkiewicz D., Ilościowe rozmieszczenie pierwiastków na powierzchni tkanek miękkich metodą LA-ICP-MS, *Analiza Specjacyjna – możliwości i kierunki rozwoju*, 4-5.03.2016, Poznań.
3. Sajnog A., Hanć A., Barańkiewicz D., Procedura kalibracji w oznaczaniu metali w tkankach miękkich metodą LA-ICP-MS, *Analiza Specjacyjna – możliwości i kierunki rozwoju*, 4-5.03.2016, Poznań.
4. Sajnog A., Hanć A., Makuch K., Barańkiewicz D., Strategie kalibracji w analizie rozmieszczenia pierwiastków w tkankach miękkich techniką ablacji laserowej z detekcją w spektrometrze mas z plazmą sprzężoną indukcyjnie, *IX Polska Konferencja Chemii Analitycznej*, 6-10.07.2015, Poznań.
5. Lorenc W., Sajnog A., Hanć A., Barańkiewicz D. Parametry procedury analitycznej w analizie pierwiastkowej tkanek miękkich techniką ablacji laserowej z detekcją w spektrometrze mas z plazmą sprzężoną indukcyjnie. *IX Polska Konferencja Chemii Analitycznej*. 6-10.07.2015 Poznań.
6. Sajnog A., Hanć A., Barańkiewicz D. Parametry analityczne wybranych strategii kalibracji w analizie rozmieszczenia pierwiastków w tkankach miękkich techniką ablacji laserowej z detekcją w spektrometrze mas z plazmą sprzężoną indukcyjnie. *XXIV Poznańskie Konwersatorium Analityczne*. 9-10.04.2015, Poznań.
7. Lorenc W., Sajnog A., Hanć A., Barańkiewicz D., Strategie kalibracji w analizie pierwiastkowej tkanek miękkich techniką ablacji laserowej z detekcją w spektrometrze mas z plazmą

sprzężoną indukcyjnie, *XXIV Poznańskie Konwersatorium Analityczne*, 9-10.04.2015, Poznań.

8. Sajnog A., Hanć A., Olszewska A., Barańkiewicz D. Analiza wielopierwiastkowa zębów zdrowych oraz z wypełnieniem stomatologicznym metodą próbkowania laserowego z detekcją ICP-MS. *XX Poznańskie Konwersatorium Analityczne*. 29.04.2011, Poznań.

#### **Działalność organizacyjna:**

1. Udział w organizowaniu konferencji: VI Konferencja Chemometria i Metrologia w Analityce, Wydział Chemii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, 01-03.03.2017, Poznań.
2. Przygotowanie i realizacja wydarzenia w Nocy Naukowców w dniu 30.09.2016 pt. „Pokaz zastosowań techniki ablacji laserowej połączonej ze spektrometrią mas z jonizacją w plazmie sprzężonej indukcyjnie (LA-ICP-MS)”
3. Przygotowanie i prowadzenie zajęć w ramach studiów podyplomowych „Analityka Chemiczna” na Wydziale Chemii UAM w roku akademickim 2016/2017 w wymiarze 33 godzin zegarowych.
4. Udział w organizowaniu konferencji: Konferencja Analiza Specjacyjna. Możliwości i kierunki rozwoju, Wydział Chemii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, 4-5.03.2016, Poznań.
5. Udział w organizowaniu konferencji: Konferencja Analiza Specjacyjna. Możliwości i kierunki rozwoju, Wydział Chemii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, 7-8.03.2014, Poznań.

#### **Udział w kursach:**

1. Certyfikat uczestnictwa w „Warsztatach z zasad stosowania metrologii w pomiarach chemicznych” zorganizowanych w ramach VI Konferencji Chemometria i Metrologia w Analityce. Poznań, 1-3.03.2017
2. Certyfikat uczestnictwa w „Warsztatach z wykorzystania metod chemometrycznych w praktyce (kurs podstawowy)” zorganizowanych w ramach VI Konferencji Chemometria i Metrologia w Analityce. Poznań, 1-3.03.2017
3. Kurs „Metody znacznikowe w hydrologii i hydrogeologii” prowadzony przez prof. dr hab. inż. Piotra Małozewskiego (Institute of Groundwater Ecology w Helmholtz Centrum Monachium). Poznań, 05-09.05.2014.

#### **Granty:**

1. Grant NCN Preludium 9 nr 2015/17/N/ST4/03808, Ilościowa wizualizacja rozmieszczenia pierwiastków w miękkich tkankach ustrojowych z zastosowaniem techniki LA-ICP-MS. Udział w grantcie jako: kierownik. Termin realizacji: 2016–2018.

**Nagrody i wyróżnienia:**

1. Wyróżnienie w sesji konkursowej doktorantów za wykład: Sajnóg A., Hanć A., Barańkiewicz D., Oznaczanie Al, Ti i V techniką LA-ICP-MS w miękkich tkankach klinicznych pobranych od pacjentów leczonych implantami stomatologicznymi, XX Jubileuszowa Konferencja "Zastosowanie metod AAS, ICP-OES i ICP-MS w analizie środowiskowej, 4-6.11.2015, Łódź.
2. Wyróżnienie w sesji posterowej za plakat: Sajnóg A., Hanć A., Makuch K., Barańkiewicz D., Mapowanie pierwiastków pochodzących z implantów ze stopu tytanu na powierzchni błony śluzowej jamy ustnej przy użyciu metody LA-ICP-MS na konferencji: Jubileuszowe XXV Poznańskie Konwersatorium Analityczne, 6-8.04.2016, Poznań.
3. Nagroda zespołowa III stopnia za osiągnięcia naukowe, przyznana przez Rektora UAM w latach: 2015, 2016 i 2017.
4. Stypendium naukowe otrzymane w roku akademickim 2014/2015.