

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

---

Studijní program: Analytická chemie



Bc. Volodymyr Vajnahij

Stanovení nanočástic Ag v matrici kosmetických přípravků

Determination of Ag nanoparticles in cosmetics matrix

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Eliška Nováková, Ph.D.

Praha 2025

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědom toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 16. 5. 2025.

Podpis:

## **Poděkování**

Rád bych tímto poděkoval RNDr. Elišce Novákové, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost, ochotu, cenné rady, které mi byly poskytnuty během celého procesu vypracovávání této diplomové práce. Odborné poznatky byly pro mě neocenitelné a výrazně přispěli k sepsání této práce.

## **Abstrakt**

Zájem o nanočástice a nanomateriály obecně prudce vzrostl a díky jejich specifickým fyzikálním a chemickým vlastnostem se staly klíčovou technologií pro 21. století. Tyto mimořádné vlastnosti je učinily atraktivními pro aplikace v mnoha oblastech medicíny, farmacie, elektroniky, zemědělství, kosmetiky či potravinářském průmyslu. Z tohoto důvodu začaly vznikat pochybnosti a obavy ohledně jejich potenciální toxicity a negativního dopadu na životní prostředí. Kvůli tomu v posledních letech dochází k rozvoji technik a metod pro účinné stanovení nanočástic.

Tato diplomová práce se zabývá stanovením kovových nanočástic stříbra ve vzorcích kosmetických přípravků s deklarovaným obsahem nanočástic dostupných na českém trhu. Ke stanovení nanočástic byla využívána perspektivní technika spICP-MS, neboť se jedná o moderní, spolehlivou techniku s nízkými limity detekce. Bylo optimalizováno vhodné stabilizační činidlo, přičemž nejvhodnější byl Triton X-100. Dále byla optimalizována navážka vzorku a doba sonikace. Po stanovení nanočástic ve vzorku kosmetických přípravků bylo zjištěno, že nejvíce nanočástic bylo obsaženo v tekutém mýdle ( $284 \text{ ng g}^{-1}$ ), poté v šamponu ( $100,49 \text{ ng g}^{-1}$ ) a nejméně ve sprchovém gelu ( $3,28 \text{ ng g}^{-1}$ ).

## **Klíčová slova**

analytická chemie, nanočástice, průměr nanočástice, koncentrace částic

## **Abstract**

Interest in nanoparticles and nanomaterials in general has grown rapidly, and due to their unique physical and chemical properties they have become a key technology for the 21st century. These extraordinary properties have made them attractive for applications in numerous fields, including medicine, pharmacy, Electronics, agriculture, cosmetics and the food industry. This has raised concerns about their potential toxicity and negative environmental impact. Because of this, techniques and methods for the efficient determination of nanoparticles have been developed in recent years.

This thesis focuses on the determination of metallic silver nanoparticles in cosmetic product samples with declared nanoparticle content and available on the Czech market. The promising technique spICP-MS was used for the determination of nanoparticles as it is modern, reliable technique with low detection limits. A suitable stabilizing reagent was optimized, with Triton X-100 being the most suitable. Furthermore, the sample weight and sonication time were also optimized. After analysing nanoparticles in cosmetics samples, it was found that the highest concentration of nanoparticles was found in liquid hand soap (284 ng g<sup>-1</sup>), followed by shampoo (100,49 ng g<sup>-1</sup>), and the lowest in shower gel (3,28 ng g<sup>-1</sup>).

## **Keywords**

analytical chemistry, nanoparticles, nanoparticle diameter, particle concentration

## Obsah

1	Úvod.....	- 10 -
1.1	Cíl diplomové práce.....	- 10 -
2	Teoretická část.....	- 12 -
2.1	Nanočástice.....	- 12 -
2.2	Legislativa .....	- 13 -
2.3	Zdravotní rizika .....	- 14 -
2.3.1	Osud nanočástic v životním prostředí .....	- 14 -
2.4	Metody stanovení nanočástic.....	- 14 -
2.5	Stříbrné nanočástice.....	- 15 -
2.6	Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem .....	- 17 -
2.6.1	Princip metody .....	- 17 -
2.7	Konstrukční prvky ICP-MS.....	- 18 -
2.7.1	Indukčně vázané plazma .....	- 18 -
2.7.1.1	Plazmová hlavice.....	- 19 -
2.7.2	Peristaltická pumpa a zmlžovač .....	- 20 -
2.7.3	Interface mezi iontovým zdrojem a hmotnostním spektrometrem.....	- 22 -
2.7.4	Iontová optika.....	- 23 -
2.7.5	Hmotnostní analyzátor .....	- 24 -
2.7.5.1	Kolizně – reakční cely .....	- 25 -
2.7.6	Detektor.....	- 26 -
2.8	Interference.....	- 26 -
2.9	Aplikace.....	- 28 -
2.10	Single particle inductively coupled plasma mass spectrometry (spICP-MS).....	- 28 -
2.10.1	Princip měření.....	- 30 -
2.10.2	Distribuce.....	- 31 -
2.10.3	Příprava roztoků před analýzou a kalibrace .....	- 31 -
3	Experimentální část.....	- 32 -
3.1	Použité chemikálie.....	- 32 -
3.2	Použité přístroje .....	- 33 -
3.3	Pracovní postup .....	- 33 -
3.3.1	Příprava disperzí nanočásticového standardu pro kalibraci .....	- 33 -
3.3.2	Příprava roztoků iontového standardu stříbra a zlata .....	- 33 -
3.4	Stanovení celkového obsahu stříbra ve vzorcích.....	- 34 -
3.4.1	Kvalifikace přístroje ICP-MS a zajištění kvality výsledků .....	- 35 -
4	Výsledky a diskuse.....	- 37 -

4.1	Stabilita nanočástic v citrátovém pufru při různých časech a pH.....	- 37 -
4.2	Stabilita nanočástic v PVA.....	- 45 -
4.3	Stabilita nanočástic v Tritonu X-100.....	- 49 -
4.4	Snížení odezvy slepého vzorku .....	- 51 -
4.5	Optimalizace přípravy vzorku s reálnou maticí.....	- 52 -
4.5.1	Optimalizace navážky vzorku .....	- 52 -
4.5.2	Optimalizace doby sonikace.....	- 53 -
4.6	Limit stanovitelnosti spICP-MS .....	- 55 -
4.7	Celkový obsah stříbra ve vzorcích.....	- 57 -
4.8	Limit stanovitelnosti v matici.....	- 57 -
4.9	Obsah nanočásticového stříbra v matici.....	- 59 -
5	Závěr .....	- 61 -
6	Seznam použité literatury.....	- 62 -

## Seznam zkratek

A4F-ICP-MS	Frakcionace v proudovém poli s asymetrickým tokem s detekcí hmotnostní spektrometrií s indukčně vázaným plazmatem ( <i>Asymmetrical field – flow fraction inductively coupled plasma mass spectrometry</i> )
AC	Střídavý proud ( <i>Alternating current</i> )
CE	Kapilární elektroforéza ( <i>Capillary electrophoresis</i> )
CEM	Elektronový násobič s kontinuální dynodou ( <i>Channel electron multiplier</i> )
CLP	Klasifikace, označování a balení látek a směsí ( <i>Classification, Labelling and Packaging of substances and mixtures</i> )
CTAB	Cetrimoniumbromid
$d$	Průměr
DC	Stejnoseměrný proud ( <i>Direct current</i> )
DLS	Dynamický rozptyl světla ( <i>Dynamic Light Scattering</i> )
$E_{\text{KIN}}$	Kinetická energie
EM	Elektronový násobič ( <i>Electron multiplier</i> )
ENPs	Uměle vytvořené nanočástice ( <i>Engineered nanoparticles</i> )
$f$	Průměrný počet píků připadající na jednotku času
FFF	Frakcionace v proudovém poli ( <i>Field-flow fractionation</i> )
GC	Plynová chromatografie ( <i>Gas chromatography</i> )
HPLC	Vysokoučinná kapalinová chromatografie ( <i>High-performance liquid chromatography</i> )
ICP-MS	Hmotnostní spektrometr s indukčně vázaným plazmatem ( <i>Inductively coupled plasma mass spectrometry</i> )
ISO	Mezinárodní organizace pro normalizaci ( <i>International Organization for Standardization</i> )
KED	Diskriminace kinetickou energií ( <i>Kinetic energy discrimination</i> )
LOD	Limit detekce ( <i>Limit of detection</i> )
LOQ	Limit stanovitelnosti ( <i>Limit of quantification</i> )

$m$	Hmotnost
$m/z$	Poměr hmotnosti ( $m$ ) a náboje ( $z$ )
MALS	Víceúhlový rozptylový detektor ( <i>Multi-Angle light scattering</i> )
$N$	Celková koncentrace částic ve vzorku
$n$	Počet měření
NPs	Nanočástice ( <i>Nanoparticles</i> )
NTA	Analýza sledování nanočástic ( <i>Nanoparticle tracking analysis</i> )
PNC	Koncentrace částic ( <i>Particle number concentration</i> )
PVA	Polyvinylalkohol
REACH	Registrace, hodnocení, autorizace a omezování chemických látek ( <i>Registration, Evaluation, Authorisation and Restrictions of Chemicals</i> )
RF	Radiofrekvenční
ROS	Reaktivní formy kyslíku ( <i>Reactive oxygen species</i> )
RSD	Relativní směrodatná odchylka ( <i>Relative standard deviation</i> )
SD	Směrodatná odchylka ( <i>Standard deviation</i> )
SDS	Dodecylsírán sodný
SEM	Skenovací elektronový mikroskop ( <i>Scanning electron microscope</i> )
spICP-MS	Analýza jednotlivých částic hmotnostní spektrometrií s indukčně vázaným plazmatem ( <i>Single particle inductively coupled plasma</i> )
TEM	Transmisní elektronová mikroskop ( <i>Transmission electron microscopy</i> )
TMAH	Tetramethylamonium hydroxid
TOF	Analýzátor doby letu ( <i>Time of flight mass spectrometry</i> )
$V$	Objem
$\nu f$	Vysokofrekvenční elektromagnetické pole
$\eta$	Transportní účinnost
$\rho$	Hustota

# 1 Úvod

V současnosti miliony lidí denně využívají kosmetické produkty a produkty osobní hygieny (např. opalovací krémy, produkty pro čištění zubů, těla a vlasů, přípravky proti stárnutí). Obecně mají kosmetické produkty velmi složitou matici s mnoha různými složkami. Některé ze složek, které se v kosmetických produktech objevily nedávno mohou být ve formě nanočástic. Například  $\text{TiO}_2$  a  $\text{ZnO}$  ve formě nanočástic se využívají v opalovacích krémech díky své vysoké fotostabilitě. Mimo toho se například nanočástice zlata nebo stříbra využívají v různých sprchových gelech a zubních pastách vzhledem ke svým vysokým antibakteriálním a antimikrobiálním vlastnostem [1].

Nanotechnologie představuje klíčovou technologii ve 21. století, která má vysoký potenciál k pokrokům v inženýrství materiálů. [2]. Nanočástice jsou pevné částice, které představují podskupinu nanomateriálů. Jsou definovány tím, že mají alespoň jeden rozměr a velikost v řádu jednotek nebo desítek nanometrů. Kromě zmíněné kosmetiky se nanočástice využívají v mnoha oblastech každodenního života, například v elektronice, chemii, textilním průmyslu, medicíně zemědělství a potravinářství [3]. Rozvoj nanotechnologií vyžaduje i sofistikovanější nanometrologii, která umožňuje přesné a spolehlivé kvantitativní stanovení a charakterizaci nanočástic a struktur v nanoměřítku. S větším využitím nanočástic vzniká i otázka ohledně jejich potenciální toxicity a škodlivosti pro životní prostředí. V reakci na tuto výzvu byla citlivost, přesnost a preciznost hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem přizpůsobena pro analýzu jednotlivých nanočástic technikou, která bývá v literatuře označovaná jako single particle ICP-MS. Rychlý rozvoj této techniky z ní dělá účinný nástroj pro kvantitativní stanovení nanočástic [2].

## 1.1 Cíl diplomové práce

Cílem diplomové práce bylo optimalizovat a následně validovat metodu pro stanovení koncentrace (particle number concentration) a středního průměru nanočástic stříbra (Ag NPs) ve vzorcích kosmetických přípravků pomocí techniky spICP-MS. Konkrétně se jednalo o vzorky šamponu, sprchového gelu a tekutého mýdla od výrobce Nanostříbro plus s. r. o, který se zaměřuje na výrobu osobní hygieny s deklarovaným obsahem nanočástic stříbra. Ke splnění cílů bylo potřeba najít vhodné ředící a stabilizační

čínidlo, optimální navážku a optimální dobu sonikace za účelem zajistit co největší přesnost, spolehlivost a opakovatelnost.

## 2 Teoretická část

### 2.1 Nanočástice

Podle definice Mezinárodní organizace pro normalizaci (ISO) jsou nanomateriály takové materiály, které mají alespoň jeden rozměr v rozsahu velikostí přibližně od 1 do 100 nm a disponují jedinečnými vlastnostmi, které se obvykle liší od vlastností chemicky identických materiálů [4,5]. Jak již bylo zmíněno, nanomateriály mohou mít jeden či více rozměrů a více tvarů. Existují nanočástice, které mají třetí rozměr, nanovlákna ve 2D ale i jednorozměrné nanodesky [6]. Nanočástice mohou mít různé tvary a struktury. Mohou být kulovité, válcovité, kuželovité, s dutým jádrem, spirálovité a podobně [7]. Vyskytují se buď přirozeně, například jako koloidy, ale mohou být také uměle vytvořeny pro konkrétní účel (ENPs) [5]. Nanomateriály mohou být anorganického nebo organického původu. V současnosti lze nanočástice a nanomateriály rozdělit do čtyř kategorií podle typu materiálu. První kategorií jsou nanomateriály na bázi uhlíku, které se vyskytují jako různé tvary, například jako duté trubice nebo jako sféry. Do této kategorie patří fullereny (C60), uhlíkové nanotrubicе nebo grafen. Druhou kategorií jsou nanočástice kovů a jejich oxidů. Mezi nejčastěji využívané kovové nanočástice patří například oxid titaničitý (TiO<sub>2</sub>), oxid zinečnatý (ZnO) nebo nanočástice zlata a stříbra, nejčastěji využívané v kosmetice nebo lékařství. Třetí kategorií jsou organické materiály, které zahrnují nanostruktury na bázi lipidů, tenzidů a polymerů využívané jako nosiče aktivních molekul nebo nanokrystaly, které slouží ke zvýšení rozpustnosti sloučenin. Poslední kategorií jsou kompozitní nanomateriály, které jsou tvořeny kombinací různých typů nanočástic mezi sebou nebo ve spojení s většími, složitějšími strukturami (např. hybridní nanovlákna) [6,8].

Za posledních 30 let došlo k výraznému rozvoji a produkci nanomateriálů a v současnosti jsou nanočástice široce využívány díky svým jedinečným a výhodným vlastnostem v zemědělství, lékařství či v kosmetickém průmyslu [9].

Takto malé částice přinášejí řadu výhod při formulaci drogistických produktů. Jejich drobné rozměry jsou více kompatibilní s biologickými strukturami, což umožňuje snadnější vstřebávání sloučenin přes kožní bariéru i buněčné membrány. To znamená, že látky aplikované na povrch těla mohou být nejen lépe absorbovány kůží, ale i ve větší míře přijímány buňkami a mohou snáze pronikat přes buněčné membrány i vnitřní

membrány buněčných organel. Nanočástice nacházejí široké uplatnění jako UV filtry, antimikrobiální látky, barviva či nosiče bioaktivních molekul. Mezi výhody použití nanočástic v kosmetice patří lepší ochrana před UV zářením, hlubší penetrace nebo zlepšená hydratace [6,10].

## 2.2 Legislativa

Nanočástice se vyznačují vlastnostmi jako vysoká chemická bioaktivita, reaktivita, schopnost pronikat na buněčné úrovni a vyšší biologická dostupnost. Tyto schopnosti je činí atraktivními pro biomedicínské aplikace, ale zároveň mohou představovat potenciální hrozbu v podobě toxicity. Z tohoto důvodu vládní organizace zavedly regulace formou legislativy, zákonů a pravidel s cílem minimalizovat a eliminovat rizika spojená s nanomateriály. Přesto neexistuje specifická mezinárodní směrnice nebo dohoda týkající se výroby, manipulace, označování, testování toxicity nebo hodnocení environmentálních dopadů nanočástic. V tomto vývoji nových předpisů pro kontrolu nanomateriálů závislém na zlepšení současných znalostí o toxicitě a ekotoxicitě nanomateriálů, stejně jako o jejich výskytu a osudu v životním prostředí [8,11]. V současnosti mají USA a Evropská unie silné regulační orgány a legislativní směrnice pro kontrolu potenciálních rizik nanočástic a nanomateriálů obecně. Evropská komise vypracovala několik částí legislativy a technických předpisů s odkazy na nanomateriály. Tato legislativa je uplatňována v zemích EU k zajištění jednotnosti napříč sektory. Podle Evropské komise je termín nanomateriál definován jako „přírodní, náhodně vzniklý nebo uměle vyrobený materiál obsahující částice v nevázaném stavu, jako agregát nebo aglomerát, přičemž 50 % nebo více částic v rozložení velikost má jeden nebo více vnějších rozměrů v rozmezí 1 nm až 100 nm“. Jelikož specifikace materiálů a produktů splňují definice látek podle REACH a nařízení, klasifikace, označování a balení chemických látek (CLP), platí pro ně ustanovení těchto předpisů [12]. V roce 2013 byla směrnice 76/768/EEC nahrazena nařízením EU o kosmetice 1223/2009 které kromě definice velikosti říká, že se jedná o nerozpustný nebo biopersistentní materiál. Také podle tohoto nařízení musí být složky přítomné ve formě nanomateriálů jasně uvedeny v seznamu složek. Názvy těchto složek musí být následovány slovem „nano“ v závorkách [8,13].

## **2.3 Zdravotní rizika**

Produkce, používání, likvidace a zpracování odpadů obsahující nanomateriály jsou hlavními důvody uvolňování nanočástic do životního prostředí. Zatímco lidská kůže představuje pomyslnou bariéru před cizorodými látkami, orgány jsou vůči nim náchylnější [14]. Nanočástice mají velikost srovnatelnou s viry, a proto jim jejich malá velikost usnadňuje transport přes bariéry, jako jsou právě kůže, plíce, tělesné tkáně a další orgány [15]. Nanočástice, které se dostávají do těla nejčastěji inhalací mohou poté snadno pronikat do tělního oběhu a jiných částí lidského těla zahrnující játra, srdce nebo krevní buňky. Mezi obecné akutní toxické účinky expozice nanočásticím patří tvorba reaktivních forem kyslíku, denaturace proteinů nebo porušení mitochondrií. Chronické toxické účinky zahrnují hromadění v retikuloendoteliálním systému, jádru nebo nervové tkáni a tvorbu neoantigenů, což může vést ke zvětšení nebo dysfunkci orgánů. Je však důležité mít na paměti, že toxicita nanočástic závisí na jejich původu a mnoho z nich se jeví jako netoxické a některé mají naopak pozitivní zdravotní účinky [8,16].

### **2.3.1 Osud nanočástic v životním prostředí**

Nedávné studie prokázaly toxický vliv nanočástic na různé organismy, což vyvolává obavy ohledně chování a osudu nanopolutantů v životním prostředí [17]. Po uvolnění nanočástic do životního prostředí podléhají dynamickým transformačním procesům. Fyzikální, chemické a biologické procesy, jako jsou homo či heteroagregace, sedimentace, adsorpce, oxidace, redukce, sulfidace či fotochemicky a biologicky řízené reakce probíhají v prostředí a zásadně ovlivňují mobilitu a biologickou dostupnost nanočástic [17,18].

## **2.4 Metody stanovení nanočástic**

Chemické složení, struktura, velikost a tvar hrají důležitou roli v unikátních vlastnostech, které charakterizují nanočástice a jejich dopad na zdraví a životní prostředí [19]. Mnoho studií zdůraznilo potřebu provádět charakterizaci nanočástic spolehlivým a robustním způsobem, který by zdůraznil, které charakteristiky jsou nezbytné pro identifikaci nebezpečí [20,21]. K charakterizaci těchto vlastností se běžně používají různé metody.

Ke stanovení velikosti se běžně využívá skenovací a transmisní elektronový mikroskop (SEM a TEM). Kromě velikosti poskytuje informace o povrchu vzorku, krystalické struktuře tvaru a dalších vlastnostech jako je například elektrická vodivost. S rozlišením přibližně 10 nm u SEM a 1 nm u TEM je rozlišení dostatečné k získání detailních snímků nanočástic. Nicméně využití této techniky je limitováno tím, že vyžaduje speciální vybavení, které není běžné v tradičních laboratořích [19,22].

NTA, neboli analýza sledování nanočástic, je metoda pro určování velikosti částic v kapalinách na základě korelace rychlosti Brownova pohybu [23]. Tato metoda stanovuje velikost částic individuálně pro každou částici a umožňuje tak vytvořit profil distribuce velikosti s průměrem přibližně 30–1000 nm [22]. NTA byla například využita pro stanovení zlatých nanočástic v pomerančovém džusu. V tomto případě bylo stanovení nanočástic pomocí NTA přijatelné (tj. odchylka byla menší než 20 %), ačkoli přesnost nebyla tak vysoká jako v případě elektronového mikroskopu a spICP-MS u stejného vzorku [24].

Další možnost je použití frakcionace v proudovém poli (FFF) pro separaci nanočástic podle velikosti. Je však důležité vzít na vědomí, že FFF je frakcionační technika, která neumožňuje stanovení velikosti nanočástic, ale pouze jejich separaci. Určení velikosti nanočástic je možné pouze po spojení s dynamickým rozptylem světla (DLS) nebo ještě lépe s MALS detektorem [22].

V neposlední řadě během několika posledních let je na vzestupu technika single particle ICP-MS pro stanovení kovových nanočástic v suspenzích. Přesnějším popisu této techniky a principu měření se více věnuje *Oddíl 2.10* na straně 28.

## **2.5 Stříbrné nanočástice**

Stříbro se používá v medicíně již stovky let. Jeho antibakteriální účinky byly využívány při léčbě traumatických ran, popálenin, angíny či syfilisu [25]. Byly popsány antimikrobiální i antibakteriální vlastnosti [26]. Z toho důvodu se stříbro ve formě částic stalo velice populárním v různých odvětvích, nejen v lékařství jako antibakteriální a protizánětlivé činidlo, ale i v enviromentálním či průmyslovém sektoru. Hrají důležitou roli při čištění vzduchu a vody nebo při výrobě textilních spotřebních výrobků [27,28]. Nanočástice stříbra se díky své popularitě vyskytují v 50 % všech výrobků obsahující nanočástice [29]. Tradičně se pro své antimikrobiální účinky využíval dusičnan stříbrný,

avšak v současnosti mají nanočástice stříbra díky svým fyzikálně – chemickým vlastnostem výrazně vyšší antimikrobiální účinek. Větší poměr povrchu k objemu zajišťuje vyšší expozici povrchu vůči mikroorganismům, což vede právě k lepšímu antimikrobiálnímu účinku [27]. V lékařství se kromě jiného využívají nanočástice stříbra jako vhodné nosiče různých terapeutických molekul, včetně protizánětlivých a protirakovinných bio látek [30]. Stříbrné nanočástice se také využívají v zubním lékařství ať už jako přídavek do zubních past nebo při výrobě zubních protéz [31].

Jak již bylo zmíněno v *Oddíle 2.3* na straně 14 nanočástice mohou být potenciálně toxické. Není tomu jinak ani v případě nanočástic stříbra, které mohou narušit dýchací řetězec mitochondrií, ovlivnit syntézu ATP a poškozovat DNA. Nejčastěji však toxicita nanočástic stříbra souvisí s produkcí reaktivních forem kyslíku (ROS), které jsou nezbytné pro normální fyziologické procesy, ale jejich nadměrná tvorba může poškodit DNA a narušit antioxidantní systém [32]. Řada studií potvrzují souvislost mezi hladinou ROS a poškozením mitochondrií. ROS, které jsou uvolňovány mitochondrií, narušují syntézu ATP tím, že vyvolají oxidační stres a následně dochází k poškození DNA a apoptóze buňky [33,34]. V jedné studii malé nanočástice stříbra produkovaly ROS a vyvolávaly apoptózu v kmenových buňkách myši [35]. Je tedy důležité sledovat a prozkoumat původ toxicity nanočástic stříbra.

## 2.6 Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem

Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem neboli ICP-MS je analytická spektrální metoda spojující indukčně vázané plazma (ICP), které slouží jako zdroj kladně nabitých iontů, a hmotnostní spektrometrii (MS), která má za úkol tyto kationty detegovat [36]. Tato metoda se vyznačuje vysokou citlivostí a selektivitou, umožňuje stanovení izotopového poměru prvků a dosahuje velmi nízkých detekčních limitů. Použití této metody je v současné době velice široké, nicméně nejčastěji je využívána ke stopovým stanovením kovů, polokovů a vybraných nekovů v koncentracích pohybujících se v rozmezí  $\mu\text{g/l}$  až po  $\text{pg/l}$  [37]. Další výhodou ICP-MS je její univerzálnost a lze jí efektivně spojovat s jinými, převážně chromatografickými nebo elektromigračními technikami, například s vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC), plynovou chromatografií (GC) nebo kapilární elektroforézou (CE) [38].

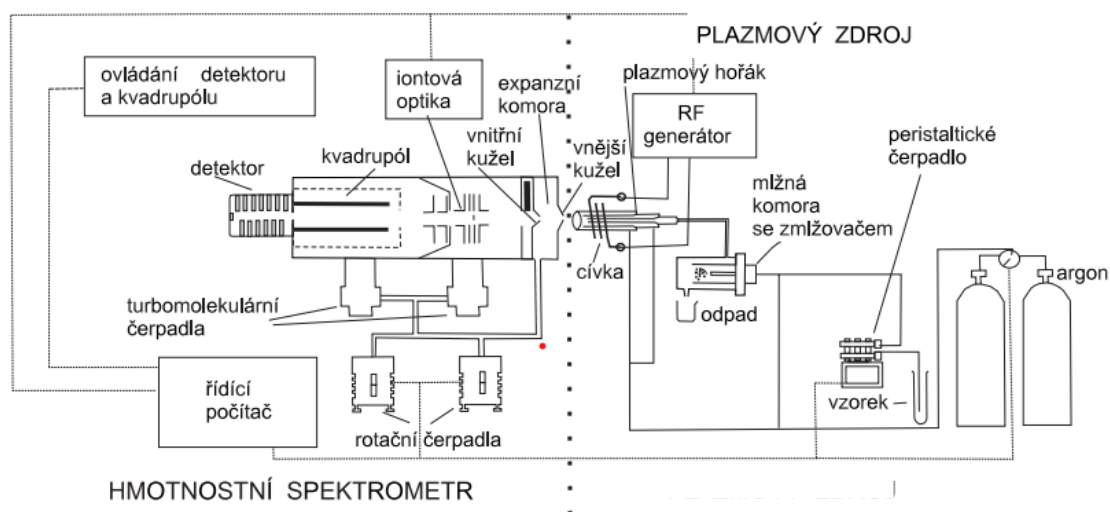
ICP-MS se díky své vysoké citlivosti a schopnosti stanovit více prvků současně uplatňuje v širokém spektru oblastí prvkové analýzy. Také se jedná o metodu, která vyniká velmi nízkou spotřebou vzorku a je předurčená ke stanovení prvků, které nelze stanovit jinými spektrálními metodami. Mezi takové prvky patří například prvky vzácných zemin, platinové kovy, wolfram či niob [36].

### 2.6.1 Princip metody

Základním principem ICP-MS je propojení plazmového výboje o kinetické teplotě iontů přibližně 10 000 K s hmotnostním spektrometrem, který pracuje při tlaku přibližně  $10^{-6}$  torr. Vzorek, jenž je převeden ve zmlžovači na aerosol, je zaveden do kanálu plazmatu a posléze je vysušen, atomizován a ionizován. Poté ionty vstupují supersonickou rychlostí malým otvorem sampleru do předvakua. Svazek iontů prochází malým otvorem ve skimmeru do vakua hmotnostního analyzátoru, který rozdělí ionty podle jejich poměru  $m/z$  v čase (TOF analyzátor) nebo v prostoru (sektorové analyzátor). Alternativně může být použit kvadrupólový filtr, který vyfiltruje ze svazku pouze ionty o zvoleném  $m/z$ . Po průchodu analyzátozem dopadají ionty na detektor, který převádí intenzitu dopadů iontů na měřitelný elektrický signál [38].

## 2.7 Konstrukční prvky ICP-MS

V ICP-MS najdeme několik klíčových komponent, které umožňují efektivní vnos vzorku, ionizaci, separaci a detekci analytů a podílejí se tedy na přesnosti stanovení. Přístroj lze rozdělit na dvě části, na část, která se nachází v prostředí atmosférického tlaku a na část, která se nachází v prostředí vysokého vakua [36]. Hlavní části ICP-MS spektrometrů zahrnují zařízení pro přívod vzorků, plazmový zdroj, rozhraní mezi plazmovým zdrojem a hmotnostním spektrometrem. Samotný hmotnostní spektrometr je tvořen iontovou optikou, daným typem analyzátoru (např. kvadrupólový) a nakonec detektorem a nezbytný je také zdroj hlubokého vakua. Schéma ICP-MS spektrometru je uvedeno na *Obrázku 2.1*.



*Obrázek 2.1.: Schéma kvadrupólového hmotnostního spektrometru s indukčně vázaným plazmatem, Zdroj: [36], upraveno*

### 2.7.1 Indukčně vázané plazma

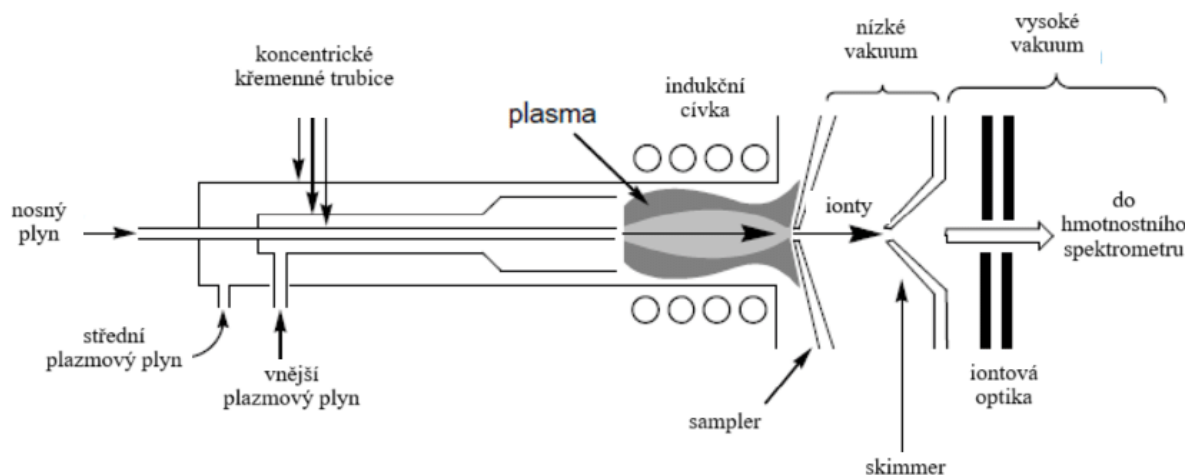
Indukčně vázané plazma (ICP) představuje standardní vysokoteplotní iontový zdroj využívaný v přístrojích pro hmotnostní spektrometrii. Plazma generuje teploty přibližně 5500°C, kterým žádný materiál nemůže dlouhodobě odolat, což z něj tvoří nejuniverzálnější dostupný atomizátor a ionizátor prvků. Na rozdíl od nízkoteplotních iontových zdrojů určených pro molekulární ionty v plazmatu dochází k úplnému rozrušení všech chemických vazeb bez ohledu na jejich typ [39]. Iniciací ICP výboje probíhá pomocí ionizace jiskrovým výbojem z Teslova transformátoru. Uvolněné

elektrony jsou následně akcelerovány vysokofrekvenčním elektromagnetickým polem (vf), což spouští řetězovou ionizační reakci v pracovním plynu [38].

Ionizovaný plyn pokračuje dále skrze plazmovou hlavici v prostoru indukční cívky, ve které začne vzniklý sekundární vysokofrekvenční proud zahřívát proudící plyn na teplotu, při které přechází do stavu vodivého plazmatu. Toto plazma se samo udržuje díky indukovanému vysokofrekvenčnímu proudu a má charakteristický kapkovitý tvar, přičemž teplota v něm může dosahovat až 10 000 K (vypočtená kinetická teplota iontů) [38]. Při takové teplotě je schopna ionizace většina prvků periodické soustavy. Minimální energie potřebná pro ionizaci molekuly se označuje jako ionizační energie nebo ionizační potenciál. Podmínkou ionizace je, aby měl prvek nižší hodnotu ionizační energie, než má argon (Ar) tj, 15,76 eV. Velká skupina prvků má první ionizační potenciál nižší, než má argon. Díky tomu jsou pomocí plazmatu ionizovatelné a následně je lze analyzovat. Naopak prvky jako fluor, helium či neon nelze ionizovat a změřit, jelikož jejich hodnota prvního ionizačního potenciálu je vyšší než hodnota 15,76 eV [36].

#### **2.7.1.1 Plazmová hlavice**

Plazmová hlavice (angl. torch) je tvořena ze tří koncentrických trubic, které jsou běžně vyrobeny z křemene a proudí jimi tok pracovního plynu, obvykle argonu. Pracovní plyn nebo také vnější plazmový plyn prochází vnější a střední trubicí průtokem přibližně 12–17 l min<sup>-1</sup> a je nositelem výboje. Druhý proud plynu (pomocný plyn) proudí mezi střední trubicí a injektorem vzorku průtokem přibližně 1 l min<sup>-1</sup> a izoluje plazma od prostřední trubice. Třetí plyn (nosný plyn), rovněž s průtokem cca 1 l min<sup>-1</sup> přivádí vzorek ve formě aerosolu do výboje [38,40]. Okolo plazmové hlavice je omotána indukční cívka, která dodává energii do plazmatu prostřednictvím vysokofrekvenčního elektromagnetického pole [40]. Schéma plazmové hlavice je na *Obrázku 2.2.* na straně 20.

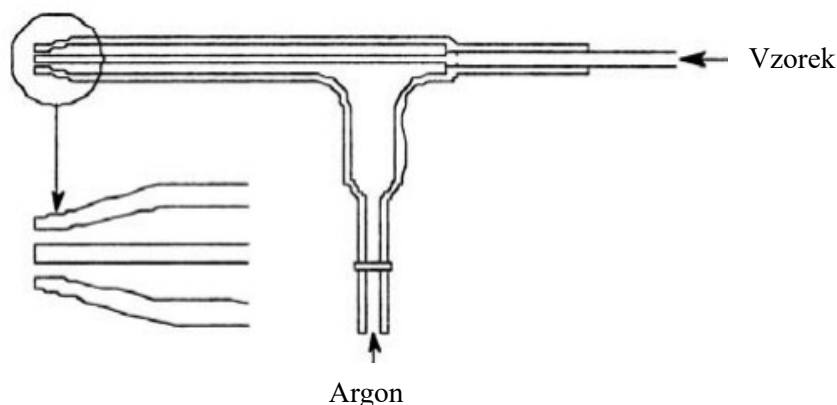


Obrázek 2.2: Schéma plazmové hlavice, Zdroj:[41], upraveno

### 2.7.2 Peristaltická pumpa a zmlžovač

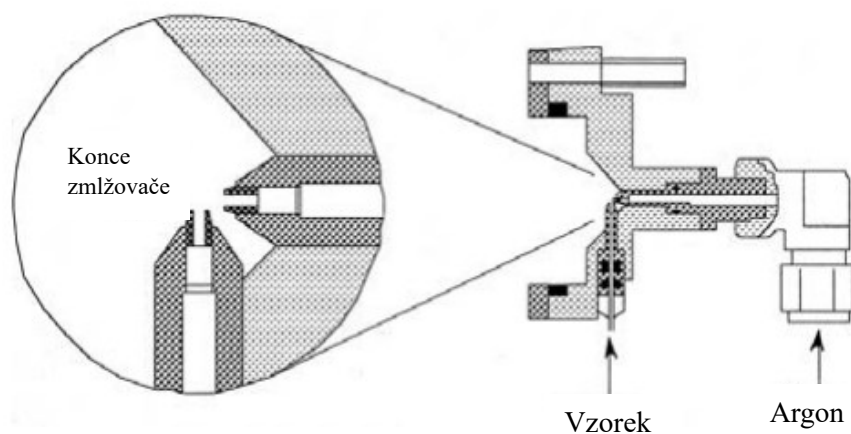
Pro měření kapalných vzorků na ICP-MS je nutné vytvořit jemný aerosol. Toho je dosaženo za pomoci zmlžovače a mlžné komory. Nejprve však bývá vzorek čerpán do zmlžovače peristaltickou pumpou. Peristaltická pumpa je pumpa s mnoha malými válci, které rotují stejnou rychlostí a tlačí na hadičku, čímž vytváří kontinuální tok. Tím zajišťuje konstantní průtok vzorku do zmlžovače obvykle rychlostí do  $1 \text{ ml min}^{-1}$ , bez ohledu na viskozitu vzorku [40]. Nevýhodou může být deformace hadičky v důsledku opotřebení, způsobující pokles průtoku a tedy citlivosti [38].

Nejběžnějším typem zmlžovače používaným v ICP-MS je koncentrický nebo pravoúhlý pneumatický zmlžovač. V koncentrickém zmlžovači je roztok přiváděn kapilární trubicí do oblasti nízkého tlaku, která vzniká rychlým prouděním plynu kolem konce kapiláry. Nízký tlak a vysokorychlostní plyn společně rozbíjejí roztok na aerosol, který se tvoří na otevřeném konci trysky zmlžovače. Koncentrické zmlžovače mohou poskytovat vynikající citlivost při práci s čistými roztoky. Nicméně jsou náchylnější k problémům s ucpáváním, zvláště pokud jsou nasávány vzorky se složitější matricí [40]. Vyobrazení koncentrického zmlžovače typu použitého v této práci je vidět na *Obrázku 2.3.* na straně 21.



Obrázek 2.3.: Znárodnění koncentrického zmlžovače, Zdroj: [40], upraveno

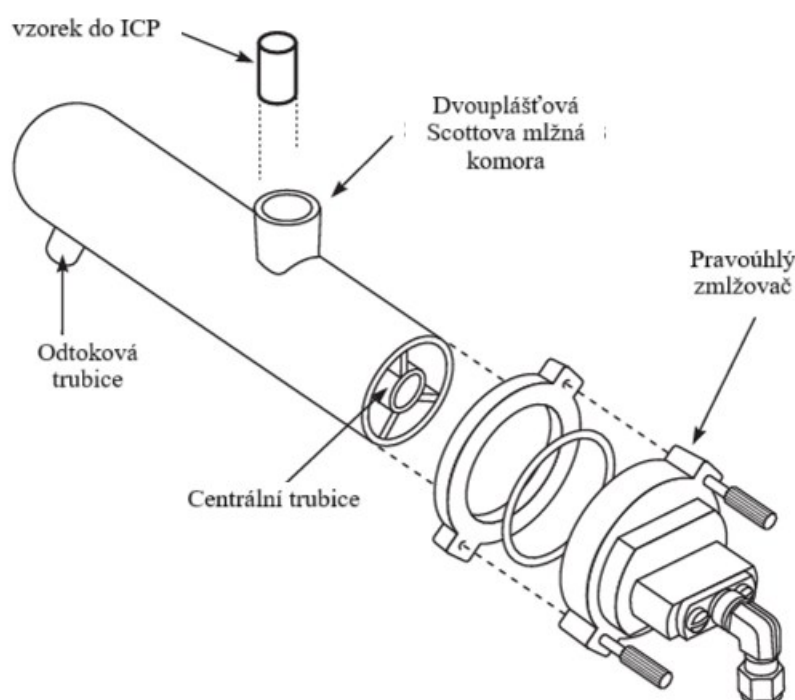
Pro vzorky obsahující složitější matici nebo malá množství nerozpuštěné hmoty je nejlepší volbou použití pravoúhlého zmlžovače. U této konstrukce je argon směřován v pravém úhlu k hrotu kapilární trubice, na rozdíl od koncentrického zmlžovače, kde je průtok plynu paralelní s kapilárou. Kontakt mezi vysokorychlostním plynem a proudem kapaliny způsobuje rozpad kapaliny na aerosol. Obecně jsou pravoúhlé zmlžovače méně účinné [40]. Pravoúhlý zmlžovač je vyobrazen na *Obrázku 2.4.*



Obrázek 2.4 Znárodnění pravoúhlého zmlžovače, Zdroj: [40], upraveno

Jakmile vzorek vstoupí do zmlžovače, kapalina je přeměněna na jemný aerosol pomocí zmlžovacího plynu (argonu) jehož kinetická energie je mnohem vyšší a trhá vzorek na malé kapičky. Aerosol, který vzniká má vysoké zastoupení částic s příliš velkým průměrem (více než 10  $\mu\text{m}$ ), které je žádoucí z aerosolu odstranit. Nejběžnější je použití dvouplášťové nebo také Scottovy mlžné komory. Aerosol vystupující ze

zmlžovače je směřován do centrální trubice, která prochází celou délkou komory. Kapky cestují společně s nosným plynem a část velkých částic se tříští vlivem nárazu na zakončení komory nebo také vlivem gravitace vypadávají a odtečou odtokovou trubicí na konci mlžné komory. Malé kapky, s průměrem menším než 10  $\mu\text{m}$ , vystupují z mlžné komory a jsou transportovány do plazmové hlavice. Mezi další typy mlžných komor patří například cyklonová či konická s impaktorem [40]. Znázornění Scottovy mlžné komory, tedy typu použitého v této práci je na *Obrázku 2.5*.

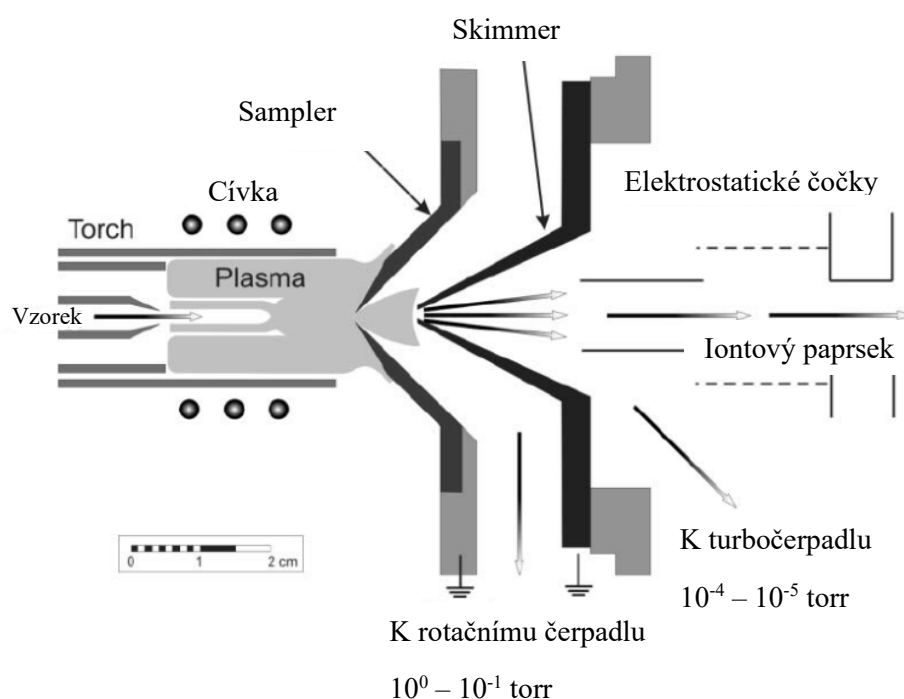


*Obrázek 2.5: Mlžná komora dle Scotta, Zdroj: [42], upraveno*

### **2.7.3 Interface mezi iontovým zdrojem a hmotnostním spektrometrem**

Rozhraní označované také jako interface je jednou z nejvíce namáhaných částí ICP-MS, neboť je v přímém kontaktu s plazmatem. Jeho úlohou je efektivní a konzistentní transport iontů z plazmatu, které se nachází za atmosférického tlaku (760 torr), do oblasti hmotnostního spektrometru, kde je tlak přibližně  $10^{-6}$  torr. Rozhraní se skládá ze dvou kovových kuželů s velmi malými otvory. První kužel je označován jako sampler. Druhý kužel zvaný skimmer je obvykle menší a špičatější než sampler [40]. Mechanická rotační vývěva udržuje tlak v prostoru mezi kužely na hodnotě cca 500 Pa. Když ionty vstoupí do této oblasti dochází vlivem prudkého poklesu tlaku k supersonické

expanzi iontů, čímž vzniká takzvaný „free-jet“. Ionty jsou následně vedeny skrze skimmer do vakuové komory a následně naváděny skrze iontovou optiku do hmotnostního spektrometru [43,44]. Oba kužely jsou vyrobeny z tepelně vodivých materiálů, nejčastěji z niklu či platiny, která je více odolná vůči korozním kapalinám. Pro snížení účinku plazmatu je pouzdro rozhraní chlazeno vodou [43]. Schéma rozhraní je na *Obrázku 2.6.*

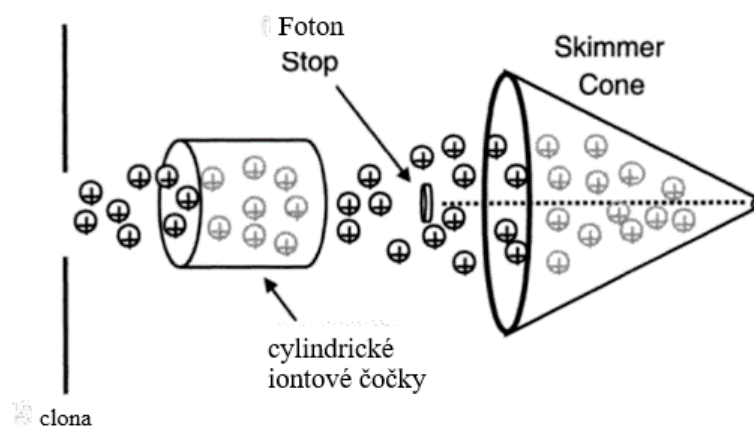


*Obrázek 2.6.: Schéma příčného řezu oblastí rozhraní, Zdroj: [43], upraveno*

#### 2.7.4 Iontová optika

Soustava elektrostatických čoček umístěných za skimmerem se souhrnně označuje jako iontová optika. Úlohou iontové optiky je převést iontový svazek z nepříznivého prostředí plazmatu přes rozhraní kuželů a nasměřovat jej do hmotnostního analyzátoru. Přitom je potřeba zabránit fotonům a dalším neutrálním částicím v dosažení detektoru [43]. Tyto částice způsobují nestabilitu signálu a pokud se dostanou do detektoru zvýší šum pozadí a tím se sníží i detekční schopnost. Existuje několik způsobů, jak zabránit těmto částicím se dostat do detektoru, přičemž nejpoužívanějším způsobem je umístění nějakého terčíku nebo mechanické zarážky za skimmer (tzv. foton-stop). Tato zarážka spolu s iontovými čočkami umožňuje fokusované svazku iontů pohybovat se

kolem ní, ale fotony a neutrální částice blokuje. Druhým způsobem je nastavení hmotnostního analyzátoru mimo osu. Třetím a nejnovějším způsobem je odraz iontového svazku o 90° pomocí dutého iontového zrcadla [40]. Iontové čočky jsou vyobrazeny na *Obrázku 2.7.*

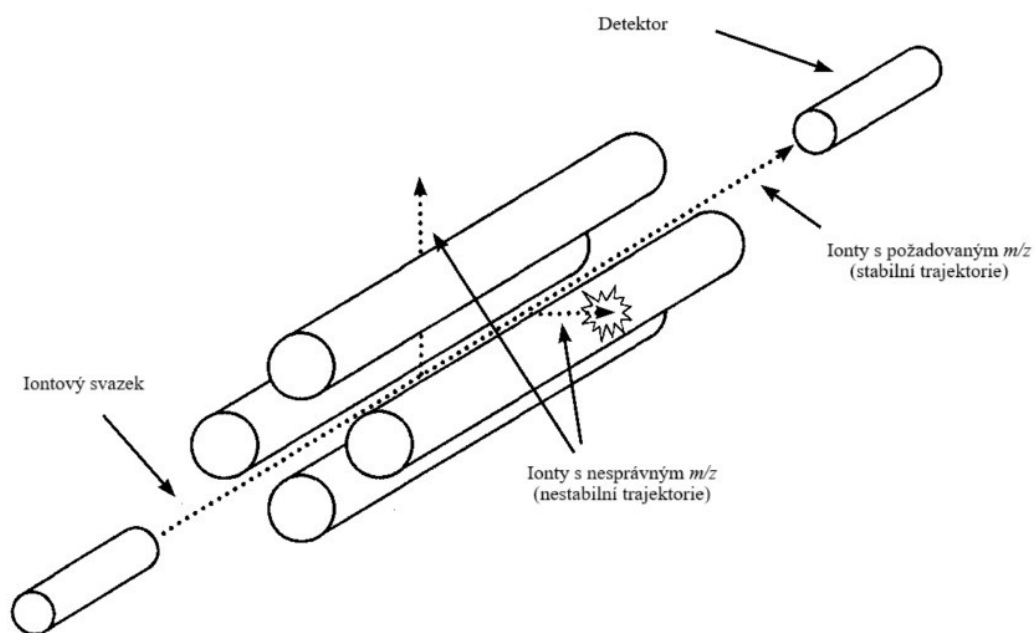


*Obrázek 2.7.: Typická konfigurace iontové čočky, znázorňující fotonovou zarážku a cylindrickou čočku, Zdroj: [45], upraveno*

### 2.7.5 Hmotnostní analyzátor

Po průchodu iontovou optikou dorazí ionty do hmotnostního analyzátoru, kde jsou rozděleny podle jejich poměru hmotnosti k náboji ( $m/z$ ). Existují v zásadě různé typy dostupných hmotnostních analyzátorů – kvadrupólové analyzátorů (Q-MS), analyzátorů doby letu (TOF-MS) či sektorové [43]. Nicméně kvadrupólové analyzátorů, buď jednoduché nebo trojitě, využívá až 95 % všech dnes používaných ICP-MS.

Kvadrupól se skládá ze čtyř rovnoběžných hyperbolických nebo válcových kovových tyčí (obvykle o délce 15-20 cm). Na tyče je přiveden vysokofrekvenční střídavý proud (AC) a stejnosměrný proud (DC), čímž se v centru tyčí vytváří časově proměnné elektrické pole, kterým procházejí ionty [43]. Výběrem optimálního poměru AC/DC na každém páru tyčí jsou pak k detektoru propuštěny pouze ionty s konkrétním poměrem  $m/z$ , kde jsou převedeny na elektrický impuls [40]. Ostatní ionty s odlišným poměrem  $m/z$  mají nestabilní trajektorii a dojde k jejich kolizi s nějakou tyčí a vybijí se nebo budou vyhozeny mezerami mezi tyčemi ven z kvadrupólu a na detektor nedopadnou [40,46]. Princip kvadrupólu je zobrazen na *Obrázku 2.8* na straně 25.



Obrázek 2.8.: Schéma a princip kvadrupólu, Zdroj: [47], upraveno

### 2.7.5.1 Kolizně – reakční cely

Detekční schopnost některých prvků je výrazně omezena při použití klasického kvadrupólového hmotnostního z důvodu tvorby spektrálních interferencí (viz *Oddíl 2.8.* na straně 26). Pro eliminaci spektrálních interferencí se proto začala využívat kolizně – reakční cely [40]. Jedná se o celu, ve které je umístěn kvadrupól (nebo multipól vyššího řádu), která je plněna inertním nebo reaktivním plynem. Obvykle se jedná o He nebo H<sub>2</sub>, ale lze se setkat i s NH<sub>3</sub> nebo Xe [43].

Existují dva přístupy eliminace interferencí. Prvním způsobem je diskriminace kinetickou energií (KED), ve kterém se jako kolizní plyn využívá helium. Ionty generované v plazmatu podstupují kolize s molekulami plynu (He), což způsobí snížení jejich kinetické energie ( $E_{\text{KIN}}$ ). Tyto polyatomické ionty lze poté jednoduše vyfiltrovat tím, že bude aplikován vhodný napěťový rozdíl mezi kolizní celou a kvadrupólem. Je také nutné podotknout, že ionty analytu jsou touto diskriminací také ovlivněny a dochází ke srážkám, ale v menší míře než u polyatomických iontů z důvodu menšího průřezu [46]. Výhodou je, že vzhledem k dramatickému snížení polyatomických interferencí dochází ke zvýšení poměru signálu k pozadí analytu a tím k nižšímu limitu detekce. Ovšem nevýhodou je, že pro odstranění izobarických interferencí dalších prvků z matrice se diskriminace kinetickou energií použít nedá [43].

Druhým přístupem je diskriminace interferentů iontově-molekulovými reakcemi. V tomto případě je reakční cela plněna reakčním plynem, nejčastěji  $H_2$ . Interferenty reagují s reakčním plynem za vzniku iontů o jiném  $m/z$  než má analyt nebo neutrálních iontů [38,40].

### 2.7.6 Detektor

Nejběžnějším detektorem používaným v ICP-MS je elektronový násobič (EM). Kladně nabitě ionty analytu narážejí na první dynodu detektoru, která je udržována na vysokém záporném napětí. Náraz iontu do detektoru způsobí emisi několika elektronů z povrchu, které následně narážejí na další dynodu a uvolňují další elektrony. Tento proces, nazývaný sekundární emise, pokračuje a generuje kaskádu, která nakonec vyústí ve vznik signálu dostatečně velkého, aby mohl být spolehlivě změřen [43]. Existují vesměs dva typy elektronových násobičů používaných v ICP-MS, které mají stejný princip, ale liší se konstrukcí. Prvním typem je elektronový násobič s kontinuální dynodou (CEM), který se vyznačuje svou vysokou citlivostí. Jedná se o skleněný kužel, který je pokrytý materiálem polovodičového typu. Druhým typem je elektronový násobič s diskrétními dynodami. Pracuje podobně jako CEM, ale využívá k násobení jednotlivé dynody. Také se vyznačuje velkou citlivostí, ale má delší dobu životnosti [40].

Posledním možným detektorem je Faradayův kelímek. Ten se využívá pro aplikace, kde nejsou vyžadovány ultrastopové analýzy. Další nevýhodou je, že je možné ho použít pouze při vysokých iontových proudech. Z důvodu své nízké citlivosti se používá v kombinaci s elektronovým násobičem [40].

## 2.8 Interference

Jako u mnoho ostatních technik stejně i u ICP-MS se lze setkat s řadou interferencí, které jsou překážkou v analýze velkého množství prvků a v některých případech dokonce znemožnit analýzu. Rozlišují se obecně dva typy interferencí, interference spektrální a nespektrální [36,48].

Spektrální interference jsou zapříčiněny signály generované izobarickými a polyatomickými ionty, které se překrývají a jsou detekovány při stejném  $m/z$  jako stanovovaný prvek. Příkladem je stanovení  $^{58}Ni^+$ , který je překrývaný  $^{58}Fe^+$ . Tyto překrývající se signály vedou k nadhodnocenému výsledku ve srovnání se skutečnou

koncentrací analytu [49]. Za větší část spektrálních interferencí však stojí polyatomické ionty. Zdrojem interferujících polyatomických iontů je především matrice vzorku, ale i plazma nebo vzduch obklopující plazma. Příkladem časté interference jsou ionty argonu ve spojení s dalšími ionty, jako jsou například  $\text{ArH}^+$ ,  $\text{ArCl}^+$ ,  $\text{ArC}^+$  nebo  $\text{ArO}^+$ . Z matrice to mohou být prvky jako kyslík, chlor, vápník a mnoho dalších. Například při stanovení  $^{75}\text{As}^+$  může být polyatomickou interferencí  $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$  nebo při stanovení  $^{80}\text{Se}$  je to polyatomický iont  $^{64}\text{Zn}^{16}\text{O}^+$ . Nutné je také podotknout, že většina prvků má izotopy, což může komplikovat stanovení ještě více prvků na více hmotách (např.  $^{36}\text{Ar}$ ,  $^{38}\text{Ar}$ ) [48].

Nejčastější způsob potlačení spektrálních interferencí je využití kolizně-reakční cely (viz *Oddíl 2.7.5.1.* na straně 25). Nicméně existují i jiné způsoby, které se v posledních letech osvědčily. Jeden ze způsobů je použití takzvaného studeného plazmatu, protože existují interferenty, které vznikají v důsledku vysokých teplot plazmatu [49]. Tento způsob spočívá v tom, že dojde ke snížení RF výkonu (500-1100 W) na cíve, čímž dojde ke snížení teploty plazmatu. Toto snížení teploty potlačí mnoho interferencí [40]. Podmínky studeného plazmatu jsou však omezeny na malou skupinu prvků s relativně nízkými ionizačními potenciály ve vodných roztocích, které jsou náchylné na spektrální interference na bázi argonu (např.  $^{56}\text{Fe}^+$ ). Pro prvky s vysokým prvním ionizačním potenciálem je však nevhodné a použití studeného plazmatu vede k nízké citlivosti pro tyto prvky (As, Se) [49].

Naopak nespektrální interference jsou způsobené matričními prvky, které ovlivňují energetické poměry, a tudíž i ionizační rovnováhy v plazmatu [50]. Nespektrální interference lze rozdělit na reverzibilní (např. zesílení nebo potlačení signálu) a na ireverzibilní (např. hromadění solí v okolí kuželů) [51]. Potlačení signálu funguje tak, že pokud máme dva prvky, tak signál izotopově lehkého analytu v izotopově těžké matrici bude potlačen mnohem více, než by tomu bylo naopak. Míru potlačení signálu určuje hodnota ionizačního potenciálu. Signál může mít nejen potlačen, ale i naopak zesílen v přítomnosti polárních sloučenin uhlíku [36]. Z praxe je známá nespektrální interference při stanovení As (ale i jiných metaloidů) způsobená přítomností uhlíku ve vzorku a posléze i v plazmatu. Uhlík může ovlivnit ionizační podmínky v plazmatu, což má za následek ke zvýšení signálu As [50].

## 2.9 Aplikace

Díky mnoha výhodám je metoda ICP-MS využívána v mnoha oblastech. Přibližně třetina všech prováděných analýz má enviromentální charakter. Mezi nejčastěji analyzované vzorky životního prostředí jsou vzorky pitné, podzemní nebo odpadní vody. Druhým nejčastějším aplikačním polem je biomedicína, jelikož ICP-MS nabízí rychlý, efektivní způsob pro analýzu stopových prvků v klíčových oblastech biomedicínského výzkumu, jako je toxikologie, patologie, výživa nebo forenzní vědy. Na ultrastopových úrovních je možné pomocí ICP-MS stanovit koncentrace mnoha prvků v tělních tekutinách, což umožňuje biochemické studie. Mezi mnohé analýzy prováděné pomocí ICP-MS patří například stanovení toxických prvků, jako je arsen, kadmium nebo olovo v krvi, stanovení stopových prvků v kostech a zubech jako indikátor expozice těžkým kovům či studium biologické dostupnosti zinku [40,52].

Tato metoda se kromě stanovení celkového obsahu kovů často využívá jako vysoce citlivý a selektivní detektor pro speciální analýzu, přičemž ICP-MS bývá propojeno s HPLC chromatografií. Mimo jiné je metoda ICP-MS hojně využívána pro stanovení geologických vzorků, protože umožňuje multielementární stanovení nízkých koncentrací vzácných zemin. Také ve spojení s laserovou ablací může sloužit k citlivé analýze povrchů [46,52].

Vzhledem k vzestupu používání nanotechnologií a nanomateriálu v různých odvětvích lidské činnosti, začalo být nutné se zajímat o případné negativní důsledky nanočástic na ekosystémy a potažmo přímo na lidské zdraví. V důsledku toho došlo v posledních letech k vývoji a vylepšení metod pro detekci nanočástic. Pro tento účel je také vhodná metoda analýzy jednotlivých částic hmotnostní spektrometrií s indukčně vázaným plazmatem (spICP-MS) používaná v této práci [53]. Jedná se o metodu, která je schopná na základě statistického zpracování intenzit signálů kvantifikovat rozdíl mezi iontovými a nanočásticovými formami analytu, stanovit koncentraci částic (PNC) a určit jejich velikost [54].

## 2.10 Single particle inductively coupled plasma mass spectrometry (spICP-MS)

Za posledních třicet let se díky svým unikátním vlastnostem staly nanočástice středem revolučních pokroků v mnoha oblastech vědy a techniky. Jejich široké využití a přínosy však vyvolává obavy ohledně možného dopadu na lidské zdraví a životní

prostředí. Kvůli tomuto bylo potřeba vyvinout účinné metody pro stanovení velikosti a koncentrace nanočástic [55]. Existuje několik analytických metod pro stanovení nanočástic. Mezi nejčastěji používané techniky patří elektronová mikroskopie (TEM i SEM), frakcionace tokem v asymetrickém proudovém poli (A4F-ICP-MS) ve spojení s hmotnostní spektrometrií s indukčně vázaným plazmatem nebo technika analýzy jednotlivých částic hmotnostní spektrometrií s indukčně vázaným plazmatem (spICP - MS) [56].

Technika spICP-MS představuje efektivní přístup pro měření nanočástic na bázi kovových oxidů, která poskytuje informace nejen o jejich početní koncentraci, ale i o distribuci jejich velikostí nebo hmotností [11]. Single particle ICP-MS je založena na předpokladu, že každý přechodný pík nebo pulz představuje událost související s jednou částicí. Frekvence těchto událostí je přímo úměrná počtu částic vstupujících do plazmatu, zatímco intenzita události je úměrná průměru částice [57].

Klíčovým faktorem rozhodujícím o přesnosti měření spICP-MS je vhodné ředění vzorku. Výhodou je, že při takto velkém naředění vzorků se snižuje výskyt matricových efektů. Nicméně u některých složitých matic, jako jsou krémy, biologické tkáně, krev nebo pastové materiály je nutné použití různých extrakčních technik, jako jsou například enzymatické či chemické [58]. Dalším aspektem ovlivňující stanovení pomocí spICP-MS je přítomnost iontových forem sledovaného prvku v matici. Signál pocházející z nanočástice a signál z iontové formy lze rozlišit, ale pouze do určité míry. Pokud koncentrace iontové formy výrazně vzroste, stává se detekce malých nanočástic poměrně obtížnou [59]. Mimo jiné se lze setkat i výskytem spektrálních i nespektrálních interferencí jako je tomu u klasického ICP-MS. U spICP-MS spektrální interference způsobují zvýšení signálu pozadí a chovají se stejně jako rozpuštěný prvek. To znamená, že tyto interference neovlivňují samotný signál nanočástice a velikost nanočástice by měla být určena správně po korekci pozadí. Na druhou stranu nespektrální interference ovlivňují jak pozadí, tak i signál nanočástice. Například přítomnost NaCl snižuje citlivost, protože snižuje účinnost ionizace a může způsobit podhodnocení průměru částic. Naopak zvýšené množství uhlíkatých sloučenin v matici může účinnost ionizace zvýšit, čímž zvýší citlivost a dojde k nadhodnocení rozměru částice [60].

### 2.10.1 Princip měření

Technika spICP-MS využívá tradiční princip měření pomocí ICP-MS, ovšem za podmínky zavádění vysoce zředěné suspenze částic do přístroje. Princip techniky je takový, že získává údaje o intenzitě jednotlivých částic při velmi krátkých integračních časech (dwell time), v rozmezí několika set mikrosekund až milisekund na jeden datový bod. Použitím takto krátkých integračních časů ve spojení s vysoce zředěnými suspenzemi částic umožňuje detekci jednotlivých událostí, kdy se do detektoru dostanou shluky částic, která mají vyšší odezvu než pozadí, odtud název "single particle". Cílem je tedy zajistit, aby do plazmatu vstupovaly oddělené částice a v rámci doby integrace byl integrován signál vyvolaný rozpadem a ionizací vždy pouze jedné částice [58]. Studie publikované v posledních letech naznačují, že pro dosažení objektivních výsledků je vhodné používat kratší doby měření, přibližně 0,1 ms. V případě, že do plazmatu vstoupí a je ionizováno více částic současně nebo v případě, že je použit delší integrační čas, hrozí riziko, že analýza poskytne nesprávné výsledky. V takovém případě bude vícero částic započítáno dohromady jako jedna částice o větším rozměru [57,61].

Pomocí spICP-MS nelze přímo stanovit velikost a koncentraci nanočástic. Přístroj nejprve měří intenzitu signálu, která se běžně pomocí kalibrační křivky převádí na hmotnost částice. Pro částice se známou geometrií, typicky se předpokládá kulatá částice, stechiometrií a hustotou lze průměr částice „ $d$ “ vypočítat přes následující rovnici:

$$d = \sqrt[3]{\frac{6m}{\pi \cdot \rho}} \cdot 10^{-4} \quad (2.1)$$

kde  $m$  je hmotnost částice v ng a  $\rho$  je hustota částice v g cm<sup>-3</sup>.

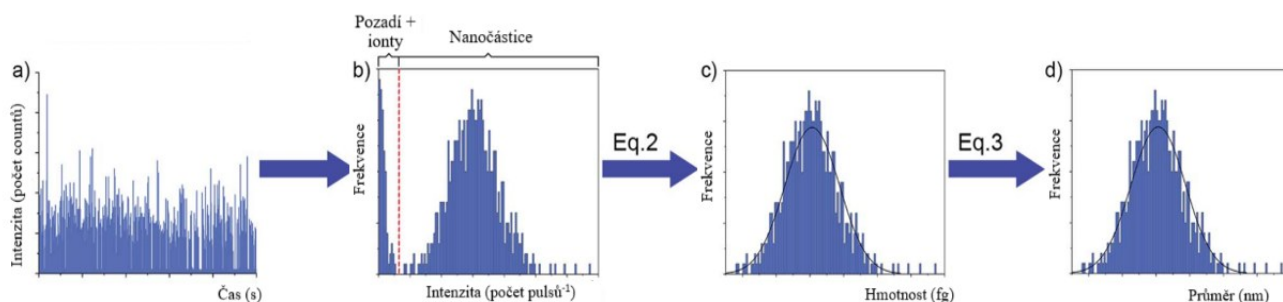
Celkovou koncentraci částic ve vzorku „ $N$ “ lze vypočítat podle rovnice:

$$N = \frac{60 \cdot f}{V \cdot \eta} \quad (2.2)$$

kde  $f$  [s<sup>-1</sup>] je průměrný počet píků připadající na jednotku času,  $\eta$  je transportní účinnost, která je bezrozměrná a  $V$  [ml min<sup>-1</sup>] je průtok vzorku nasávaného do zmlžovače [53].

## 2.10.2 Distribuce

Na *Obrázku 2.9*. lze pozorovat, jak vypadá záznam z měření. Nejprve vidíme původní naměřený signál jednotlivých nanočástic, který se poté přepočte na distribuci frekvence vs integrovaná intenzita (*Obrázek 2.9b*). Zde můžeme vidět statistické zastoupení generované iontovou formou a nanočásticemi. Vysoká frekvence, ale malá intenzita pulsů náleží iontové formě. Naopak nižší frekvence, ale velká intenzita je nanočásticová forma. Toto grafické znázornění lze převést po provedení příslušné kalibrace na distribuci frekvence vs hmotnost analytu (*Obrázek 2.9c*) ve které se již počítá pouze s nanočásticovou formou. Pro získání distribuce frekvence vs průměr částice (*Obrázek 2.9d*) je potřeba mít údaje o hustotě a přes rovnici pro výpočet objemu, přičemž se předpokládá kulový tvar částice, lze dopočítat velikost částice podle *Rovnice 2.1*. [59].



*Obrázek 2.9.: Data a distribuce získaná pomocí spICP-MS po adekvátním zpracování a kalibraci, Zdroj: [59], upraveno*

## 2.10.3 Příprava roztoků před analýzou a kalibrace

Nanočástice se často vyskytují ve složitých maticích (např. pevné matrice, potraviny, enviromentální vzorky) a někdy vyžadují pečlivou přípravu vzorku pro jejich úspěšnou extrakci a analýzu pomocí spICP-MS [62]. Při výběru optimálního postupu přípravy vzorku je nutné zvážit chemické vlastnosti materiálu nanočástic, chemické složení matrice a rozpustnost jednotlivých složek. Příprava vzorků je také klíčová pro dosažení správných výsledků. Při přípravě mohou vznikat různé problémy, jako je neúplná extrakce nanočástic, agregace, disoluce nebo změna velikosti extrahovaných nanočástic. Kapalně vzorky nebo biologické tekutiny lze analyzovat přímo po zředění vhodným ředícím činidlem. Často používaným činidlem je methanol nebo Triton X-100. Pro přípravu vzorků je také velmi důležitá sonikace, která zajišťuje homogenitu vzorku [13,53]. U pevných biologických vzorků (např. orgány nebo rostlinná pletiva) je nezbytná homogenizace s cílem narušit biologické struktury (např. buněčné stěny), následovaná extrakcí nebo hydrolýzou vzorku [53].

## 3 Experimentální část

### 3.1 Použité chemikálie

Ar odpařovaný z kapalného Ar (99,999%, SIAD, ČR) nebo plynný Ar (99,999%, Linde, ČR) jako ionizační plyn

Kyselina dusičná (HNO<sub>3</sub>) – 67–69% (Analpure, Analytika, spol. s. r. o., Česká republika)

Kyselina chlorovodíková (HCl) – 34-37% (Analpure, Analytika, spol. s. r. o., Česká republika)

Peroxid vodíku (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) – 30% p.a. nestabilizovaný (Lach-Ner, s. r. o., Česká republika)

80 nm Silver Nanospheres, koncentrace 0,020 mg ml<sup>-1</sup>, matrice 2mM citrát o pH = 9, NanoXact™ (nanoComposix)

40 nm Silver Nanospheres, koncentrace 0,020 mg ml<sup>-1</sup>, matrice 2mM citrát o pH = 9, NanoXact™ (nanoComposix)

60 nm Gold Nanospheres, koncentrace 0,054 mg ml<sup>-1</sup>, matrice 2mM citrát o pH = 9, NanoXact™ (nanoComposix)

30 nm Gold Nanospheres, koncentrace 0,053 mg ml<sup>-1</sup>, matrice 2mM citrát o pH = 9, NanoXact™ (nanoComposix)

Triton X-100, 93420, (Fluka chemie GmbH, Německo)

Kyselina citronová (p.a., 99,5%) monohydrát, M<sub>r</sub> = 210,14 (Penta, Česká republika)

Polyvinyl alkohol, Cas-No: 9002-89-5, (Merck Schuchardt OHG, Německo)

Deionizovaná voda o měrném odporu 18,2 MΩcm připravená zařízením MilliQ<sub>PLUS</sub> (Millipore, USA)

Vodný kalibrační roztok stříbra AN 90011N – o koncentraci 1,000 ± 2 mg l<sup>-1</sup>, matrice 2% HNO<sub>3</sub> (v/v) (Analytika, spol. s. r. o., Česká republika)

Vodný kalibrační roztok zlata AN 90041C – o koncentraci  $1,000 \pm 2 \text{ mg l}^{-1}$ , matrice 5% HCl (v/v) (Analytika, spol. s r. o., Česká republika)

### **3.2 Použité přístroje**

Hmotnostní spektrometr s indukčně vázaným plazmatem Agilent 7900 ICP-MS s kvadrupólovým hmotnostním analyzátozem vybavený SW balíčkem pro stanovení nanočástic (Agilent Technologies, USA) a osazený plazmovou hlavicí pro spICP-MS (1.0 mm i.d., Agilent, USA)

Mikrovlnné rozkladné zařízení SpeedWave Xpert (Berghof, Německo)

Analytické váhy RC 210 D (Sartorius, Německo)

### **3.3 Pracovní postup**

#### **3.3.1 Příprava disperzí nanočásticového standardu pro kalibraci**

Standard stříbrných nanočástic (Ag NPs) o koncentraci  $0,020 \text{ mg ml}^{-1}$  byl po vyjmutí z lednice sonikován v ultrazvukové lázni po dobu 3 minuty. Posléze bylo odpipetováno 100  $\mu\text{l}$  nanočásticového standardu do 15ml zkumavky a objem byl doplněn do 10ml zvoleným stabilizačním činidlem. Poté byla tato zkumavka sonikována v ultrazvukové lázni. Tento postup byl opakován ještě dvakrát, dokud nebylo dosaženo koncentrace 20 ppt stříbra, resp. částicové koncentrace  $5,3 \cdot 10^7$  částic  $\text{l}^{-1}$ . Takto připravená zředěná suspenze mohla být použita pro kalibraci nebo jako modelový roztok pro optimalizace. Nikdy nebylo pipetováno méně než 100  $\mu\text{l}$  nanočásticové disperze, aby bylo sníženo riziko chybné koncentrace kvůli horší homogenitě disperze.

Nanočásticový standard zlata (Au NPs), který byl používán při kalibraci jako referenční materiál byl připravován analogickým způsobem. Připravována byla koncentrace 20 ppt Au respektive  $9,2 \cdot 10^6$  částic  $\text{l}^{-1}$ .

Slepým vzorkem bylo, není-li uvedeno jinak, stabilizační činidlo používané v daném experimentu.

#### **3.3.2 Příprava roztoků iontového standardu stříbra a zlata**

Ze zásobního roztoku stříbra (Ag) o koncentraci  $1000 \text{ mg l}^{-1}$  byl nejprve připraven roztok o koncentraci  $10 \text{ mg l}^{-1}$  tím, že bylo odpipetováno 100  $\mu\text{l}$  roztoku o koncentraci

1000 mg l<sup>-1</sup> a doplněno vhodným ředícím činidlem (citrátový pufr, PVA, Triton X-100) na 10 ml. Poté bylo z roztoku o koncentraci 10 mg l<sup>-1</sup> znovu pipetováno 100 µl a byl připraven roztok o koncentraci 100 µg l<sup>-1</sup>. Následně bylo tohoto roztoku odpipetováno 100 µl a doplněno do 10ml, čímž vznikl roztok iontového standardu stříbra (iAg) o koncentraci 1 µg l<sup>-1</sup>. Všechny roztoky byly připravovány do plastových centrifugačních zkumavek a doplňovány do 10 ml.

V případě iontového standardu zlata byl použit zásobní roztok zlata o koncentraci 1000 mg l<sup>-1</sup>. Postup byl totožný jako u přípravy iontového standardu stříbra, avšak s použitím jiného rozpouštědla. K přípravě iontového standardu byla vždy použita 5% lučavka královská, připravená z 67–69% kyseliny dusičné a 36% kyseliny chlorovodíkové.

### 3.4 Stanovení celkového obsahu stříbra ve vzorcích

Na analytických vahách Sartorius bylo naváženo 250 mg vzorku do teflonových kalíšků. Konkrétně se jednalo o sprchový gel s nanostříbrem pro ženy, šampon s nanostříbrem pro muže a přírodní tekuté mýdlo s obsahem nanostříbra. Všechny vzorky byly od výrobce kosmetiky s deklarovaným obsahem nanostříbra – Nanostříbro plus s. r. o. Poté byly teflonové misky za pomoci pinzety vloženy do rozkladných patron. Následně byla k těmto vzorkům pipetována kyselina dusičná a peroxid vodíku. Po přidavku peroxidu vodíku byly rozkladné patrony ponechány 15 minut v digestoři kvůli případné bouřlivé reakci chemikálií se vzorkem. Poté byly patrony uzavřeny a byl rozložen s použitím teplotního a tlakového programu vyvinutého výrobcem rozkladného zařízení. Použitý program je popsán v *Tabulce 3.1*.

*Tabulka 3.1: Použitý rozkladný program*

Krok	Teplota, °C	Tlak, bar	Doba změny teploty, min	Čas, min
1	170	30	2	5
2	190	35	5	30
3	50	25	1	10

Rozložené vzorky byly následně převedeny z rozkladných patron do plastových 50ml zkušev a jejich objem byl doplněn deionizovanou vodou na celkový objem 50ml. Poté byl obsah stříbra v těchto vzorcích stanoven na ICP-MS proti modelové řadě kalibračních roztoků o koncentracích 0; 10; 25; 100; 300; 500  $\mu\text{g l}^{-1}$ . Pro stanovení bylo zvoleno  $m/z = 107$  a měřicí mód bez kolizního plynu.

### 3.4.1 Kvalifikace přístroje ICP-MS a zajištění kvality výsledků

Hmotnostní spektrometr s indukčně vázaným plazmatem je ovládán programem MassHunter, ve kterém probíhá i vyhodnocení výsledků. Na úvod každého měřicího dne bylo v programu MassHunter spuštěno ladění přístroje ICP-MS, při kterém jsou napětí na iontových čočkách a další parametry přístroje optimalizovány za pomoci ladícího roztoku na co nejvyšší citlivost. Následně je vygenerována zpráva o citlivosti a opakovatelnosti měřených hmot, přiřazení hmotnostní osy a zastoupení dvojnásobně nabitých iontů a oxidů za daných podmínek v plazmatu. V spICP-MS uspořádání bylo toto ladění prováděno v rámci batch a ve dvou krocích. V prvním kroku bylo toto ladění prováděno s využitím hmot 7, 89 a 205 pro přiřazení hmotnostní osy (s přesností lepší než 0,1) a určení citlivosti a opakovatelnosti a s využitím poměrů hmot 156/140 (zastoupení oxidů Ce) a 70/140 (zastoupení dvojnásobně nabitých oxidů Ce. Zastoupení oxidů bylo žádoucí pod 6 % vzhledem k tomu, že Ag netvoří ochotně AgO a interference  $^{91}\text{Zr}^{16}\text{O}^+$  je ve vzorcích velice nepravděpodobná. Zastoupení dvojnásobně nabitých iontů bylo žádoucí pod 3 %. Vyšší procenta zastoupení jsou způsobená použitím torche, u které je potřeba snížit průtok pracovního plynu. Ve druhém kroku bylo doladění iontových čoček pro ideální zaostření paprsku zopakováno za použití hmot 107 a 197. V tomto kroku byla zjišťována pouze citlivost, přiřazení hmotnostní osy a opakovatelnost.

Každé měření také začínalo kalibrační účinností transportu a citlivostí. Jako první byla změřena odezva slepého vzorku, jemuž je SW přiřazena nulová koncentrace nanočástic i iontové formy. Následně byly změřeny iontové standardy Ag a Au o koncentraci 1  $\mu\text{g l}^{-1}$  pro vytvoření dvoubodové kalibrace citlivosti (tedy vždy slepý vzorek a jeden standard). Bohužel SW Mass Hunter neumožňuje vícebodovou kalibraci citlivosti. Posledním krokem kalibrace bylo vždy změření nanočásticového referenčního materiálu o známé koncentraci a průměru částic. Z distribuce signálů tohoto RM je určována účinnost transportu NPs a je z ní kalibrována závislost mezi citlivostí

a průměrem nanočástic. Z detekovaného počtu NPs a známé (změřené) rychlosti průtoku čerpací hadičkou je pak určována koncentrace částic (viz *Oddíl 2.10.1.* na straně 30).

Dle potřeby byly měřeny slepé vzorky nebo nanočásticový referenční materiál i jako kontrolní vzorky. Podmínkou začátku měření vzorků byl plynulý průtok vzorku, určení správné koncentrace částic a průměru částice u RM a účinnost transportu v rozmezí 2-10 %. Nesplnění těchto podmínek znamenalo buď zopakování kalibrace nebo zastavení experimentální práce a vyřešení příčiny.

## 4 Výsledky a diskuse

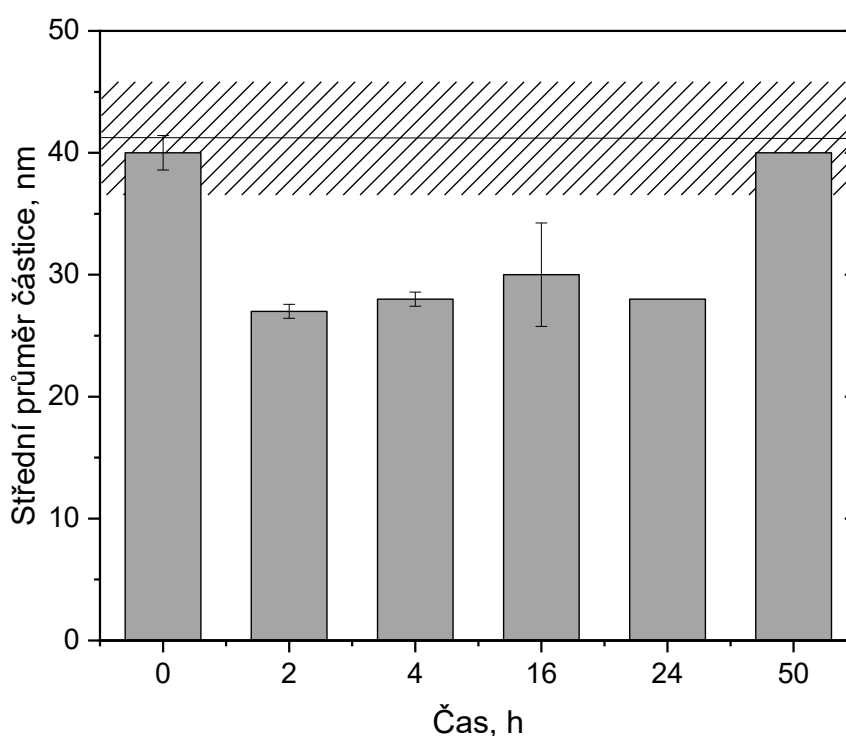
V následující kapitolách jsou shrnuty všechny dosažené výsledky, které jsou diskutovány.

### 4.1 Stabilita nanočástic v citrátovém pufru při různých časech a pH

Nanočástice nejsou kvůli svému velkému relativnímu povrchu a reaktivitě příliš stabilní. Konkrétně nanočástice stříbra se mohou rozpouštět i v deionizované vodě. Jako první byla otestována jejich stabilita v deionizované a kohoutkové vodě a bylo pozorováno kompletní rozpuštění nanočástic již v průběhu jednotek hodin. Je tedy nezbytné používat stabilizátory, což jsou látky vázající se na povrch částice a bránící jeho interakci s rozpouštědlem a také interakci s dalšími částicemi. Jako první stabilizační činidlo byl zvolen citrátový pufr, protože ho pro syntézu a stabilizaci nanočástic používá jejich výrobce. Citrát se váže k povrchu nanočástice přes kyslík jedné nebo více  $-OH$  skupin. Zbylé nenavázané  $O^-$  fungují jako elektrostatická zábrana proti agregaci takto obalených nanočástic [63,64]. Koncentrace byla od výrobce převzata, ale bylo testováno, zda a jaký vliv má na dlouhodobou stabilizaci Ag NPs proti agregaci a rozpouštění pH citrátového pufru. Nejprve byly testovány stability nanočástic v citrátovém pufru o  $pH = 8$  a  $pH = 9$  v časovém rozmezí 0 až 50 hodin. Vzhledem k tomu, že při  $pH = 8$  je citrát prakticky úplně disociován, stejně jako při  $pH = 9$ , tak bylo očekáváno, že záporně nabitá vrstva, která se vytvoří na povrchu nanočástic zabrání jejich agregaci a výsledky budou prakticky srovnatelné s  $pH = 9$ . Na *Obrázku 4.1* na straně 38 pro  $pH = 8$  lze vidět, že čerstvě připravený vzorek má velikost přibližně 40 nm, což odpovídá certifikované hodnotě uváděné výrobcem ( $41 \pm 5$  nm). V průběhu dalších hodin (2h, 4h) dochází ke snížení velikosti částic pod optimální hodnotu, tento pokles může naznačovat agregaci menších částic nebo rozpouštění. Po 16 hodinách se velikost částic zvyšuje, přičemž se zvyšuje i variabilita výsledků a s tím můžeme pozorovat i větší směrodatnou odchylku. Po 50 hodinách velikost opět narůstá a dosahuje hodnoty přibližně 40 nm, což je opět v rozmezí a může to naznačovat stabilizaci nanočástic, avšak toto je v rozporu s trendem, který můžeme pozorovat s narůstajícím časem.

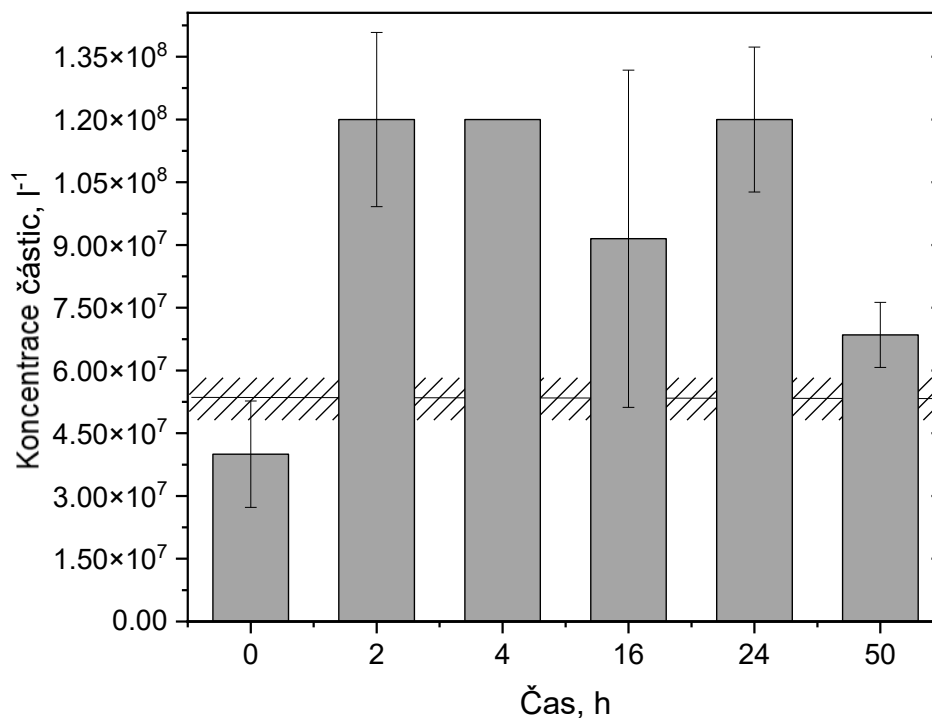
Z výsledků lze tedy pozorovat, že docházelo k nadhodnocení počtu částic a podhodnocení jejich velikostí. Zajímavé je, že hlavně u čerstvého vzorku a 50hodinového vzorku lze sledovat obdobné výsledky. Pokud by se nanočástice

rozpouštěly, tak by měl být pozorovatelný určitý trend. Nicméně nelze prokázat, že tento návrat velikosti částic k očekávané souvisí s nějakou nestabilitou nanočástic v pufru. Vzorky nebyly měřeny v jeden den a ICP-MS nebylo v provozu celých 50 hodin a mezitím byl stroj vypnut a znovu nakalibrován. Někdy v průběhu opakovaných kalibrací tedy mohly nastat nepodchycené efekty, které mají za důsledek to, že pozorujeme nárůst středního průměru částic při delších časech. Lze však pozorovat trend (*Obrázek 4.1*) ukazující, že v průběhu času nám klesá střední průměr částic, což by naznačovalo, že se stříbrné nanočástice částečně rozpouštějí. Lze tedy říct, že pH pufru nebylo dostatečně vysoké, aby zajistilo plnou stabilizaci nanočástic.



*Obrázek 4.1.: Velikosti nanočástic při použití citrátového pufru o pH = 8*

V případě *Obrázku 4.2* na straně 39, který znázorňuje počet částic na litr vzorku (PNC) v závislosti na čase mezi přípravou a analýzou vzorku můžeme vidět, že ani jedna hodnota se nenachází v rozmezí odchylky 10 % od certifikované hodnoty koncentrace standardu, přičemž teoretická koncentrace byla vypočítána jako  $5,3 \cdot 10^7$  částic v 1 litru. Pouze čerstvý vzorek se blíží této hranici, ale má poměrně velkou směrodatnou odchylku. Celkový vzhled trendů odpovídá situaci, kdy je naměřeno buď vyšší množství částic o menším průměru nebo naopak menší množství částic o větším průměru; tedy nedařilo se správně určit současně koncentraci částic a jejich průměr. Z výsledku experimentu nebylo možné určit, zda je příčinou pH pufru nebo jiná příčina.

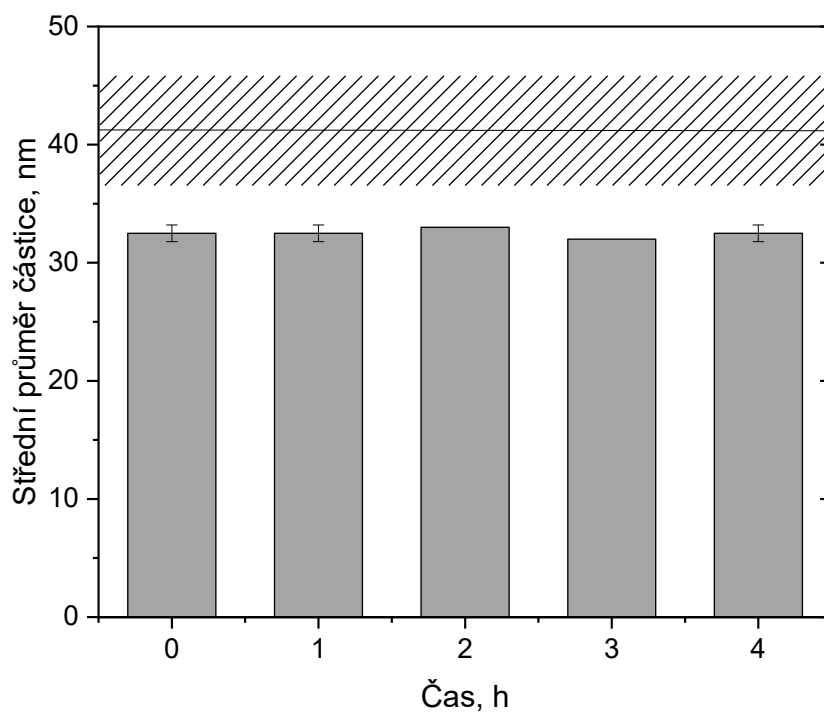


Obrázek 4.2.: Koncentrace částic v jednom litru při pH = 8

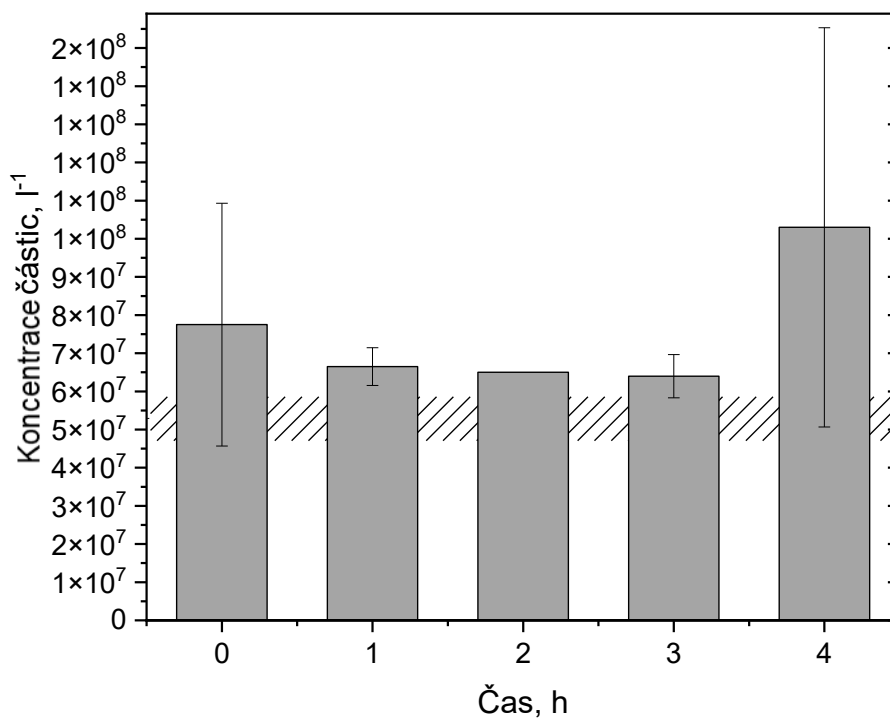
Současně docházelo k velkému nadhodnocení počtů částic, převážně v rozmezí 2 hodiny až 24 hodin, které byly měřeny v jeden den. Čerstvý vzorek a 50hodinový byly měřeny společně další den. Příčinou těchto dat může být jak efekt pH tak fakt, že to bylo měřeno v rámci dvou dnů a dvou kalibrací, stejně jako v případě experimentu s velikostí částic.

Experiment se stabilitou nanočástic ve 2mM citrátovém pufru o pH = 8 byl zopakován při kratších časových intervalech, protože bylo usouzeno, že pro manipulaci s nanočásticemi bude nejlepší využít kratší časy do 4 hodin, vzhledem k výsledkům, které byly získány při delších časech. Na *Obrázku 4.3* na straně 40 lze vidět, že všechny vzorky jsou pod limitní velikostí nanočásticového standardu stříbra a mají přibližně stejnou velikost. Ve všech případech vychází velikost kolem 33 nm. V případě počtu částic na litr vzorku, si lze na *Obrázku 4.4* na straně 40 všimnout, že naměřená PNC se nejvíce blíží k teoretické u 2 a 3hodinového vzorku. U 1hodinového vzorku lze také sledovat výsledek, který se blíží rozmezí, ale žádná z naměřených hodnot není v rozmezí  $\pm 10\%$ . U 4hodinového vzorku lze sledovat vysokou koncentraci částic a zároveň i velkou směrodatnou odchylku, čímž se vymyká viditelnému trendu. Důvodem mohla být systematická chyba při ředění vzorku nebo při samotném měření. Výsledkem experimentu bylo tedy nadhodnocení veškerých koncentrací částic a podhodnocení jejich

rozměrů. Pufry o  $\text{pH} = 8$  byl tedy jako stabilizační činidlo zamítnut, protože v něm nebylo možné získat reprodukovatelné a smysluplné výsledky.

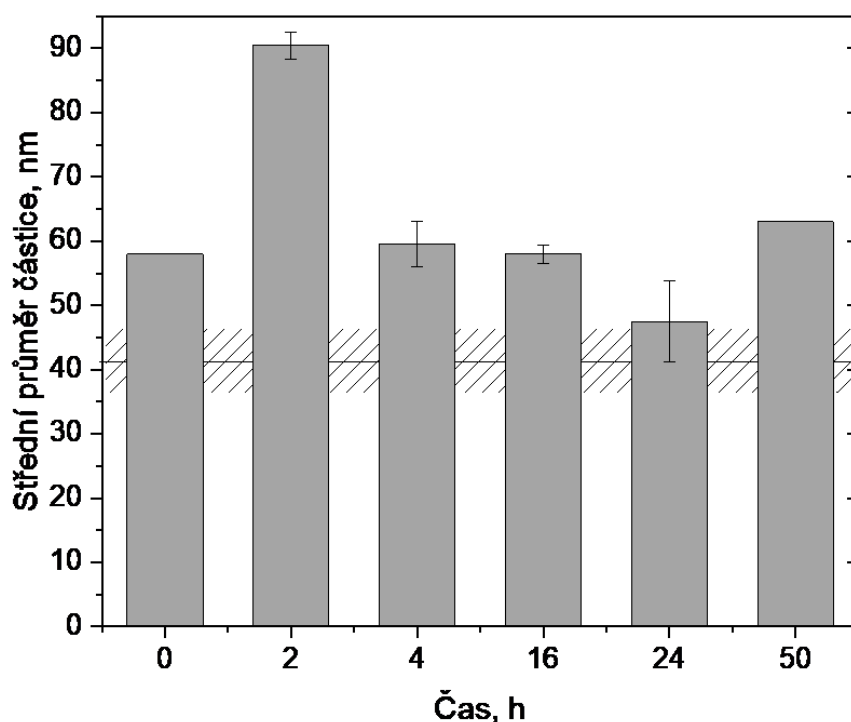


Obrázek 4.3.: Velikosti nanočástic při použití citrátového pufru o  $\text{pH} = 8$  při krátkých časech



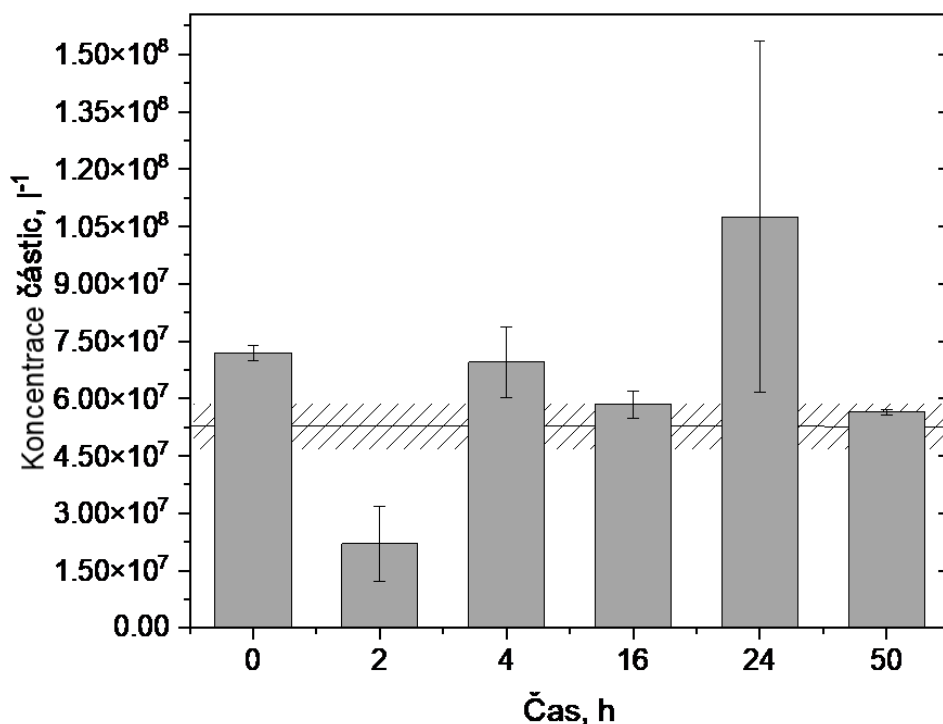
Obrázek 4.4.: Koncentrace částic v jednom litru při použití citrátového pufru o  $\text{pH} = 8$  při krátkých časech

Dále byl studován vliv  $\text{pH} = 9$  z důvodu problematických výsledků u  $\text{pH} = 8$ . Při tomto  $\text{pH}$  je citrátový pufr ještě více disociován. To znamená, že by částice měly být lépe stabilizované, než tomu bylo u  $\text{pH} = 8$  a výsledky by měly být více reprodukovatelné a smysluplné. Nejprve byla znovu studována stabilita nanočástic při delších časech. Obrázek 4.5 zobrazuje závislost středního průměru v nanometrech na čase v hodinách. Šrafovaná oblast v obrázku znovu označuje optimální rozmezí velikosti částic stanovené výrobcem, tedy  $41 \pm 5$  nm. Z obrázku je patrné, že většina velikostí byla nadhodnocena. Již u čerstvého vzorku lze sledovat, že velikost nanočástic dosahuje hodnoty přibližně 60 nm. Po dvou hodinách dochází k výraznému nárůstu velikosti částic k hodnotě 90 nm a představuje to maximálně naměřenou hodnotu v průběhu měření. V dalších hodinách lze pozorovat postupný pokles velikosti částic. Při 24 hodinách se velikost pohybuje kolem 47 nm a jedná se o jedinou z naměřených hodnot, která se tomuto rozmezí přiblížila. Při 50 hodinách velikost znovu vzrostla. Důvodem takto zvýšené hodnoty u dvou časových intervalů může být vznik agregátů částic, což může výsledek ovlivnit k vyšším hodnotám. Příčinou tohoto výsledku je nejspíš systematická chyba, zapříčiněná možným nepřesným ředěním nebo nedostatečnou sonikací vzorku.



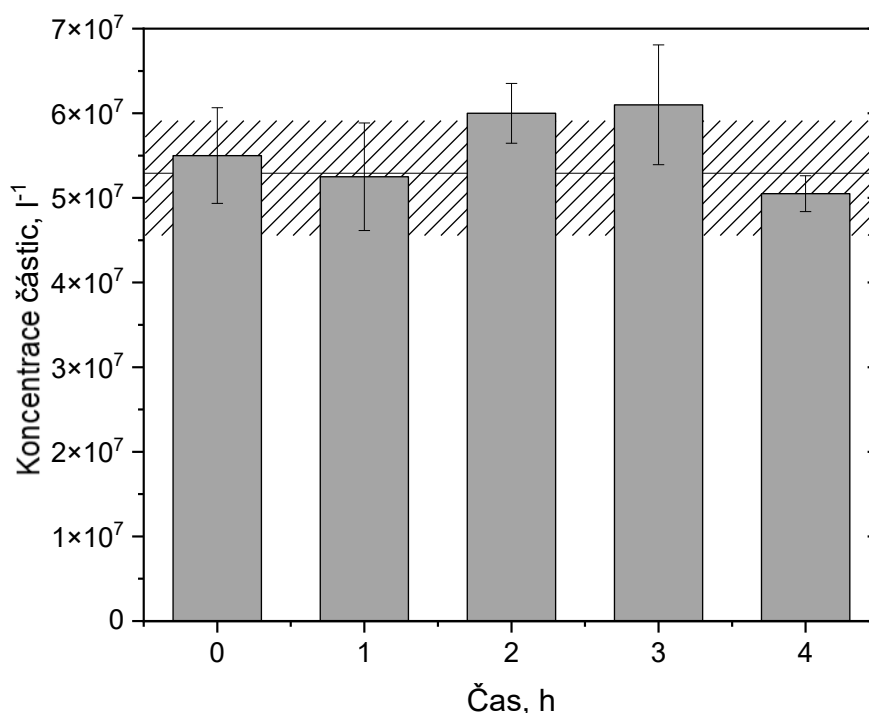
Obrázek 4.5.: Velikosti nanočástic při použití citrátového pufru o  $\text{pH} = 9$

Získané výsledky lze vidět na *Obrázku 4.6*, zachycující časovou závislost koncentrace nanočástic stříbra. Šrafovaná oblast opět vymezuje vypočítané optimální rozmezí koncentrace, které se pohybuje od  $4,77 \cdot 10^7$  do  $5,83 \cdot 10^7$  částic na litr, přičemž očekávaná hodnota je  $5,30 \cdot 10^7$  částic na litr. Z *Obrázku 4.6*. je viditelné, že v případě čerstvého vzorku je koncentrace částic mírně nad optimálním rozmezím. U 2 hodin lze pozorovat výrazný pokles koncentrace a poté opět následuje vzestup koncentrace k hodnotám přibližně  $6,5 \cdot 10^7$  částic na litr. V čase 16 hodin se koncentrace dostala na hodnotu  $5,80 \cdot 10^7$  částic na litr, což odpovídá horní hranici rozmezí. Nejvyšší koncentrace je viditelná v čase 24 hodin, kdy koncentrace dosahuje hodnot až  $1,05 \cdot 10^8$  částic na litr. V tomto čase lze pozorovat i značnou směrodatnou odchylku. Po 50 hodinách koncentrace klesá na hodnotu  $5,80 \cdot 10^7$  částic na litr, což opět odpovídá optimální rozmezí, přičemž směrodatná odchylka dosahuje nejnižší hodnoty. Důvodem nízké hodnoty koncentrace částic v čase 2 hodiny může být stejně jako v případě středního průměru částic systematická chyba způsobená nepřesným ředěním nebo nedostatečnou sonikací, což způsobilo pokles koncentrace částic.



*Obrázek 4.6.: Koncentrace částic v jednom litru při použití citrátového pufru o pH = 9*

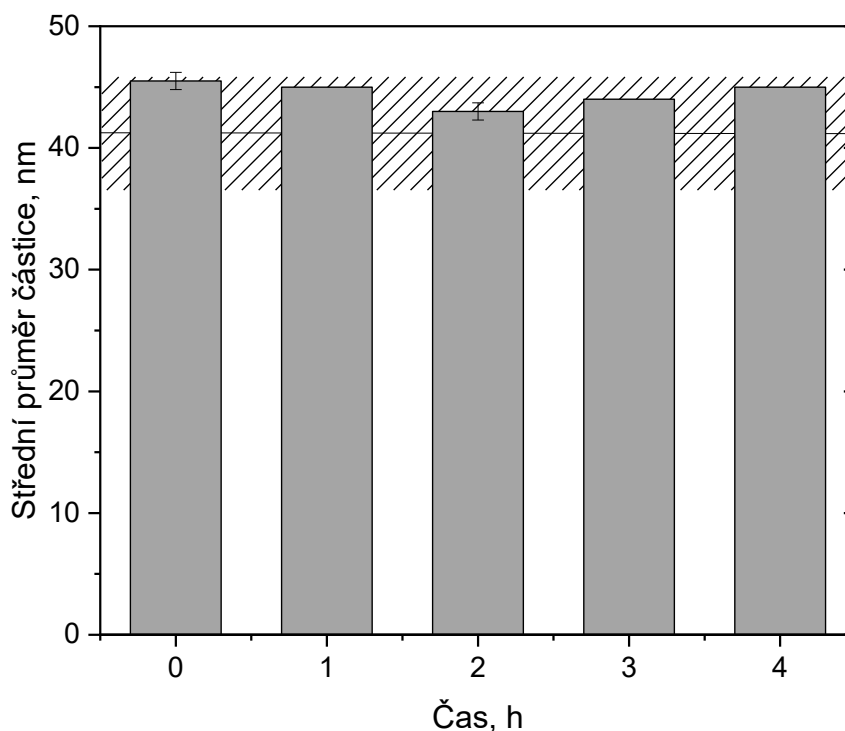
Obrázek 4.7 zobrazuje závislost koncentrace částic v jednom litru na čase mezi přípravou a analýzou při  $\text{pH} = 9$ . Teoreticky vypočítaná koncentrace byla znovu  $5,3 \cdot 10^7$  částic  $\text{l}^{-1}$ , přičemž akceptovatelné rozmezí je definováno jako  $\pm 10\%$ , tedy od  $4,77 \cdot 10^7$  do  $5,83 \cdot 10^7$  částic  $\text{l}^{-1}$ . Z Obrázku 4.7 lze pozorovat, že čerstvě připravený vzorek má koncentraci velmi blízkou teoretické hodnotě. U 1hodinového vzorku můžeme vidět mírný pokles ke spodní hranici, avšak stále je v akceptovatelném intervalu. Měření po dvou a třech hodinách ukazuje mírný růst koncentrace částic, která by se však mohla pohybovat v rámci stanovených limitů. Po čtyřech hodinách dochází k výraznému poklesu, což může naznačovat agregaci či rozpouštění nanočástic. Pro dosažení nejlepších výsledků se tedy nabízí analyzovat vzorky nejpozději do tří hodin po přípravě a nejlépe čerstvý vzorek. Vzhledem k přípravě pufru titrací kyseliny citronové hydroxidem sodným je možné, že ve vzorku je vyšší koncentrace  $\text{Na}^+$  iontů, které mohou vést k interferenčním efektům (ionizační interference) nebo i negativně ovlivňovat stabilitu nanočástic, což může mít za následek zkreslené koncentrace nebo střední průměry nanočástic. Výsledky jsou ovšem ve srovnání s  $\text{pH} = 8$  akceptovatelné.



Obrázek 4.7.: Koncentrace nanočástic v jednom litru při použití citrátového pufru o  $\text{pH} = 9$  při krátkých časech

Na Obrázku 4.8 na straně 44 lze opět vidět závislost mediánu velikostí nanočástic na čase mezi přípravou a vzorku a jeho analýzou metodou spICP-MS při  $\text{pH} = 9$ .

Optimální velikost stanovená výrobcem standardu je  $41 \pm 5$  nm, odpovídající rozmezí 36 – 46 nm, která je vyznačené šrafovanými hranicemi. Z obrázku je patrné, že medián velikostí nanočástic se u všech časů pohybuje v optimálním rozsahu a velikost zůstává stabilní. U dvou hodin lze pozorovat mírné snížení, které i přesto zůstává v rámci stanovené hranice. Nízké směrodatné odchylky mohou naznačovat minimální agregaci nanočástic.



Obrázek 4.8.: Velikost částic v jednom litru při použití citrátového pufru o pH = 9 při krátkých časech

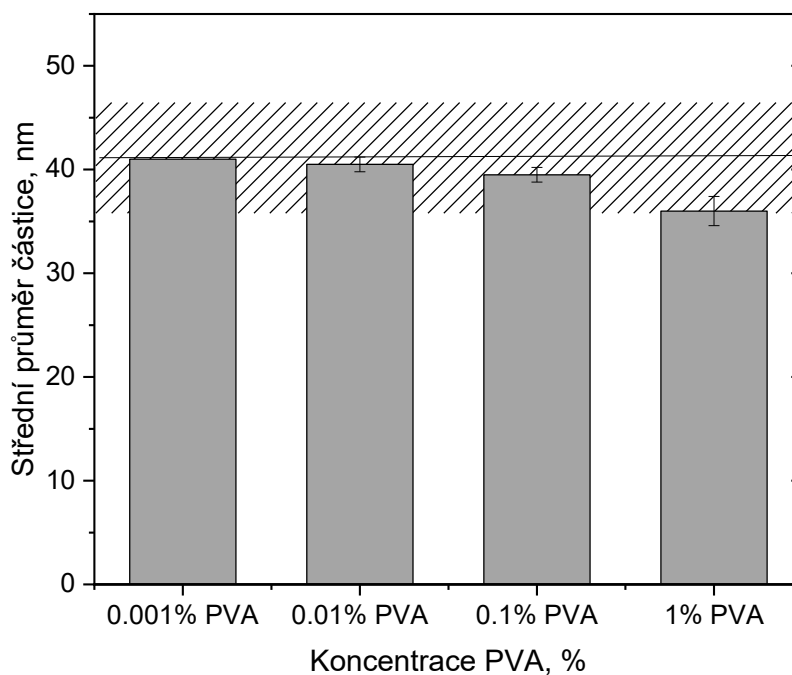
Při porovnání výsledků s předchozím měření za použití s pH = 8 lze říct, že pH = 9 poskytuje lepší distribuci nanočástic. Při pH = 8 bylo možné pozorovat větší variabilitu výsledků jak u mediánu velikosti nanočástic, tak u počtu částic na litr vzorku (PNC). To znamená, že při pH = 8 mohlo docházet k agregaci nanočástic či naopak k jejich rozpouštění, což právě vedlo k variabilitě výsledků. Naopak pH = 9 nejspíše poskytuje lepší elektrostatickou stabilizaci nanočástic a zabraňuje agregaci nanočástic.

Na základě získaných dat lze říct, že citrátový pufr o pH = 9 je vhodnější než o pH = 8 při manipulaci s nanočásticemi, protože nepodléhají významným změnám ve velikosti ani v koncentraci.

## 4.2 Stabilita nanočástic v PVA

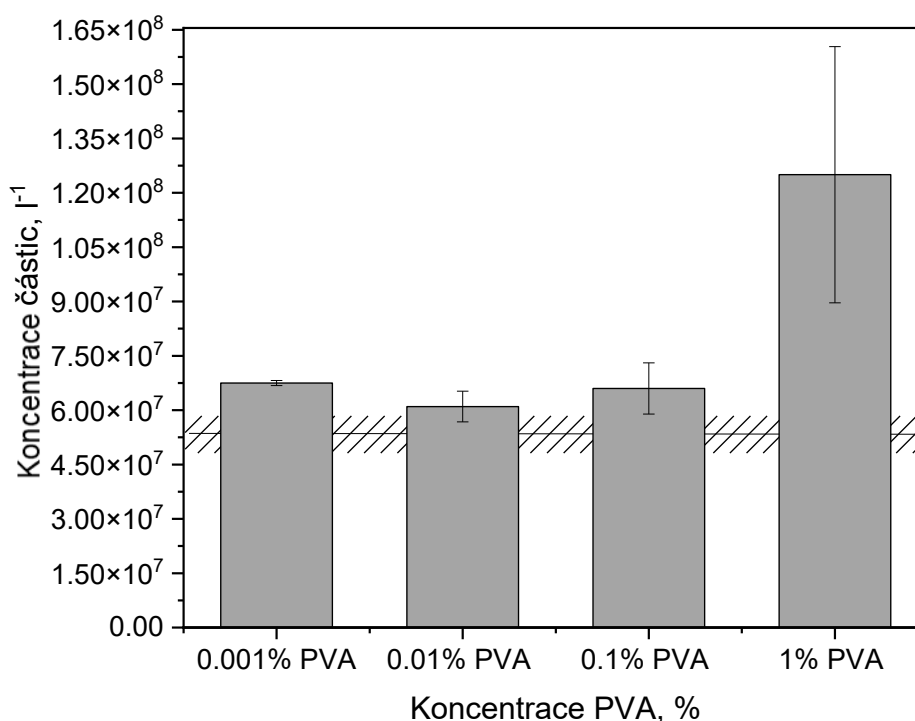
Pro porovnání byly vyzkoušeny i látky, které by mohly stabilizovat nanočástice nikoliv elektrostatickým mechanismem, ale i sterickým mechanismem. Jedná se o látky s delšími organickými řetězci. V literatuře byly popsány následující: SDS, želatina, Triton X-100, TMAH nebo CTAB [1,3,13,65,66]. Použití sterického stabilizátoru by nemělo být zatíženo problémy způsobenými interferencemi solí (např.  $\text{Na}^+$ ).

Jako první sterický stabilizátor byl zkoumán polyvinylalkohol o různých koncentracích. Byl zvolen jako alternativa k želatině, protože se na rozdíl od ní, nekazí. Hypotéza byla taková, že při použití sterických stabilizátorů lze dosáhnout lepších výsledků z důvodu jiného principu stabilizace nanočástic. Z výsledků testování stability nanočástic v různých koncentracích PVA, které lze vidět na *Obrázku 4.9* vyplývá, že mediánová velikost nanočástic v jednotlivých vzorcích se pohybuje v rozmezí od 36 nm do 41 nm. Již zmíněná optimální velikost je stanovena na  $41 \pm 5$  nm, což znamená, že všechny měřené koncentrace splňují požadované rozmezí. Nejlepší výsledky z hlediska velikosti nanočástic poskytují koncentrace PVA 0,001% a 0,01%. Při 1% koncentraci PVA dochází k mírnému poklesu velikosti na hranu tolerančního rozmezí, což může souviset s interakcemi mezi nanočásticemi. Důvodem může být právě vyšší koncentrace polymeru, vedoucí ke změně povrchových vlastností částic.



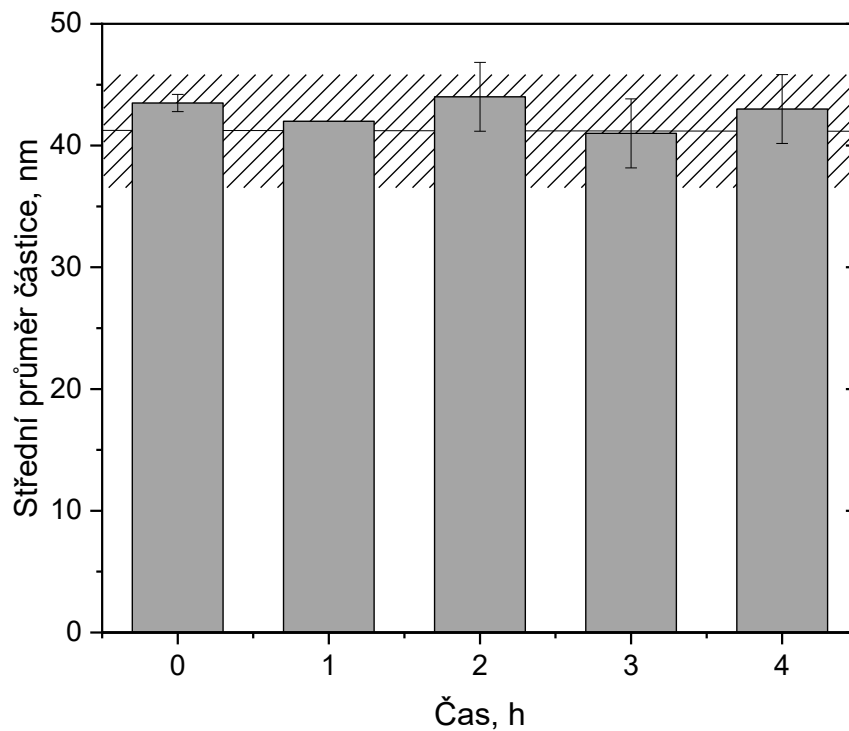
*Obrázek 4.9.: Velikost částic při použití PVA o různých koncentracích*

V případě *Obrázku 4.10*, který znázorňuje koncentraci nanočástic v jednom litru vzorku v závislosti na koncentraci PVA můžeme vidět, že vzorek s nejnižší koncentrací 0,001% dosahuje hodnoty přibližně  $6,7 \cdot 10^7$  částic  $l^{-1}$ , což přesahuje horní hranici. V případě dalších koncentrací lze pozorovat, že vzorky s koncentrací 0,01% a 0,1% PVA jsou mírně nad horní hranicí a pohybují se kolem hodnoty  $6,5 \cdot 10^7$  částic  $l^{-1}$ . Významný nárůst koncentrace můžeme vidět u vzorku s 1% PVA, kde hodnota dosahuje koncentrace až hodnot  $1 \cdot 10^8$  částic  $l^{-1}$ . Zároveň je patrná zvýšená směrodatná odchylka, a tudíž i variabilita měření. Tento velký nárůst může být způsoben vysokou koncentrací PVA, která má za následek ovlivňování fyzikálně-chemických vlastností nanočástic a také potenciálně vliv na ionizaci (nespektrální interference uhlíku).



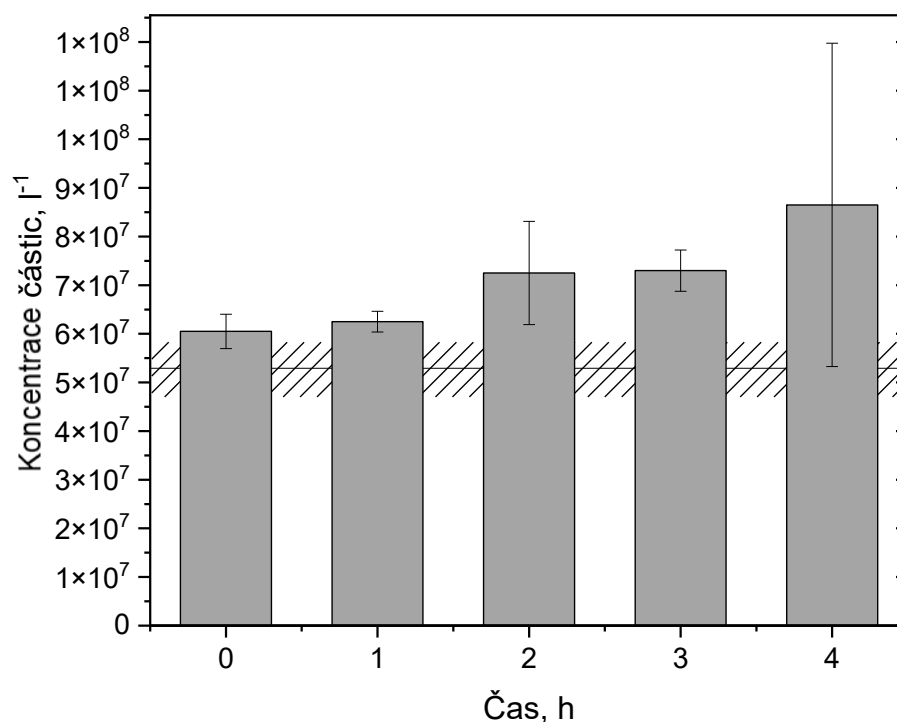
*Obrázek 4.10.: Koncentrace částic v jednom litru při použití PVA o různých koncentracích*

Na základě získaných dat se jako nejvhodnější koncentrace PVA jeví 0,001% či 0,01%. Bylo rozhodnuto, že bude otestována stabilita s 0,001% PVA. Tato koncentrace byla zvolena na základě toho, že by mohla poskytnout dostatečnou stabilizaci nanočástic a minimálně ovlivnit jejich povrchové vlastnosti. I přes uspokojivé výsledky 0,01% PVA vznikaly obavy ohledně potenciálních negativních důsledků vysoké koncentrace, které bylo možné pozorovat během měření. Vyšší koncentrace PVA by také mohla způsobit zvětšení hydrodynamického průměru částice.



Obrázek 4.11.: Velikost částic při použití 0,001% PVA

Ze získaných výsledků, které jsou vyobrazeny na *Obrázku 4.11* vyplývá, že velikost nanočástic v roztoku 0,001% PVA se pohybuje přibližně v rozmezí 41-45 nm, což je skutečně uvnitř rozmezí deklarovaného výrobcem (36-46 nm). To naznačuje že všechny hodnoty jsou v optimálním rozmezí a nebyl sledován výrazný trend změny velikosti částic v časovém horizontu 4 hodin. Malé směrodatné odchylky svědčí o dobré stabilitě nanočástic v daném roztoku PVA.



Obrázek 4.12.: Koncentrace částic v jednom litru při použití 0,001% PVA

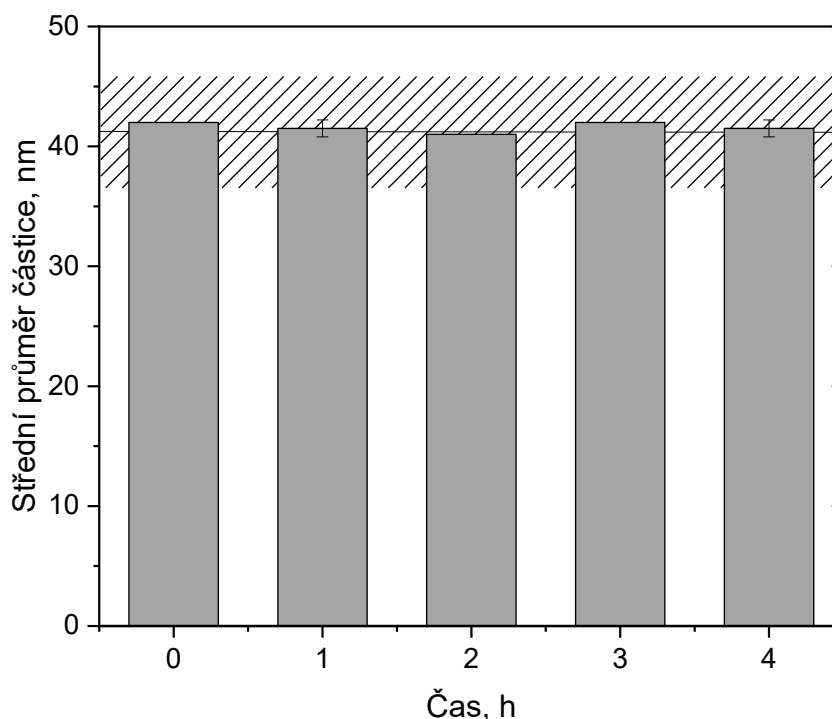
V případě koncentrace nanočástic neboli počtu částic v jednom litru roztoku znázorněné na *Obrázku 4.12* lze pozorovat výsledky, které jsou nad horní hranici požadovaného rozmezí. Čerstvý vzorek, jehož koncentrace je přibližně  $6,0 \cdot 10^7$  částic  $l^{-1}$ , překračuje mírně horní hranici požadovaného rozmezí. U dalších vzorků lze sledovat trend zvyšování koncentrace částic v průběhu času. U 4hodinového vzorku je koncentrace nejvyšší, dosahující hodnot až  $8,5 \cdot 10^7$  částic  $l^{-1}$  a zároveň lze vidět i největší směrodatnou odchylku, což naznačuje velkou variabilitu měření a počínající agregaci částic nebo jiné procesy, které mohou destabilizovat systém.

Výše pozorované trendy ve velikosti částic a koncentraci částic naznačují, že by sterický stabilizátor mohl být vhodnější než elektrostatický stabilizátor. Přestože výsledky vypadají slibně jak v případě mediánu velikosti, tak v případě koncentrace částic, docházelo během měření k mírným komplikacím. Během měření opakovaně docházelo k ucpávání hadičky pro nanočástice, a proto musel být experiment opakován. Také docházelo i ke znečištění torche, což se projevilo i v dalších měřeních, které byly pozorovány jinými uživateli ICP-MS. Vzhledem k tomu byl hledán další stabilizátor pro

zajištění spolehlivější analýzy a minimalizaci rizika technických komplikací při experimentech.

### 4.3 Stabilita nanočástic v Tritonu X-100

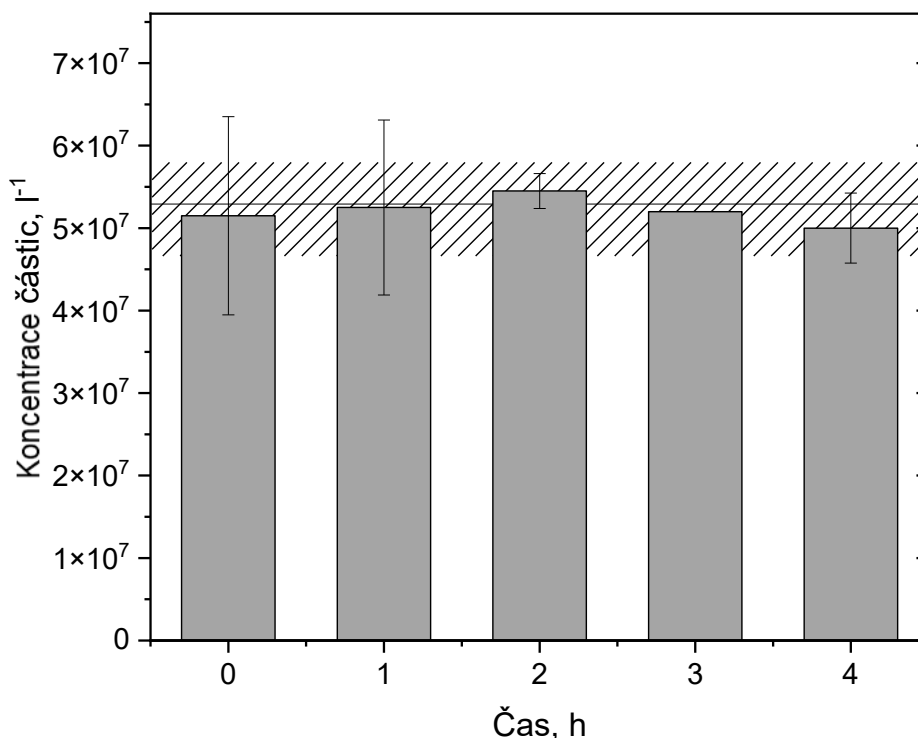
V literatuře bylo nalezeno, že se pro manipulaci s nanočásticemi hojně využívá Triton X-100 [13,65]. Vzhledem ke komplikacím způsobeným vyšší koncentrací PVA v minulém experimentu, byl vybrán 0,001% Triton X-100 a vyšší koncentrace testována nebyla. Triton X-100 je strukturně *terc*-oktylfenol ethoxylát a je na seznamu sledovaných látek (REACH) z důvodu podezření na endokrinní disruptor, tudíž by jeho používání mělo být omezeno na minimum nebo by měl být nahrazen [67].



Obrázek 4.13.: Velikost nanočástic v 0,001% Tritonu

Triton X-100 neiontové hydrofobní činidlo, dochází k tomu, že jeho hydrofobní řetězec se adsorbuje na povrch nanočástice. Jeho hydrofilní polyoxoethylenový řetězec směřuje do okolního prostředí, čímž vytváří bariéru, která zabrání agregaci nanočástic. Bylo tedy předpokládáno, že použitím sterického stabilizátoru by mohlo dojít k lepší stabilizaci nanočástic. Z Obrázku 4.13 vyplývá, že naměřené hodnoty velikostí nanočástic se v celém průběhu experimentu pohybují v požadovaném rozmezí. Nejsou pozorovány žádné výrazné odchylky, tedy nedochází k agregaci či rozpouštění nanočástic

během experimentu. Nejmenší odchylku lze pozorovat u čerstvého vzorku a vzorku měřeného po 1 hodině. Naopak vyšší variabilitu výsledků lze pozorovat u vzorku analyzovaného po 3 hodinách.



Obrázek 4.14.: Koncentrace nanočástic v jednom litru v 0,001% Tritonu

Koncentrace nanočástic u čerstvého a 1hodinového roztoku měly poměrně velkou variabilitu výsledků oproti ostatním (Obrázek 4.14). Byla tudíž vznesena otázka, jaký je důvod velké směrodatné odchylky. Vzorky byly však připravovány stejným postupem ve všech případech. Jedna možná hypotéza je, že Triton X-100 elektrostaticky obalí nanočástice, aby nemohly agregovat a pak je rozhodující, jak dlouho trvá tento proces, než jsou nanočástice dostatečně obaleny stabilizátorem a je zabráněno jejich agregaci. Pokud by tento proces trval delší dobu, tak by se u kratších časových intervalů projevovala větší variabilita výsledků, přičemž by se to to hlavně projevovalo u koncentrace částic nikoliv u rozměru částic. Při hledání v literatuře bylo zjištěno, že tento proces je téměř okamžitý, tudíž byla tato hypotéza vyloučena [68]. Další hypotézou bylo ohřívání vzorku při sonikaci, nicméně sonikace trvá stejně dlouhou dobu u všech vzorků, tudíž by se tento problém projevil u všech vzorků nikoliv pouze u prvních dvou. Porovnáním s předchozími výsledky bylo zjištěno, že větší směrodatná odchylka počtu částic se vyskytla u 0,001% PVA a čase od přípravy vzorku 4 h. Předpokládá se, že se jedná spíše o náhodný jev.

Z testovaných stabilizátorů byl Triton X-100 vyhodnocen jako nejvhodnější varianta. Pro optimalizaci a validaci metody bylo potřeba zjistit parametry, při kterých bude metoda co nejvíce citlivá a bude zajištěna spolehlivost a reprodukovatelnost výsledků.

#### 4.4 Snížení odezvy slepého vzorku

V rámci snahy snížit odezvu slepého vzorku bylo potřeba upravit vyplachovací proces mezi měřeními, kde se v prvním kroku používá 2% kyselina dusičná a druhém kroku deionizovaná voda, aby následně nedocházelo k rozpouštění stříbra, a najít vhodný postup výplachu. Cílem bylo také snížit limit detekce a stanovitelnosti.

Experiment byl zaměřen na optimalizaci doby proplachu kyselinou dusičnou a vodou, přičemž rychlost proplachu měněna nebyla. Důvodem bylo zabránit trhání kapaliny, ke kterému by v případě změny rychlosti mohlo docházet. Postup experimentu byl takový, že byly prodlužovány doby proplachu kyseliny dusičné (10, 20, 40, 60, 80 s) zatímco proplach vodou zůstával stejný (40 s). Ukázalo se, že s prodloužením doby proplachu 2% kyselinou dusičnou, se odezva slepého vzorku zvyšuje, což nejspíše souvisí s tím, že dochází k částečnému rozpouštění nanočástic.

Závěrem bylo, že s prodlužováním proplachu kyselinou dusičnou se zvyšuje pozadí, což nejspíše souvisí s tím, že dochází k částečnému rozpouštění nanočástic a tím se zhoršuje LOD počtu částic. Je tedy potřeba použít co nejkratší oplach  $\text{HNO}_3$ , nicméně nelze ho úplně vynechat, aby se předešlo přenosu stříbra mezi vzorky a kontaminacím. Na druhou stranu je potřeba prodloužit proplach deionizovanou vodou. Jako optimální vyplachovací proces byl zvolen takový, že první oplachovací krok s kyselinou dusičnou byl nastaven na 10 s a druhý oplachovací krok deionizovanou vodou byl prodloužen na 90 s.

## 4.5 Optimalizace přípravy vzorku s reálnou maticí

Po optimalizaci ředících a zároveň stabilizačních činidel byly provedeny experimenty s maticí ve formě sprchového gelu, který by měl dle uvedeného složení obsahovat nanočástice Ag. Celkový obsah Ag byl stanoven pomocí ICP-MS a byl  $16,03 \mu\text{g g}^{-1}$  ( $n = 4$ ,  $SD = 1,32 \mu\text{g g}^{-1}$ ). Nicméně při pokusu optimalizovat navážku vzorku bylo zjištěno, že výsledky jsou na úrovni blanku. Proto byla optimalizace přípravy vzorku v přítomnosti matrice provedena se maticí obohacenou nanočásticovým standardem o průměru částic 80 nm a koncentraci  $0,020 \text{ mg ml}^{-1}$ , tj. o částicové koncentraci  $7,1 \cdot 10^6$  částic na litr.

### 4.5.1 Optimalizace navážky vzorku

Prvním optimalizovaným parametrem byla navážka vzorku. Konkrétně se jednalo o navážky 60, 150, 300 a 600 mg. Hmotnosti byly zvoleny tak, aby pokrývaly široký obsah vzorku. Důvod byl takový, že při nízkých navážkách vzorku se může projevit nedostatečná reprezentativnost vzorku, což je způsobeno nedostatečnou homogenitou vzorku. Také se může projevit zvýšený vliv náhodných chyb. Naopak při vysokých navážkách vzorku lze očekávat větší riziko agregace nanočástic. Dále může docházet k zanášení přístroje či ucpání nasávací hadičky či zmlžovače. Vzorek sprchového gelu byl navážen na analytických vahách v duplikátech, ke každému vzorku byl přidán přídatek nanočásticového standardu a každý vzorek byl naředěn tak, aby finální koncentrace standardu v roztoku byla  $5 \cdot 10^7$  částic v litru vzorku. Potom co byly vzorky naváženy, zředěny na vhodnou koncentraci a změřeny spICP-MS byly vyhodnoceny. Z výsledků v *Tabulce 4.1* na straně 53 lze vidět, že všechny navážky měly blízkou shodu s očekávanou koncentrací  $5 \cdot 10^7 \text{ l}^{-1}$ . Nejprve byla vybrána navážka 600 mg vzhledem ke své nejnižší směrodatné odchylce a 3% odchylce od koncentrace přídatku standardu, což indikovalo vysokou reprodukovatelnost. Nicméně v průběhu experimentu optimalizace doby sonikace, který je popsán v *Kapitole 4.5.2* na straně 53 došlo k ucpání nasávací hadičky a výsledky se nedaly použít. Proto byla vybraná navážka 150 mg, která i přes větší směrodatnou odchylku poskytovala podobné výsledky jako navážka 600 mg, přičemž odchylka naměřené koncentrace měla méně než 1% odchylku od koncentrace přídatku standardu.

Tabulka 4.1: Optimalizované navážky vzorku matrice a koncentrace nanočástic v matrici

Navážka, mg	Medián koncentrace částic, l <sup>-1</sup>	Směrodatná odchylka, l <sup>-1</sup>
60	$5,25 \cdot 10^7$	$2,1 \cdot 10^6$
150	$4,95 \cdot 10^7$	$5,0 \cdot 10^6$
300	$5,30 \cdot 10^7$	$4,2 \cdot 10^6$
600	$5,15 \cdot 10^7$	$7,1 \cdot 10^5$

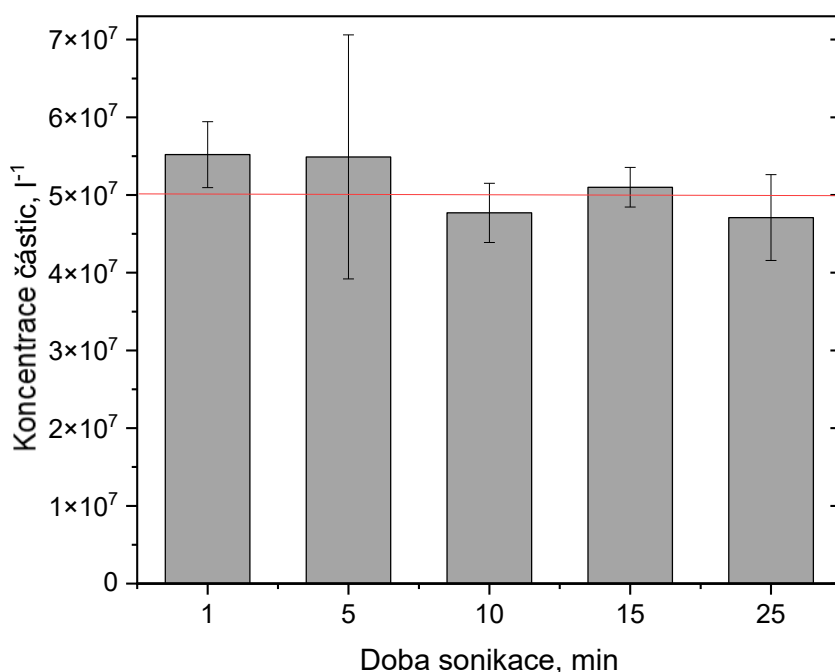
Nicméně v přítomnosti matrice přestaly vycházet rozměry. Průměr částice se počítá z s využitím citlivosti změřené s iontovými standardy. Přítomnost zvýšeného množství organického uhlíku v matrici by mohla způsobit změnu citlivosti, a tedy chybný výpočet průměru částice. Koncentrace částic se nezdá být ovlivněna, a proto jsme se rozhodli nadále vyhodnocovat pouze počet částic, který je pro posouzení bezpečnosti výrobku důležitější.

#### 4.5.2 Optimalizace doby sonikace

Po výběru optimální navážky bylo potřeba optimalizovat i dobu sonikace. Po výběru optimální navážky byla tato hmotnost matrice navážena v duplikátech na analytických vahách. Poté co bylo přidáno předem vypočítané množství 40 nm nanočásticového standardu stříbra tak, aby finální koncentrace v roztoku byla  $5 \cdot 10^7$  částic v litru vzorku. Poté byly obohacené vzorky sonikovány v ultrazvukové lázni různě dlouhou dobu. Konkrétně se jednalo o 1, 5, 10, 15 a 25 minut. Následně po odebrání 100  $\mu$ l vzorku z první zkumavky a doplnění na 10 ml byl každý vzorek znovu sonikován, tentokrát již po dobu 2 minuty. Hypotéza byla taková, že při příliš krátkých sonikacích by nedocházelo k dostatečnému rozptýlení nanočástic z matrice. To by znamenalo, že nanočástice by zůstávaly agregované v matrici, což by vedlo k podhodnocení jejich skutečné koncentrace. Na druhou stranu při delších sonikacích by mohlo docházet k degradaci vzorku a snížené stabilitě nanočástic. Může opět docházet k agregaci

nanočástic. Zároveň dlouhodobá sonikace vede ke zvýšení teploty vzorku, což může opět ovlivnit stabilitu nanočástic a tím i přesnost měření. Cílem tedy bylo najít optimální dobu sonikace, která zajistí efektivní uvolnění nanočástic do roztoku.

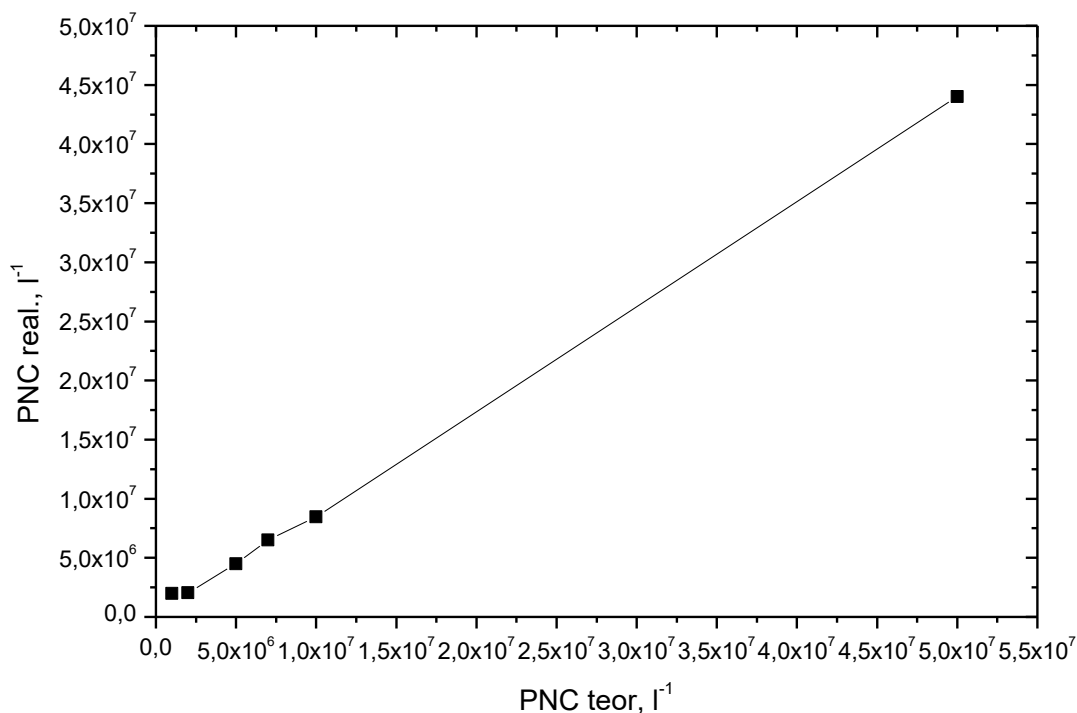
Obrázek 4.15 znázorňuje závislost doby sonikace (v minutách) na koncentraci částic ve vzorku ( $l^{-1}$ ). Lze si povšimnout, že všechny hodnoty jsou relativně blízko očekávané hodnotě koncentrace nanočástic, která je  $5 \cdot 10^7$  částic na litr vzorku. V případě 1 minuty jsou hodnoty blízko této koncentraci a tato doba sonikace poskytuje konzistentní výsledky. Při 5 minutách lze pozorovat mírně vyšší hodnotu a také poměrně velkou směrodatnou odchylku. Při 10 minutách lze naopak sledovat koncentraci nižší, než je očekávaná, přičemž směrodatná odchylka je zde již menší. Doba sonikace 15 minut je velmi blízko očekávané hodnotě koncentrace a směrodatná odchylka je nejnižší ze všech. Nakonec doba sonikace 25 minut má obdobnou hodnotu koncentrace jako doba sonikace 10 minut a je tudíž nižší než předpokládaná koncentrace přídavku. Na základě těchto skutečností bylo rozhodnuto, že optimální doba sonikace je buď 1 minuta nebo 15 minut. Z těchto dvou možností byla upřednostněna doba sonikace 15 minut vzhledem k tomu, že delší sonikace nám zajistí lepší homogenizaci vzorku, což pro analýzu matrice sprchového gelu a obdobných je důležité, a také proto, že před analýzou je každý vzorek sonikován 2 minuty za účelem důkladného rozmíchání disperze. Sonikační čas 1 minuta by byl kratší než čas míchání.



Obrázek 4.15: Koncentrace částic v závislosti na době sonikace

#### 4.6 Limit stanovitelnosti spICP-MS

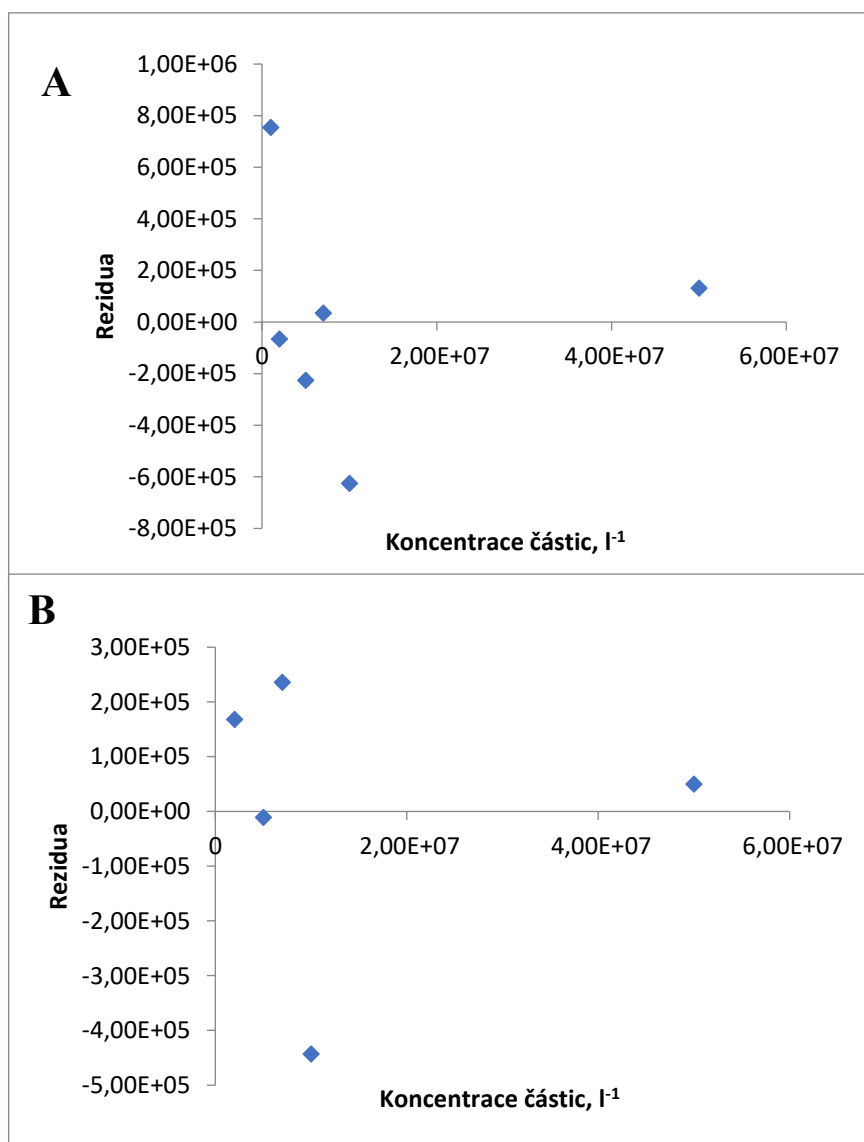
Limit stanovitelnosti koncentrace a rozměru částic je v literatuře určován různými statistickými způsoby [69]. V této práci byl zvolen jednoduchý způsob odhadu lineárního dynamického rozsahu koncentrace a určení limitu stanovitelnosti na základě práce dříve publikované autory Kaňa a kol. [13]. Limit stanovitelnosti byl získán za použití standardu stříbrných nanočástic o rozměru 80 nm a koncentraci 0,020 mg ml<sup>-1</sup>. Byly připraveny různé koncentrace tohoto standardu v rozmezích 1 · 10<sup>6</sup> až 5 · 10<sup>7</sup> částic na litr vzorku a následně změřeny za pomoci spICP-MS. Získané výsledky lze vidět v grafu na *Obrázku 4.16*, ve kterém lze pozorovat závislost mezi reálně stanovenou koncentrací nanočástic a jejich teoretickou koncentrací. Celý záznam grafu byl měl být teoreticky sigmoidní s lineární částí odpovídající rovnici  $y=x$ , tedy naměřená koncentrace se shoduje s očekávanou, přičemž by byla proložena pouze tato lineární část a spodní konec této lineární části byl považován za limit stanovitelnosti. Lineární část byla vybrána na základě testování linearit dat metodou analýzy reziduí.



*Obrázek 4.16.: Rozsah měřených koncentrací*

Postup byl následující. K závislosti byla v programu MS provedena regresní analýza včetně výpočtu reziduí. Je-li trend lineární, musí být rezidua malá a náhodně rozmístěná okolo horizontální osy. Je-li trend jiný než lineární (sigmoidní, polynomický)

bude v grafu reziduí možné pozorovat trend. Po vynesení grafu s rezidui bylo možné pozorovat trend ve tvaru „U“, způsobený odlehlými koncentracemi  $1 \cdot 10^6 \text{ l}^{-1}$  a  $1 \cdot 10^7 \text{ l}^{-1}$  (Obrázek 4.17. A), tudíž byl testován rozsah bez nejnižší hodnoty koncentrace  $1 \cdot 10^6$  částic na litr (Obrázek 4.17 B). V tomto případě se rezidua zmenšila a oblast koncentrací  $2 \cdot 10^6 - 5 \cdot 10^7$  tedy byla vyhodnocena jako lineární dynamický rozsah. Nejnižší bod naší kalibrační přímky a zároveň první bod této analýzy, konkrétně koncentrace  $2 \cdot 10^6$  částic na litr, představuje spodní konec lineárního dynamického rozsahu. Lze ze zkušenosti říct, že za situace, kdy není kontaminovaný Triton X - 100, je k dispozici čistá deionizovaná voda a čisté, nekontaminované hadičky pro nasávání vzorku, tak se limit stanovitelnosti opakovaně pohybuje kolem koncentrace  $2 \cdot 10^6$  částic na litr a odezvy slepého vzorku jsou pod touto hodnotou.



Obrázek 4.17.: Graf s rezidui; A = s odlehlou koncentrací  $1 \cdot 10^6$  částic na litr; B = bez odlehlé koncentrace  $1 \cdot 10^6$  částic na litr

#### 4.7 Celkový obsah stříbra ve vzorcích

Cílem experimentu bylo změřit celkový obsah stříbra ve vzorku. Jednalo se jednak o stříbro v nanočásticové formě, jednak v iontové formě. Po změření celkového obsahu stříbra ve vzorcích šamponu, sprchového gelu a tekutého mýdla na ruce na ICP-MS v rutinním roztokovém uspořádání a v módu bez kolizního či reakčního plynu byly výsledky vyhodnoceny. Výsledkem byl obsah stříbra v jednotkách  $\text{ng g}^{-1}$ . Z výsledků v *Tabulce 4.2* lze vyvodit, že šampon obsahuje nejvyšší koncentraci stříbra, přičemž rozdíl v duplikátech je minimální. Koncentrace stříbra ve sprchovém gelu je dvakrát nižší než u šamponu a rozdíl je výraznější. Oproti očekávání u tekutého mýdla byla naměřena nejnižší hodnota koncentrace stříbra. Nízké směrodatné odchylky naznačují vysokou reprodukovatelnost a vysokou homogenitu vzorku.

*Tabulka 4.2: Celkový obsah stříbra stanovený pomocí ICP-MS v rutinním uspořádání*

Vzorek	Navážka, g	Obsah Ag ve vzorku, $\text{ng g}^{-1}$	Směrodatná odchylka $\text{ng g}^{-1}$
Šampon	0,25015	$13,32 \cdot 10^3$	$0,28 \cdot 10^3$
Sprchový gel	0,25172	$6,99 \cdot 10^3$	$1,04 \cdot 10^3$
Tekuté mýdlo	0,25150	$6,34 \cdot 10^3$	$1,04 \cdot 10^3$

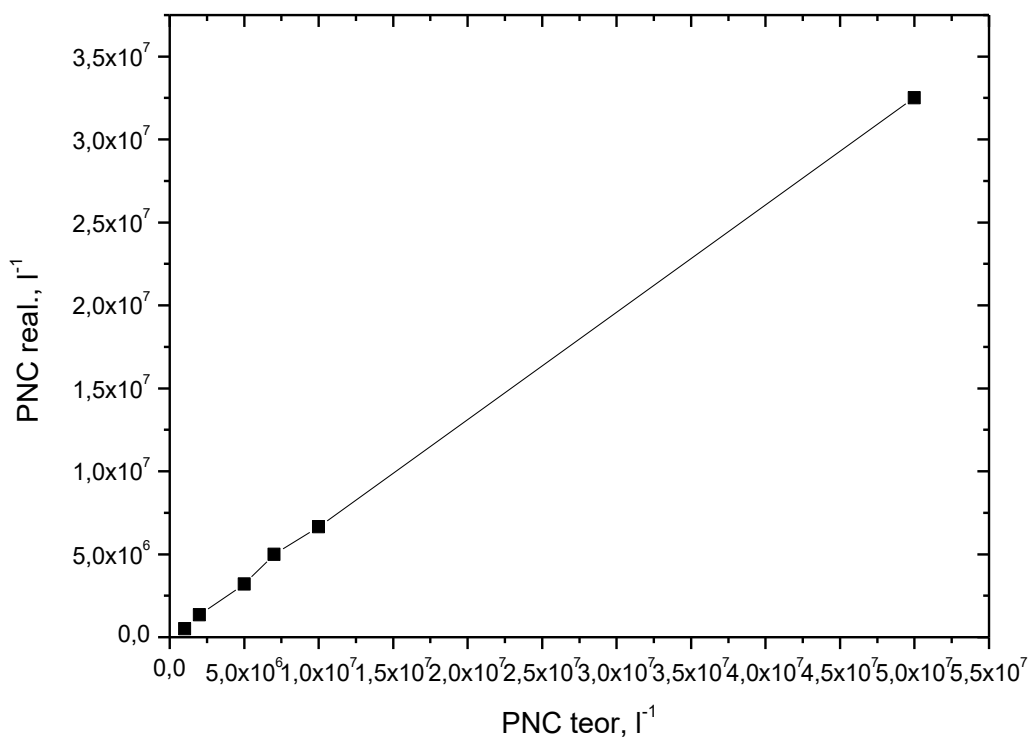
Ve vzorcích bylo provedeno i stanovení obsahu nanočástic za účelem zjištění, zda tyto výrobky nanočástice skutečně obsahují, a pokud ano, pak jaké koncentrace částic.

#### 4.8 Limit stanovitelnosti v matrici

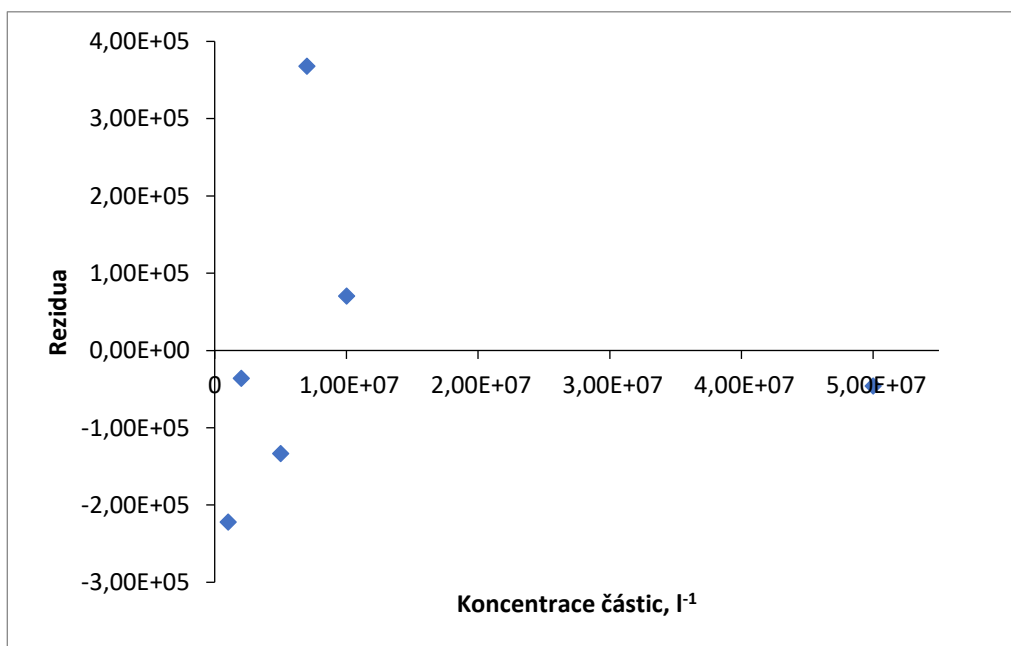
Cílem experimentu bylo zjistit, jak se změní limit stanovitelnosti v matrici v porovnání se samotným nanočásticovým standardem. Také bylo důležité zjistit, zda nám matrice zúží lineární dynamický rozsah, tj. zda nezvýší limit stanovitelnosti nebo nesníží horní limit tohoto rozsahu. Experiment byl prováděn s optimální navážkou a optimální dobou sonikace. Bylo očekáváno, že se limit stanovitelnosti může změnit v důsledku vlivu matrice a může se i zhoršit.

Limit stanovitelnost byl stanoven v reálné matrici v podobě sprchového gelu s obsahem nanočástic. Po navážení 150 mg matrice bylo ke vzorkům přidáno vypočítané

množství standardu stříbrných nanočástic o koncentraci  $0,020 \text{ mg ml}^{-1}$  a velikost  $80 \text{ nm}$ , čímž vznikla koncentrační řada v rozsahu od  $1 \cdot 10^6$  do  $5 \cdot 10^7$  částic na litr vzorku. Získané výsledky jsou zobrazeny v grafu na *Obrázku 4.18*, který opět vyobrazuje závislost mezi reálně stanovenou a teoretickou koncentrací nanočástic.



*Obrázek 4.18.: Rozsah měřených koncentrací*



*Obrázek 4.19.: Graf s reziduí pro matici*

Rezidua byla analyzována v celém rozsahu kalibrační křivky (Obrázek 4.19. na straně 58). Při nižších koncentracích byla blízko nule, což může svědčit o přesnosti měření. S vyšší koncentrací dochází k rozptylu, nicméně nebyly pozorovány velké odchylky. Metoda je v celém rozsahu lineární a v případě matrice vycházel limit stanovitelnosti lepší než u modelových vzorků (vzorku s nanočásticovým standardem). Nicméně toto je velice nepravděpodobné, tudíž byl limit stanovitelnosti určen stejně jako v případě nanočásticového standardu  $2 \cdot 10^6$  částic na litr. Lineární dynamický rozsah byl také zachován.

#### 4.9 Obsah nanočásticového stříbra v matrici

Po optimalizaci navážky vzorku a sonikace byl změřen obsah nanostříbra v matrici s již optimalizovaným postupem přípravy. Jednalo se o vzorky sprchového gelu, šamponu a tekutého mýdla. Jednak byly stanoveny částicové koncentrace Ag ve vzorcích. Za účelem alespoň řádového odhadu, jak velká frakce Ag byla ve vzorcích přítomna coby nanočástice byl vypočítán také obsah nanočásticového Ag v  $\text{ng g}^{-1}$ . Celkový obsah byl vypočítán z průměru nanočástic s předpokladem, že se jedná o nanočástici kruhového průřezu a jako průměr byl použit průměr získaný spICP-MS, i když je nadhodnocen, což by mohlo mít za důsledek zkreslování výsledků.

Tabulka 4.3: Obsah nanočásticového stříbra ve vzorku šamponu, sprchového gelu a tekutého mýdla

Vzorek	Průměrný počet částic, $\text{g}^{-1}$	Střední průměr částice, nm	Obsah AgNPs ve vzorku, $\text{ng g}^{-1}$
Šampon	$1,96 \cdot 10^7$	79	100,49
Sprchový gel	$5,58 \cdot 10^5$	84,5	3,28
Tekuté mýdlo	$2,09 \cdot 10^7$	128,5	284

Z výsledků v Tabulce 4.3 vyplývá, že nejvyšší obsah nanočásticového stříbra je ve vzorku tekutého mýdla ( $284 \text{ ng g}^{-1}$ ) a zároveň i částice s největším středním průměrem (128,5 nm). U šamponu můžeme naopak pozorovat nejmenší částice (79 nm). Nejmenší obsah nanočástic ve vzorku vykazoval sprchový gel ( $3,28 \text{ ng g}^{-1}$ ) s velikostí kolem 85 nm.

Naměřené rozdíly v koncentraci a velikosti nanočástic stříbra mezi analyzovanými vzorky poukazují na rozdílné postupy přípravy vzorků výrobcem nebo specifickými požadavky daného kosmetického přípravku.

Tekuté mýdlo podle očekávání obsahovalo nejvyšší koncentraci Ag NPs ve vzorku. Tento vyšší obsah nanočástic může být záměrný ze strany výrobce vzhledem k tomu, že se pokožka rukou se dostává do kontaktu s různými bakteriemi nejčastěji, tudíž se u mýdla očekávají silnější antibakteriální vlastnosti. Větší velikost nanočástic může souviset se snahou výrobce zvýšit stabilitu nanočástic v této matici. Šampon vykazoval vysoký počet částic na gram a malý průměr částic, což může to znamenat, že docházelo k lepší disperzi nanočástic ve vzorku. Důvod menších částic ve vzorku šamponu může souviset s lepším pronikáním do vlasových folikulů. Naopak nízký obsah nanočástic ve vzorku sprchového gelu může být způsoben větší mírou agregace vzorku, sedimentací nebo interakcí nanočástic s maticí. Sprchové gely mohou mít jiné složení než například šampony či tekutá mýdla nebo mít jiné pH vzhledem k jejich zamýšlenému použití. Složky, které nejsou obsažené například v šamponu mohou interagovat s nanočásticemi a způsobovat jejich agregaci. Další možností je také záměr použít méně nanočástic stříbra z důvodu bezpečnosti. Po porovnání stanoveného množství nanočásticového stříbra s celkovým obsahem stříbra v matici bylo zjištěno, že zastoupení nanočásticového stříbra je v šamponu je 0,75 %, ve sprchovém gelu 0,047 % a v tekutém mýdle 4,4 %. Z toho vyplývá, že nanočástice představují jen zlomek obsaženého stříbra ve vzorku. Vzhledem k tomu, že vzorek nebyl extrahován nebo filtrován, pouze ředěn, tudíž nemohlo dojít ke ztrátě Ag. Lze tedy předpokládat, že zbylé stříbro ve vzorku je ve formě rozpuštěného iontového stříbra

Důležité je zmínit, že během měření v matici přestaly vycházet velikosti nanočástic, a tudíž může být nepřesná. Pro získání lepších výsledků by bylo vhodné použít alternativní techniky, například elektronový mikroskop, který poskytuje přesnější velikosti nanočástic.

## 5 Závěr

Hlavním cílem v této diplomové práci bylo stanovit koncentraci a střední průměr stříbrných nanočástic ve vzorcích přípravků osobní hygieny pomocí techniky pro stanovení nanočástic spICP-MS. Bylo potřeba vyvinout a optimalizovat metodu a následně ji validovat.

Byla testována různá ředící a zároveň stabilizační činidla. Konkrétně se jednalo o citrátový pufr o různých pH, PVA a Triton X-100. Činidla byla vybírána na základě jejich použití ve vědeckých člancích s obdobnou tematikou. Použití pufru o pH = 8 vedlo k nepřesným výsledkům (nejčastěji k podhodnocení středního průměru částic a nadhodnocení koncentrace) a byl proto zamítnut jako stabilizační činidlo. Naopak pufr o pH = 9 poskytoval lepší stabilizaci, a proto byl považován za vhodnější pro manipulaci s nanočásticemi. Dále byla studována sterická stabilizace nanočástic pomocí PVA a Tritonu X-100. Ačkoliv PVA poskytoval slibné výsledky docházelo k ucpávání hadičky a znečištění torche. Jako další byl použit Triton X-100, který ze všech testovaných stabilizátorů poskytoval nejlepší výsledky, a tudíž byl vybrán jako vhodný stabilizátor. Poté byla optimalizována navážka vzorku, která byla 150 mg a doba sonikace, přičemž nejlepší homogenizace vzorku byla pozorována při 15minutové sonikaci. Dále byl určen limit stanovitelnosti spICP-MS a byl stanoven celkový obsah nanočásticového stříbra optimalizovaným postupem ve vzorcích šamponu, sprchového gelu a tekutého mýdla.

Cíle práce byly splněny částečně. Problémem bylo, že v přítomnosti matrice přestaly vycházet rozměry nanočástic, což mohlo být způsobeno uhlíkovou interferencí. Koncentrace částic ovlivněna nebyla, a proto bylo usouzeno, že se dále bude vyhodnocovat pouze počet částic, která je pro bezpečnost výrobku důležitější. Po stanovení celkového obsahu nanočásticového stříbra ve vzorku bylo zjištěno, že je ho nejvíce obsaženo ve vzorku tekutého mýdla, konkrétně 284 ng g<sup>-1</sup>.

## 6 Seznam použité literatury

- [1] I. De La Calle, M. Menta, M. Klein, F. Séby, Screening of TiO<sub>2</sub> and Au nanoparticles in cosmetics and determination of elemental impurities by multiple techniques (DLS, sp-ICP-MS, ICP-MS and ICP-OES), *Talanta* 171 (2017) 291–306. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.05.002>.
- [2] M.D. Montaña, J.W. Olesik, A.G. Barber, K. Challis, J.F. Ranville, Single Particle ICP-MS: Advances toward routine analysis of nanomaterials, *Anal. Bioanal. Chem.* 408 (2016) 5053–5074. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9676-8>.
- [3] M. Loula, A. Kaňa, R. Koplík, J. Hanuš, M. Vosmanská, O. Mestek, Analysis of Silver Nanoparticles Using Single-Particle Inductively Coupled Plasma – Mass Spectrometry (ICP-MS): Parameters Affecting the Quality of Results, *Anal. Lett.* 52 (2019) 288–307. <https://doi.org/10.1080/00032719.2018.1459657>.
- [4] ISO 80004-1:2023 - Nanotechnologies - Vocabulary - Part 1: Core terms (2023)
- [5] Z. Zhou, D. Beauchemin, Single particle inductively coupled plasma mass spectrometry and its variations for the analysis of nanoparticles, *Chem. Commun.* 60 (2024) 1826–1839. <https://doi.org/10.1039/D3CC04974D>.
- [6] P.D. Darbre, Chapter 3 - Nanomaterials, in: *Pers. Care Prod. Hum. Health*, Academic Press, 2023: pp. 67–78. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780323996846000094>.
- [7] N. Joudeh, D. Linke, Nanoparticle classification, physicochemical properties, characterization, and applications: a comprehensive review for biologists, *J. Nanobiotechnology* 20 (2022) 262. <https://doi.org/10.1186/s12951-022-01477-8>.
- [8] J. Jeevanandam, A. Barhoum, Y.S. Chan, A. Dufresne, M.K. Danquah, Review on nanoparticles and nanostructured materials: history, sources, toxicity and regulations, *Beilstein J. Nanotechnol.* 9 (2018) 1050–1074. <https://doi.org/10.3762/bjnano.9.98>.
- [9] A.R. Montoro Bustos, K.P. Purushotham, A. Possolo, N. Farkas, A.E. Vladár, K.E. Murphy, M.R. Winchester, Validation of Single Particle ICP-MS for Routine Measurements of Nanoparticle Size and Number Size Distribution, *Anal. Chem.* 90 (2018) 14376–14386. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b03871>.
- [10] N. Serpone, Sunscreens and their usefulness: have we made any progress in the last two decades?, *Photochem. Photobiol. Sci.* 20 (2021) 189–244. <https://doi.org/10.1007/s43630-021-00013-1>.
- [11] F. Laborda, J. Jiménez-Lamana, E. Bolea, J.R. Castillo, Critical considerations for the determination of nanoparticle number concentrations, size and number size distributions by single particle ICP-MS, *J. Anal. At. Spectrom.* 28 (2013) 1220. <https://doi.org/10.1039/c3ja50100k>.
- [12] Definition of nanomaterial [online], Eur. Chem. AGENCY (2025). (<https://euon.echa.europa.eu/definition-of-nanomaterial>).
- [13] V. Kantorová, M. Loula, A. Kaňa, O. Mestek, Determination of silver nanoparticles in cosmetics using single particle ICP-MS, *Chem. Pap.* 75 (2021) 5895–5905. <https://doi.org/10.1007/s11696-021-01763-z>.
- [14] P.H. Hoet, I. Brüske-Hohlfeld, O.V. Salata, Nanoparticles – known and unknown health risks, *J. Nanobiotechnology* 2 (2004) 12. <https://doi.org/10.1186/1477-3155-2-12>.
- [15] C. Buzzea, I.I. Pacheco, K. Robbie, Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity, *Biointerphases* 2 (2007) MR17–MR71. <https://doi.org/10.1116/1.2815690>.

- [16] A. Gnach, T. Lipinski, A. Bednarkiewicz, J. Rybka, J.A. Capobianco, Upconverting nanoparticles: assessing the toxicity, *Chem. Soc. Rev.* 44 (2015) 1561–1584. <https://doi.org/10.1039/C4CS00177J>.
- [17] Q. Abbas, B. Yousof, Amina, M.U. Ali, M.A.M. Munir, A. El-Naggar, J. Rinklebe, M. Naushad, Transformation pathways and fate of engineered nanoparticles (ENPs) in distinct interactive environmental compartments: A review, *Environ. Int.* 138 (2020) 105646. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.105646>.
- [18] G.E. Batley, J.K. Kirby, M.J. McLaughlin, Fate and Risks of Nanomaterials in Aquatic and Terrestrial Environments, *Acc. Chem. Res.* 46 (2013) 854–862. <https://doi.org/10.1021/ar2003368>.
- [19] A. López-Serrano, R.M. Olivas, J.S. Landaluze, C. Cámara, Nanoparticles: a global vision. Characterization, separation, and quantification methods. Potential environmental and health impact, *Anal Methods* 6 (2014) 38–56. <https://doi.org/10.1039/C3AY40517F>.
- [20] S.A. Love, M.A. Maurer-Jones, J.W. Thompson, Y.-S. Lin, C.L. Haynes, Assessing Nanoparticle Toxicity, *Annu. Rev. Anal. Chem.* 5 (2012) 181–205. <https://doi.org/10.1146/annurev-anchem-062011-143134>.
- [21] T.P.J. Linsinger, Q. Chaudhry, V. Dehalu, P. Delahaut, A. Dudkiewicz, R. Grombe, F. Von Der Kammer, E.H. Larsen, S. Legros, K. Loeschner, R. Peters, R. Ramsch, G. Roebben, K. Tiede, S. Weigel, Validation of methods for the detection and quantification of engineered nanoparticles in food, *Food Chemistry.* 138 (2013) 1959–1966. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.11.074>.
- [22] M. Mattarozzi, M. Suman, C. Cascio, D. Calestani, S. Weigel, A. Undas, R. Peters, Analytical approaches for the characterization and quantification of nanoparticles in food and beverages, *Anal. Bioanal. Chem.* 409 (2017) 63–80. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9946-5>.
- [23] V. Filipe, A. Hawe, W. Jiskoot, Critical Evaluation of Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) by NanoSight for the Measurement of Nanoparticles and Protein Aggregates, *Pharm. Res.* 27 (2010) 796–810. <https://doi.org/10.1007/s11095-010-0073-2>.
- [24] J.A. Gallego-Urrea, J. Tuoriniemi, M. Hassellöv, Applications of particle-tracking analysis to the determination of size distributions and concentrations of nanoparticles in environmental, biological and food samples, *Trends Anal. Chem.* 30 (2011) 473–483. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2011.01.005>.
- [25] J.K. Schluesener, H.J. Schluesener, Nanosilver: application and novel aspects of toxicology, *Arch. Toxicol.* 87 (2013) 569–576. <https://doi.org/10.1007/s00204-012-1007-z>.
- [26] C.-N. Lok, C.-M. Ho, R. Chen, Q.-Y. He, W.-Y. Yu, H. Sun, P.K.-H. Tam, J.-F. Chiu, C.-M. Che, Silver nanoparticles: partial oxidation and antibacterial activities, *J. Biol. Inorg. Chem.* 12 (2007) 527–534. <https://doi.org/10.1007/s00775-007-0208-z>.
- [27] S.P. Deshmukh, S.M. Patil, S.B. Mullani, S.D. Delekar, Silver nanoparticles as an effective disinfectant: A review, *Mater. Sci. and Eng. C* 97 (2019) 954–965. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.12.102>.
- [28] A.L.M. De Souza, T. Pedron, R.M. Pereira, F.F. Da Silva, C.N. Lange, A.B. Seabra, B.L. Batista, Sizing silver nanoparticles in biological matrices by spICP-MS, *J. Trace Elem. Miner.* 4 (2023) 100054. <https://doi.org/10.1016/j.jtemin.2023.100054>.
- [29] P. Hartemann, P. Hoet, A. Proykova, T. Fernandes, A. Baun, W. De Jong, J. Filser, A. Hensten, C. Kneuer, J.-Y. Maillard, H. Norppa, M. Scheringer, S. Wijnhoven, Nanosilver: Safety, health and environmental effects and role in antimicrobial resistance, *Mater. Today* 18 (2015) 122–123. <https://doi.org/10.1016/j.mattod.2015.02.014>.

- [30] Z. Muhammad, A. Raza, S. Ghafoor, A. Naeem, S.S. Naz, S. Riaz, W. Ahmed, N.F. Rana, PEG capped methotrexate silver nanoparticles for efficient anticancer activity and biocompatibility, *Eur. J. Pharm. Sci.* 91 (2016) 251–255. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2016.04.029>.
- [31] A.-C. Burduşel, O. Gherasim, A.M. Grumezescu, L. Mogoantă, A. Ficai, E. Andronescu, Biomedical Applications of Silver Nanoparticles: An Up-to-Date Overview, *Nanomaterials* 8 (2018) 681. <https://doi.org/10.3390/nano8090681>.
- [32] R. Foldbjerg, P. Olesen, M. Hougaard, D.A. Dang, H.J. Hoffmann, H. Autrup, PVP-coated silver nanoparticles and silver ions induce reactive oxygen species, apoptosis and necrosis in THP-1 monocytes, *Toxicol. Lett.* 190 (2009) 156–162. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2009.07.009>.
- [33] T. Jaswal, J. Gupta, A review on the toxicity of silver nanoparticles on human health, *Mater. Today Proc.* 81 (2023) 859–863. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2021.04.266>.
- [34] M. Akter, Md.T. Sikder, Md.M. Rahman, A.K.M.A. Ullah, K.F.B. Hossain, S. Banik, T. Hosokawa, T. Saito, M. Kurasaki, A systematic review on silver nanoparticles-induced cytotoxicity: Physicochemical properties and perspectives, *J. Adv. Res.* 9 (2018) 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2017.10.008>.
- [35] L.K. Braydich-Stolle, B. Lucas, A. Schrand, R.C. Murdock, T. Lee, J.J. Schlager, S.M. Hussain, M.-C. Hofmann, Silver Nanoparticles Disrupt GDNF/Fyn kinase Signaling in Spermatogonial Stem Cells, *Toxicol. Sci.* 116 (2010) 577–589. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfq148>.
- [36] M. Mihaljevič, L. Strnad, O. Šebek, Využití hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem v geochemii, *Chem. Listy* 98 (2004) 123–130.
- [37] T. Pluháček, V. Maier, Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem - analýza jediné buňky, *Chem. Listy* 114 (2020) 239–243.
- [38] V. Otruba, 6. kurz ICP spektrometrie, Spektrosk. Spol. Jana Marka Marci (2011).
- [39] A.A. Ammann, Inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP MS): a versatile tool, *J. Mass Spectrom.* 42 (2007) 419–427. <https://doi.org/10.1002/jms.1206>.
- [40] R. Thomas, Practical Guide to ICP-MS, Marcel Dekker, New York, 2004. <https://doi.org/10.1201/9780203027073>.
- [41] R. Gałązka, MODERN ANALYTICAL METHODS IN ENVIRONMENTAL ANALYSIS – ICP-MS TECHNIQUE, (2011). <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.3854.7686>.
- [42] R.J. Thomas, Measuring Heavy Metal Contaminants in Cannabis and Hemp, 1st ed., CRC Press, First edition. | Boca Raton: Taylor and Francis, 2020., n.d. <https://doi.org/10.1201/9781003004158>.
- [43] S. Wilschefski, M. Baxter, Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry: Introduction to Analytical Aspects, *Clin. Biochem. Rev.* 40 (2019) 115–133. <https://doi.org/10.33176/AACB-19-00024>.
- [44] P.B. Farnsworth, R.L. Spencer, Ion sampling and transport in Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.* 134 (2017) 105–122. <https://doi.org/10.1016/j.sab.2017.06.009>.
- [45] H.E. Taylor, Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry: Practices and Techniques, 1st ed., Elsevier, 2000.
- [46] O. Mestek, Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem, (2010). [https://old.vscht.cz/anl/josef/LabAtom/Navod\\_ICP-MS\\_2010.pdf](https://old.vscht.cz/anl/josef/LabAtom/Navod_ICP-MS_2010.pdf).
- [47] J.W. Honour, Benchtop mass spectrometry in clinical biochemistry, *Ann. Clin. Biochem. Int. J. Lab. Med.* 40 (2003) 628–638. <https://doi.org/10.1258/000456303770367216>.

- [48] A. Kaňa, O. Mestek, Použití dynamické reakční cely pro odstranění spektrálních interferencí při měření metodou hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem, *Chem. Listy* 105 (2011) 930–937.
- [49] T.-S. Lum, K. Sze-Yin Leung, Strategies to overcome spectral interference in ICP-MS detection, *J. Anal. At. Spectrom.* 31 (2016) 1078–1088. <https://doi.org/10.1039/C5JA00497G>.
- [50] A. Kaňa, Z. Klimšová, O. Mestek, Internal standardisation for arsenic and its species determination using inductively coupled plasma mass spectrometry, *Talanta* 192 (2019) 86–92. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.09.038>.
- [51] R.F.J. Dams, J. Goossens, L. Moens, Spectral and non-spectral interferences in inductively coupled plasma mass-spectrometry, *Mikrochim. Acta* 119 (1995) 277–286. <https://doi.org/10.1007/BF01244007>.
- [52] G. Gauglitz, D.S. Moore, eds., Handbook of Spectroscopy: Second, Enlarged Edition, 2nd ed., Wiley, 2014. <https://doi.org/10.1002/3527602305.fmatter>.
- [53] D. Revenco, M. Loula, O. Mestek, R. Koplík, Stanovení anorganických nanočástic v biologických materiálech a potravinách analýzou jednotlivých částic hmotnostní spektrometrií s indukčně vázaným plazmatem, *Chem. Listy* 113 (2019) 478–484.
- [54] R. Thomas, Single particle ICP-MS: A Key Analytical Technique for Characterizing Nanoparticles, *Spectroscopy* 32 (2017) 12–25.
- [55] A.R. Montoro Bustos, K.P. Purushotham, A. Possolo, N. Farkas, A.E. Vladár, K.E. Murphy, M.R. Winchester, Validation of Single Particle ICP-MS for Routine Measurements of Nanoparticle Size and Number Size Distribution, *Anal. Chem.* 90 (2018) 14376–14386. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b03871>.
- [56] K. Loeschner, M.E. Johnson, A.R. Montoro Bustos, Application of Single Particle ICP-MS for the Determination of Inorganic Nanoparticles in Food Additives and Food: A Short Review, *Nanomaterials* 13 (2023) 2547. <https://doi.org/10.3390/nano13182547>.
- [57] A. Hineman, C. Stephan, Effect of dwell time on single particle inductively coupled plasma mass spectrometry data acquisition quality, *J Anal Spectrom* 29 (2014) 1252–1257. <https://doi.org/10.1039/C4JA00097H>.
- [58] H. Goenaga-Infante, D. Bartczak, Single particle inductively coupled plasma mass spectrometry (spICP-MS), in: *Charact. Nanoparticles*, Elsevier, 2020: pp. 65–77. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814182-3.00003-1>.
- [59] M. Resano, M. Aramendía, E. García-Ruiz, A. Bazo, E. Bolea-Fernandez, F. Vanhaecke, Living in a transient world: ICP-MS reinvented *via* time-resolved analysis for monitoring single events, *Chem. Sci.* 13 (2022) 4436–4473. <https://doi.org/10.1039/D1SC05452J>.
- [60] M. Loula, A. Kaňa, O. Mestek, Non-spectral interferences in single-particle ICP-MS analysis: An underestimated phenomenon, *Talanta* 202 (2019) 565–571. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.04.073>.
- [61] I. Abad-Álvaro, E. Peña-Vázquez, E. Bolea, P. Bermejo-Barrera, J.R. Castillo, F. Laborda, Evaluation of number concentration quantification by single-particle inductively coupled plasma mass spectrometry: microsecond vs. millisecond dwell times, *Anal. Bioanal. Chem.* 408 (2016) 5089–5097. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9515-y>.
- [62] D. Mozhayeva, C. Engelhard, A critical review of single particle inductively coupled plasma mass spectrometry – A step towards an ideal method for nanomaterial characterization, *J. Anal. At. Spectrom.* 35 (2020) 1740–1783. <https://doi.org/10.1039/C9JA00206E>.

- [63] H. Al-Johani, E. Abou-Hamad, A. Jedidi, C.M. Widdifield, J. Viger-Gravel, S.S. Sangaru, D. Gajan, D.H. Anjum, S. Ould-Chikh, M.N. Hedhili, A. Gurinov, M.J. Kelly, M. El Eter, L. Cavallo, L. Emsley, J.-M. Basset, The structure and binding mode of citrate in the stabilization of gold nanoparticles, *Nat. Chem.* 9 (2017) 890–895. <https://doi.org/10.1038/nchem.2752>.
- [64] J.-W. Park, J.S. Shumaker-Parry, Structural Study of Citrate Layers on Gold Nanoparticles: Role of Intermolecular Interactions in Stabilizing Nanoparticles, *J. Am. Chem. Soc.* 136 (2014) 1907–1921. <https://doi.org/10.1021/ja4097384>.
- [65] Y. Dan, H. Shi, C. Stephan, X. Liang, Rapid analysis of titanium dioxide nanoparticles in sunscreens using single particle inductively coupled plasma–mass spectrometry, *Microchem. J.* 122 (2015) 119–126. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2015.04.018>.
- [66] O. Mestek, M. Loula, A. Kaňa, M. Vosmanská, Can ultrafast single-particle analysis using ICP-MS affect the detection limit? Case study: Silver nanoparticles, *Talanta* 210 (2020) 120665. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120665>.
- [67] W. Luo, D. Hickman, M. Keykhosravani, J. Wilson, J. Fink, L. Huang, D. Chen, S. O'Donnell, Identification and characterization of a Triton X-100 replacement for virus inactivation, *Biotechnol. Prog.* 36 (2020) e3036. <https://doi.org/10.1002/btpr.3036>.
- [68] A. Kyrychenko, D.A. Pasko, O.N. Kalugin, Poly(vinyl alcohol) as a water protecting agent for silver nanoparticles: the role of polymer size and structure, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 19 (2017) 8742–8756. <https://doi.org/10.1039/C6CP05562A>.
- [69] M.E. Zorn, R.D. Gibbons, W.C. Sonzogni, Evaluation of Approximate Methods for Calculating the Limit of Detection and Limit of Quantification, *Environ. Sci. Technol.* 33 (1999) 2291–2295. <https://doi.org/10.1021/es981133b>.