

ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE

Fakulta jaderná a fyzikálně inženýrská

Katedra dozimetrie a aplikace ionizujícího záření



BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Rentgenová fluorescenční analýza biologických
vzorků

Autor: Aneta Dušková

Vedoucí: doc. Ing. Tomáš Trojek, Ph.D.

Akademický rok: 2020/2021



Katedra: KDAIZ

Akademický rok: 2019/2020

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Student: Aneta Dušková

Studijní program: Aplikace přírodních věd

Obor: Dozimetrie a aplikace ionizujícího záření

Název práce: Rentgenová fluorescenční analýza biologických vzorků
(česky)

Název práce: X-ray fluorescence analysis of biological samples
(anglicky)

Pokyny pro vypracování:

1. Seznamte se s principem rentgenové fluorescenční analýzy a mikroanalýzy.
2. V odborné literatuře vyhledejte články a zpracujte rešerši popisující použití laboratorní rentgenové fluorescenční analýzy k identifikaci a kvantifikaci chemických prvků přítomných v biologických vzorcích nebo přímo v živých organismech.
3. Naučte se pracovat se základním přístrojovým vybavením pro rentgenovou fluorescenční analýzu, které je dostupné na katedře dozimetrie a aplikace ionizujícího záření, a seznamte se s postupy kvalitativní a semi-kvantitativní analýzy dat.
4. Proveďte měření a vyhodnocení vybraných biologických vzorků.
5. Zhodnoťte možnosti dostupného přístrojového vybavení při studiu biologických vzorků.

Doporučená literatura:

- [1] MARGUI, Eva a Rene VAN GRIEKEN. *X-Ray Fluorescence Spectrometry and Related Techniques: An Introduction*. New York: Momentum Press, 2013. ISBN 978-1-60650-391-1.
- [2] PAVLINSKY, Gely V. *Fundamentals of X-ray Physics*. Cambridge: Cambridge International Science Publishing, 2008. ISBN 978-1-904602-64-4.
- [3] JENKINS, Ron, Robert W. GOULD a Dale GEDCKE. *Quantitative X-Ray Spectrometry*. 2nd ed. New York: Marcel Dekker, 1995. ISBN 978-0-824795-54-2.

Jméno a pracoviště vedoucího bakalářské práce:

doc. Ing. Tomáš Trojek, Ph.D.
České vysoké učení technické v Praze
Fakulta jaderná a fyzikálně inženýrská
Katedra dozimetrie a aplikace ionizujícího záření
Břehová 7
115 19 Praha 1

Jméno a pracoviště konzultanta bakalářské práce:


Datum zadání bakalářské práce: 13. 3. 2020

Termín odevzdání bakalářské práce: 6. 1. 2021

Doba platnosti zadání je dva roky od data zadání.


.....
garant oboru


.....
vedoucí katedry


.....
děkan

V Praze dne 13.3.2020



Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně a použila jsem pouze podklady uvedené v příloženém seznamu.

V Praze

.....
Aneta Dušková

Poděkování

Upřímně děkuji panu doc. Ing. Tomáši Trojkovi, Ph.D. za odborné vedení, vstřícnost a cenné rady při zpracování této práce. Dále mé poděkování patří rodině a partnerovi za jejich neustálou podporu. Ráda bych také vyjádřila vděčnost za možnost studovat na FJFI a za vše, co mne tato fakulta naučila.

Aneta Dušková

Název práce: **Rentgenová fluorescenční analýza biologických vzorků**

Autor: Aneta Dušková

Obor: Dozimetrie a aplikace ionizujícího záření

Druh práce: Bakalářská práce

Vedoucí práce: doc. Ing. Tomáš Trojek, Ph.D., Katedra dozimetrie a aplikace ionizujícího záření Fakulty jaderné a fyzikálně inženýrské Českého vysokého učení technického v Praze

Konzultant: —————

Abstrakt:

Rentgenová fluorescenční analýza (XRF) je nedestruktivní metoda dobře zavedená v mnoha oborech, která se prosazuje i v oblastech biologie. Existuje značné množství z ní odvozených technik nabízejících mnohá pozitiva, například 3D mapování prvků ve vysokém rozlišení. Biologické vzorky vyžadují specifickou přípravu v závislosti na svém charakteru. Z rešerše bylo zjištěno, že většina aplikací XRF na biologických vzorcích se dá rozdělit do následujících skupin: Medicína; Zemědělství a kontrola potravin; Environmentální studie, energetika a průmysl a Chemie rostlin. Tyto skupiny se mohou vzájemně prolínat. V Praktické části práce bylo dokázáno, že provádět přesnou analýzu biologických vzorků je schopna také aparatura přítomná na KDAIZ FJFI ČVUT v Praze a bylo nalezeno její nejvhodnější uspořádání. Byly diskutovány specifické potřeby a charakter rentgenové fluorescenční analýzy biologických vzorků, a to v kontextu zmíněné aparatury. V závěru práce byly představeny výsledky 2D skenování horizontálních řezů kmenem plísni napadené vrby a borovice s dobře viditelnými letokruhy. Ve všech měřených vzorcích byly zjištěny změny koncentrací vybraných prvků v závislosti na vzdálenosti od středu kmene, letokruzích nebo napadené a zdravé části dřeva.

Klíčová slova: Rentgenová fluorescenční analýza, XRF, biologické vzorky, dřevo, listy

***Title:* X-ray fluorescence analysis of biological samples**

Author: Aneta Dušková

Abstract: X-ray fluorescence analysis is a non-destructive method well established in various fields, currently increasing in biological studies. There is an abundance of XRF-related techniques, each offering various beneficial possibilities, such as high-resolution 3D elemental mapping. Biological samples require specific preparation methods depending on their character. Recherche study results contribute to the possibility of dividing XRF analysis of biological samples applications into the following groups: Medicinal; Agrar and food controls; Environmental studies, energy and industry and Chemical research in botany. Borderlines between these groups may be blurry. It was verified in the Experimental section that the XRF spectrometer located in DDAIZ FNSPE CTU in the Prague laboratory is capable of appropriate biological samples measurements, and its most appropriate setup was found. Several specific needs and features of XRF analysis on biological samples were discussed regarding the used spectrometer. Finally, XRF elemental maps of horizontal stem cuts with biodeterioration and cuts with good annual-ring visibility were introduced. Strong elemental concentration alterations throughout stem were observed, showing a decay and clear-wood zones dependence or annual-ring and distance from core dependence in all analysed samples, both or separately.

Key words: X-ray fluorescence analysis, XRF, biological samples, wood, leaves

Obsah

1	Úvod	9
2	Teoretická část	10
2.1	Rentgenová fluorescenční analýza (XRF)	10
2.1.1	Princip	10
2.1.2	Fyzika záření X	12
2.1.3	Kvalitativní a kvantitativní analýza	16
2.2	Aparatura XRF	19
2.2.1	Zdroj primárního záření	20
2.2.2	Detekce sekundárního záření	24
2.2.3	Modifikátory svazku	26
2.2.4	Bezpečnost a ochrana před ionizujícím zářením	27
2.3	Mikro-XRF	28
2.4	Biologické vzorky	28
2.4.1	Příklady aplikace XRF na biologických vzorcích	29
3	Praktická část	38
3.1	Aparatura na KDAIZ FJFI ČVUT v Praze	38
3.2	Výsledky měření	38
3.2.1	Referenční materiál	38
3.2.2	Vzorky neznámého složení	45
4	Závěr	56

Kapitola 1

Úvod

Tato bakalářská práce se zabývá využitím rentgenové fluorescenční analýzy při určování prvkového složení biologických vzorků. Rentgenová fluorescenční analýza (obvykle se používá zkratka XRF z anglického X-ray fluorescence) představuje již dobře zavedenou metodu atomové emisní spektrometrie, která je v některých oborech již velmi rozšířená a snadno dostupná [1], [2]. V oblasti výzkumu biologických vzorků se však teprve prosazuje, zejména kvůli nízké energii charakteristických čar hledaných biogenních prvků (a tím i jejich zhoršené možnosti detekce) a nízké koncentraci hledaných prvků v materiálu či navíc vysokému obsahu vody. Hlavní výhodou této metody je však její nedestruktivnost, což dovoluje další zkoumání již proměřeného vzorku [3], [4], či její aplikaci na výzkum metabolických procesů v živých organismech bez nutnosti jejich usmrcení (vzhledem však k určité hladině ozáření zkoumaného vzorku jsou vhodným kandidátem takového výzkumu zejména rostliny).

Typickou překážkou může být nerovný povrch biologického vzorku, jeho nehomogenita nebo nevhodný objem či tloušťka. V praxi se takovéto problémy často odstraňují vysušením, rozmělněním, případně následnou peletizací zkoumaného materiálu [3], [4]. V této práci jim bylo předejito výběrem vzorků vhodné tloušťky i tvaru, které bylo možno měřit bez úpravy.

Cílem této práce je popsat postupy rentgenové fluorescenční analýzy zejména při její aplikaci na biologických vzorcích, zhodnotit možnosti měření v této oblasti, které nabízí aparatura trvale přítomná na katedře dozimetrie na FJFI ČVUT v Praze a nalézt její vhodné uspořádání.

Kapitola 2

Teoretická část

2.1 Rentgenová fluorescenční analýza (XRF)

2.1.1 Princip

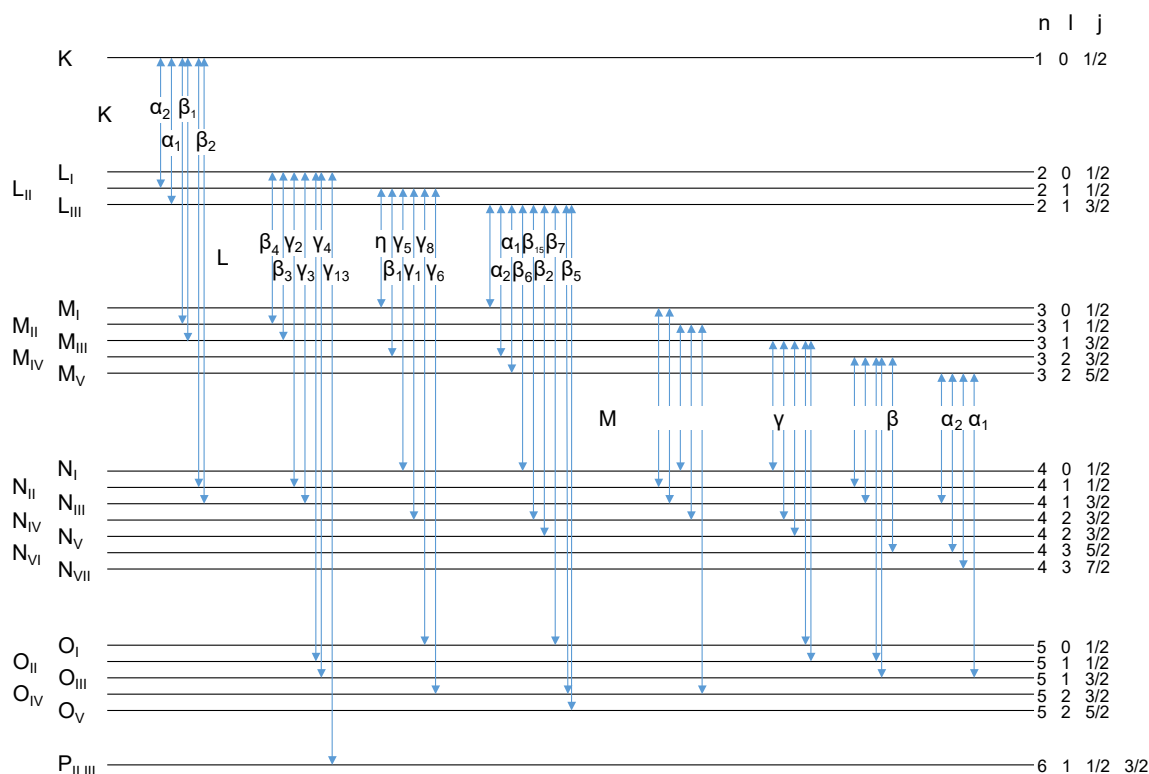
Klasická rentgenová fluorescenční analýza (XRF) je založena na ozáření zkoumaného materiálu rentgenovým zářením. Fotony tohoto záření mohou být s určitou pravděpodobností absorbovány, přičemž jejich energie je přeměněna na vyražení jednoho z elektronů na vnitřních slupkách atomu ve zkoumaném materiálu. Tento jev se nazývá fotoefekt a je podmínkou pro vznik fluorescence, tedy pro stimulovanou emisi elektromagnetického záření.

Dokud je totiž v atomovém obalu volné místo, je příslušný stav atomu nestabilní a na výběr jsou dva procesy, které mohou následovat. V obou dvou je volné místo na vnitřní slupce zaplněno přeskokem elektronu ze slupky vyšší. Rozdíl energií, kterou měl elektron na vyšší slupce a té, kterou má nyní na nižší, však při prvním z procesů (tzv. Augerův jev) vede k emisi elektronu z vnější slupky atomu. Při druhém z procesů je rozdíl energií vyzářen ve formě fotonu. Energie tohoto fotonu přísluší rentgenovému spektru a je pro každý atom charakteristická. [1] Svazek takových fotonů o dané energii se nazývá charakteristické záření a jeho vlnová délka λ (a z ní plynoucí energie E) je dána Moseleyho zákonem:

$$\frac{1}{\lambda} = \frac{E}{hc} = K(Z - \sigma)^2, \quad (2.1)$$

kde h je Planckova konstanta, c rychlost světla ve vakuu a Z je protonové číslo prvku, ze kterého charakteristické záření pochází. K je konstanta pro konkrétní sérii charakteristických energií (série je dána slupkou atomu, kde vzniklo počáteční volné místo a různé energie v sérii pak různými slupkami a jejich podslupkami, ze kterých na něj přeskočil elektron) a σ je konstanta pro korekci odpuzování způsobeného dalšími elektrony v atomu [5], [6].

Dle zákonů kvantové mechaniky nejsou však všechny přechody mezi slupkami dovolené. Ty, které jsou dovolené, se po detekci sekundárního rentgenového záření mohou objevit ve spektrech jako tzv. charakteristické čáry (reálně však vlivem nepřesnosti detekční techniky jde o gaussovské píky) a pro jejich pojmenování existuje



Obrázek 2.1: Terminologie charakteristických čar rentgenového záření podle Karla Manneho Siegbahna. Obrázek byl přepracován na základě materiálů uvedených v publikaci [5].

několik konvencí. Dvě nejčastěji používané notace jsou Karla Manneho Siegbahna (notace Siegbahn) a International Union of Pure and applied Chemistry (notace IUPAC). [1]

Notace Siegbahn je graficky znázorněna na obrázku 2.1. V této terminologii je čára ve spektru pojmenována symbolem prvku následovaným jménem slupky (K, L, M, ...), ve které se objevila iniciální díra, s řeckým písmenem v dolním indexu. Řecká písmena udávají pravděpodobnosti emise dané čáry (od největší po nejmenší) a tedy i její relativní intenzitu ve spektru. U jednotlivých řeckých písmen se objevují dále i číslice, které značí, že ve skutečnosti je na daném místě charakteristických čar více, jejich rozdíl je však příliš malý na to, abychom je v praxi mohli rozlišit. Tyto číslice udávají opět pravděpodobnost emise.

Jako příklad uveďme nejsilnější charakteristickou čáru zinku $Zn - K_{\alpha}$.

Při použití nomenklatury IUPAC je čára pojmenována symbolem prvku, pak slupky, ve které se objevila iniciální díra, a dále slupky, ze které přeskočil elektron, který tuto díru zaplnil. Například $Zn - KL_{III}$ je charakteristická čára zinku způsobená vznikem díry ve slupce K zaplněné elektronem ze slupky L_{III} . [1]

Kromě těch dovolených bylo však pozorováno značné množství čar, které svými energiemi do normálního energetického diagramu nesedí. Říkáme jim satelity a většina z nich má velmi slabou intenzitu. Předpokládá se, že jejich zdrojem je dvojitá

nebo vícera ionizace atomu. Přechod vícero elektronů po ionizaci následuje emise jediného fotonu energie vyšší než charakteristického záření. Dodejme, že pravděpodobnost přechodu více elektronů způsobujícího emisi satelitní čáry je významně vyšší pro prvky s nízkým Z , než pro ty se středním a vysokým Z . [5]

Dále můžeme pozorovat, že charakteristické emisní spektrum některých prvků v pevném skupenství obsahuje spojité pásy o šířce od 1 do 10 eV, přičemž stejný prvek v plynném skupenství emituje pouze obvyklé ostré čáry. Pásy se vyskytují pouze v případě, že elektron, který zaplní díru po fotoefektu, spadne z nejvyšší nebo valenční vrstvy atomu, jejíž úroveň je rozšířena do širokého pásu, pokud je atom vázán v krystalové mřížce. Výzkum takových spekter je velmi důležitý k pochopení elektronové struktury kovů, slitin nebo složitých koordinačních sloučenin v pevném skupenství. [5]

2.1.2 Fyzika záření X

Záření X, nebo také rentgenové záření, je elektromagnetické záření o vlnové délce v rozmezí zhruba 0,01 – 10 nm, což odpovídá energiím v rozsahu 0,125 – 125 keV. Při krátkých vlnových délkách přechází do záření γ a při dlouhých do UV záření. Není ovlivňováno elektrickým ani magnetickým polem, při průchodu látkou různého složení, hustoty nebo tloušťky vykazuje různou absorpci. Je možno u něj pozorovat odraz, difrakci, lom i polarizaci. Při průchodu elektronovým obalem atomu je schopno uvolňovat fotoelektrony nebo vyrážet Comptonovské elektrony. Má ionizační účinky, a proto je schopno poškozovat nebo zabíjet živé buňky. [1], [5]

K dosažení produkce rentgenového záření daného prvku je jediným požadavkem použití excitujícího záření s energií vyšší než je absorpční hrana příslušné skupiny čar. [1]

Brzdné záření

Podle klasické elektromagnetické teorie by měla být změna vektoru rychlosti nabíjených částic doprovázena emisí fotonového záření. Vysokoenergetické elektrony prudce zabrzděné v materiálu (takový materiál nazýváme terčíkem) by tak díky velké změně rychlosti měly produkovat impuls záření. Takové záření nazýváme brzdné a jeho energetické spektrum je spojité s maximální energií E_{max} (analogicky minimální vlnovou délkou λ_{min}) danou Duane-Huntovým zákonem :

$$eV_0 = \frac{hc}{\lambda_{min}} = E_{max} , \quad (2.2)$$

kde e je elektrický náboj elektronu a V_0 je napětí, které elektron urychlilo.

Pravděpodobnost vyzáření brzdného záření je zhruba úměrná $q^2 Z^2 T^2 / M_0^2$ kde q je náboj částice v jednotkách náboje elektronu e , Z je protonové číslo materiálu terčíku, T je kinetická energie částice a M_0 její klidová energie.

Jelikož protony a těžší částice mají vysoké klidové hmotnosti v porovnání s elektrony, vyzařují oproti nim brzdné záření relativně málo. Například intenzita brzdného záření generovaného protony je zhruba o čtyři řády nižší než generovaného elektrony.

Poměr energie ztracené brzdým zářením ku energii ztracené ionizací při průchodu nabitě částice látkou pak může být aproximován vztahem

$$\left(\frac{m_0}{M_0}\right)^2 \cdot \frac{ZT}{1600 \cdot m_0 c^2}, \quad (2.3)$$

kde m_0 je klidová hmotnost elektronu.

Je-li elektronovým svazkem ostřelována tenká fólie, intenzita emitovaného brzděného záření má maximum kolem 55° vzhledem ke směru tohoto svazku a při 180° se stává nulovou. Oproti tomu, brzděné záření pocházející z terčů tlustých je charakterizováno mnohem nižší anizotropií. Je to způsobeno tím, že v tenkých terčích elektrony často nestihnou projít více než jednou kolizí, než projdou skrz, zatímco v terčích tlustých je většina elektronů zastavena v kolizích více. Tím mají jejich směry letu v látce terčů většinou značné rozdíly. Obecně lze také říci, že vzrůst anizotropie brzděného záření z tlustých terčů je pozorován při nejkratších vlnových délkách emitovaného záření a pro terče s nízkým Z .

Dále předpokládáme, že ostřelující elektrony jsou urychlovány nízkým napětím. Teorie elektromagnetizmu pak předpovídá maximální energii brzděného záření v pravém úhlu ku směru ostřelujícího elektronového svazku. Se zvyšujícím se napětím by se směr, ve kterém je energie brzděného záření maximální, měl přibližovat ke směru primárního svazku. [5]

Charakteristické záření

V úvodu této kapitoly byl zmíněn vznik charakteristického rentgenového záření. V následující sekci rozvedeme jeho emisi podrobněji.

Jestliže je vlivem srážky s ostřelujícím elektronem nebo vlivem absorpce fotonu uvolněn elektron z K-slupky atomu, vzniklý ion se ocitne ve vysoce excitovaném stavu. Nadbytek této energie oproti stavu základnímu je roven energii potřebné k přemístění elektronu ze slupky K do prostoru vně atomu, nebo-li energii vazby elektronu na slupce K. Jak již bylo řečeno, pokud je volné místo na slupce K zaplněno elektronem ze slupky L, je tento přechod doprovázen emisí energie ve formě rentgenového záření. Foton takového rentgenového záření má jasně definovanou energii rovnou rozdílu vazbových energií obou slupek, kterou v případě zmíněného přechodu ze slupky L na slupku K nazýváme čarou K_α . Po uskutečnění tohoto procesu pak zbyde volné místo na slupce L. Volné místo na slupce K však může být s určitou nižší pravděpodobností zaplněno i elektronem ze slupky M (pokud má atom k tomu elektronů dostatek), což je doprovázeno emisí čáry K_β , která má nižší relativní intenzitu. Vzniklá volná místa na slupkách L a M pak mohou být opět zaplněna elektronem z vyšší orbity a doprovázena emisí dalšího rentgenového záření.

Emisi charakteristického záření tedy předchází ionizace vnitřních slupek atomu, a to buďto nabitými částicemi, nebo fotony s energií vyšší, než je příslušná absorpční hrana.

Předpokládáme nejprve ionizaci elektrony. Účinný průřez takové ionizace dané slupky atomu prvku i je funkcí pouze $U = E/E_{c,i}$, kde E je energie elektronu a $E_{c,i}$ je energie potřebná k ionizaci atomu prvku i . Maximum účinného průřezu při ostřelování elektrony se ukazuje při $U \cong 3 - 4$.

Nyní předpokládejme ionizaci fotony. Zde není ionizace vnitřních slupek atomu důsledkem srážky, ale fotoefektu, tedy absorpce. Kinetická energie vyraženého fotoelektronu je pak dána rozdílem mezi energií fotonu $h\nu$ a vazbovou energií elektronu v atomu E_c . Kritické absorpční vlnové délky fotonu spojené s kritickými absorpčními energiemi se pak dají spočítat dle vztahu $\lambda(nm) = 1,24/E(keV)$. Pro energie daleko od absorpční hrany a v nerelativistickém rozsahu je účinný průřez τ_K vyrazení elektronu ze slupky K fotoefektem dán vztahem:

$$\tau_K = \frac{32\sqrt{2}}{3} \cdot \pi r_0^2 \frac{Z^5}{(137)^4} \cdot \left(\frac{m_0 c^2}{h\nu} \right)^{7/2}, \quad (2.4)$$

kde r_0 je klasický poloměr elektronu roven $2,818 \cdot 10^{-15} m$ a Z je protonové číslo ostřelovaného prvku.

Jak již bylo v úvodu této kapitoly řečeno, nadbytek energie, kterou má atom po odebrání elektronu z vnitřní slupky, ať již jakýmkoliv způsobem, vede k emisi buďto charakteristického záření, nebo alternativně jednoho ze slabě vázaných elektronů. Tento druhý proces se nazývá Augerův jev a emitovaný elektron Augerův, přičemž jeho pravděpodobnost stoupá s klesajícím rozdílem mezi příslušnými energetickými stavy atomu a je nejvyšší pro prvky s nízkým Z .

Jelikož excitovanému atomu po první ionizaci již jeden elektron schází, například na slupce K, a druhý je emitován při Augerově jevu, například ze slupky L, atom se po něm bude nacházet v dvojitě excitovaném stavu, ve kterém mu chybí elektrony dva. Takový atom se vrátí do základního stavu dvěma izolovanými přeskoky elektronů z vyšších orbitalů a emisí charakteristických čar, které spadají do klasického diagramu dovolených přechodů, nebo dvojitým přeskokem s emisí jedné čáry satelitní. Alternativně k emisi charakteristického záření však může nastat další Augerův jev s emisí elektronu třetího, například ze slupky M. [5]

Důležitý následek Augerova jevu je ten, že počet emitovaných fotonů charakteristického záření je nižší, než by se dalo očekávat z počtu ionizací na vnitřních slupkách atomů v látce. Pravděpodobnost, že se volné místo v atomu zaplní radiačním přechodem, nazýváme fluorescenční výtěžek. Ten má hodnotu přibližně 1 pro prvky s vyšším Z , zatímco pro prvky s nízkým Z má hodnotu méně než 0,01. Závislost fluorescenčního výtěžku na protonovém čísle Z je přibližně zobrazena na obrázku 2.2. [5], [1]

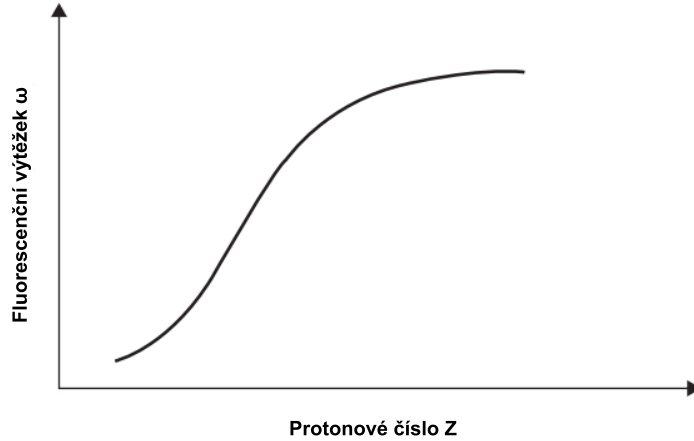
Pokud přejdeme od definice fluorescenčního výtěžku pro celý atom k pouze jedné slupce (pro začátek k té nejnižší), fluorescenční výtěžek slupky K je:

$$\omega_K = \frac{I_K}{n_K}, \quad (2.5)$$

kde I_K je celkový počet emitovaných fotonů charakteristického záření ze slupky K v celém vzorku a n_K je počet primárních vakancí na slupce K.

Definice fluorescenčního výtěžku vyšších atomových slupek je již komplikovanější, a to z následujících důvodů:

1. Slupky vyšší než K obsahují více než jednu podslupku. Průměrný fluorescenční výtěžek pak záleží na tom, jak jsou ionizované.



Obrázek 2.2: Závislost fluorescenčního výtěžku na protonovém čísle ozařovaného prvku. Obrázek byl převzat ze zdroje [1] a přeložen do češtiny.

2. Objevují se Coster-Kronigovy přechody, což jsou neradiační přechody mezi jednotlivými podslupkami atomových slupek (tedy přechody mezi energetickými hladinami, které mají stejné hlavní kvantové číslo).

V případě, kdy Coster-Kronigovy přechody přítomné nejsou, fluorescenční výtěžek i -té podslupky atomové slupky, jejíž hlavní kvantové číslo je dáno písmenem X ($X = L, M, \dots$), se dá napsat jako:

$$\omega_i^X = \frac{I_i^X}{n_i^X} . \quad (2.6)$$

Střední fluorescenční výtěžek $\bar{\omega}_X$ pro slupku X je pak dán vztahem:

$$\bar{\omega}_X = \sum_{i=1}^k N_i^X \omega_i^X , \quad (2.7)$$

kde N_i^X je relativní počet primárních vakancí podslupky i slupky X:

$$N_i^X = \frac{n_i^X}{\sum_{i=1}^k n_i^X} , \quad \sum_{i=1}^k N_i^X = 1. \quad (2.8)$$

Pro definici středního fluorescenčního výtěžku musí být distribuce primárních vakancí neměnná, tedy Coster-Kronigovy přechody nesmí probíhat.

Je nutno poznamenat, že $\bar{\omega}_X$ obecně není vlastností atomu, ale závisí jak na fluorescenčních výtěžcích podslupek ω_i^X , tak na relativním počtu primárních vakancí N_i^X charakteristických způsob ionizace atomu. [5]

Interakce rentgenového záření s látkou

Interakce fotonového záření s látkou je složité téma, které zahrnuje celou škálu procesů. Budeme se proto zabývat jen těmi, které jsou důležité pro rentgenovou fluorescenční analýzu.

Relativní zastoupení jednotlivých interakcí je závislé na energiích fotonů přítomných v primárním svazku záření a složení látky, ve které se svazek rozptyluje. Dále se při průchodu svazku látkou zeslabuje jeho intenzita a klesá tedy jejich pravděpodobnost.

Rentgenové záření využitelné k rentgenové fluorescenční analýze interaguje při průchodu látkou téměř výhradně s elektrony, přičemž lze ukázat, že dominují 2 procesy: fotoelektrický jev a rozptyl. Část záření může projít i skrz ozařovaný vzorek. [6]

Fotoelektrický jev jsme si již popsali, věnujme se proto rozptylu. Jedná se opět o interakci s elektrony atomu, přičemž pokud je tato interakce elastická (tj. při kolizi není ztracena žádná energie), rozptyl se nazývá koherentní (nebo Rayleighův).

Pokud foton část své energie při kolizi předá, rozptyl se nazývá nekoherentní (nebo Comptonův). Záření pocházející z Comptonova rozptylu je charakterizováno lehce nižší energií, než byla energie dopadajících fotonů.

Kvůli těmto jevům se ve spektru při rentgenové fluorescenční analýze nacházejí krom charakteristických čar vzorku i píky příslušné Rayleighovu a Comptonovu rozptylu primárního svazku. Píky příslušné Rayleighovu rozptylu mají gaussovský tvar, jehož poloha odpovídá charakteristickým energiím vyskytujícím se v primárním svazku. Oproti tomu Comptonovské píky jsou širší než Rayleighovy a nacházejí se na lehce nižších energiích.

Závěrem dodejme, že intenzita rozptýleného záření je závislá na střední hodnotě atomového čísla, hustotě a tloušťce ozařovaného vzorku. [1]

2.1.3 Kvalitativní a kvantitativní analýza

Rentgenová fluorescenční analýza se dá rozdělit na kvalitativní (identifikace prvků přítomných ve vzorku) a kvantitativní (určení či odhadnutí jejich koncentrací). Pro kvalitativní zjištění přítomnosti prvku obvykle stačí nalezení 1 nebo 2 jeho charakteristických čar v detekovaném spektru, k čemuž se v praxi využívají tabulky s již změřenými hodnotami příslušných energií.

Kvalitativní analýza

Schopnost zaznamenat přítomnost prvku metodou rentgenové fluorescenční analýzy však není stejná pro všechna protonová čísla Z . Jelikož je citlivost XRF spektrometru v závislosti na Z složité téma a její průběh není ani monotónní, bude předmětem hlubšího zkoumání až v pracích navazujících na tuto práci bakalářskou. Již zde je však důležité zmínit, že jednou z hlavních nevýhod rentgenové fluorescenční analýzy je její nízká schopnost zaznamenat přítomnost lehkých prvků. Tato schopnost rychle klesá již kolem protonového čísla $Z = 12$ (Mg) a pro prvky se $Z < 9$

(lehčí než F) se rentgenová fluorescenční analýza bez k těmto účelům dobře upraveného spektrometru stává již velmi složitou [6]. Speciálně pak prvky H a He není možné měřit pomocí metody XRF vůbec, protože nemají žádnou vyšší slupku, ze které by po ionizaci mohl elektron přeskočit.

Nízká schopnost zaznamenat přítomnost lehkých prvků metodou rentgenové fluorescenční analýzy je způsobena především kombinací absorpce velké části charakteristického záření s nízkou energií již ve vzorku, vzduchu či okénku detektoru, dále rychlého růstu pravděpodobnosti fotoelektrického jevu s protonovým číslem Z atomu (těžší prvky ve vzorku tedy absorbují většinu dopadajícího záření na úkor lehkých) a nakonec nízkých hodnot fluorescenčního výtěžku pro nízká Z ionizovaných atomů (u lehkých prvků ústí fotoelektrický jev většinou v Augerův jev). Ve výsledku tak detekované záření, které vzniklo ve vzorku a zároveň má nízkou energii, bude pocházet dokonce s vyšší pravděpodobností z přechodů molekulárních než orbitálních [6]. Dále, jelikož střední volná dráha charakteristického záření v látce je nízká (typicky $1 - 1000 \mu m$), je vhodné, aby měřený vzorek byl homogenní směrem do hloubky [6].

Rentgenová fluorescenční analýza se však technicky posouvá stále kupředu a v dnešní době mají komerčně dostupné spektrometry s lepší citlivostí již rozsah přibližně $0,6 - 40 keV$, což dovoluje měření K sérií od již zmíněného protonového čísla $Z = 9$ (F) po $Z = 71$ (Lu) a L čar od $Z = 25$ (Mn) po $Z = 92$ (U). Dále může být v některých rentgenových spektrometrech přítomna komora, do které se vkládá ozařovaný vzorek a která je schopna udržet po dobu měření vakuum. Problém s absorpcí nízkenergetického záření ve vzduchu je tak výrazně snížen a v těchto speciálních podmínkách je možno zaznamenat i charakteristickou čáru Be. Ve vakuovém prostředí však nemohou být měřeny vzorky kapalné kvůli jejich zrychlenému vypařování. V takových případech je komora vyplněna heliem, které sice absorbuje záření prvků s protonovým číslem $Z < 9$, ale záření prvků těžších prakticky neovlivňuje. Citlivost spektrometru je tak pro lehké prvky stále lepší, než kdyby byl kapalný vzorek obklopen vzduchem. [1]

Kvantitativní analýza

Velikost čisté plochy píku charakteristické čáry prvku (tedy celkové plochy píku po odečtení pozadí pod ním) je přímo úměrná koncentraci daného prvku ve vzorku. Změřený pík je obvykle proložen Gaussovou křivkou a dále je provedena integrace na intervalu, který byl přibližně zvolen jako ten, na kterém se změřený pík rozkládá. Jednodušším a méně přesným způsobem výpočtu je prosté sečtení impulzů zaznamenaných detektorem na tomto intervalu. Obvykle se poté takto vypočtená celková plocha píku vydělí časem měření T_p . Vzniká tak intenzita píku I_p rovná střednímu počtu detekovaných impulzů dané charakteristické čáry za sekundu. Následně je odhadnuto pozadí pod píkem, tedy počet detekovaných impulzů s energií spadající do zvoleného intervalu, jejichž zdrojem však není charakteristické záření dané čáry. Po vydělení časem měření pozadí T_b vzniká intenzita pozadí píku I_b . Spektrum určené k výpočtu pozadí může být změřeno zvlášť, časy T_p a T_b tak mohou být obecně různé. Čistá intenzita píku se pak vypočítá pomocí rozdílu $I_p - I_b$.

Převod čisté intenzity píku i na koncentraci prvku ve vzorku je pak proveden dosazením do předpisu pro kalibrační křivku. Pokud lze kalibrační křivku pokládat

za lineární, její předpis bude dán vztahem

$$I_p - I_b = m_i C_i, \quad (2.9)$$

kde C_i je koncentrace a m_i je kalibrační konstanta, nazývaná také citlivost přístroje. Sestavení kalibrační přímky, tedy nalezení konstanty m_i , je založeno na předpokladu, že závislost změřené intenzity I na koncentraci prvku C je stejná pro vzorky podobného složení (a zároveň je tato závislost lineární). Pokud je tedy na daném spektrometru a při jeho daném nastavení změřena intenzita čáry i vzorku, pro nějž je koncentrace příslušného prvku známa (tedy byla změřena již dříve jinou metodou), citlivost přístroje pro měření tohoto prvku (za využití jeho charakteristické čáry i) ve vzorcích podobného složení (tedy s podobnou maticí) je dána vztahem

$$m_i = \frac{I_p - I_b}{C_i}, \quad (2.10)$$

kde $I_p - I_b$ je čistá intenzita píku i ve změřeném spektru a C_i je známá koncentrace prvku příslušejícího k píku i v měřeném vzorku. Takový vzorek se pak nazývá referenční materiál. [7]

S citlivostí přístroje souvisí také jeho schopnost zjistit, zda je prvek ve vzorku přítomen, nebo není. Jinými slovy, otázka tedy zní, jaká je nejmenší možná čistá intenzita píku $I_p - I_b$, pro kterou lze s danou statistickou nejistotou říci, že příslušný prvek se ve vzorku opravdu nachází. Po dosazení do vzorce (2.9) je tato intenzita převedena na nejmenší koncentraci, která se nazývá detekční limit. K výpočtu detekčního limitu existují různé přístupy, přičemž jimi nalezené hodnoty se mohou velmi lišit. Nejjednodušším takovým přístupem je stanovení *LLD* podle vzorce

$$LLD = \frac{2\sqrt{2}}{m_i} \sqrt{\frac{I_b}{T_b}} \approx \frac{3}{m_i} \sqrt{\frac{I_b}{T_b}}. \quad (2.11)$$

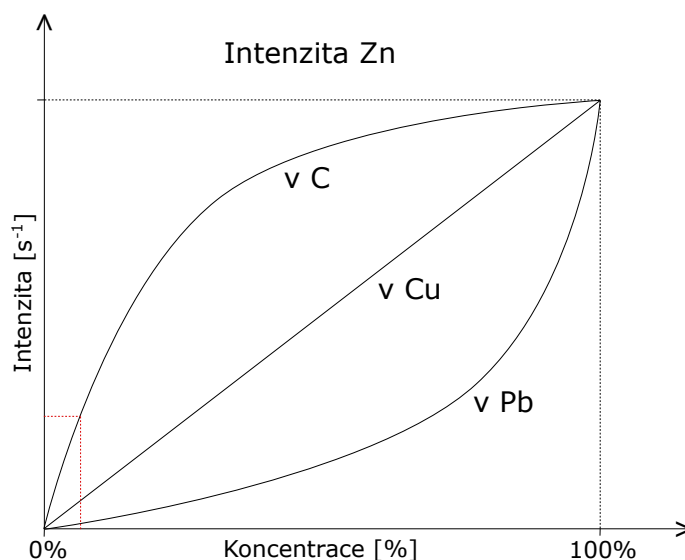
Takto stanovený detekční limit není však příliš přesný a bývá nižší, než je hodnota skutečná. Od tohoto faktu je odvozen jeho název "Lower Limit of Detection", tedy nižší nebo dolní mez detekce. [7]

Závěrem, při kvantitativní analýze je tedy vždy potřeba stanovit vybraným způsobem detekční limit dané čáry i a zkontrolovat, zda vypočtená koncentrace prvku ve vzorku je vyšší, než příslušná hodnota.

Semi-kvantitativní analýza

Vztah mezi intenzitou I a koncentrací C však ve skutečnosti bývá přibližně lineární pouze ve velmi omezeném rozsahu. Ve většině případů totiž není intenzita charakteristické čáry závislá pouze na koncentraci příslušného prvku, ale také na vlivu dalších prvků utvářejících vzorek. Tyto jevy se nazývají maticové a dají se z velké části eliminovat pomocí vhodných počítačových programů. [6]

Schematické znázornění maticových jevů je na obrázku 2.3, kde lze vidět přibližně načrtnutý průběh závislosti detekované intenzity na koncentraci Zn ve vzorku



Obrázek 2.3: Schématické znázornění matricových jevů při určování koncentrace zinku v matrici z uhlíku, mědi a olova společně s označením intervalu, kde se závislost intenzity vybrané čáry zinku na jeho koncentraci v uhlíku dá považovat za lineární.

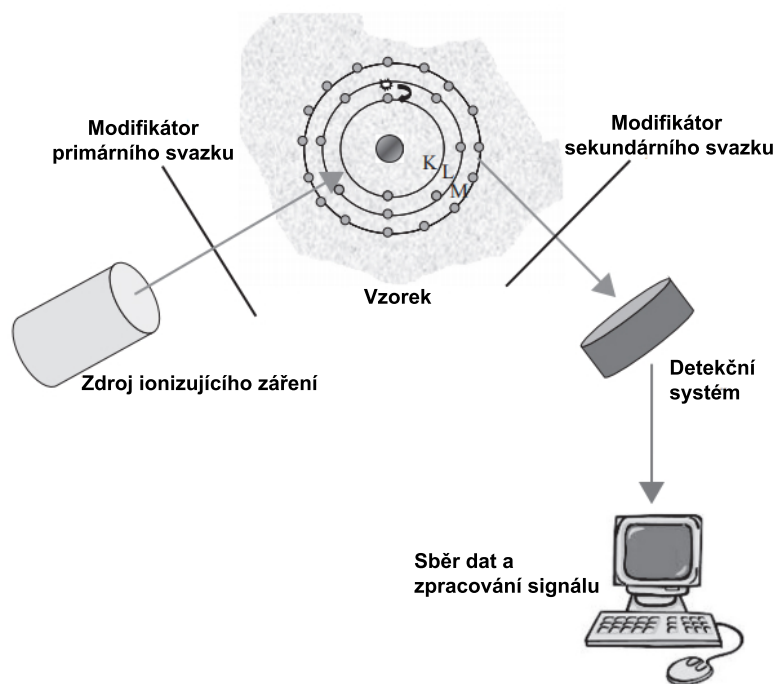
s matricí popořadě tvořenou C, Cu a Pb. Při analýze biologických vzorků se přitom dá předpokládat, že jejich matrice je vždy podobná (z velké části tvořená C) a zároveň také, že koncentrace měřených prvků ve vzorku je nízká. Za těchto předpokladů pak lze použít referenční materiál původem z jiného biologického druhu, než je měřený vzorek a předpokládat lineární průběh kalibrační křivky. Vzhledem k tomu, že proběhly zmíněné aproximace, lze příslušnou kvantitativní analýzu považovat za semi-kvantitativní.

2.2 Aparatura XRF

Pod pojmem spektrometr je myšlen soubor všech přístrojů a pomocných komponent, které jsou potřeba ke změření a zpracování dat spektrometrické analýzy. Základní součásti všech spektrometrů využívaných k rentgenové fluorescenční analýze můžeme rozdělit následujícím způsobem:

1. Zdroj ionizujícího záření o dostatečné energii ke způsobení fotoefektu v ozařovaném vzorku
2. Systém umožňující vystavení vzorku ozáření
3. Detekční systém sbírající emitované charakteristické záření
4. Systém ke sběru dat a zpracování signálu

Při některých specifických aplikacích jsou spektrometry vybaveny také modifikátory svazku vycházejícího ze zdroje (primárního svazku) nebo nalétávajícího ze



Obrázek 2.4: Základní součásti XRF spektrometru. Obrázek byl převzat ze zdroje [1] a přeložen do češtiny.

vzorku do detektoru (sekundárního svazku) za účelem zlepšení jejich požadovaných vlastností. [1]

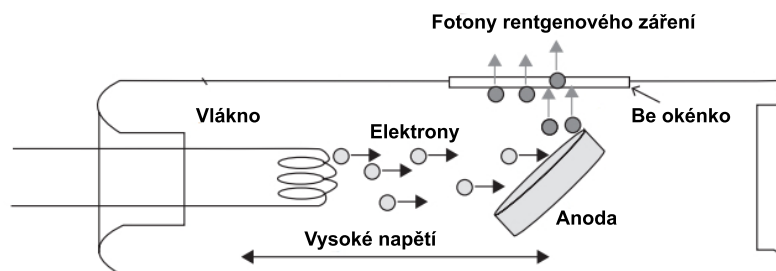
Základní součásti rentgenového spektrometru jsou shrnuty na obrázku 2.4. Zdroj ionizujícího záření je u klasické XRF analýzy nejčastěji nastaven tak, aby svazek záření dopadal na povrch vzorku přibližně pod úhlem 45° . Stejně tak vstupní okénko detektoru je namířeno nejčastěji tak, aby svazek emitovaný vzorkem dopadal do detektoru také pod úhlem přibližně 45° .

2.2.1 Zdroj primárního záření

Rentgenové lampy

Zdaleka nejvíce používané zdroje ionizujícího záření v rentgenové spektrometrii jsou rentgenové lampy, jejichž základní design můžeme vidět na obrázku 2.5.

Rentgenové lampy obsahují spirálovité vlákno (většinou z W), které se chová jako katoda, a terčík (anodu, většinou z Mo, Rh, Pd, nebo W), oboje umístěné ve vakuové trubici. Při vpuštění elektrického proudu do vlákna (o velikosti $1\text{ mA} - 1\text{ A}$) se vlákno zahřeje a začne termicky emitovat elektrony. Ty jsou vtahovány a urychlovány směrem k anodě pomocí vysokého napětí ($30 - 50\text{ kV}$), které je přiloženo mezi katodu a anodu. Při nárazu na anodu se elektrony prudce zpomalí, což způsobí emisi brzdného záření, které se ve výsledném rentgenovém spektru zobrazí jako spojitý pás emitovaných energií. Energie brzdného záření závisí na přiloženém napětí (kV) a materiálu terčíku (anody). Proud v katodě (mA) zase ovlivňuje počet



Obrázek 2.5: Základní design rentgenové lampy s okénkem umístěným na straně trubice. Obrázek byl převzat ze zdroje [1] a přeložen do češtiny.

z ní emitovaných fotonů. Vedle emise brzdného záření část urychlených elektronů, po vyražení jiného elektronu z atomu anody, způsobí emisi charakteristického záření materiálu terčíku. To se zobrazí jako spektrum čárové navršené na spektrum spojité pocházející z brzdného záření.

Jak brzdné, tak charakteristické záření je emitováno z anody ve všech směrech, ale z rentgenové lampy vychází pouze berylliovým okénkem, které je umístěno buď na konci (end-window X-ray tube), nebo na straně (side-window X-ray tube).

Část energie elektronů se přemění na teplo anodového materiálu, kvůli čemuž bylo dříve nutné rentgenové lampy chladit, aby se předešlo jejich poškození. Nové technologické postupy však umožnily konstrukci kompaktních energeticky úsporných kovo-keramických rentgenových lamp (s maximálním výkonem 50 W), které je možné chladit pouze vzduchem. To umožnilo vývoj stolních a příručních systémů pro aplikace méně náročné na přesnost spektrometru, avšak s jednoduchou obsluhou a přijatelnou pořizovací cenou.

Životnost rentgenových lamp je v rámci tisíců pracovních hodin a z většiny záleží na materiálu anody. K zajištění maximální možné délky života lampy je potřeba rozehrívát katodu pomalu (15 – 45 min, v závislosti na délce doby od posledního použití).

Byl popsán základní princip emise záření a zacházení s rentgenovou lampou. Její vlastnosti, které mohou ovlivnit výběr konkrétní lampy k rentgenové fluorescenční analýze, jsou následující:

1. Materiál anody a přiložené napětí určují, které prvky ve vzorku mohou být ionizovány. Platí totiž, že většina atomů vzorku, které emitovaly charakteristické záření s nízkou energií, byla ionizována charakteristickým zářením rentgenové lampy taktéž s nízkou energií. Naopak většina atomů, které emitovaly charakteristické záření s vysokou energií, byla ionizována zářením brzdným. Pro rentgenovou lampu s Rh anodou je tato vlastnost zobrazena na obrázku 2.6.
2. Výkon rentgenové lampy souvisí s citlivostí spektrometru. Tok elektronů mezi katodou a anodou závisí na proudu připojenému k rentgenové lampě (resp. proudu v katodovém vláknu), zatímco rychlost, kterou elektrony letí a následně narazí do anody, je závislá na přiloženém napětí. Tedy jak proud tak napětí

■ Excitují: K čáry Rh, Měřeny: K čáry
■ Excitují: L čáry Rh, Měřeny: K čáry
■ Excituje: brzdné záření, Měřeny: K čáry
■ Excitují: K/L čáry Rh, Měřeny: L čáry

1 H																	2 He						
3 Li	4 Be																	5 B	6 C	7 N	8 O	9 F	10 Ne
11 Na	12 Mg																	13 Al	14 Si	15 P	16 S	17 Cl	18 Ar
19 K	20 Ca	21 Sc	22 Ti	23 V	24 Cr	25 Mn	26 Fe	27 Co	28 Ni	29 Cu	30 Zn	31 Ga	32 Ge	33 As	34 Se	35 Br	36 Kr						
37 Rb	38 Sr	39 Y	40 Zr	41 Nb	42 Mo	43 Tc	44 Ru	47 Rh	46 Pd	47 Ag	48 Cd	49 In	50 Sn	51 Sb	52 Te	53 I	54 Xe						
55 Cs	56 Ba	57-70 *	71 Lu	72 Hf	73 Ta	74 W	75 Re	76 Os	77 Ir	78 Pt	79 Au	80 Hg	81 Tl	82 Pb	83 Bi	84 Po	85 At	86 Rn					
87 Fr	88 Ra	89-102 **	103 Lr	104 Rf	105 Db	106 Sg	107 Bh	108 Hs	109 Mt	110 Ds	111 Rg	112 Cn	113 Nh	114 Fl	115 Mc	116 Lv	117 Ts	118 Og					

*	57 La	58 Ce	59 Pr	60 Nd	61 Pm	62 Sm	63 Eu	64 Gd	65 Tb	66 Dy	67 Ho	68 Er	69 Tm	70 Yb
**	89 Ac	90 Th	91 Pa	92 U	93 Np	94 Pu	95 Am	96 Cm	97 Bk	98 Cf	99 Es	100 Fm	101 Md	102 No

Obrázek 2.6: Prvky, které jsou většinou ionizovány rentgenovou lampou s Rh anodou a charakteristické čáry těchto prvků, které jsou poté využitelné při XRF analýze. Obrázek byl přepracován na základě materiálů uvedených v publikaci [1].

ovlivňují intenzitu rentgenového záření emitovaného z lampy, což můžeme vidět na obrázku 2.7.

Výkon lampy, roven součinu proudu a napětí, je díky tomu jedním z nejdůležitějších parametrů souvisejících s citlivostí rentgenových spektrometrů. Ke zlepšení jejich poměru signálu a pozadí nebo detekčního limitu mohou být použity modifikátory primárního svazku, které popíšeme podrobněji níže. [1]

Nyní si popíšeme spektrum brzdného záření emitovaného rentgenovou lampou. Pokud je terčík dostatečně tlustý, je toto spojitě spektrum charakterizováno následujícími znaky:

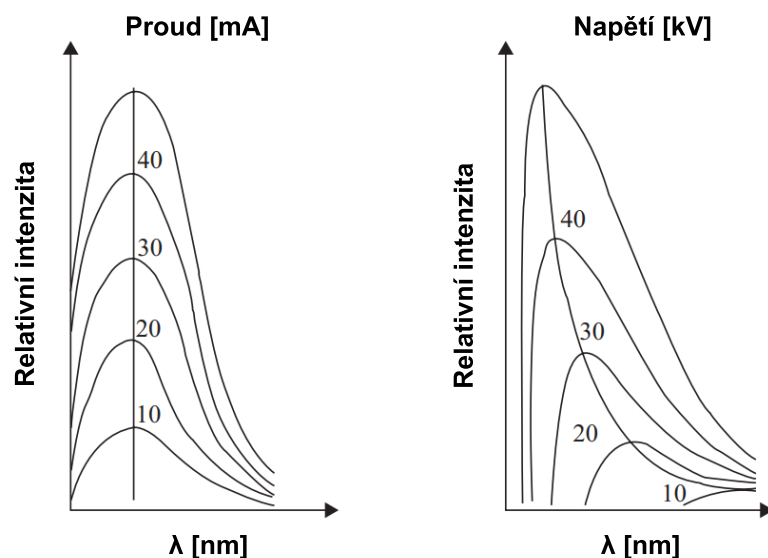
1. Není pozorováno záření s vlnovou délkou nižší než λ_{min} , viz. vzorec (2.2).
2. $\lambda_{max} \approx 1,5 \cdot \lambda_{min}$.

Druhý vztah mezi λ_{max} a λ_{min} však záleží do jisté míry na napětí a protonovém čísle.

Empirický vztah popisující celkový tvar energetického spektra stanovil Kulenkampff (1922, 1933) jako:

$$I(\nu)d\nu = i [aZ(\nu_0 - \nu) + bZ^2]d\nu, \quad (2.12)$$

kde $I(\nu)d\nu$ je intenzita spojitěho rentgenového záření v intervalu frekvence ($\nu, \nu + d\nu$), i je elektrický proud ostřelující terčík v rentgence, Z je protonové číslo materiálu



Obrázek 2.7: Způsob, jakým napětí a proud ovlivňují intenzitu záření různých vlnových délek emitovaného z rentgenové lampy. Obrázek byl převzat ze zdroje [1] a přeložen do češtiny.

terčíku, $\nu_0 = c/\lambda_{min}$ a a, b jsou konstanty nezávislé na atomovém čísle, napětí ani na λ_{min} . Druhý člen vzorce je obvykle malý v porovnání s prvním a často se zanedbává. (Později tento vztah zpřesnil Kramers pomocí kvantové teorie.)

Účinnost Eff konverze elektrického příkonu rentgenové lampy na celkové generované rentgenové záření (všech frekvencí) je přibližně dána vztahem:

$$Eff = 9,2 \cdot 10^{-10} Z V_0 . \quad (2.13)$$

Přesný popis brzdného rentgenového spektra je v rentgenové spektrometrii zásadní. Stanovení distribuce intenzity spektra generovaného rentgenovou lampou je důležité pro matematickou korekci matricových jevů v kvalitativní rentgenové fluorescenční analýze. [5]

Radioizotopy

Radioizotopy, jakožto zdroje ionizujícího záření při rentgenové fluorescenční analýze, byly v minulosti velmi populární jako součásti přenosných spektrometrů, především díky svým malým rozměrům a nulové spotřebě elektrické energie. Negativem však jsou spíše krátké poločasy rozpadu některých radioizotopů, nízká intenzita záření a zvláštní regulační požadavky na jejich transport a použití. Nejčastěji byly používány radioizotopy ^{55}Fe , ^{109}Cd , ^{241}Am a ^{57}Co . [1]

Další zdroje

Kromě rentgenových lamp se při rentgenové fluorescenční analýze používají i další zdroje primárního záření využívající urychlené částice. Nejdůležitějšími z nich jsou synchrotron, protonové nebo alfa zářiče a elektronové zdroje (využívané především v elektronových mikroskopech a mikrosondách).

Zejména poslední dva typy zdrojů však nejsou snadno dostupné, protože jsou k jejich konstrukci většinou zapotřebí velké urychlovače částic.

Vzhledem k tomu, že nejčastěji používané zdroje ionizujícího záření v rentgenové fluorescenční analýze jsou rentgenové lampy, (především v komerčně využívaných spektrometrech), zaměříme se v následujících sekcích na systémy pro XRF analýzu využívající právě je. [1]

2.2.2 Detekce sekundárního záření

Cílem každého detekčního systému, který je součástí rentgenového spektrometru, je převést fotony rentgenového záření vyletující ze vzorku na elektrické pulzy, přičemž velikost tohoto pulzu je úměrná energii fotonu. Pulzy jsou poté zesíleny a sečteny multikanálovým analyzátorem (MCA). Počet pulzů dané výšky určuje intenzitu příslušné energie záření a v rentgenovém spektru se zobrazí jako pík. Skutečná šířka fluorescenčních čar je méně než 10 eV, kvůli rušivým tepelným jevům v detektoru a jejich následném zesílení elektronikou nejsou však píky v digitalizovaném rentgenovém spektru zobrazeny jako ostré čáry, nýbrž jsou rozšířeny do křivky gaussovského typu.

Nejčastěji používané detektory při XRF analýze jsou proporcionální, scintilační a polovodičové, přičemž dvě nejdůležitější vlastnosti každého detekčního systému používaného při rentgenové fluorescenční analýze jsou energetická rozlišovací schopnost a detekční účinnost.

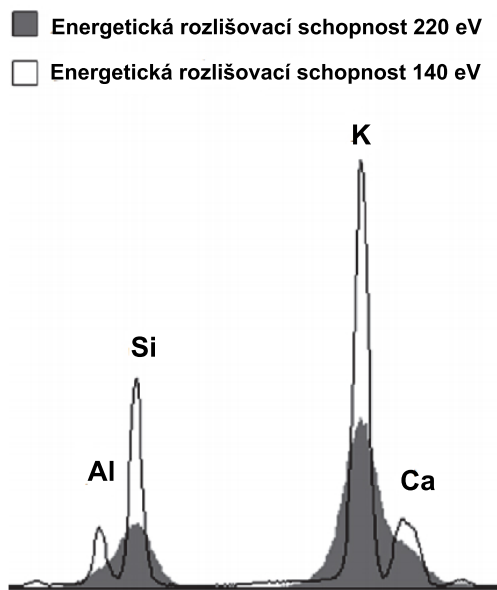
Energetická rozlišovací schopnost je definována jako schopnost detektoru rozlišit různé hodnoty energií. Názorný příklad můžeme vidět na obrázku 2.8. Většinou je odhadována pomocí šířky píku v polovině jeho maxima (FWHM, Full Width at Half Maximum).

Hodnoty FWHM se však zvyšují s energií píku. Aby bylo možno porovnávat energetickou rozlišovací schopnost různých detektorů, ustanovila se $Mn - K_{\alpha}$ jako referenční čára, u které se FWHM detektorů udává.

Při víceprvkové rentgenové fluorescenční analýze se mohou objevit vzájemné překryvy píků. Tento nežádoucí efekt může být dobrou energetickou rozlišovací schopností detektoru snížena. K přiřazení správných intenzit prvkům příslušným k překrývajícím se píků se využívá matematický proces zvaný dekonvoluce.

Detekční účinnost je definována jako poměrná část fotonů ionizujícího záření z naměřeného detektorem z celkového množství ionizujícího záření, které k detektoru ze vzorku doletělo. Závisí (mimo jiné) na typu detektoru a jeho velikosti a tvaru.

Výběr detektoru je většinou založen na rozsahu protonových čísel prvků, které je potřeba změřit, a z nich plynoucích požadavků na energetickou rozlišovací schop-



Obrázek 2.8: Spektra získaná použitím detekčních systémů s různou energetickou rozlišovací schopností. Obrázek byl převzat ze zdroje [1] a přeložen do češtiny.

nost a detekční účinnost. Například proporcionální detektory jsou charakteristické středně dobrou energetickou rozlišovací schopností a detekční účinností dobrou pro lehké prvky (Be-Cu), ale spíše horší pro středně těžké a těžké prvky (Cu-U). Pro toto rozmezí mají dobrou detekční účinnost scintilační detektory, jejich energetická rozlišovací schopnost je však velmi špatná v porovnání s polovodičovými detektory, zvláště pak při nízkých energiích. Naproti tomu polovodičové detektory (Si(Li), HPGe, PIN diody, SDD) mají uspokojivou až dobrou detekční účinnost pro široké rozmezí prvků (Na-U) a výbornou energetickou rozlišovací schopnost.

Některé útvary v rentgenovém fluorescenčním spektru, jmenovitě únikové a sumační píky, nemají původ v měřeném vzorku, ale v detekčním systému. Atomy v detektoru totiž také mohou emitovat charakteristické záření, když interagují s rentgenovým zářením přilétajícím ze vzorku. Malá část tohoto charakteristického záření pak může vylétnout z objemu detektoru a odnést tak svou energii, která nebude započtena do výsledného spektra. Pokud toto charakteristické záření detektoru bylo vybuzeveno taktéž zářením charakteristickým, ve spektru se objeví pík o energii rovné rozdílu těchto dvou charakteristických energií, který nazýváme pík únikový (escape peak).

Píky sumační jsou výsledkem přiletu dvou charakteristických fotonů do detektoru s tak krátkým časovým rozdílem, že je detektor vyhodnotí jako jednu událost a jejich energii sečte. Pro charakteristické záření vzorku, které nemá vysokou intenzitu, není tento jev příliš pravděpodobný, stejně jako pro přilet tří a více charakteristických fotonů s takto krátkým časovým rozdílem.

Pulzy produkované detektorem jsou následně zpracovány komplexním elektronickým systémem, na jehož výstupu jsou započítány amplitudy s určitou výškou,

tvůřící finální spektrum. Tato elektronika potřebuje jisté množství času ke zpracování jednoho pulzu, po kterou není schopna registrovat pulz jiný. Tato doba se nazývá mrtvá a je různá pro různé detekční systémy. Platí, že čím větší je intenzita pulzů přicházejících k detektoru, tím více jich je ztraceno během mrtvé doby. Tedy, aby vztah mezi skutečnými a změřenými intenzitami byl lineární, je potřeba zapojit softwareovou korekci. [1]

2.2.3 Modifikátory svazku

Většina rentgenových spektrometrů je vybavena modifikátory primárního nebo sekundárního svazku za účelem zlepšení citlivosti a detekčních limitů nebo lepší přizpůsobivosti spektrometru konkrétní prvkové analýze.

Výhody užití modifikátorů svazku primárního jsou většinou spojeny se snížením intenzity záření vycházejícího z rentgenové lampy za účelem omezení překryvů píků nebo zvýšení poměru signálu ku pozadí u vybraných prvků. Dalším benefitem, který mohou modifikátory primárního svazku přinést, je regulace jeho šířky, a tedy velikosti ozařované plochy vzorku.

Modifikátory svazku sekundárního jsou do spektrometru přidávány většinou za účelem efektivnějšího sběru fluorescenčního záření vylétujícího ze vzorku či regulace spektrální distribuce záření ve prospěch hledaných charakteristických čar.

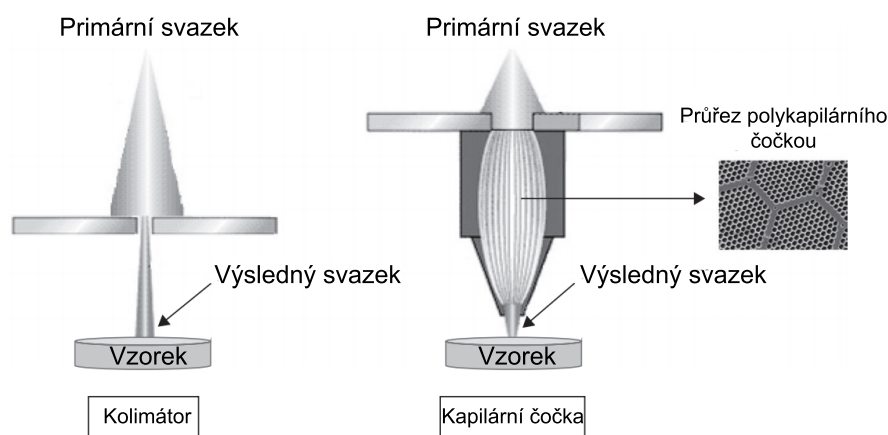
Mezi často používané modifikátory svazku při rentgenové fluorescenční analýze patří filtry, fokusační optika nebo kolimátory.

Filtry jsou většinou tenké kovové plíšky, které se umísťují do spektrometru za účelem absorpce části záření do určité energie, která je dána materiálem a tloušťkou filtru. Různým filtrům je pak přizpůsobeno napětí na rentgenové lampě.

Filtry primárního svazku snižují intenzitu interferenčních čar a intenzitu záření rentgenové lampy, čímž zlepšují poměr signálu ku šumu ve vybrané oblasti energií, kde se nacházejí charakteristické čáry hledaných prvků. Tím se zlepšuje detekční limit těchto prvků. V některých specifických případech mohou být použity i filtry svazku sekundárního, které modifikují spektrální distribuci fluorescenčního záření vycházejícího ze vzorku, znovu za účelem vyniknutí charakteristických čar hledaných prvků ve výsledném spektru.

Fokusační optika se používá k soustředění rentgenového svazku do malého bodu na povrchu vzorku, pokud modifikuje svazek primární, nebo k zachycení fluorescenčního záření z pouze malého bodu při povrchu vzorku, pokud modifikuje svazek sekundární. Nejjednodušeji lze takového uspořádání docílit, pokud je do cesty svazku vložen jednodotvorový kolimátor. Tím je však snížena jeho intenzita, což je nežádoucí v případě měření prvků s nízkou koncentrací. Jakožto pokročilejší zařízení lze k takovému účelu použít kapilární čočky. Ty jsou založeny na využití dutých skleněných vláken, kterými rentgenový svazek prolétá, přičemž fotony odchylovající se od směru letu svazku jsou (s určitou pravděpodobností) odraženy zpět do prostoru vlákna. Svazek vylétující z takového optického zařízení může mít i průměr menší než jeden mikrometr.

Složitější kolimátory používané při XRF analýze mají podobu soustavy kovových



Obrázek 2.9: Výsledné svazky primárního záření při použití jednootvorového kolimátoru a fokusační optiky. Obrázek byl převzat ze zdroje [1] a přeložen do češtiny.

plátků umístěných několik desetin milimetru od sebe, které umožní průchod jen úzkým paralelním svazkům záření a ostatní záření odstíní. Taková kolimace svazku je jednoduchá a levná, avšak snižuje jeho intenzitu. [1]

2.2.4 Bezpečnost a ochrana před ionizujícím zářením

Rentgenové záření, jakožto záření ionizující, může při kontaktu s lidskou tkání způsobit poškození různé závažnosti, například zlomit či modifikovat chemické vazby pro buňky důležitých molekul. Takové změny mohou vést až ke smrti poškozených buněk či zvyšovat riziko vzniku rakoviny.

Následky ozáření lidského těla může ovlivnit více faktorů, z nichž nejdůležitější jsou absorbovaná dávka, energie záření, ozářená oblast nebo individuální buněčná citlivost.

Při práci s přístroji využívajícími rentgenové záření je tedy třeba zajistit bezpečné zacházení a minimalizovat nepříznivé efekty na zdraví zúčastněných. Ve všech zemích světa jsou zákonem předepsány dávkové limity, jejichž hodnoty jsou založené na doporučeních ICRP (International Commission on Radiological Protection). K jejich dodržení se na pracovištích využívají dosimetry, které měří individuální dávku za daný časový interval. Hodnoty dávek jsou archivovány po dobu několika let, přičemž je, mimo jiné, pro každý rok sečtena dávka celková, která nesmí překročit stanovené limity.

Komerční analytické rentgenové přístroje jsou odstíněny ochranným krytem tak, aby ozáření při normálním použití bylo minimální. Zvláštní opatrnost je potřeba při práci se systémy s otevřeným svazkem záření (vyskytujícími se často například ve výzkumu). [5]

Při práci s rentgenovou fluorescenční aparaturou, obzvláště ve výzkumných laboratořích, nebo pohybu kolem ní je třeba si být vědom rizik vyplývajících z ozáření a znát postupy příslušné ochrany. Při správné obsluze však aparatura nebezpečná

není (Pro srovnání, kolem roku 2000 bylo v takovém případě ozáření spíše menší, než při sledování barevného televizoru. Přitom dnešní hodnota ozáření při této metodě se v případě klasické XRF nijak radikálně nezvýšila). [6]

2.3 Mikro-XRF

Technický posun relativně nedávné doby v oblasti rentgenové optiky dovolil vývoj spektrometrů, které jsou schopny analyzovat vzorky i na úrovni mikrometrů. Příslušné odvětví XRF se označuje jako rentgenová fluorescenční mikroanalýza (μ -XRF) a je jedním z nejmladších. Hlavní odlišností od klasické rentgenové fluorescenční analýzy je fokusace primárního svazku na mnohem menší průměr pomocí vhodné fokusovací optiky, obvykle monokapilárních nebo polykapilárních čoček, jejichž základní princip byl popsán již v sekci 2.2.3. Standardní μ -XRF spektrometry jsou většinou vybaveny také běžným mikroskopem (nebo jen fotoaparátem) pro možnost přesného výběru bodu, ve kterém měření proběhne, a zobrazení na monitoru počítače jeho pozice na povrchu vzorku během ladění spektrometru a samotného měření. Společně s programovatelným zařízením pro pohyb ve třech prostorových souřadnicích je pak možné provádět plně automatizované skenování vzorku s výrazně lepším rozlišením, než u běžné XRF analýzy. Takové skenování se provádí obvykle v přímce nebo na ploše.

Komerčně dostupné μ -XRF spektrometry nabízejí rozlišení v řádu desítek až stovek μm . Použitím kapilární optiky se však v porovnání s klasickou XRF analýzou sníží poměr čistých ploch píků ku pozadí a sníží citlivost spektrometru. Vzhledem k typicky nízkým koncentracím mikrobiogenních prvků tak není μ -XRF vždy vhodná k analýze biologických vzorků. Použitím výkonnějších zdrojů primárního záření se však dá zvýšit rozlišení i senzitivita μ -XRF spektrometru, především pak takových, které jsou založeny na urychlování ozařujících částic. Mezi nimi je v kontextu μ -XRF nejvýznamnějším synchrotron, který dovoluje posunout rozlišení až k nano-oblastem a citlivost k pico- či femto-oblastem. [1]

Začátkem druhého tisíciletí byla vyvinuta varianta μ -XRF založená na vložení druhého fokusovacího zařízení mezi vzorek a detektor, které dovoluje vniknout do detektoru pouze záření z vybraného bodu v ozařovaném objemu vzorku. Pohybem tohoto bodu pak lze získat informaci a koncentraci vybraného prvku v závislosti na hloubce ve vzorku. Tato metoda se nazývá konfokální rentgenová fluorescenční analýza a vybavení k jejímu provedení je přítomné i na Katedře dozimetrie a aplikace ionizujícího záření na FJFI ČVUT. Toto zařízení je přenositelné a uzpůsobené k analýzám historických maleb, což je jedna z nejčastějších aplikací konfokální μ -XRF, především právě díky možnosti přinést informace o složení jednotlivých nanosených vrstev barvy. [8]

2.4 Biologické vzorky

Metoda rentgenové fluorescenční analýzy je nedestruktivní a použitelná k měření látek v pevném, kapalném i plynném skupenství [6]. To však přináší různé přístupy

k přípravě vzorku k měření rentgenovou fluorescenční analýzou. Špatně zvolená nebo nedostatečná příprava vzorku je přitom největším zdrojem chyb při XRF analýze. Bez úprav je možné měřit pouze vzorky, které jsou dostatečně homogenní a mají rovný povrch. Pokud tyto podmínky splněny nejsou, což je častým problémem biologických vzorků, a vzorek je pevného skupenství, jednou z možností přípravy ke XRF analýze je rozemletí na prášek, jehož zrna jsou přibližně stejně velká a zároveň dostatečně malá na to, aby vzorek mohl být chemicky homogenní. Typickým problémem je zde kontaminace vzorku v průběhu mletí prvků původem z mlecího zařízení.

Takto rozemletý prášek může být před měřením zabalen do velmi tenké plastové folie, peletizován, nebo smíchán s vhodnou tekutinou, která je poté přefiltrována za vytvoření tenké vrstvy z původního prášku na ploše filtru. Tyto odlišné přístupy jsou vybírány na základě toho, jaké prvky je potřeba měřit a jaké jsou kladeny nároky na velikost chyby měření. Například měření nepeletizovaného prášku zabaleného do fólie poskytne nižší citlivost pro lehčí prvky (například biogenní Na) než peletizovaného kvůli většímu objemu a absorpci ve fólii. Dalším možným nedostatkem nepeletizovaného prášku může být jeho ne zcela nehomogenní hustota, což může zvýšit chybu měření.

Kromě nehomogenity nebo nerovného povrchu je typickým problémem biologických vzorků zvýšený obsah vody. Vzorky kapalné, nebo kapalinu obsahující, vykazují vyšší rozptyl záření, který způsobuje vyšší pozadí v detekovaném spektru vedoucí ke zhoršení poměru čistých píků ku pozadí, tedy zhoršení citlivosti i limitů detekce. Obecně vzorky pevného skupenství vykazují příznivější vlastnosti pro měření pomocí XRF analýzy než vzorky kapalné. Při přípravě kapalných vzorků se tedy často používají procesy, při kterých je kapalná matrice redukována. V případě kvantitativní analýzy rostlinných vzorků se jedná především o vysušení teplotou do 60°C, nebo vysušení mrazem, a rozmělnění na jemný prášek s následnou peletizací. V případě kvantitativní analýzy tkání je namísto vysušení teplotou voleno prakticky výhradně sušení mrazem, v případě měření prvkové distribuce zmrazení tekutým dusíkem s následným rozřezáním na tenké plátky. [1]

2.4.1 Příklady aplikace XRF na biologických vzorcích

Během zpracování této práce se postupně podařilo vyhledat přibližně 100 článků popisujících použití laboratorní rentgenové fluorescenční analýzy na biologických vzorcích nebo živých organismech. V následujících řádcích budou výsledky tohoto vyhledávání shrnuty a některé z článků zmíněny blíže.

Medicína

Z výsledků rešerše bylo zjištěno, že rentgenová fluorescenční analýza je využitelná v medicíně, a to jak ve výzkumu, tak ve zobrazovací přístrojové technice. První uvedené studie se budou týkat především výzkumu a diagnostiky nádorového bujení.

Imbalance stopových prvků v těle může vést k patologickým stavům včetně rakoviny. Stanovení koncentrací těchto prvků v nádorových tkáních a porovnání s kon-

centracemi fyziologickými tak může napomoci k lepšímu pochopení karcinogeneze. Ve studii [3] byla použita rentgenová fluorescenční spektrometrie ke kvantitativní analýze Fe, Cu a Zn v nádorové a odpovídající zdravé tkáni plic, prostaty, vaječníků a tlustého střeva. Z této tkáně byly připraveny vhodné biologické vzorky pomocí lyofilizace, rozemletí a slisování do pelet. Prvková analýza pomocí metody XRF byla vybrána díky její nedestruktivnosti, která dovoluje použít vzorky k dalším analýzám, schopnosti detekovat částice i o nízkých koncentracích a schopnosti dosáhnout vysokých detekčních limitů. U všech měřených prvků byly detekovány jasné změny v koncentracích mezi zdravou a nádorovou tkání, a to navíc v závislosti na typu dané tkáně.

Na stejném základě je založena i práce [9], ale s odlišným uplatněním výsledků. Změny v absolutních koncentracích, změny ve vzájemných poměrech koncentrací nebo speciace prvků Cu, Fe, Mn, Zn, Mg, Co a Na v maligní a benigní tkáni změřené rentgenovou fluorescenční analýzou zde byly představeny jako možný způsob zjištění přítomnosti, závažnosti a typu rakoviny tkáně prsou a prostaty. Jakožto analog lidské tkáně zde byla použita psí, výsledky ale ukázaly potenciál přenést výzkum do klinické fáze.

Další rozvíjející se technikou v oblasti diagnostiky a léčby rakoviny, která využívá rentgenovou fluorescenční analýzu, je rentgenová fluorescenční výpočetní tomografie (XFCT). V nedávné době byl totiž zaznamenán vývoj nových molekul na bázi zlata (GNPs) s výjimečně dobrou schopností dopravit a uvolnit léčivo do nádorové tkáně. Tyto nanočástice tak mají potenciál zlepšit účinnost chemoterapie, jakožto i radio-terapie díky možnosti cílit na tyto částice absorbované v nádoru při ozařování. [10] XFCT, která je díky vlastnostem rentgenové fluorescence citlivá na detekci prvků s vysokým protonovým číslem, například právě zlata, je technikou s potenciálem sledovat distribuci a koncentraci GNPs v tělech pacientů [11]. Technikou XFCT je možno detekovat L-čáry vznikající v hloubkách 4 – 9 mm lidské tkáně a K-čáry vznikající v hloubkách několika centimetrů při zachování vysokého prostorového rozlišení, což jiné zobrazovací techniky typicky nedovolují [12]. Zavedení polykapilární optiky jako součásti přístroje XFCT velmi účinně snižuje čas potřebný k detekci dostatečného množství charakteristického záření a zvyšuje citlivost při měřeních provedených na fantomech, je tedy příznivou cestou k realizaci preklinického výzkumu [12].

Kromě onkologie je rentgenová fluorescenční analýza využitelná i v dalších oblastech medicíny. Studie [13] například prokázala, že rentgenovou fluorescenční analýzou s totálním odrazem (TXRF) je možné měřit i (typicky velmi nízké) fyziologické koncentrace olova v lidských vlasech a séru vzniklého při odstředování krve. Nejvíce článků však bylo zaznamenáno takových, které se zabývají prvkovou analýzou rostlin používaných jako léčivých bylin, například [14], [15], [16], [17] a [18].

Rostliny z rodu *Alternanthera* (plevuňka), především pak jejich vodní extrakty a výluhy, jsou v tradiční brazilské medicíně používány jako protizánětlivé [19]. Ve studii [20] byly tři druhy rostlin z tohoto rodu podrobeny prvkové analýze metodou synchrotronové rentgenové fluorescenční analýzy s totálním odrazem (SRTXRF). Ve všech rostlinách byly nalezeny i zdraví nebezpečné prvky, jejichž původ může být, dle autorů, v kontaminaci přírodního prostředí a měly by být tedy provedeny další studie zabývající se bioakumulací prvků těmito rostlinami. Z vodních extraktů všech analyzovaných rostlin však bylo metodou SRTXRF zjištěno, že prvky K a Ca velmi

dobře přecházejí z rostliny do vodného roztoku, kde se koncentrují, zatímco zdraví nebezpečné Cd, Sn a Sb mají tendenci v rostlině zůstat. V případě těchto prvků se tak nepotvrdilo vážné nebezpečí pro tu populaci Brazílie, která výluhy zmíněných rostlin stále využívá.

Další rostliny používané v tradiční brazilské medicíně *Alchornea glandulosa*, *Davilla elliptica* a *Davilla nitida* při léčbě žaludečních vředů byly podrobeny prvkové analýze ve studii [21] jakožto potenciální zdroje nových léčiv. Výsledky získané metodou SRTXRF při měření extraktů těchto rostlin naznačují, že jejich léčivost není založena pouze na poskytnutí prvků, které působí pozitivně při hojení žaludeční sliznice, ale také na podpoře přesunu těchto prvků ze zdravých částí sliznice do části nemocné. Na základě zjištěných korelací a antikorelací mezi koncentracemi léčivých prvků bylo dále objasněno, proč vykazuje nejvyšší účinnost při léčbě pacientů *Davilla elliptica*, o něco nižší účinnost *Alchornea glandulosa* a střední účinnost *Davilla nitida*.

Zemědělství a kontrola potravin

Dalším odvětvím, kde je rentgenová fluorescenční analýza hojně využívána, je zemědělství. Prvním příkladem je studie [22], ve které bylo provedeno měření koncentrací Zn a Fe v zrnech rýže a perlového prosa jakožto součást biofortifikace (šlechtění za účelem zvýšení obsahu vitamínů nebo minerálů) zmíněných plodin. Studie [23] se na rozdíl od předešlé zabývá vlivem sucha na morfologii a chemické složení listu pšenice s potenciálem využít tyto výsledky při šlechtění nových typů pšenice vůči suchu odolných. Dále ve [24] byly zkoumány efekty nadbytku Mn při růstu pšenice na její schopnost absorbovat jiné prvky důležité pro vlastní metabolismus. Zde bylo zjištěno, že akumulace Mn v listech sazenic negativně ovlivňuje absorpci a translokaci Ca, K a Fe, zatímco absorpci Cu a Zn naopak stimuluje. Podobně cílem studie [25] bylo zjistit, jestli se po zotavení rostliny z nedostatku Fe změní i absorpce a translokace jiných důležitých prvků v listech. Za tímto účelem byly plošně skenovány listy okurek pomocí synchrotronové mikro-XRF. Byl zjištěn pozitivní vliv dodání Fe na schopnost rostliny roznést z cévního systému prvky K, Cu a Zn a z trichomů prvky Ca a Mn do plochy celého listu.

Ve studii [26] bylo pomocí ručního XRF spektrometru (model Tracer III-SD od firmy Bruker, USA) provedeno in situ měření koncentrací K, Ca, S a Si v živých listech cukrové třtiny. Bylo zjištěno, že průměrné koncentrace získané in situ měřeními jsou v těsné shodě s hodnotami získanými měřeními těchto vzorků (po vysušení, rozemletí a slisování do pelet o tloušťce cca 2 mm) laboratorní rentgenovou fluorescenční analýzou (provedenou stolním spektrometrem EDX-720 od firmy Shimadzu, Japonsko) s dobře prověřenou přesností. Byl tak nejen nalezen jednoduchý a dostatečně přesný způsob měření koncentrací v rostlinách bez časově náročné přípravy vzorků (využitelný mimo jiné i samotnými zemědělci při zvyšování výtěžku), ale také možnost provedení kvantitativní rentgenové fluorescenční analýzy na živých rostlinách v laboratoři při studiích rostlinné fyziologie a kinetiky prvků, nabízející rychle vypočtené výsledky. Tedy i možnost měřit, jakým způsobem se v těle rostliny distribuují v čase vybrané prvky.

Studie [27] zas představila analytickou metodu vzniklou spojením rentgenové flu-

orescence a blízké infračervené spektroskopie (NIR), kterou lze rychle měřit koncentrace širokého spektra prvků včetně těch lehkých. Lze tak získat komplexní informace o obsahu mnoha prvků v rostlinách včetně nedostatku N. Tím se nabízí snadnější způsob získání dat k přesnému výběru způsobu hnojení s minimální přípravou vzorku oproti konvenčním metodám. Navíc je příslušná aparatura přenositelná, což otevírá další nové možnosti.

Na pomezí zemědělské studie a kontroly kvality potravin je článek [28], který zkoumá koncentraci těžkých kovů v různých fázích výroby vína (listy vinné révy, hroznový mošt a konečné víno) dvou různě starých vinogradů (6 a 14 let). K prvkové analýze listů a hroznů byla zvolena klasická rentgenová fluorescence, zatímco k analýze moštu a vína rentgenová fluorescence s totálním odrazem. Listy ze staršího vinohradu vykazovaly extrémně vysoké množství Cu způsobené pravděpodobně zde zvýšeným používáním fungicidů na bázi mědi k redukci plísně. Vyšší koncentrace Cu pak byla změřena i v hroznech, ale ne tak výrazně. Lehce vyšší pak i ve víně, nepřekročila však doporučené maximální limity. Tím bylo ukázáno, že i použití velkého množství fungicidu na bázi mědi při výrobě vína nemusí vést ke zdravotním rizikům. Dále bylo demonstrováno, že ačkoli listy a hrozny dvou zkoumaných vinogradů vykazují podobné chemické složení, díky použití jiných technik výroby vzniknou dvě velmi odlišná vína vzájemně odlišitelná svým obsahem prvků.

Do analýzy potravin spadá i článek [29], který zkoumá různé chemické složení čajů v závislosti na jejich typu, balení a louhování. Jako analytická metoda byla zvolena rentgenová fluorescence s totálním odrazem. Dalším příkladem využití XRF při analýze potravin, tentokrát její klasické varianty, je článek [30], který se zabývá měřením koncentrací 12 vybraných prvků v 9 druzích mexické chilli papričky. Použita byla rentgenová lampa s Rh anodou a Si-PIN detektor. Vzorky byly před měřením vysušeny mrazem a kalibrace byla provedena za použití standardních referenčních materiálů NIST 1547 (listy broskví), 1574 (listy rajčat) a 1570A (listy špenátu), ke zjišťování nejistoty byl však použit ještě čtvrtý referenční materiál také původem z listů s číslem 1571. Výsledky ukázaly pět hlavních skupin charakterizovaných různým chemickým složením, do kterých se dají měřené papričky rozdělit.

Článek [4] představuje zároveň potravinářskou kontrolu původu ryb a mořských plodů a environmentální studii. Těla živočichů byla před analýzou usušena a roze-mleta. Díky zastoupení prvků pak mohl být určen geografický původ těchto živočichů a jestli byli chováni na farmě nebo uloveni jako divoce žijící. Rentgenová fluorescence byla zvolena díky své jednoduchosti a díky možnosti provést na neporušeném vzorku další analýzy. Mikro-XRF se od svého počátku používá v environmentálních studiích, geologická studia využívají mikro-XRF ke stanovení prvkového složení půd a hornin. Bylo prokázáno, že mikroanalýza má potenciál být využita také při kontrole kvality, bezpečnosti a původu potravin. Itrax je měřicí systém pro mikro-XRF vyvinutý primárně k měření geologických vzorků. Zde byl rovněž úspěšně rozšířen na analýzu měkkých biologických tkání. Environmentální přesah má i studie [31], jejíž motivace je shrnuta v následujícím odstavci.

Rýže, pšenice a kukuřice jsou tři nejvíce konzumované plodiny na světě, vzhledem k očekávanému vzrůstu celosvětové spotřeby potravin je tak vhodné zabývat se jejich efektivním pěstováním šetrným ke zdraví lidí i přírodních ekosystémů. Všechny tři druhy jsou akumulátory oxidu křemičitého a zároveň platí, že hnojením touto látkou

se snižuje abiotický a biotický stres rostlin, čímž se snižuje nutnost využívání pesticidů. Měření obsahu Si v půdách a rostlinách je tak užitečné k identifikaci v tomto smyslu chemicky chudého prostředí, tradiční metody měření Si chemickou cestou však nejsou po všech stránkách zcela bezpečné a jsou časově náročné. Pokrok ve zvyšování citlivosti ručních rentgenových fluorescenčních spektrometrů ale vytváří nové příležitosti. V článku bylo srovnáno měření pomocí tradičních chemických metod a pomocí ručních XRF spektrometrů SciAps X-300 a Niton XL3t GOLDD+. Bylo zjištěno, že SciAps jsou přesnější než Niton a průměrná doba potřebná k analýze Si pomocí SciAps byla čtyři sekundy na vzorek. Tyto údaje podporují možnost použití ručních XRF spektrometrů pro rychlou analýzu Si a naznačují, že má metoda potenciál měřit i koncentrace pro rostliny důležitých prvků K a P.

Závěrem bude uvedeno využití klasické XRF při prvkové analýze listů citrusů napadených plísní *Capnodium* fungi ve studii [32] a využití mikro-XRF při prostorovém zobracování Zn a dalších prvků v listech citrusů napadených bakteriální chorobou Huanglongbing [33].

Environmentální studie, energetika a průmysl

Přesah některých článků do environmentálních studií byl zmíněn již výše. Různé typy XRF však mají v environmentálních studiích i hlubší využití. Například rentgenová fluorescenční analýza s totálním odrazem byla ve studii [34] použita k monitorování kvality ovzduší ve městě Brescia v severní Itálii. Postupně byly nasbírány listy 6 různých druhů stromů v 11 parcích z různých částí města. Byly použity různé postupy přípravy vzorků. Při jedné z metod byla část listů omyta a část neomyta za účelem zkoumat vrstvu aerosolů usazených na jejich povrchu. Při porovnání výsledných dat pak byly zjištěny změny v koncentracích prvků Cu, Pb a Fe, za jejichž zdroj se považuje lidská činnost, v závislosti na tom, jestli byl daný list omyt, nebo ne. Na základě výsledků byly určeny tři druhy stromů, které mohou sloužit jako bioindikátory znečištění ovzduší, a konkrétní parky, které jsou nejvíce zasaženy. K monitorování znečištění zaneseného srážkami je potřeba měřit listy bez úpravy a zaměřit se zejména na stopové prvky. Další využití klasické rentgenové fluorescenční analýzy bylo nalezeno při měření kontaminace rostlin a půdy z oblasti wolframového dolu v Portugalsku [35]. Byly zjištěny vysoké koncentrace zejména As a W přesahující limity doporučené WHO.

Zajímavou environmentální studii dále představuje článek [36]. Sekundární cestou pro vylučování nadbytku stopových prvků v tělech ptáků je jeho ukládání do rostoucího peří. Jeho prvkovou analýzou pak lze zkoumat expozici ptáků znečištěnému prostředí. Důkazy založené na analytickém zobrazování a spektroskopii naznačují, že prostorové rozložení základního stopového prvku Zn v peří souvisí s melaninovou pigmentací. Naše chápání způsobu ukládání stopových prvků do rostoucího peří je však velmi nízké a poznání v této oblasti brzdí zejména nedostatek analytických nástrojů schopných zkoumat přesnou lokalizaci prvků uvnitř peří. Relativně novou metodou, která tyto schopnosti má, je synchrotronová rentgenová fluorescenční mikroanalýza. Ta byla ve zmíněné studii využita k mapování Zn mezi větvemi a paprsky v perech poláka vlnkovaného (*Aythya affinis*) po experimentálním zvýšení Zn v potravě. Výsledky ukázaly výrazné změny Zn v prostoru mezi větvemi a paprsky,

příčemž vyšší hladiny byly pozorovány v paprscích. Analýza průřezů peří dále odhalila, že větve a paprsky s vyšší hustotou melanosomů také obsahují vyšší hladiny zinku. Tyto výsledky nejen rozšiřují poznání o ukládání Zn v peří ptáků, ale podporují použití peří jakožto neinvazivní metody monitorování expozice ptáků stopovým prvkům a referují o metodě XRF jako o užitečném nástroji k pozorování vlivu rychle se měnícího prostředí na jejich zdraví.

Dále bylo nalezeno značné množství článků, ve kterých byla rentgenová fluorescenční analýza využita k měření koncentrací prvků v popelu vzniklém při spalování biomasy jakožto zbytků zemědělské produkce. Výsledky těchto studií je možné využít při hledání vhodných podmínek při výrobě energie. V článku [37] bylo zjištěno, že koncentrace Mg, Si, P a S se v popelu oproti původní biomase zvyšuje úměrně zvyšující se teplotě spalování. Naopak koncentrace Na, Cl a K se zvyšující se teplotou klesá díky odpařování chloridů. Bylo zjištěno, že lze navrhnout další využití získaného popela. Tím se podrobněji zabývá studie [38] na popelu vzniklém při spalování zbytků rostliny hořčice. Pomocí prvkové analýzy metodou XRF bylo zjištěno, že popel při rozsypání na poli může fungovat jako zdroj živin a zároveň jako adsorbent často používaného herbicidu, kyseliny 2,4-dichlorfenoxyoctové. Ze stanovených koncentrací prvků bylo vypočteno doporučené množství dávkování popela na hektar pro různé pěstované plodiny. Dle studie [39] může být popel ze spalování biomasy po úpravě využit také jako adsorbent sulfanu při čištění bioplynu. V této studii byla při analýze těchto možností využita také klasická rentgenová fluorescence. Článek [40] zkoumá za využití metody XRF fyzikální vlastnosti popela bambusu, borovice Massonovy a uhlí. XRF a příbuzné techniky byly využity i při analýze popela topolu a pšenice v článku [41]. Pelety z biomasy zde byly v různých fázích spalování analyzovány synchrotronovou 3D rentgenovou fluorescenční výpočetní mikro-tomografií, díky čemuž mohl být zmapován a zobrazen vývoj trhlin, dutin a popelových vrstev. Analýza zmíněných vrstev pak byla dokončena pomocí skenovací elektronové mikroskopie a klasické rentgenové fluorescenční analýzy. Další článek [42] je zaměřen na hledání kalibrace metody XRF pro popel vzniklý spalováním dřeva. Při spalování zbytků z dřevoprůmyslu je potřeba počítat s tím, že větve stromů jsou bohatší na těžší prvky než kmen. Vzniklý popel s těžšími prvky totiž v elektrárně může způsobovat specifické technické problémy.

Rentgenová fluorescence může být využita také při prvkové analýze průmyslových výrobků původem ze dřeva, například při zjišťování recyklovatelnosti nebo toxicity [43], [44]. Rentgenová fluorescenční výpočetní tomografie byla ve studii [45] úspěšně využita k pozorování a kvantifikaci pronikání lepidla do dřeva. Dále bylo v rámci rešeršní práce zjištěno, že XRF analýza dřeva může také být využita v environmentálních studiích. Konkrétně v článku [46] je prováděno měření koncentrace Cd ve vrbě – jeho přirozeném akumulátoru. Stromy jsou totiž díky velkému množství produkované biomasy schopné podílet se na dekontaminaci znečištěných oblastí. Detailní pochopení způsobu, jakým v sobě toxické prvky akumulují, může proto napomoci k dekontaminacím efektivnějším nebo bezpečnějším. V této konkrétní studii k tomu byla použita synchrotronová mikro-XRF.

Chemie rostlin

Rentgenová fluorescenční analýza a její odvozené techniky jsou využitelné také ve výzkumu v oblasti botaniky. Lze si povšimnout, že některé výše zmíněné studie již tento přesah měly.

Ve studii [33] byla pomocí synchrotronové rentgenové fluorescenční analýzy měřena koncentrace Zn a dalších prvků v hyperakumulátoru zinku *Sedum alfredii*. Epidermální vrstvy byly identifikovány jako důležitá úložiště pro nahromaděný Zn v této rostlině. V další studii hyperakumulátorů [47], tentokrát niklu, jsou předmětem výzkumu tropické rostliny *Rinorea bengalensis* a *Rinorea javanica* pomocí rentgenové fluorescenční mikroskopie (XRM) a mikrosondy (micro-PIXE). Cílem bylo objasnit podobnosti a rozdíly v distribuci Ni a fyziologicky aktivních prvků (K, Ca, Mn a Zn) v různých orgánech a tkáních. Akumulaci Cr v rostlině *Callitriche cophocarpa* zkoumá studie [48]. Mladé listy, starší listy a stonky byly vysušeny mrazem podle speciálního protokolu zamezujícího kvantitativnímu a kvalitativnímu znehodnocení akumulovaného Cr. Po přípravě vzorků byly pomocí mikro-XRF získány mapy rozložení Cr.

K objasnění interakce Zn s homeostázou Fe je klíčové analyzovat distribuci Zn v rostlinných tkáních nebo v buňkách. Ve studii [49] byla zkoumána subcelulární distribuce v buňkách listů okurek s deficitem Fe pomocí hmotnostní spektrometrie po buněčné frakcionaci s indukčně vázanou plazmou (ICP/MS) a synchrotronové nano-XRF. Ve studii [50] byly nasbírány listy 50 let starého samičího stromu *Ginkgo biloba* v průběhu jednoho vegetačního období (od prvních jarních listů až po podzimní spadané), rozemlety, smíchány s methylcelulózou v poměru 1 : 1 a analyzovány klasickou kvantitativní XRF. V článku [51] byla metodou TXRF provedena prvková analýza sekretu listů mangrovového druhu *Avicennia germinans* rostoucího v odlišných salinitách. Prvek Na byl doměřen pomocí atomové absorpční spektrometrie.

Ve studii [52] byla zkoumána absorpce a distribuce Zn v živých listech *Solanum lycopersicum* a *Citrus reticulatus* v čase. Pomocí synchrotronové rentgenové fluorescenční mikroskopie byl Zn sledován při prostupování tkání listu až do žil nižší úrovně. Podle zjištění studie [53] je distribuce stopových prvků v živých rostlinách dobře měřitelná i komerčně dostupným mikro-XRF spektrometrem (M4 TORNADO od firmy Bruker). To bylo možné především ze 4 důvodů: byl zvolen detektor s největší komerčně dostupnou aktivní plochou $2 \times 60 \text{ mm}^2$, do spektrometru byla zabudována komora na živé vzorky udržující fyziologické podmínky jako vlhký vzduch a vodný roztok, prostorové rozlišení použitého spektrometru je dostatečné k pozorování distribuce kovů na úrovni tkání (v některých případech jsou viditelné i buňky) a konečně precizní optimalizace spektrometru a komory zajistila, že list zůstal neporušený bez vážného poškození fotosyntetického aparátu. To umožnilo přímou korelaci distribuce prvků s fotosyntézou. Citlivost metody byla dále prokázána analýzou mikrobiogenních (Cu, Ni, Fe, Zn) a makrobiogenních prvků (Ca, K) v nehyperakumuláčnických plodinách (kořeny sóji a listy pepře), kterou bylo možné získat ve vysokém rozlišení pro skenovací oblasti několika milimetrů. Bylo zjištěno, že mapy distribuce Zn vykazují vyšší akumulaci ve špičkách a žilkách mladých listů ve srovnání s mezofylovým pletivem, zatímco u starších listů bylo rozdělení homogennější. Je vhodné

dodat, že tato studie byla financována Českou republikou a provedena ve spolupráci Jihočeské univerzity a Biologického centra AV ČR.

Všechny výše zmíněné studie chemie rostlin se týkaly pouze měření listů, stonků, kořenů nebo sekretu. Skenování horizontálních průřezů kmene stromů pomocí fluorescenční analýzy je provedeno ve studiích [54], [55] a [56]. V prvních dvou článcích, dendrochemických studiích, jsou metodou mikro-XRF zjišťovány koncentrace vybraných prvků v závislosti na části letokruhu a vzdálenosti od středu kmene ve stromech *Pinus sylvestris*, *Castanea sativa* a *Pinus taeda*. Byly změřeny silné periodické změny jak napříč letokruhy, tak neperiodické napříč kmenem. Ve třetím z článků bylo metodou mikro-XRF a rentgenové densitometrie analyzováno tropické dřevo napadené plísní, přičemž byly zaznamenány výrazné změny při přechodu mezi zdravou a napadenou částí jak po chemické stránce, tak v hustotě. Ze získaných dat byly vyvozeny závěry o způsobu, jakým se měřené stromy brání napadení plísní.

Další aplikace

Množství článků nalezených při rešeršní práci bylo rozděleno do čtyř hlavních skupin a většina relevantních studií byla zmíněna, často pocházejících z velmi nedávné doby. V některých odvětvích souvisejících i s biologickými vzorky je rentgenová fluorescence již dobře zavedenou a dlouho používanou metodou, a to jmenovitě především v environmentálních studiích, analýzách půd nebo průmyslu. V dalším odvětví, kde je rentgenová fluorescenční analýza hojně využívána, je restaurování historických předmětů a maleb, a to především díky tomu, že je považována za nedestruktivní. [2]

Studie [57] si přesto klade za cíl prozkoumat možná poškození historických dřevěných artefaktů způsobená různými typy rentgenové fluorescence. Těmito typy jsou rentgenová fotoelektronová spektroskopie (XPS, X-Ray Photoelectron Spectroscopy), rentgenová výpočetní mikro-tomografie (mikro-CT) a přenosná ruční rentgenová fluorescenční analýza (XRF). Možné molekulární změny pro provedených analýzách byly měřeny infračervenou spektroskopií s Fourierovou transformací (FTIR, Fourier transform infrared analysis). U mikro-CT a XRF infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací nezjistila žádné podstatné změny. Žádné významné změny nebyly detekovány ani v případě, kdy měření metodou XPS trvalo v řádu minut. Pokud však měření metodou XPS trvalo v řádu desítek hodin, ve dřevě se objevilo významné poškození.

Umoregi a jindai-boku jsou typické japonské výrazy pro staré stromy ponořené pod zemí v důsledku přírodních jevů (například poklesů půdy, sesuvů nebo lavin), které nebyly podstatně denaturovány. Až do svého vykopání byla většina z nich chráněna před vzduchem a slunečním zářením. Takto mohly být pod zemí uchovány i několik tisíc let. Někdy jsou jako překlady výrazů umoregi a jindai boku používány výrazy slatinné dřevo, fosilní dřevo, subfosilní dřevo nebo lignit. Jejich význam však není přesně ekvivalentní. Podmínky vzniku tohoto dřeva ve specifických japonských podmínkách jsou totiž v rámci světa jedinečné. Vědecká definice dřeva označeného výrazy umoregi a jindai boku zatím neexistuje, bude tedy používán výraz umoregi a definován jako kmen starého stromu ponořeného pod zemí (nebo již vykopaného), který neobsahuje karbonizované ani zkamenělé komponenty. Ve studii [58] byla pro-

vedena spektroskopická analýza cedrového dřeva umoregi (*Cryptomeria japonica*) vytěženého z podhůří hory Chokai za účelem zkoumání faktorů ovlivňujících jeho barvu. Rentgenová fluorescenční analýza potvrdila, že hlavními kovy ve dřevě *Cryptomeria japonica* jsou Ca a Fe. Infračervená fotoakustická spektroskopie odhalila, že dlouhodobé ponoření pod zemí nezpůsobilo vážný chemický rozklad. Podařilo se určit pravděpodobný původ hnědého zbarvení ve specifických sloučeninách Fe. Jak však bylo zjištěno dále, hloubka tónu zbarvení není nutně úměrná koncentraci Fe, tu se tedy objasnit nepodařilo.

Většina uranových ložisek v kontinentálních sedimentárních horninách nevznikla dříve než v období Siluru. To lze vysvětlit především masivnějším vývojem suchozemských rostlin právě až v silurském období. Když podzemní voda obsahující uran pronikala porézními sedimenty, což bylo prostředí s vysokou pravděpodobností obsahující kmeny stromů a jiné rostlinné zbytky, docházelo k zachycování uranu organickými látkami. Jejich pozdější rozklad způsoboval redukční chemické prostředí, ve kterém začalo docházet k vysrážení uranu. [59] Dnešní ložiska uranové rudy tak jsou často vázána na ložiska rostlinných fosilií. Geologické studie zabývající se rentgenovou fluorescenční analýzou minerálů uranu obsažených ve fosilním dřevě, například [60], tak představují zajímavé odvětví související s biologií.

Kapitola 3

Praktická část

3.1 Aparatura na KDAIZ FJFI ČVUT v Praze

V laboratoři rentgenové fluorescenční analýzy na KDAIZ FJFI ČVUT v Praze (Katedra dozimetrie a aplikace ionizujícího záření Fakulty jaderné a fyzikálně inženýrské Českého vysokého učení technického v Praze) je přítomné značné množství vybavení vhodného k různým typům měření, mimo jiné i ke klasické a konfokální mikroanalýze. Z tohoto vybavení bylo vybráno takové, které je nejvhodnější k měření biologických vzorků, a sestaveno do aparatury, jejíž nejvhodnější uspořádání bylo za cíl nalézt experimentálně. Tato aparatura se skládala z rentgenové lampy, množství hliníkových filtrů a kolimátorů primárního svazku, skenovacího zařízení a detektoru.

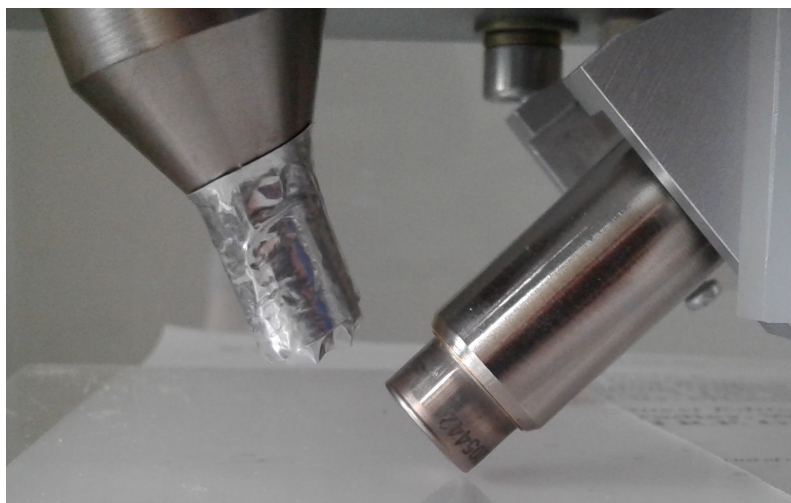
Použitá rentgenová lampa má výrobní název Mini-X a byla vyrobena a dodána americkou firmou Amptek. Na webových stránkách této firmy jsou informace už jen k novější variantě Mini-X2 [61], ta je ale velmi podobná starší verzi Mini-X. Mini-X má anodu ze zlata, maximální urychlovací napětí 40 kV a maximální výkon 4 W .

Použitý detektor je křemíkový typu SDD taktéž od firmy Amptek, jehož webová stránka [62] je stále aktuální. Konkrétně detektor na KDAIZ má velikost aktivní plochy 25 mm^2 , tloušťku aktivní plochy 0,5 mm a okénko detektoru je z berylia o tloušťce 12,5 μm .

3.2 Výsledky měření

3.2.1 Referenční materiál

Dílčím cílem této bakalářské práce bylo nalézt uspořádání aparatury, které bude vhodné pro měření biologických vzorků. Nejprve bylo pro uspořádání s klasickou geometrií (výstup pro záření z rentgenové lampy a vstup pro záření do detektoru ve stejné výšce) změřeno spektrum referenčního materiálu s průměrem kolimátoru primárního svazku 1 mm . Dále bylo zvoleno druhé uspořádání s průměrem kolimátoru primárního svazku 2 mm a Al filtrem primárního svazku tloušťky 1 mm . Při třetím uspořádání byla změněna geometrie (viz. obrázek 3.1), kolimátor zůstal o průměru



Obrázek 3.1: Geometrie 3. uspořádání.

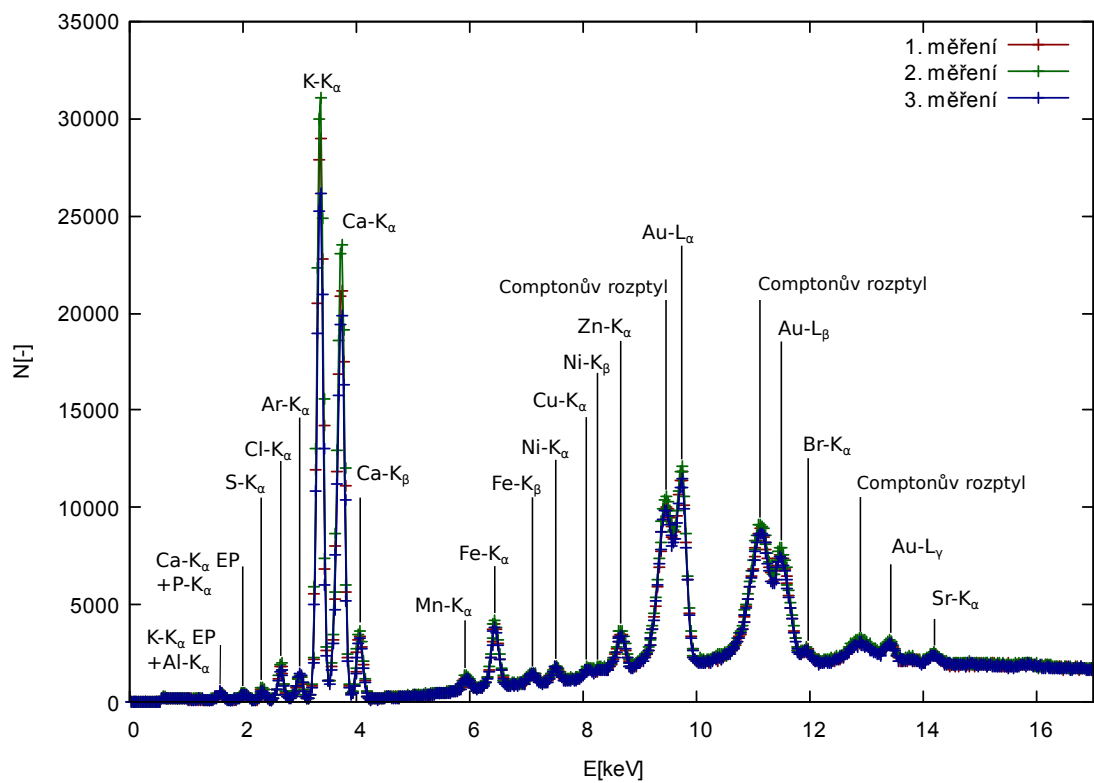
2 mm, tloušťka Al filtru byla zvýšena na 1,25 mm a ústí rentgenové lampy bylo obaleno Al folií. Při všech uspořádáních byl vůči povrchu vzorku primární svazek pod úhlem přibližně 60° a sekundární pod úhlem přibližně 45°, detektor byl vzdálen 2,4 mm od povrchu vzorku, měření bylo provedeno na třech různých místech a na rentgenové lampě bylo zvoleno napětí 30 kV a proud 120 μ A. Výsledná spektra referenčního materiálu pro 1., 2., a 3. uspořádání jsou v grafech 3.2, 3.3 a 3.4, společně s popisy jednotlivých píků a dalších útvarů. Použitý referenční materiál je označen kódem SRM NIST 1570a (jedná se o usušené listy špenátu, které byly rozemlety, slisovány a obaleny tenkou plastovou fólií).

Hliníkový filtr o tloušťce 1 mm odstíní většinu záření s energií do 10 keV, širší kolimátor však zároveň intenzitu primárního svazku zvýší. Pozadí spektra je tak ve výsledku vyšší pro nízké energie (vlivem rozptylu záření v detektoru) a vysoké energie (vlivem vyšší intenzity svazku). Poměr čisté plochy píku a pozadí (plochy pod píkem) se však sníží pouze pro interval nízkých energií. Vlastnosti metody XRF spolu s certifikací referenčního materiálu (prvky, jejichž koncentrace v referenčním materiálu byly změřeny) umožňují měřit v tomto intervalu pouze prvky K a Ca. Ty patří mezi makrobiogenní, tedy snížení poměru zmíněných ploch a v návaznosti na to zvýšení *LLD*, není problém, jelikož intenzita charakteristických čar těchto prvků je ve většině případů dostatečná. Referenční materiál je v této oblasti energií certifikován také pro prvky Al a P, jejich píky jsou však bohužel překryty únikovými píky $K - K_{\alpha}$ a $Ca - K_{\alpha}$, v grafech 3.2, 3.3 a 3.4 označenými zkratkou EP.

Zbývající prvky, pro které je referenční materiál certifikován, a zároveň je jejich koncentrace dostatečná k tomu, aby mohly být změřeny metodou XRF, jsou Mn, Cu, Zn a Sr.

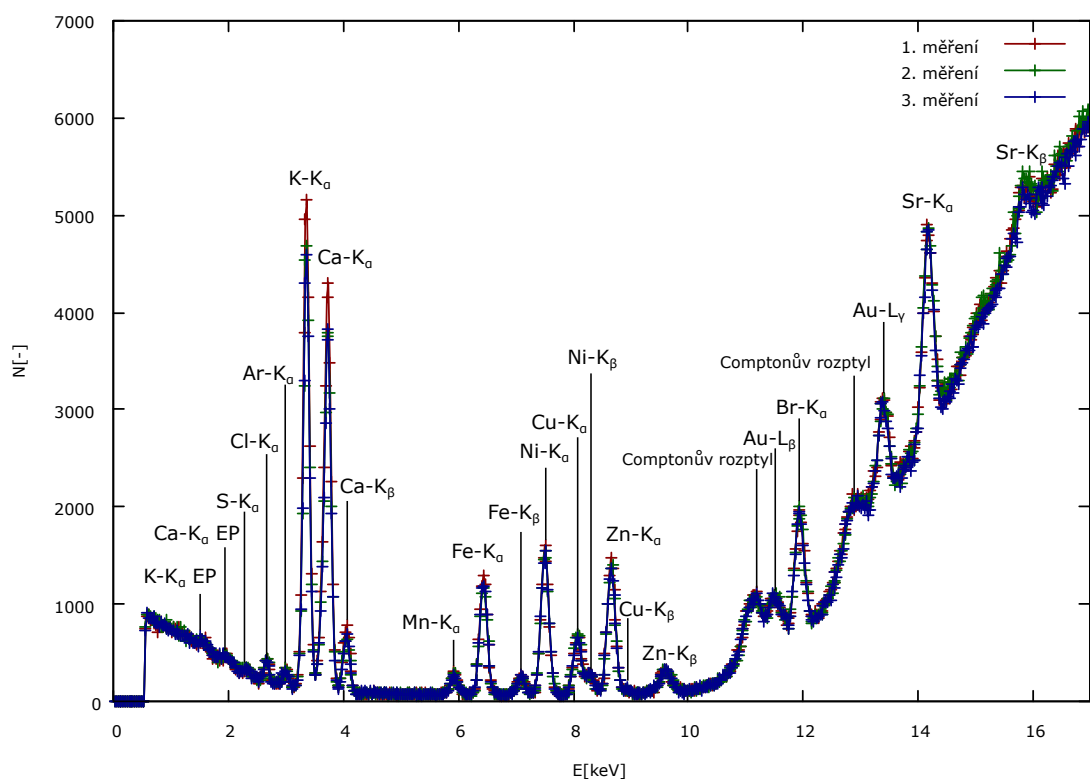
Mn, Cu a Zn patří mezi mikrobiogenní prvky, jejich *LLD* je proto vhodné snížit. Sr biogenním prvkem není, přesto však bývá rostlinami snadno absorbováno, jelikož se po chemické stránce chová podobně jako Ca. Účinnost této absorpce závisí mimo jiné na vlastnostech půdy, podnebí, biosféře, druhu rostliny nebo konkrétní rostlinné populaci. [63]. Výsledná koncentrace stroncia je tedy individuální.

Spektrum referenčního materiálu pro 1. uspořádání (1 mm kolimátor, bez stínění, klasická geometrie)



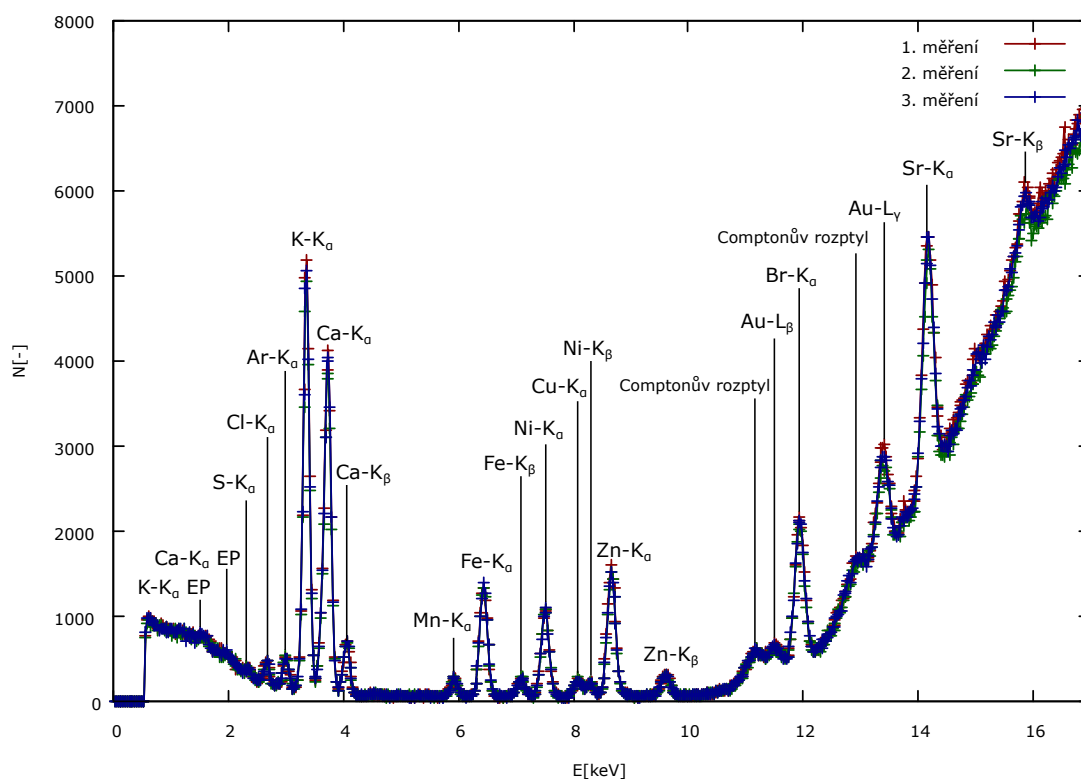
Obrázek 3.2: Spektrum referenčního materiálu pro 1. uspořádání.

Spektrum referenčního materiálu pro 2. uspořádání (2 mm kolimátor, 1 mm stínění, klasická geometrie)



Obrázek 3.3: Spektrum referenčního materiálu pro 2. uspořádání.

Spektrum referenčního materiálu pro 3. uspořádání (2 mm kolimátor, 1,25 mm stínění, speciální geometrie)



Obrázek 3.4: Spektrum referenčního materiálu pro 3. uspořádání.

Kromě píků charakteristického záření pocházejícího ze vzorku se ve spektrech objevuje také charakteristické záření pocházející se spektrometru, konkrétně čáry Au z anody rentgenové lampy s příslušnými comptonovskými rozptyly a čáry Ni z kolimátoru detektoru. Z těchto útvarů je jediným rušivým pík čáry $Ni - K_\beta$, který částečně překrývá pík čáry $Cu - K_\alpha$. Zároveň je $Cu - K_\alpha$ jedinou čarou Cu, která se ve spektru jasně objevuje, a je tedy schopna poskytnout informace o koncentraci tohoto prvku ve vzorku. V praxi by se tento problém dal poměrně snadno odstranit prokladem nepřekryté části píku čáry $Cu - K_\alpha$ Gaussovou křivkou. Náplní této práce však bylo spočítat čisté plochy píků a plochy pozadí ručně za účelem hlubšího porozumění metodě. Dekonvoluce spektra je tak ponechána pracem navazujícím na tuto práci bakalářskou. Místo ní bylo využito faktu, že dva překrývající se píky stejného tvaru a výšky si vzájemně odeberou i přidají stejné množství impulzů. V 1. a 3. uspořádání se píky čar $Cu - K_\alpha$ a $Ni - K_\beta$ této situaci blíží. Ve 2. uspořádání tohoto faktu využito být nemohlo, výsledky spojené s $Cu - K_\alpha$ tak zde budou méně přesné.

Způsob, jakým může být spektrum vyhodnoceno ručně, tedy bez použití speciálních programů, je následující. Nejprve je třeba stanovit interval energií, na kterém se vyskytuje daný pík. Toto stanovení je subjektivní, mělo by však být co nejpřesnější a jeho způsob dodržen ve zbytku měření. Následně, za předpokladu, že nejbližší okolí píku je přibližně lineární, jsou stanoveny intervaly před a za píkem, oba o velikosti poloviční ku velikosti intervalu, na kterém se rozkládá pík. Součet detekovaných částic na těchto dvou intervalech před a za píkem je roven pozadí pod daným píkem. Od součtu detekovaných částic o energiích příslušných intervalu, kde byl stanoven pík, se pak toto pozadí odečte, čímž je získána čistá plocha píku.

Některé píky ve změřeném spektru, jejichž plochu bylo třeba stanovit, však navazovaly na jiné a nebylo tak možné volit intervaly před a za píkem. Ve všech případech, kdy byl jiný pík příliš blízko pouze z jedné strany píku měřeného prvku, bylo pozadí z druhé strany blízké konstantní funkci. Interval, ze kterého bylo dopočítáno pozadí, tak byl volen pouze z jedné strany píku. Pokud i tak byl příliš krátký, byl přenásoben vhodným koeficientem. V oblasti nízkých energií na sebe v každém změřeném spektru navazují píky čar $Ar - K_\alpha$, $K - K_\alpha$, $Ca - K_\alpha$ a $Ca - K_\beta$ způsobem, který nedovoluje volit žádný interval, který by mohl sloužit k odhadnutí ploch pod jednotlivými píky. Vzhledem k tvaru spektra v okolí těchto píků tak byl zvolen za nejpřesnější lineární proklad bodu mezi $Ar - K_\alpha$ a $K - K_\alpha$ a nejbližšího bodu za $Ca - K_\beta$, ze kterého bylo pozadí dopočítáno.

Charakteristické záření Ar pochází ze vzduchu. Vzhledem k tomu, že měření nebylo prováděno ve vakuovém prostředí, se vyskytuje ve všech spektrech. Dále vysoká intenzita čáry $K - K_\alpha$ napovídá, že se ve spektru jistě vyskytuje i $K - K_\beta$, která je však plně překryta píkem čáry $Ca - K_\alpha$. Tento fakt bohužel nadhodnocuje výslednou koncentraci Ca z čáry $Ca - K_\alpha$, koncentrace stanovená z $Ca - K_\beta$ je proto pravděpodobně přesnější. Ve spektru 2. a 3. uspořádání se objevila také čára $Zn - K_\beta$, pro porovnání či pozdější využití proto byla vyhodnocena také. Další K_β čáry měřených prvků se ve spektru neobjevily buď vůbec, nebo dostatečně jasně k tomu, aby bylo možno identifikovat interval, na kterém se pík rozkládá. Po stanovení čistých ploch píků a ploch pozadí byly obě hodnoty vyděleny časem měření spektra $T = 120$ s, který byl pro všechna měření stejný. Tento podíl čisté plochy píku a času

	1. uspořádání	2. uspořádání	3. uspořádání
i	$m_i [(s \cdot \%)^{-1}]$	$m_i [(s \cdot \%)^{-1}]$	$m_i [(s \cdot \%)^{-1}]$
$K - K_\alpha$	411	67	71
$Ca - K_\alpha$	691	122	125
$Ca - K_\beta$	94	17	17
$Mn - K_\alpha$	4000	1345	1323
$Cu - K_\alpha$	30048	27561	9536
$Zn - K_\alpha$	14047	8261	9759
$Zn - K_\beta$	–	1942	1696
$Sr - K_\alpha$	4293	24232	34725

Tabulka 3.1: Průměrná hodnota citlivosti (kalibrační konstanty) spektrometru pro charakteristické čáry prvků a 3 různá uspořádání při měření referenčního materiálu.

	1. uspořádání	2. uspořádání	3. uspořádání
i	$LLD [\%]$	$LLD [\%]$	$LLD [\%]$
$K - K_\alpha$	$3,36 \cdot 10^{-3}$	$1,66 \cdot 10^{-2}$	$1,57 \cdot 10^{-2}$
$Ca - K_\alpha$	$1,94 \cdot 10^{-3}$	$9,07 \cdot 10^{-3}$	$8,26 \cdot 10^{-3}$
$Ca - K_\beta$	$1,25 \cdot 10^{-2}$	$5,06 \cdot 10^{-2}$	$4,54 \cdot 10^{-2}$
$Mn - K_\alpha$	$5,65 \cdot 10^{-4}$	$5,84 \cdot 10^{-4}$	$5,45 \cdot 10^{-4}$
$Cu - K_\alpha$	$1,00 \cdot 10^{-4}$	$2,89 \cdot 10^{-5}$	$7,17 \cdot 10^{-5}$
$Zn - K_\alpha$	$3,03 \cdot 10^{-4}$	$1,35 \cdot 10^{-4}$	$8,97 \cdot 10^{-5}$
$Zn - K_\beta$	–	$5,76 \cdot 10^{-4}$	$4,90 \cdot 10^{-4}$
$Sr - K_\alpha$	$1,07 \cdot 10^{-3}$	$2,20 \cdot 10^{-4}$	$1,57 \cdot 10^{-4}$

Tabulka 3.2: Průměrná hodnota LLD (odhad detekčního limitu) pro charakteristické čáry prvků a 3 různá uspořádání při měření referenčního materiálu.

měření, respektive pozadí a času měření, je roven intenzitě $I_p - I_b$, respektive I_b , $T = T_b$. Společně se známými koncentracemi příslušných prvků v referenčním materiálu uvedenými v certifikátu byly intenzity píků $I_p - I_b$ dosazeny do vzorce (2.10) pro výpočet citlivosti (kalibrační konstanty) m_i . Následně byly vypočtené citlivosti, I_b a T_b dosazeny do vzorce (2.11) pro odhad detekčních limitů LLD . Ze tří měření pro každé uspořádání byly vypočteny průměry m_i a LLD , které jsou uvedeny v tabulkách 3.1 a 3.2.

Podle hodnot LLD v tabulce 3.2 pak lze hodnotit, které uspořádání je nejlepší pro měření biologických vzorků. Pro prvky K a Ca se LLD zhoršilo (tedy zvýšilo) v 2. a 3. uspořádání oproti 1. uspořádání. Jak bylo řečeno výše, je to způsobeno vzrůstem pozadí spektra při nízkých energiích vlivem záření rozptýleného v detektoru. Jsou to však prvky makrobiogenní, tedy není příliš pravděpodobné, že by změřená koncentrace těchto prvků ve vzorku zvýšené LLD nepřekonal. Horší LLD na intervalu nízkých energií proto není problém. Při porovnání pouze 2. a 3. uspořádání vychází 3. uspořádání jako lepší než 2. uspořádání pro všechny měřené čáry K a Ca. Dále pro Mn se LLD s různými uspořádáními příliš neměnilo, nejlépe z nich však vychází 3. uspořádání. Pro všechny měřené čáry Zn a Sr platí, že LLD se od 1. po 3. uspořádání pouze zlepšuje. Pro čáru $Cu - K_\alpha$ je sice LLD 2. uspořádání výrazně

lepší než 1. uspořádání, pro 3. uspořádání se však opět o něco zhorší. Opět, jak bylo řečeno výše, výsledky spojené s $Cu - K_\alpha$ ve 2. uspořádání jsou méně přesné než v ostatních uspořádáních kvůli méně výhodnému překryvu s píkem čáry $Ni - K_\beta$, pozorované zhoršení 3. uspořádání oproti 2. tak nemusí platit ve skutečnosti. K tomu navíc se blízko čáry $Cu - K_\alpha$ nachází čára $Zn - K_\alpha$, pro kterou vyšlo 3. uspořádání lépe, a vzhledem k obecně spíše pozvolným změnám pozadí vůči změně energie ve spektru je pravděpodobné, že ve skutečnosti je i pro čáru $Cu - K_\alpha$ 3. uspořádání lepší než druhé.

Závěrem tedy bylo zjištěno, že 3. uspořádání je ze všech tří měřených nejvhodnější pro prvkovou analýzu biologických vzorků za využití daného referenčního materiálu, a to s ohledem na typické koncentrace prvků v biomase.

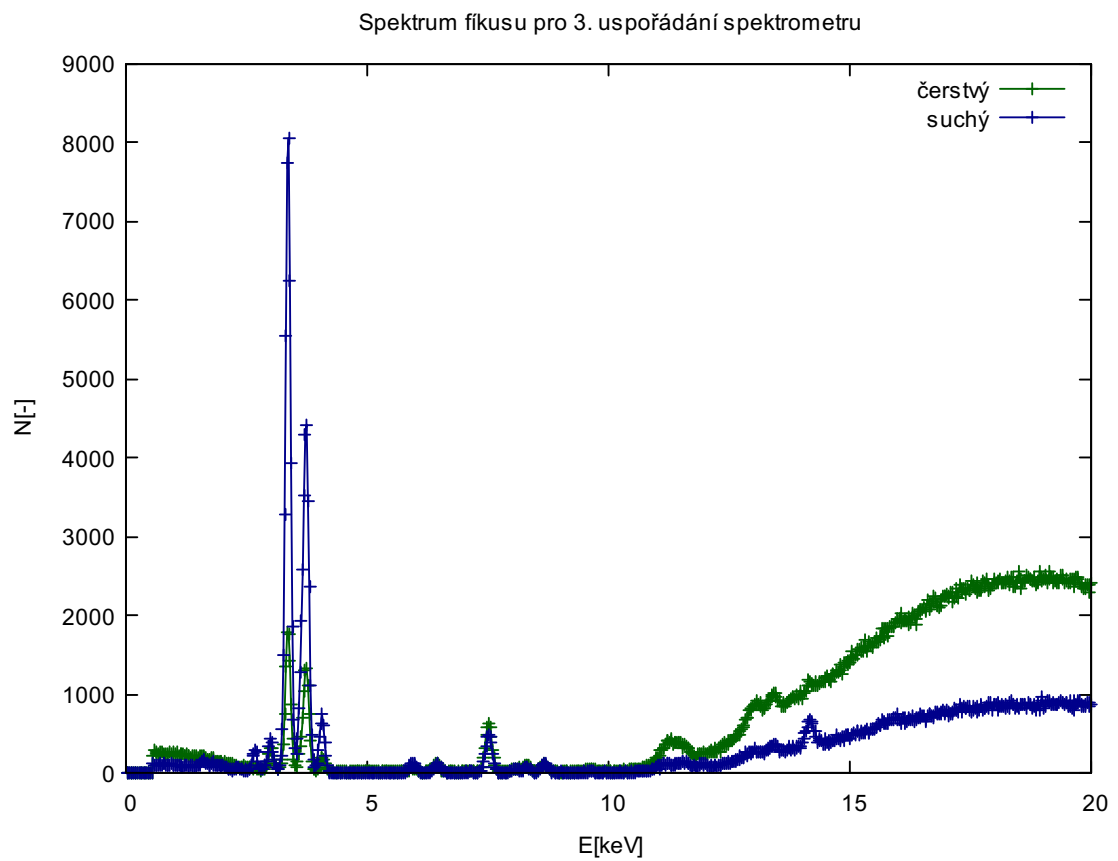
3.2.2 Vzorky neznámého složení

Vzhledem k tomu, že 3. uspořádání se ukázalo za daných podmínek jako nejlepší, byla provedena prvková analýza vzorků neznámého složení dále jen pro něj. Jednalo se o čerstvý a suchý list fíkusu a horizontální průřez kmenem tří různých stromů. První ze vzorků dřeva byl průřez kmenem vrby s největší pravděpodobností napadené plísní, druhý kmenem borovice taktéž s největší pravděpodobností napadené plísní a třetí kmenem zdravé borovice s dobře viditelnými letokruhy.

Nejprve bylo změřeno spektrum ve vybraném bodě na povrchu čerstvého listu fíkusu a podobně bylo postupováno s listem suchým. Cílem bylo porovnat spektra a výsledné koncentrace prvků ve vzorku ze stejné rostliny, ale s různým obsahem vody. Výsledná spektra jsou v grafu 3.5. V oblastech vysokých energií je vidět, že spektrum čerstvého listu má výrazně vyšší pozadí. Je to způsobeno tím, že rentgenové záření s vyšší energií interaguje ve vzorku především rozptylem, přitom v čerstvém listu je mnohem více molekul vody, na jejichž elektronech se může záření rozptylovat. V oblastech nízkých energií má spektrum čerstvého listu pozadí také vyšší. Díky vyššímu rozptylu fotonů o vysoké energii totiž vlétá do detektoru více vysokoenergetických částic, které se zde mohou rozptýlit nekoherentně a uniknout. Energie, kterou při tomto procesu ztratí, je detektorem zaznamenána, což způsobuje vzrůst pozadí v oblasti nízkých energií. Píky charakteristického záření vycházejícího z čerstvého listu jsou naopak nižší, protože záření primární interaguje ve vzorku především s molekulami vody. Tento fakt představuje hlavní důvod, proč je biologické vzorky lepší před měřením vysušit.

Kromě změření samotných spekter listů byly také vyhodnoceny koncentrace vybraných prvků. Nejprve byly spočítány čisté intenzity $I_p - I_b$ charakteristických čar, pro které byly dříve spočítány kalibrační konstanty m_i pro 3. uspořádání, a dosazeny do vzorce (2.9) pro výpočet příslušných koncentrací C_i . Z intenzit pozadí pod píky I_b pak byly dopočítány hodnoty LLD dosazením do vzorce (2.11). Výsledky C_i a LLD jsou v tabulkách 3.3 a 3.4. Hodnoty v těchto tabulkách však jsou pouze odhady hodnot skutečných, jelikož tloušťka listů byla příliš malá a nechovala se jako nasycená vrstva (tedy nekonečně tlustá pro všechny energie ionizujícího záření). Tloušťka referenčního materiálu však nasycená byla.

Porovnáním hodnot v tabulkách je však na první pohled zřejmé, jak rozdílné



Obrázek 3.5: Spektrum čerstvého a suchého listu fíkusu pro 3. uspořádní spektrometru.

výsledky lze dostat analýzou čerstvého a vysušeného biologického vzorku. Dle očekávání (z pozorování nižší výšky píků charakteristického záření vycházejícího z čerstvého listu) jsou koncentrace většiny měřených prvků v čerstvém listu vypočteny jako nižší. Neplatí to pouze pro koncentrace vypočtené z čar $Cu - K_\alpha$ a $Zn - K_\beta$. Z chybějící dekonvoluce spektra však lze předpokládat, že výsledky spojené s čarou $Cu - K_\alpha$ nejsou přesné, jak již bylo řečeno výše. Z velikosti hodnot LLD pro $Zn - K_\beta$ lze zas pozorovat, že koncentrace vypočtené z této čáry by neměly být správně ani uváděny, neboť bude jejich nejistota příliš velká. Kromě limitu detekce je totiž další důležitou veličinou spojenou s XRF analýzou tzv. mez stanovitelnosti, která je udávána jako přibližně třikrát až čtyřikrát vyšší, než příslušná hodnota LLD . Jedná se o mez, od které má stanovená koncentrace nejistotu nižší, než je určitá daná akceptovatelná hodnota [7]. Z hodnot v tabulkách 3.3 a 3.4 lze pak přibližně dopočítat, že koncentrace vypočtená ze $Zn - K_\beta$ mez stanovitelnosti nepřesahuje. Při XRF analýze se koncentrace prvků stanovuje zpravidla z jejich čar s nejvyšší intenzitou, neboť výsledná nejistota takových koncentrací bude nižší. Čáry s intenzitou nižší se využívají pouze v případě, že pík čáry s vyšší intenzitou je nějakým způsobem znehodnocen, například překryvem s jiným píkem. Lze tedy pozorovat, že v případě mikrobiogenních prvků při měření biologických vzorků je nutno postupovat s volením píků s nižší intenzitou zvláště opatrně, pokud vůbec. Naproti tomu v oblasti prvků makrobiogenních můžeme pozorovat, že obě koncentrace vypočtené z čar $Ca - K_\alpha$ a $Ca - K_\beta$ jsou si poměrně blízké. Navíc výsledky odpovídají předpokladu, že koncentrace vypočtená z $Ca - K_\alpha$ bude nadhodnocena kvůli čáře $K - K_\beta$, kterou zcela obsahuje. Vzhledem k dostatečné intenzitě čar prvků makrobiogenních je tak vhodné volit i čáry příslušející méně pravděpodobným přechodům, pokud je nejvyšší pík znehodnocen.

Dalším problémem vedle $Zn - K_\beta$ je koncentrace Sr vypočtená pro čerstvý list, která nepřesahuje ani příslušnou hodnotu LLD , nelze tedy správně říci, že je Sr v tomto vzorku vůbec přítomné, natož stanovovat jeho koncentraci. Koncentrace vyšla nižší sice pouze velmi těsně, LLD je však spíše hrubým dolním odhadem skutečných hodnot limitů detekce, jak bylo řečeno již výše. Na rozdíl od čerstvého listu, v listu suchém je vypočtená koncentrace Sr vyšší, než příslušná mez detekce, její nejistota bude mít tedy akceptovatelnou hodnotu a přítomnost Sr lze stanovit. Vyjma $Zn - K_\beta$ a $Sr - K_\alpha$ pro čerstvý list jsou všechny vypočtené koncentrace vyšší relativně pohodlně, než přibližně vypočtená mez stanovitelnosti. Je vhodné ještě jednou zdůraznit, že uvedené výsledky jsou spíše ilustrační v kontextu úskalí XRF analýzy, na která lze při měření biologických vzorků narazit, a zde přiložené k možnosti vzájemně porovnat výsledky analýzy vzorků obsahujících vodu a vzorků vysušených. Pro přesnější analýzu by bylo třeba vzorky před měřením vhodně upravit, aby charakterem více odpovídaly referenčnímu materiálu, zejména co se týče tloušťky. Postupy takové přípravy byly stručně popsány v kapitole 2.4.

Po spektrech listů fíkusů bylo změřeno spektrum vzorku vrby v takovém místě na jeho povrchu, kde bylo dřevo zdravé (C) a v místě, kde bylo dřevo napadené plísní (D). Stejně bylo postupováno i se vzorkem borovice. Cílem bylo opět porovnat zmíněná měření. Dřevo napadené plísní může totiž vykazovat jiné koncentrace vybraných prvků než dřevo zdravé [56]. Výsledky C_i a LLD spočtené stejným způsobem jako u spekter listů jsou uvedeny v tabulkách 3.5 a 3.6. Stejně jako u vzorků



Obrázek 3.6: Měřené vzorky suchého a živého listu fíkusy.

	fíkus čerstvý	fíkus suchý
i	C_i [%]	C_i [%]
$K - K_\alpha$	1,04	4,66
$Ca - K_\alpha$	0,50	1,77
$Ca - K_\beta$	0,41	1,69
$Mn - K_\alpha$	$2,01 \cdot 10^{-3}$	$4,92 \cdot 10^{-3}$
$Cu - K_\alpha$	$3,36 \cdot 10^{-4}$	$2,96 \cdot 10^{-4}$
$Zn - K_\alpha$	$5,67 \cdot 10^{-4}$	$6,40 \cdot 10^{-4}$
$Zn - K_\beta$	$1,09 \cdot 10^{-3}$	$5,94 \cdot 10^{-4}$
$Sr - K_\alpha$	$9,89 \cdot 10^{-5}$	$5,72 \cdot 10^{-4}$

Tabulka 3.3: Hmotnostní koncentrace prvků v čerstvém a suchém listu fíkusy vypočtené pomocí charakteristických čar i .

	říkus řerstvý	říkus suchý
i	LLD [%]	LLD [%]
$K - K_\alpha$	$9,51 \cdot 10^{-3}$	$9,57 \cdot 10^{-3}$
$Ca - K_\alpha$	$5,17 \cdot 10^{-3}$	$4,69 \cdot 10^{-3}$
$Ca - K_\beta$	$2,96 \cdot 10^{-2}$	$2,30 \cdot 10^{-2}$
$Mn - K_\alpha$	$3,34 \cdot 10^{-4}$	$2,54 \cdot 10^{-4}$
$Cu - K_\alpha$	$4,28 \cdot 10^{-5}$	$3,30 \cdot 10^{-5}$
$Zn - K_\alpha$	$5,09 \cdot 10^{-5}$	$3,74 \cdot 10^{-5}$
$Zn - K_\beta$	$3,01 \cdot 10^{-4}$	$2,05 \cdot 10^{-4}$
$Sr - K_\alpha$	$1,00 \cdot 10^{-4}$	$5,85 \cdot 10^{-5}$

Tabulka 3.4: Odhad limitu detekce LLD prvků v řerstvém a suchém listu říkusu vypočtené pomocí charakteristických řar i .

	vrba C	vrba D	borovice C	borovice D
i	C_i [%]	C_i [%]	C_i [%]	C_i [%]
$K - K_\alpha$	0,08	0,28	0,10	0,11
$Ca - K_\alpha$	0,22	0,28	0,17	0,16
$Ca - K_\beta$	0,23	0,27	0,15	0,18
$Mn - K_\alpha$	$7,73 \cdot 10^{-3}$	$3,48 \cdot 10^{-3}$	$2,87 \cdot 10^{-2}$	$2,64 \cdot 10^{-2}$
$Cu - K_\alpha$	$5,01 \cdot 10^{-4}$	$4,15 \cdot 10^{-4}$	$3,95 \cdot 10^{-4}$	$3,93 \cdot 10^{-4}$
$Zn - K_\alpha$	$4,62 \cdot 10^{-3}$	$3,79 \cdot 10^{-3}$	$9,67 \cdot 10^{-4}$	$1,02 \cdot 10^{-3}$
$Zn - K_\beta$	$5,21 \cdot 10^{-3}$	$3,31 \cdot 10^{-3}$	$1,71 \cdot 10^{-3}$	$1,66 \cdot 10^{-3}$
$Sr - K_\alpha$	$4,55 \cdot 10^{-3}$	$5,08 \cdot 10^{-3}$	$6,20 \cdot 10^{-3}$	$6,68 \cdot 10^{-3}$

Tabulka 3.5: Hmotnostní koncentrace prvků ve zdravém (C) a napadeném (D) dřevě vrby a borovice vypočtené pomocí charakteristických řar i .

listů se jedná pouze o odhady skutečných hodnot. Dřevo obecně má totiž výrazně vyšší hustotu než použitý referenční materiál, jímž byly rozemleté listy špenátu. I kdyby byly hustoty podobné, dá se předpokládat, že volba referenčního materiálu původem z listů ku volbě referenčního materiálu původem ze dřeva vyžaduje podrobnější teoretickou přípravu. Další referenční materiál však zatím není na KDAIZ přítomný.

Všechny hodnoty v tabulkách 3.5 a 3.6 překračují svá LLD , lze tedy stanovit přítomnost příslušných prvků ve vzorku. Dále všechny hodnoty příslušné řarám K_α překračují své meze stanovitelnosti. Při použití těchto řar (tedy v případě, pro který se XRF analýza typicky dělá) tak má smysl provádět další měření na vzorcích dřeva s použitou aparaturou a referenčním materiálem.

Zatím všechny výsledky v této kapitole nebyly uvedeny společně se svými nejistotami. Je to tak proto, že metoda výpočtu ploch piků byla zvolena obecně nepřesná (přinesla však možnost hlubšího porozumění metodě), navíc byl použit pouze jeden referenční materiál k měření vzorků různých vlastností. Zanesená chyba je tak podstatně větší, než by byla vypočtená nejistota na základě statistiky a certifikátu referenčního materiálu. Analýza nejistot při měření biologických vzorků metodou XRF je tak ponechána k další řešerši.

	vrba C	vrba D	borovice C	borovice D
i	LLD [%]	LLD [%]	LLD [%]	LLD [%]
$K - K_\alpha$	$1,84 \cdot 10^{-2}$	$1,84 \cdot 10^{-2}$	$1,67 \cdot 10^{-2}$	$1,76 \cdot 10^{-2}$
$Ca - K_\alpha$	$9,36 \cdot 10^{-3}$	$9,58 \cdot 10^{-3}$	$8,90 \cdot 10^{-3}$	$8,90 \cdot 10^{-3}$
$Ca - K_\beta$	$5,51 \cdot 10^{-2}$	$5,36 \cdot 10^{-2}$	$5,31 \cdot 10^{-2}$	$5,14 \cdot 10^{-2}$
$Mn - K_\alpha$	$6,52 \cdot 10^{-4}$	$6,56 \cdot 10^{-4}$	$6,43 \cdot 10^{-4}$	$6,38 \cdot 10^{-4}$
$Cu - K_\alpha$	$8,29 \cdot 10^{-5}$	$8,31 \cdot 10^{-5}$	$8,09 \cdot 10^{-5}$	$8,09 \cdot 10^{-5}$
$Zn - K_\alpha$	$1,01 \cdot 10^{-4}$	$1,01 \cdot 10^{-4}$	$9,57 \cdot 10^{-5}$	$9,45 \cdot 10^{-5}$
$Zn - K_\beta$	$5,86 \cdot 10^{-4}$	$5,89 \cdot 10^{-4}$	$5,74 \cdot 10^{-4}$	$5,62 \cdot 10^{-4}$
$Sr - K_\alpha$	$2,14 \cdot 10^{-4}$	$2,08 \cdot 10^{-4}$	$2,04 \cdot 10^{-4}$	$2,05 \cdot 10^{-4}$

Tabulka 3.6: Odhad limitu detekce LLD prvků ve zdravém (C) a napadeném (D) dřevě vrby a borovice vypočtené pomocí charakteristických čar i .

Po změření spekter vzorků v jednom bodě následovalo skenování, tedy automatizované měření bod po bodu na zvolené ploše. To bylo provedeno na stejném vzorku napadené vrby, který byl použit v předchozím měření, a na vzorku zdravé borovice s dobře viditelnými letokruhy. Při měření metodou XRF průřezem kmenů s dobře viditelnými letokruhy totiž lze (při správně zvolených podmínkách včetně typu vzorku a referenčního materiálu) pozorovat změny v koncentracích vybraných prvků [55], [54].

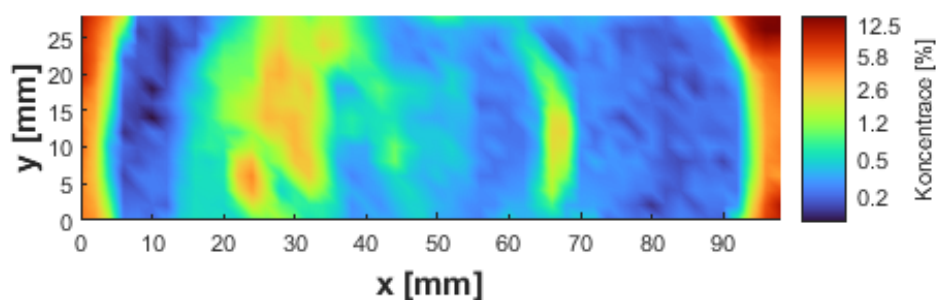
Vzorek napadené vrby byl skenován po dvou milimetrech 15 body na šířku a 50 na délku, celkově tak byla naskenována plocha o stranách 30 a 100 mm . Vzorek borovice byl skenován opět po dvou milimetrech 19 body na šířku 41 na délku. Celkově tak byla naskenována plocha o stranách 38 a 82 mm . V obou případech byla doba měření jednoho bodu $T = 20$ s. Oba vzorky byly skenovány spektrometrem nastaveným ve 3. uspořádání a jejich fotografie je přiložena jako obrázek 3.7. Plochy píků prvků Ca, Fe, K, Mn, Sr a Zn byly spočítány pomocí za tím účelem speciálně napsaného programu a převedeny na koncentrace dosazením do vzorce (2.9) (vyjma Fe, pro které nebyl referenční materiál certifikován). Koncentrace (v případě Fe pouze plochy píků) byly poté převedeny na obrazové mapy pro porovnání množství daného prvku napříč plochou vzorku. K odhadnutí koncentrace Fe by bylo možné interpolovat citlivosti mezi Mn a Cu. Rozdíl příslušných hodnot z tabulky 3.1 je ale velký natolik, že by takto vypočtená citlivost aparatury k měření Fe byla zatížena velkou nejistotou. Přesnější stanovení této citlivosti je tak ponecháno měření referenčního materiálu, který bude k takové analýze certifikován.

Obrazové mapy ze skenování napadené vrby jsou přiloženy jako obrázky 3.8, 3.9, 3.10, 3.11, 3.12 a 3.13. Je jasně patrné, že předpoklad změn v koncentracích prvků v napadené části se potvrdil. V mapě rozložení Sr a Zn se objevily také změny napříč letokruhy. Dále lze u všech prvků pozorovat velký vzrůst koncentrace v oblasti kůry. Z rozložení koncentrace prvků na ploše vzorku je patrné, že zvolit jeden bod v oblasti napadeného dřeva a jeden bod v oblasti dřeva zdravého může sloužit pouze k velmi hrubému odhadu. Takové měření tak má smysl spíše ke vzájemnému porovnání hodnot a úvaze, jestli má smysl pokračovat ve skenování vzorku. Může sloužit také k odhadnutí řádu výsledných koncentrací. Obrazové mapy ze skenování borovice jsou přiloženy jako obrázky 3.14, 3.15, 3.16, 3.17, 3.18 a 3.19. V mapě rozložení Mn

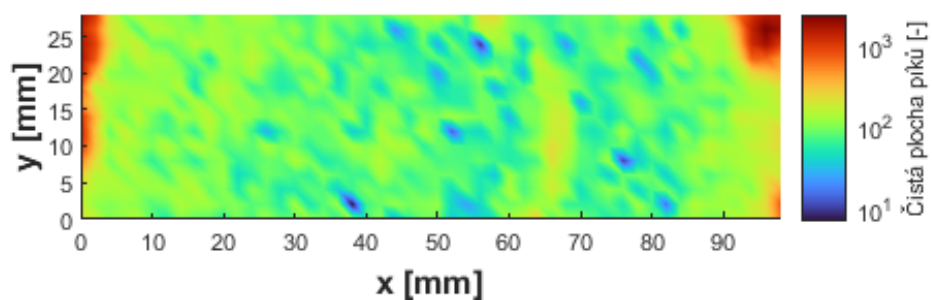


Obrázek 3.7: Vzorčky průřezu kmenem napadené vrby a průřezu kmenem borovice měřené pro 3. uspořádání.

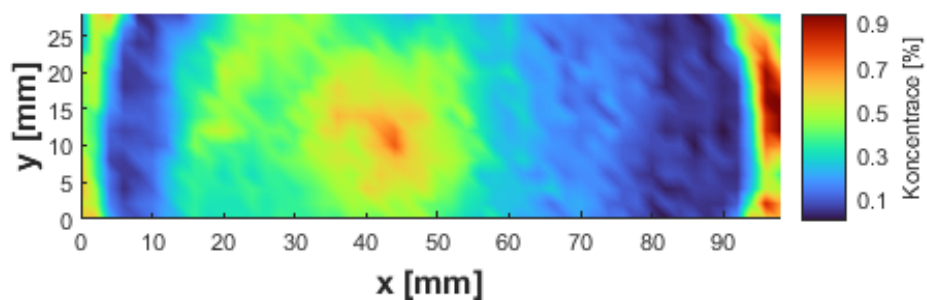
a Sr se opět objevily změny napříč letokruhy, u ostatních prvků se objevily změny vázané pouze na vzdálenost od středu kmenu směrem ke kůře. Potvrdilo se tak, že použitá aparatura a použitý referenční materiál přinesly výsledky, které korespondují se zjištěním ve studiích [56], [55] a [54]. Jsou tedy dostatečné ke zkoumání změn v koncentracích v průřezech kmeny stromů.



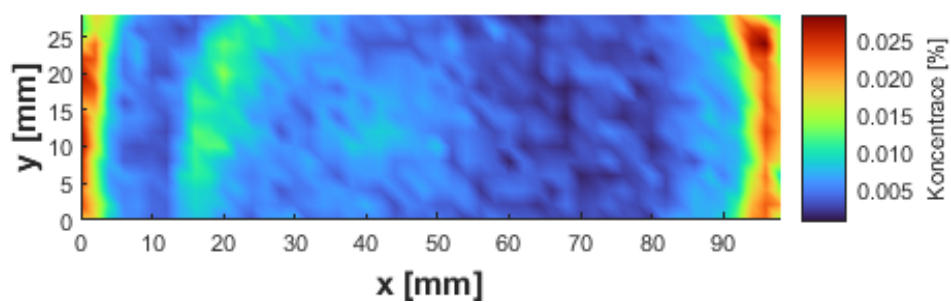
Obrázek 3.8: Koncentrace Ca v horizontálním průřezu kmenem napadené vrby pro 3. uspořádání v logaritmické škále.



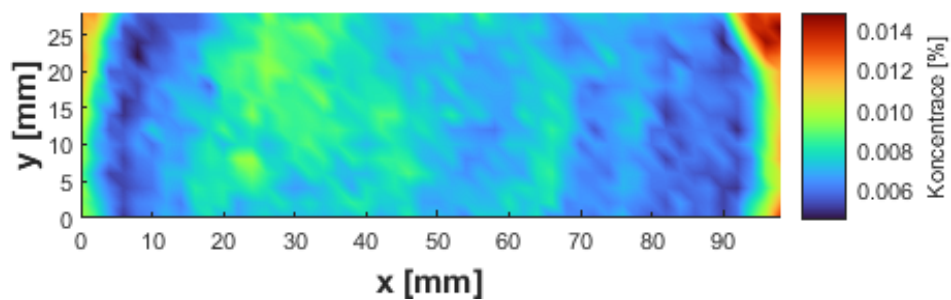
Obrázek 3.9: Relativní rozložení Fe v horizontálním průřezu kmenem napadené vrby pro 3. uspořádání v logaritmické škále. Hodnoty jsou udány jako čisté plochy píků Fe v detekovaném spektru.



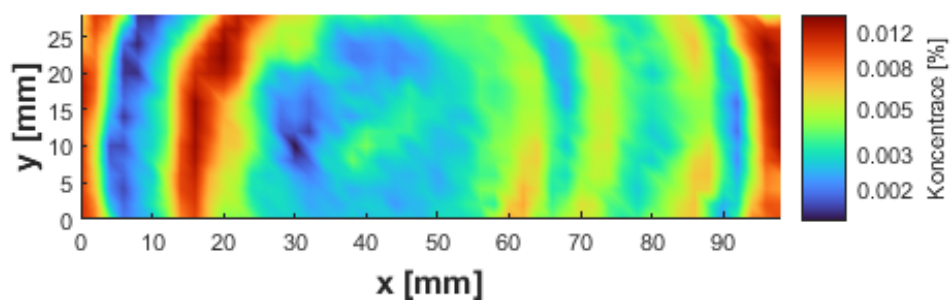
Obrázek 3.10: Koncentrace K v horizontálním průřezu kmenem napadené vrby pro 3. uspořádání v lineární škále.



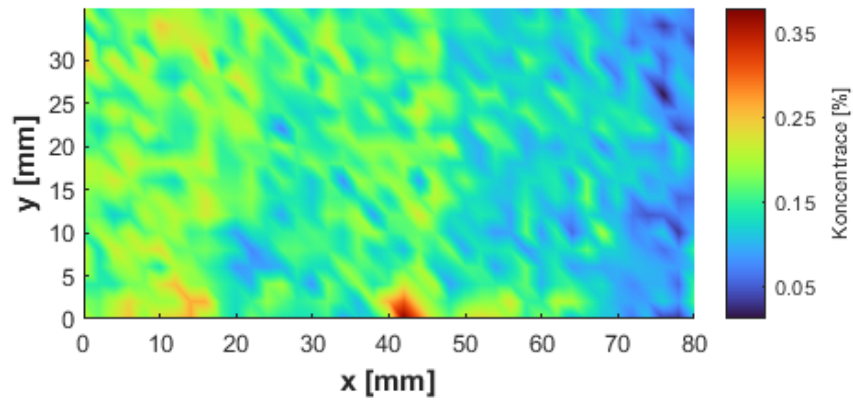
Obrázek 3.11: Koncentrace Mn v horizontálním průřezu kmenem napadené vrby pro 3. uspořádání v lineární škále.



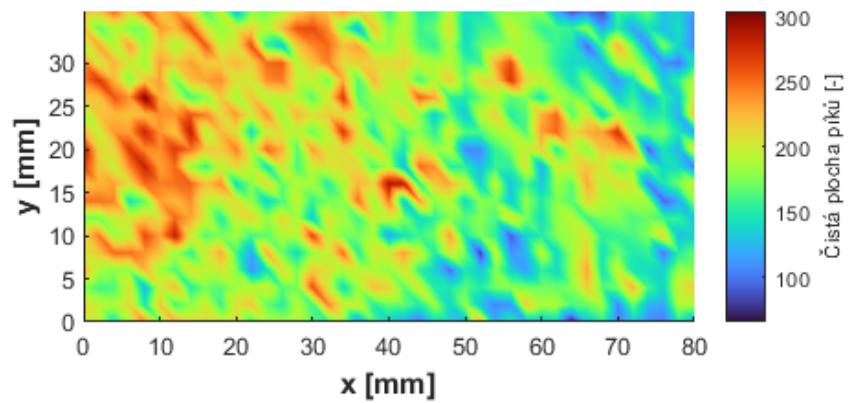
Obrázek 3.12: Koncentrace Sr v horizontálním průřezu kmenem napadené vrby pro 3. uspořádání v lineární škále.



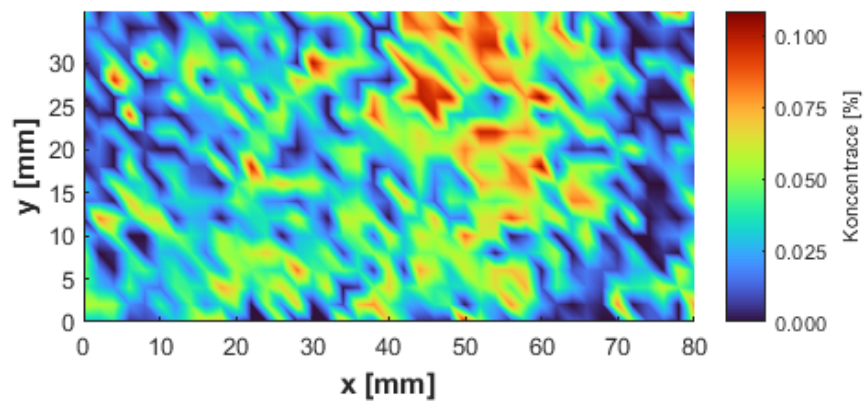
Obrázek 3.13: Koncentrace Zn v horizontálním průřezu kmenem napadené vrby pro 3. uspořádání v logaritmické škále.



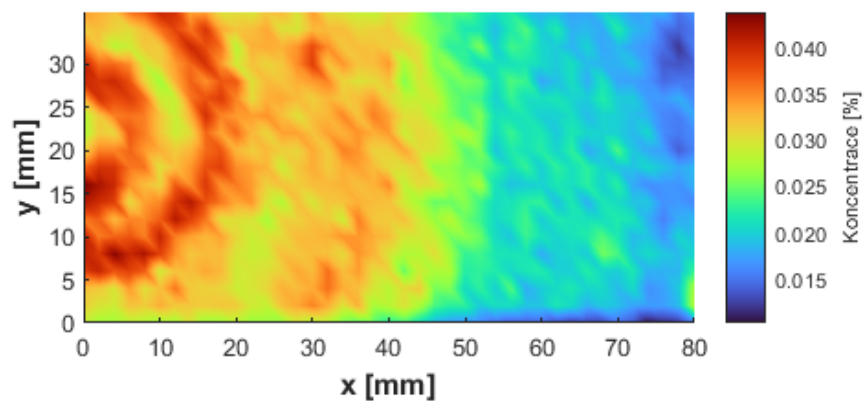
Obrázek 3.14: Koncentrace Ca v horizontálním průřezu kmenem borovice pro 3. uspořádání v lineární škále.



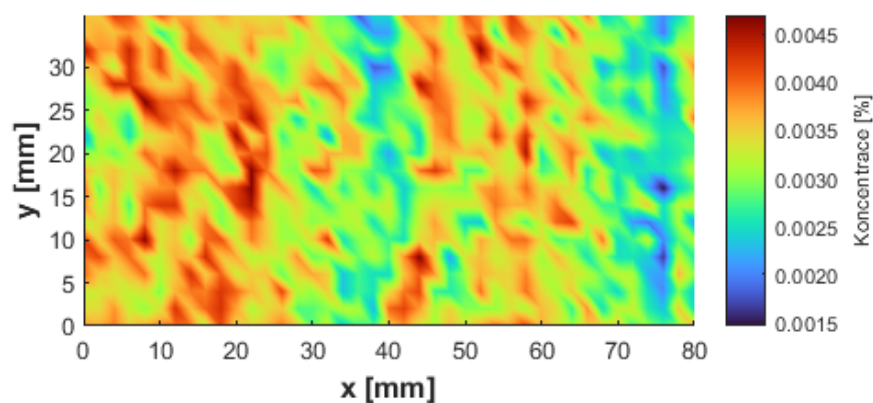
Obrázek 3.15: Relativní rozložení Fe v horizontálním průřezu kmenem borovice pro 3. uspořádání v lineární škále. Hodnoty jsou udány jako čisté plochy píků Fe v detekovaném spektru.



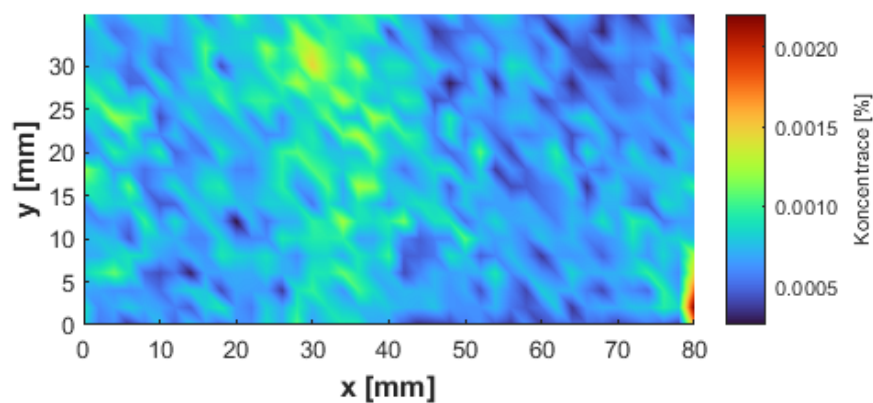
Obrázek 3.16: Koncentrace K v horizontálním průřezu kmenem borovice pro 3. uspořádání v lineární škále.



Obrázek 3.17: Koncentrace Mn v horizontálním průřezu kmenem borovice pro 3. uspořádání v lineární škále.



Obrázek 3.18: Koncentrace Sr v horizontálním průřezu kmenem borovice pro 3. uspořádání v lineární škále.



Obrázek 3.19: Koncentrace Zn v horizontálním průřezu kmenem borovice pro 3. uspořádání v lineární škále.

Kapitola 4

Závěr

V této bakalářské práci byly uvedeny výsledky prvkové analýzy vybraných biologických vzorků metodou rentgenové fluorescenční analýzy. K tomuto účelu bylo vybráno nejvhodnější vybavení trvale přítomné v laboratoři na KDAIZ FJFI ČVUT v Praze a experimentálně nalezeno jeho nejvhodnější geometrické uspořádání. Ukázalo se, že i nízké koncentrace prvků typické pro biologické vzorky jsou touto aparaturou měřitelné s dostatečnou přesností, což je demonstrováno například vysokými hodnotami citlivostí spektrometru pro měřené prvky ku nízkým hodnotám jejich limitů detekce. Dále vypočtené hodnoty citlivostí a limitů detekce mají charakter, který je pro metodu rentgenové fluorescenční analýzy typický. Přesnost výsledků a množství analyzovaných prvků byly limitovány přítomností pouze jednoho referenčního materiálu, je však více možností, kterými se tento nedostatek dá kompenzovat či vyřešit. Další možností zpřesnění výsledků je použití speciálních metod přípravy měřených vzorků a speciálních programů pro vyhodnocování detekovaných spekter.

V experimentální části bylo nejprve změřeno a vyhodnoceno spektrum referenčního materiálu, které ukázalo množství dobře viditelných píků, ze kterých se dá provádět analýza příslušných prvků. Poté bylo přistoupeno k určování koncentrací prvků ve vzorcích neznámého složení. Zde bylo nejprve demonstrováno, že rentgenová fluorescenční analýza je přesnější, pokud je vzorek vysušen. Poté bylo demonstrováno, že příslušnou aparaturou a s použitým referenčním materiálem lze analyzovat i vzorky dřeva. Závěrem experimentální části pak bylo provedeno plošné skenování horizontálních průřezů kmenem stromu viditelně napadeného plísní a kmenem s dobře viditelnými letokruhy. Na základě rešerše dostupné literatury vznikl předpoklad, že by skenování metodou rentgenové fluorescenční analýzy mohlo ukázat změny v koncentracích vybraných prvků v závislosti na poloze v horizontálním průřezu kmenem. To se potvrdilo na obou měřených vzorcích a při měření všech vybraných prvků. Na rozlišení takových změn je tedy aparatura dostatečně citlivá.

Dalšími cíli této bakalářské práce bylo seznámit se s postupy kvalitativní a semi-quantitativní analýzy dat, seznámit se s principem rentgenové fluorescenční analýzy a mikroanalýzy a zpracovat rešerši popisující použití laboratorní rentgenové fluorescenční analýzy k identifikaci a kvantifikaci chemických prvků přítomných v biologických vzorcích nebo přímo v živých organismech. Tyto cíle byly splněny v Teoretické části. Z rešerše článků bylo zjištěno, že většina aplikací XRF na biologických vzorcích se dá rozdělit do následujících skupin: Medicína; Zemědělství a

kontrola potravin; Environmentální studie, energetika a průmysl a Chemie rostlin. Tyto skupiny se mohou vzájemně prolínat, rozhodnutí o tom, kam daný článek patří, může proto být individuální. Z vyhledaného souboru studií o přibližně sto článcích se povedlo zařadit do skupiny Jiné aplikace pouze články dva, první týkající se restaurování historických předmětů vyrobených ze dřeva a druhý týkající se japonského dřeva umoregi. Zbytek vyhledaných článků, který v této práci nebyl uveden, může bez výjimky být rozřazen do uvedených skupin. Odvětvím, ve kterém je rentgenová fluorescenční analýza již dobře zavedena a dlouho používána, je analýza půd. Půda není považována za biologický vzorek, z rešerše však vyplývá, že může toto odvětví s analýzou biologických vzorků úzce souviset. Při studiích týkajících se rostlin je totiž nezdědka velmi důležité znát i prvkový obsah, případně fertilitu půdy.

Literatura

- [1] E. Margu and R. V. Grieken, *X-Ray Fluorescence Spectrometry and Related Techniques : An Introduction*. New York: Momentum Press, 2013.
- [2] H. Brtov, *Výzkum maleb a historických fotografií metodou rentgenov fluorescenn analzy*. PhD thesis, esk vysok uen technick v Praze, Praha, esk Republika, 2019.
- [3] P. M. Carvalho, S. Pessanha, J. Machado, A. L. Silva, J. Veloso, D. Casal, D. Pais, and J. P. Santos, “Energy dispersive x-ray fluorescence quantitative analysis of biological samples with the external standard method,” *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, vol. 174, p. 105991, Dec. 2020.
- [4] P. Gadd, K. Gopi, J. Sammut, N. Saintilan, J. Crawford, and D. Mazumder, “Itrax micro x-ray fluorescence (μ XRF) for soft biological tissues,” *MethodsX*, vol. 5, pp. 1267–1271, 2018.
- [5] R. V. Grieken and A. Markowicz, *Handbook of X-ray spectrometry*. New York: Marcel Dekker, 2002.
- [6] R. Jenkins, R. W. Gould, and D. Gedcke, *Quantitative X-Ray Spectrometry*. New York: Marcel Dekker, 2 ed., 1995.
- [7] R. M. Rousseau, “Detection limit and estimate of uncertainty of analytical XRF results,” *The Rigaku Journal*, vol. 18, no. 2, pp. 33–47, 2001.
- [8] R. Proke, *Konfokln rentgenov fluorescenn analza*. PhD thesis, esk vysok uen technick v Praze, Praha, esk Republika, 2020.
- [9] E. K. Sichangi, H. K. Angeyo, and A. Dehayem-Kamadjeu, “Trace metal biomarker based cancer diagnostics in body tissue by energy dispersive x-ray fluorescence and scattering spectrometry,” *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, vol. 158, p. 105635, Aug. 2019.
- [10] H. Shabbir and A. Muhammad, “A review on gold nanoparticles (GNPs) and their advancement in cancer therapy,” *International Journal of Nanomaterials, Nanotechnology and Nanomedicine*, pp. 019–025, Jan. 2021.
- [11] S. Zhang, L. Li, and Z. Chen, “XFCT imaging system with pinhole collimation and attenuation correction,” in *2016 IEEE Nuclear Science Symposium, Medical Imaging Conference and Room-Temperature Semiconductor Detector Workshop (NSS/MIC/RTSD)*, IEEE, Oct. 2016.

- [12] D. Vernekohl, M. Ahmad, X. Dai, W. Zhao, K. Cheng, and L. Xing, “Reduced acquisition time for l-shell x-ray fluorescence computed tomography using polycapillary x-ray optics,” *Medical Physics*, vol. 46, pp. 5696–5702, Oct. 2019.
- [13] A. Kubala-Kukuś, D. Banaś, U. Majewska, I. Stabrawa, J. Wudarczyk-Moćko, and S. Gózdź, “Determination of lead at physiological level in human biological materials using the total reflection x-ray fluorescence analysis,” *X-Ray Spectrometry*, vol. 45, pp. 318–324, Sept. 2016.
- [14] N. Ekinici, R. Ekinici, R. Polat, and G. Budak, “Analysis of trace elements in medicinal plants with energy dispersive x-ray fluorescence,” *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, vol. 260, no. 1, pp. 127–131, 2004.
- [15] E. V. Chuparina and A. M. Martynov, “Application of nondestructive x-ray fluorescence analysis to determine the element composition of medicinal plants,” *Journal of Analytical Chemistry*, vol. 66, pp. 389–395, Apr. 2011.
- [16] M. P. Makarova, A. V. Syroeshkin, T. V. Maksimova, I. S. Matveeva, and T. V. Pleteneva, “Features of microelements express-determination in medicinal and nonofficial plants by x-ray-fluorescence analysis,” *Drug development & registration*, vol. 8, pp. 93–97, May 2019.
- [17] S. Al-Omari, A. A. Mubarak, M. Al-Noaimi, F. Afaneh, A. Aqili, I. Hamarneh, and N. Mustapha, “Multielemental analysis of pharmaceuticals derived from plant seeds by energy dispersive x-ray fluorescence spectrometry,” *Instrumentation Science & Technology*, vol. 44, pp. 98–113, June 2015.
- [18] O. Lukačovičová, “Radionuclide x-ray fluorescence spectrometry of medical plant samples,” *Acta Chimica Slovaca*, vol. 11, pp. 74–81, Apr. 2018.
- [19] R. Guerra, H.-A. Pereira, L. Silveira, and R. Olea, “Immunomodulatory properties of *Alternanthera tenella* colla aqueous extracts in mice,” *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, vol. 36, pp. 1215–1219, Sept. 2003.
- [20] M. J. Salvador, D. A. Dias, S. Moreira, and O. L. A. D. Zucchi, “Analysis of medicinal plants and crude extracts by synchrotron radiation total reflection x-ray fluorescence,” *Journal of Trace and Microprobe Techniques*, vol. 21, pp. 377–388, Jan. 2003.
- [21] L. D. Vieira, K. T. da Silva, R. S. Giarola, G. F. Inocente, H. Kushima, C. A. H. Lima, and J. M. Hormaza, “Multielement analysis of plant extracts with potential use in the treatment of peptic ulcers by synchrotron radiation total reflection x-ray fluorescence,” *PeerJ*, vol. 6, p. e5375, Sept. 2018.
- [22] N. G. Paltridge, L. J. Palmer, P. J. Milham, G. E. Guild, and J. C. R. Stangoulis, “Energy-dispersive x-ray fluorescence analysis of zinc and iron concentration in rice and pearl millet grain,” *Plant and Soil*, vol. 361, pp. 251–260, Jan. 2012.
- [23] I. R. Willick, R. Lahlali, P. Vijayan, D. Muir, C. Karunakaran, and K. K. Tanino, “Wheat flag leaf epicuticular wax morphology and composition in response

- to moderate drought stress are revealed by SEM, FTIR-ATR and synchrotron x-ray spectroscopy,” *Physiologia Plantarum*, vol. 162, pp. 316–332, Nov. 2017.
- [24] S. Sharma, A. S. Bharti, M. K. Tiwari, and K. N. Uttam, “Effect of manganese stress on the mineral content of the leaves of wheat seedlings by use of x-ray fluorescence excited by synchrotron radiation,” *Spectroscopy Letters*, vol. 51, pp. 302–310, May 2018.
- [25] N. Tomasi, T. Mimmo, R. Terzano, M. Alfeld, K. Janssens, L. Zanin, R. Pinton, Z. Varanini, and S. Cesco, “Nutrient accumulation in leaves of fe-deficient cucumber plants treated with natural fe complexes,” *Biology and Fertility of Soils*, vol. 50, pp. 973–982, Apr. 2014.
- [26] M. Guerra, A. Adame, E. de Almeida, M. Brasil, C. Schaefer, and F. Krug, “In situ determination of k, ca, s and si in fresh sugar cane leaves by handheld energy dispersive x-ray fluorescence spectrometry,” *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 2017.
- [27] F. Comino, M. Ayora-Cañada, V. Aranda, A. Díaz, and A. Domínguez-Vidal, “Near-infrared spectroscopy and x-ray fluorescence data fusion for olive leaf analysis and crop nutritional status determination,” *Talanta*, vol. 188, pp. 676–684, Oct. 2018.
- [28] S. Pessanha, M. L. Carvalho, M. Becker, and A. von Bohlen, “Quantitative determination on heavy metals in different stages of wine production by total reflection x-ray fluorescence and energy dispersive x-ray fluorescence: Comparison on two vineyards,” *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, vol. 65, pp. 504–507, June 2010.
- [29] A. Winkler, M. Rauwolf, J. H. Sterba, P. Wobrauschek, C. Streli, and A. Turanskaya, “Total reflection x-ray fluorescence analysis of elemental composition of herbal infusions and teas,” *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 100, pp. 4226–4236, May 2020.
- [30] E. Romero-Dávila, J. Miranda, and J. Pineda, “X-ray fluorescence analysis of mexican varieties of dried chili peppers,” *Journal of Food Composition and Analysis*, vol. 93, p. 103592, Oct. 2020.
- [31] Howell, Tan, Ulitzka, and Quinnell, “Comparative analysis and evaluation of handheld x-ray fluorescence spectrometry to measure silicon in crop plants,” *Proceedings*, vol. 36, p. 87, Feb. 2020.
- [32] M. S. Blonski, C. R. Appoloni, P. S. Parreira, P. H. A. Aragão, and V. F. N. Filho, “Elementary chemical analysis in leaves infected by fumagina by x-ray fluorescence technique,” *Brazilian Archives of Biology and Technology*, vol. 50, pp. 851–860, Sept. 2007.
- [33] S.-K. Tian, L.-L. Lu, X.-E. Yang, J. M. Labavitch, Y.-Y. Huang, and P. Brown, “Stem and leaf sequestration of zinc at the cellular level in the hyperaccumulator sedum alfredii,” *New Phytologist*, vol. 182, pp. 116–126, Jan. 2009.

- [34] F. Bilo, L. Borgese, R. Dalipi, A. Zacco, S. Federici, M. Masperi, P. Leone-sio, E. Bontempi, and L. E. Depero, “Elemental analysis of tree leaves by total reflection x-ray fluorescence: New approaches for air quality monitoring,” *Chemosphere*, vol. 178, pp. 504–512, July 2017.
- [35] S. C. P.-L. Santos, M. E. Cruz, A. M. E. Barroso, C. P. S. Fonseca, M. Guerra, M. L. Carvalho, and J. P. Santos, “Elemental characterization of plants and soils in panasqueira tungsten mining region,” *Journal of Soils and Sediments*, vol. 14, pp. 778–784, Oct. 2013.
- [36] F. Akhter, G. D. Fairhurst, P. E. R. Blanchard, K. L. Machin, R. I. R. Blyth, J. Thompson, J. McLeod, R. Feng, and C. Soos, “Experimental variation in the spatial deposition of trace metals in feathers revealed using synchrotron x-ray fluorescence,” *X-Ray Spectrometry*, vol. 49, pp. 471–479, Feb. 2020.
- [37] E. Garzón, L. Morales, J. M. Martínez-Blanes, and P. J. Sánchez-Soto, “Characterization of ashes from greenhouse crops plant biomass residues using x-ray fluorescence analysis and x-ray diffraction,” *X-Ray Spectrometry*, vol. 46, pp. 569–578, Aug. 2017.
- [38] N. S. Trivedi, S. A. Mandavgane, and B. D. Kulkarni, “Mustard plant ash: a source of micronutrient and an adsorbent for removal of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid,” *Environmental Science and Pollution Research*, vol. 23, pp. 20087–20099, Feb. 2016.
- [39] H. L. Zhu, D. Papurello, M. Gandiglio, A. Lanzini, I. Akpinar, P. R. Shearing, G. Manos, D. J. Brett, and Y. S. Zhang, “Study of h₂s removal capability from simulated biogas by using waste-derived adsorbent materials,” *Processes*, vol. 8, p. 1030, Aug. 2020.
- [40] Z. Liu, T. Zhang, J. Zhang, H. Xiang, X. Yang, W. Hu, F. Liang, and B. Mi, “Ash fusion characteristics of bamboo, wood and coal,” *Energy*, vol. 161, pp. 517–522, Oct. 2018.
- [41] A. Strandberg, M. Thyrel, N. Skoglund, T. A. Lestander, M. Broström, and R. Backman, “Biomass pellet combustion: Cavities and ash formation characterized by synchrotron x-ray micro-tomography,” *Fuel Processing Technology*, vol. 176, pp. 211–220, July 2018.
- [42] M. Thyrel, R. Samuelsson, M. Finell, and T. Lestander, “Critical ash elements in biorefinery feedstock determined by x-ray spectroscopy,” *Applied Energy*, vol. 102, pp. 1288–1294, Feb. 2013.
- [43] M. Fellin, M. Negri, and R. Zanuttini, “Multi-elemental analysis of wood waste using energy dispersive x-ray fluorescence (ED-XRF) analyzer,” *European Journal of Wood and Wood Products*, vol. 72, pp. 199–211, Dec. 2013.
- [44] C. N. Block, T. Shibata, H. M. Solo-Gabriele, and T. G. Townsend, “Use of handheld x-ray fluorescence spectrometry units for identification of arsenic in treated wood,” *Environmental Pollution*, vol. 148, pp. 627–633, July 2007.

- [45] J. E. Jakes, C. R. Frihart, C. G. Hunt, D. J. Yelle, N. Z. Plaza, L. Lorenz, W. Grigsby, D. J. Ching, F. Kamke, S.-C. Gleber, S. Vogt, and X. Xiao, “X-ray methods to observe and quantify adhesive penetration into wood,” *Journal of Materials Science*, vol. 54, pp. 705–718, Aug. 2018.
- [46] E. Harada, A. Hokura, S. Takada, K. Baba, Y. Terada, I. Nakai, and K. Yazaki, “Characterization of cadmium accumulation in willow as a woody metal accumulator using synchrotron radiation-based x-ray microanalyses,” *Plant and Cell Physiology*, vol. 51, pp. 848–853, Apr. 2010.
- [47] A. van der Ent, M. D. de Jonge, R. Mak, J. Mesjasz-Przybyłowicz, W. J. Przybyłowicz, A. D. Barnabas, and H. H. Harris, “X-ray fluorescence elemental mapping of roots, stems and leaves of the nickel hyperaccumulators *riorea* cf. *bengalensis* and *riorea* cf. *javanica* (violaceae) from sabah (malaysia), borneo,” *Plant and Soil*, vol. 448, pp. 15–36, Jan. 2020.
- [48] J. Augustynowicz, Z. Gajewski, A. Kostecka-Gugała, P. Wróbel, and A. Kołton, “Accumulation patterns of cr in callitriche organs—qualitative and quantitative analysis,” *Environmental Science and Pollution Research*, vol. 23, pp. 2669–2676, Oct. 2015.
- [49] G. Vigani, S. Bohic, F. Faoro, B. Vekemans, L. Vincze, and R. Terzano, “Cellular fractionation and nanoscopic x-ray fluorescence imaging analyses reveal changes of zinc distribution in leaf cells of iron-deficient plants,” *Frontiers in Plant Science*, vol. 9, Aug. 2018.
- [50] S. Czigle, E. Háznagy-Radnai, K. Pintye-Hódi, J. Tóth, D. Tekel'ová, and I. Máthé, “Elemental analysis of ginkgo biloba leaf samples collected during one vegetation period,” *Natural Product Communications*, vol. 8, p. 1934578X1300800, Aug. 2013.
- [51] M. Sobrado and E. Greaves, “Leaf secretion composition of the mangrove species *avicennia germinans* (l.) in relation to salinity: a case study by using total-reflection x-ray fluorescence analysis,” *Plant Science*, vol. 159, pp. 1–5, Oct. 2000.
- [52] Y. Du, P. M. Kopittke, B. N. Noller, S. A. James, H. H. Harris, Z. P. Xu, P. Li, D. R. Mulligan, and L. Huang, “In situ analysis of foliar zinc absorption and short-distance movement in fresh and hydrated leaves of tomato and citrus using synchrotron-based x-ray fluorescence microscopy,” *Annals of Botany*, vol. 115, pp. 41–53, Nov. 2014.
- [53] A. Mijovilovich, F. Morina, S. N. Bokhari, T. Wolff, and H. Küpper, “Analysis of trace metal distribution in plants with lab-based microscopic x-ray fluorescence imaging,” *Plant Methods*, vol. 16, June 2020.
- [54] T. Scharnweber, A. Hevia, A. Buras, E. van der Maaten, and M. Wilmking, “Common trends in elements? within- and between-tree variations of wood-chemistry measured by x-ray fluorescence — a dendrochemical study,” *Science of The Total Environment*, vol. 566-567, pp. 1245–1253, Oct. 2016.

- [55] D. R. O. Rodriguez, H. W. P. de Carvalho, and M. Tomazello-Filho, “Nutrient concentrations of 17- year-old pinus taeda annual tree-rings analyzed by x-ray fluorescence microanalysis,” *Dendrochronologia*, vol. 52, pp. 67–79, Dec. 2018.
- [56] L. S. Jr., D. R. O. Rodriguez, M. T. Quintilhan, S. Brazolin, and M. T. Filho, “Evidence to wood biodeterioration of tropical species revealed by non-destructive techniques,” *Science of The Total Environment*, vol. 672, pp. 357–369, July 2019.
- [57] “Possible radiation-induced damage to the molecular structure of wooden artifacts due to micro-computed tomography, handheld x-ray fluorescence, and x-ray photoelectron spectroscopic techniques,” *Journal of Conservation and Museum Studies*, vol. 14, May 2016.
- [58] Y. Kurimoto, S. Yamauchi, T. Takayama, and Y. Sakai, “Coloring mechanisms of ancient buried wood: Japanese cedar trees excavated from the foothills of mt. chokai,” *Journal of Wood Science*, vol. 66, Apr. 2020.
- [59] *Age, sedimentary environments, and other aspects of sandstone and related host rocks for uranium deposits : results of correspondence from members of the IAEA Uranium Geology Working Group Project II on Sedimentary Basins and Sandstone-Type Uranium Deposits*. Vienna: International Atomic Energy Agency, 1983.
- [60] G. E. Mustoe, “Uranium mineralization of fossil wood,” *Geosciences*, vol. 10, p. 133, Apr. 2020.
- [61] Amptek, “Mini-X2 X-Ray Tube.” <https://www.amptek.com/products/mini-x2-x-ray-tube>, 2019. [Online]. Accessed: 2021-07-28.
- [62] Amptek, “FAST SDD Ultra High Performance Silicon Drift Detector.” <https://www.amptek.com/products/x-ray-detectors/fast-sdd-x-ray-detectors-for-xrf-eds/fast-sdd-silicon-drift-detector>, 2019. [Online]. Accessed: 2021-07-28.
- [63] D. Gupta, *Behaviour of strontium in plants and the environment*. Cham, Switzerland: Springer, 2018.