

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Analytická chemie



Mgr. Ondřej Linhart

SPECIAČNÍ ANALÝZA ARSENU A RTUTI POMOCÍ
POSTKOLONOVÉHO GENEROVÁNÍ TĚKAVÝCH SLOUČENIN
PRO POTŘEBY ATOMOVÝCH SPEKTROMETRICKÝCH METOD

Speciation analysis of arsenic and mercury using postcolumn generation of their
volatile compounds for needs of atomic spectroscopic methods

Disertační práce

Vedoucí disertační práce: RNDr. Václav Červený, Ph.D.

Konzultant: RNDr. Jan Kratzer, Ph.D.

Praha 2018

Disertační práce byla vypracována na Katedře analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy (Hlavova 2030/8, 128 43, Praha 2), v týmu spektrometrických metod.

Finančně byla disertační práce podporována z následujících projektů Univerzity Karlovy: GA UK 152214, SVV260440, UNCE 204025/2012, OP VaVpI Project EU CZ.02.2.67/0.0/0.0/16_016/0002266 a GA ČR 14-23532.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto disertační práci zpracoval samostatně pod vedením školitele RNDr. Václava Červeného, Ph.D. a konzultanta RNDr. Jana Kratzera, Ph.D. a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

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

V Praze dne.....

.....

Podpis

Poděkování

Děkuji svému školiteli RNDr. Václavu Červenému, Ph.D. za odborné vedení, rady, připomínky a také za jeho ochotu a především trpělivost. Poděkování také patří konzultantovi RNDr. Janu Kratzerovi, Ph.D. z Ústavu analytické chemie AV ČR, v.v.i. za jeho odborné rady, připomínky a pomoc při sepisování odborné publikace. Dále děkuji za podporu, pomoc a umožnění práce v příjemném kolektivu. Jmenovitě děkuji RNDr. Jakubu Hraníčkoví, Ph.D., RNDr. Elišce Novákové, Ph.D., Mgr. Alžbětě Mrázové, RNDr. Marcele Rybínové, Ph.D. a všem dalším spolupracovníkům.

V neposlední řadě děkuji rodině za podporu, toleranci a trpělivost a samozřejmě i své přítelkyni Mgr. Radce Haislové, která mi vždy pomohla najít správný směr.

Prohlášení o autorství

Jako zástupce spoluautorů prohlašuji, že se Mgr. Ondřej Linhart podílel na níže uvedených publikovaných pracích měrou uvedenou v závorkách:

1. **Linhart O.**, Smolejová J., Červený V., Hraníček J., Nováková E., Resslerová T., Rychlovský P.: Determination of As by UV-photochemical generation of its volatile species with AAS detection. *Monatsh. Chem.* 147, 1447-1454 (2016).

(podíl:70%)

2. Nováková E., **Linhart O.**, Červený V., Rychlovský P., Hraníček J.: Flow injection determination of Se in dietary supplements using TiO₂, mediated ultraviolet-photochemical volatile species generation. *Spectrochim. Acta, Part B* 134, 98-104 (2017)

(podíl: 5 %)

3. **Linhart O.**, Mrázová-Kolorosová A., Kratzer J., Hraníček J., Červený V.: Mercury Speciation in Fish by High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) and Post-Column Ultraviolet (UV)-Photochemical Vapor Generation (PVG): Comparison of Conventional Line-Source and High-Resolution Continuum Source (HR-CS) Atomic Absorption Spectrometry (AAS) Přijato k publikování v *Analytical Letters* (2018)

(podíl: 75%)

.....
RNDr. Václav Červený, Ph.D.

Předmětová slova

Analytická chemie, spektrometrie

Klíčová slova

Speciační analýza, AAS, arsen, rtuť, UV-fotochemické generování těkavých sloučenin, elektrochemické generování, UV-fotoreaktor, interference, účinnost generování

Subject words

Analytical chemistry, spectrometry

Key words

Speciation analysis, AAS, arsenic, mercury, UV-photochemical generation of volatile compounds, electrochemical generation, UV-photochemical reactor, interferences, generation efficiency

Abstrakt

Disertační práce se zabývá využitím UV-fotochemického generování těkavých sloučenin (UV-PVG) jako derivatizační techniky pro spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) s atomovou absorpční spektrometrií (AAS). Pro speciální analýzu byly vybrány dva modelové prvky (arsen a rtuť) a jejich sloučeniny. Práce byla rozdělena do několika částí, které na sebe navazují.

V první části výzkumu byla sestavena aparatura pro UV fotochemické generování těkavých sloučenin rtuti a jejich detekci v externě vyhřívané trubici atomového absorpčního spektrometru nové generace s kontinuálním zdrojem záření a vysokou rozlišovací schopností (HR-CS AAS). Pro zvýšení citlivosti stanovení byla tato metoda dále upravena pro použití s atomovou fluorescenční detekcí. Dále byla sestavena aparatura pro elektrochemické generování studené páry rtuti s detekcí pomocí AAS. Po sestavení aparatur byly vždy optimalizovány pracovní podmínky (např.: koncentrace a průtok roztoků: kyseliny sírové a kyseliny chlorovodíkové; mobilní fáze; průtoková rychlost nosného plynu a místo jeho zavádění) a následně byly stanoveny základní analytické charakteristiky. Obě metody generování byly mezi sebou vzájemně porovnány podle dosažených charakteristik pro stanovení jednotlivých specií rtuti ve směsi. Použitelnost navrhované metody (včetně extrakce z rybích tkání hydroxidem tetramethylamonným a kyseliny chlorovodíkové při 75 °C) byla prověřena analýzou certifikovaných referenčních materiálů DOLT-4 (žraločí játra) a ERM-CE464 (svalovina tuňáka) a referenčními metodami (HPLC-ICP-MS a AMA254) u stanovení.

V další části práce byla sestavena aparatura pro UV fotochemické generování těkavých sloučenin arsenu v režimu FIA s AAS detekcí v externě vyhřívaném křemenném atomizátoru. Důraz byl kladen na konstrukci UV generátoru, a to zejména na materiál reakční cívky (teflon, křemen). Byly testovány trubičky různých průměrů a tloušťky stěn s následnou optimalizací pracovních podmínek (složení nosného média a jeho průtok, průtoková rychlost nosného a reakčního plynu a jejich zapojení do aparatury). Bylo dosaženo zvýšené citlivosti stanovení použitím vhodného reakčního modifikátoru s dlouhodobým nebo krátkodobým účinkem (Bi^{3+} nebo Sb^{3+}).

Abstract

The presented dissertation thesis deals with the use of UV-photochemical generation of volatile compounds (UV-PVG) as a derivatization technique for the combination of high-performance liquid chromatography (HPLC) and atomic absorption spectrometry (AAS) detection. Two model elements arsenic and mercury and their compounds were selected for the speciation analysis. The work was divided into several parts that follow.

In the first part of the research, the apparatus for the UV-photochemical generation of the volatile mercury compounds and their detection with a new continuum source and high-resolution atomic absorption spectrometer (HR-CS AAS) with an externally heated detection tube was constructed. The analytical method was adapted for use with atomic fluorescence detection with the aim to improve sensitivity of the determination. Furthermore, apparatus for the electrochemical generation of cold mercury vapor with AAS detection was built. The construction of the apparatus was followed by optimization of the reaction conditions (concentration and flow of electrochemical reagents: sulfuric and hydrochloric acid, mobile phase, carrier medium, flow rate of the carrier gas and localization of its introduction), determination of the analytical figures of merit, and comparison of the methods. Both methods of generation were compared to each other to find a suitable method for determination of mercury species. The applicability of the proposed method (including extraction by tetramethylammonium hydroxide and HCl at 75 °C) was demonstrated by using certified reference materials DOLT-4 (dogfish liver), ERM-CE464 (tuna fish), fish tissues and by HPLC-ICP-MS and AMA 254.

The next part of work started by construction of the apparatus for the UV-photochemical generation of volatile compounds of arsenic in flow injection analysis with AAS detection in externally heated quartz tube atomizer. Emphasis was placed on the construction of the UV-photochemical generator, especially on the material of the reaction coil (Teflon or quartz). The tubes of different diameters and wall thickness were tested. The optimization of the working conditions (composition of the carrier solution and its flow rate, flow rate of carrier and reaction gas and the place of their introduction to the apparatus, reaction coil material and its length, type of UV generator) was performed. The sensitivity of the determination can be improved by

addition of a suitable reaction modifier with persistent or short-time effect (Bi(III) and Sb(III)).

Obsah

1	ÚVOD	13
1.1	Cíle práce	14
2	TEORETICKÁ ČÁST	17
2.1	Sloučeniny rtuti – výskyt a toxicita	17
2.2	Sloučeniny arsenu – výskyt a toxicita	19
2.3	Možnosti generování těkavých sloučenin	20
2.3.1	Chemické generování	21
2.3.2	Elektrochemické generování	23
2.3.3	UV-fotochemické generování	24
2.4	Detekce AAS a AFS	26
2.4.1	Atomizace v AAS	26
2.4.2	Atomizace v AFS	27
2.5	Speciační analýza	28
2.5.1	Speciační analýza rtuti	28
2.5.2	Speciační analýza arsenu	29
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	30
3.1	Chemikálie	30
3.1.1	Chemikálie použité při UV-fotochemickém generování studené páry rtuti	30
3.1.2	Chemikálie použité při EcVG studené páry rtuti	30
3.1.3	Certifikované referenční materiály pro rtuť	31
3.1.4	Reálné vzorky pro speciační analýzu rtuti	31
3.1.5	Chemikálie použité při UV-PVG arsenu	31
3.2	Použité přístroje a zařízení	32
3.2.1	Atomový absorpční spektrometr	32
3.2.2	Atomový fluorescenční spektrometr	32
3.2.3	HPLC systém a kolona	33
3.2.4	UV-fotochemický generátor	34
3.2.5	Elektrochemická generační cela	37
3.2.6	Ostatní přístroje a zařízení	38
3.3	Experimentální uspořádání a pracovní postupy	39
3.3.1	Konstrukce UV-fotochemického generátoru	39

3.3.2	UV-fotochemické generování studené páry rtuti v kombinaci s HPLC a detekcí AAS.....	39
3.3.3	Elektrochemické generování studené páry rtuti	40
3.3.4	Extrakce rtuti	41
3.3.5	UV-fotochemické generování těkavých sloučenin arsenu	42
3.3.6	Vyhodnocení a zpracování dat	43
4	Výsledky a diskuze	46
4.1	Speciační analýza rtuti pomocí RP-HPLC-UV-PVG-QTAAS	46
4.1.1	Optimální podmínky pro speciační analýzu rtuti pomocí RP-HPLC-UV-PVG-QTAAS	46
4.1.2	Základní charakteristiky metody	48
4.2	Detekce pomocí AFS	51
4.3	Extrakční metoda a extrakční činidlo.....	51
4.3.1	Stanovení reálných vzorků a CRM	52
4.4	Elektrochemické generování studené páry rtuti	55
4.4.1	Předběžné pokusy.....	55
4.4.2	Vliv složení katolytu	56
4.4.3	Optimální podmínky stanovení specií rtuti pomocí RP-HPLC-EcVG-QTAAS	57
4.4.4	Základní charakteristiky stanovení vybraných specií Hg metodou RP-HPLC-EcVG-QTAAS	58
4.5	UV-fotochemické generování těkavých sloučenin arsenu	62
4.5.1	Volba reakčního (fotochemického) činidla	62
4.5.2	Průtoková rychlost nosného plynu	63
4.5.3	Průtoková rychlost reakčního plynu.....	64
4.5.4	Reakční cívka	65
4.5.5	Zdroj záření	66
4.5.6	Průtoková rychlost roztoku reakčního činidla a délka reakční cívky	66
4.5.7	Reakční modifikátor Bi(III)	69
4.5.8	Optimální podmínky pro generování těkavých sloučenin arsenu	72
4.5.9	Základní charakteristiky stanovení As(III) a DMAs(V)	73
4.5.10	Vliv přídavku kyseliny chlorovodíkové a dusičné	74
5	Závěr.....	77
6	Literatura:	79

Seznam použitých zkratk a symbolů

A_λ	absorbance při dané vlnové délce
AAS	atomová absorpční spektrometrie
AFS	atomová fluorescenční spektrometrie
anolyt	anodový roztok
As(III,V)	anorganická specie arsenu s vyznačeným oxidačním číslem
CRM	certifikovaný referenční materiál
CVG	chemické generování těkavých sloučenin
c_{vzorek}	molární koncentrace analytu ve vzorku
φ_{HCOOH}	objemová procenta kyseliny mravenčí
DMA _s (V)	organická specie arsenu – dimethyl arseničnan
EcVG	elektrochemické generování těkavých sloučenin
ETAAS	atomová absorpční spektrometrie s elektrotermickou atomizací
EtHg(I)	organická specie rtuti – ethylrtuťný ion
FIA	průtoková injekční analýza
FIGS	atomizátor „flame in gas shield“
GLS	separátor fází
Hg(II)	anorganická specie rtuti – rtuťnatý ion
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HR-CS AAS	atomová absorpční spektrometrie s kontinuálním zdrojem a vysokým rozlišením monochromátoru
I	elektrický proud
ICP	indukčně vázané plazma
i.d.	vnitřní průměr
katolyt	katodový roztok
l	délka UV-fotochemického reaktoru
LED	dioda emitující světlo
LOD	mez detekce
LOQ	mez stanovitelnosti
LDR	lineární dynamický rozsah
M	mol l ⁻¹

MDF	miniaturní difuzní plamínek
min	minuta
mM	mmol l ⁻¹
ME	2-merkapt ethanol
MeHg(I)	organická specie rtuti– methylrtuťný ion
MF	mobilní fáze
MMAs(III)	organická specie arsenu– monomethyl arsenitý ion
MS	hmotnostní spektrometrie
o.d.	vnější průměr
PA	plocha píku
PTFE	polytetrafluoretylen (Teflon)
PhHg(I)	organická specie rtuti– fenylrtuťný ion
Q _x	průtoková rychlost daného činidla
QF	křemenný atomizátor
QT	křemenná detekční trubice (vyhřívána do 150 °C)
T _{atm}	atomizační teplota
TMAH	hydroxid tetramethylamonný
UV	ultrafialové záření
UV-PVG	UV-fotochemické generování těkavých sloučenin a studené páry rtuti
VSG	generování těkavých sloučenin
V _{vz}	dávkovaný objem daného vzorku
WDR	pracovní dynamický rozsah
σ	směrodatná odchylka šumu základní linie zjištěná opakovaným měřením vzorku o velice nízké koncentraci

1 ÚVOD

Technika generování těkavých sloučenin, případně studených par, je dnes již poměrně známý způsob zavádění vzorku pro potřeby spektrometrických metod. Spočívá v konverzi analytu z kapalně do plynné fáze, ve které je těkavá sloučenina atomizována a detegována. Tato metoda má několik výhod: oddělení analytu od kapalně matrice vzorku, vysokou účinnost zavedení stanovovaného prvku do detektoru, vysokou citlivost, jednoduchost, omezení vlivu interferencí při atomizaci a dosažení lepších detekčních limitů. Nejčastěji využívanou kombinací je spojení generování těkavých sloučenin s atomovou absorpční spektrometrií (AAS) nebo atomovou fluorescenční spektrometrií (AFS) sloužícími jako prvkově selektivní detektory. V dnešní době je nejčastěji využívaným přístupem ke generování těkavých sloučenin metoda chemického generování, následovaná elektrochemickým generováním. Chemické generování je založeno na chemické reakci analytu s redukčním činidlem, obvykle tetrahydridoboritanem sodným v prostředí minerálních kyselin. Při elektrochemickém generování se využívá redukce analytu na katodě elektrochemické cely při průchodu elektrického proudu. Třetí možný způsob generování těkavých sloučenin je založený na fotochemické redukci analytu UV zářením v přítomnosti jednoduchých organických kyselin. Tento přístup je nejméně prozkoumaný, ačkoli dle informací dostupných v literatuře v sobě skýtá slibný potenciál pro některé aplikace.

Předkládaná disertační práce je souhrnem výsledků, které navazují na předchozí výzkum prováděný v laboratoři spektrometrických metod na katedře analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy. Záměrem práce bylo zavedení UV-fotochemického generování těkavých sloučenin jako alternativního přístupu schopného konkurovat dnes již běžně používaným metodám, jako jsou chemické a elektrochemické generování.

Cílem výzkumu bylo vylepšení dosažených výsledků pro speciální analýzu vybraných sloučenin rtuti pomocí UV-fotochemického generování studené páry rtuti jakožto derivatizačního kroku mezi vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) a atomovou absorpční spektrometrií s možností stanovení specií rtuti v komplikovanějších matricích. Za tímto účelem musela být rovněž modifikována extrakční procedura a vybráno vhodné extrakční činidlo tak, aby byly kompatibilní s následným krokem UV-fotochemického generování. Dále byla v práci optimalizována

metoda elektrochemického generování studené páry rtuti a testována její využitelnost při speciální analýze rtuti. Následně byly za nalezených optimálních podmínek určeny a vzájemně porovnány analytické charakteristiky pro oba přístupy ke speciální analýze rtuti, tj. spojení HPLC s postkolonovým fotochemickým či elektrochemickým generováním páry rtuti z jednotlivých specií rozdělených na koloně a jejich následnou detekcí pomocí AAS. Postkolonové fotochemické generování specií rtuti vykazovalo vyšší citlivost a jeho použitelnost v analytické praxi byla demonstrována na vzorcích a certifikovaných referenčních materiálech ryb.

Druhým zkoumaným prvkem byl arsen a jeho specie. Byla provedena optimalizace konstrukce UV-fotochemického generátoru i podmínek UV-fotochemického generování těkavých sloučenin arsenu v režimu průtokové injekční analýzy s AAS detekcí. Jelikož z testovaných čtyř specií arsenu (As(III), As(V), MMAs(III) a DMAs(V)) byly nalezeny podmínky pro úspěšné UV-fotochemické generování pouze dvou z nich (As(III) a DMAs(V)), nebyla dále testována použitelnost UV-fotochemického generování jako postkolonového derivatizačního kroku využitelného pro speciální analýzu arsenu. Pozornost však byla věnována snaze o objasnění mechanismu UV-fotochemického generování arsenovodíku z As(III), zejména pozitivnímu vlivu některých iontů (Bi(III) a Sb(III)) na signál arsenu.

1.1 Cíle práce

Úkolem práce byl důkladný výzkum možností použití UV-fotochemického generování studené páry rtuti a těkavých sloučenin arsenu pro jejich prvkovou speciální analýzu v reálných vzorcích (rybí tkáň a certifikované referenční materiály jen pro Hg) metodami AAS a AFS. Tato témata souvisela s řešením grantového projektu GA UK 152214.

Jednotlivé cíle práce byly:

Speciální analýza Hg

1. Sestavit měřicí aparatury - realizace spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie na reverzních fázích (RP-HPLC) a (HR-CS AAS) detektoru,

s atomizací v křemenné detekční trubici (QT) s využitím postkolonového UV-fotochemického generování studené páry rtuti (UV-PVG).

2. Optimalizovat experimentální podmínky jak pro HPLC separaci specií Hg, tak i pro následné postkolonové UV-fotochemické generování páry rtuti. Následně určit základní charakteristiky vyvinuté metody RP-HPLC-UV-PVG-QTAAS.
3. Modifikovat extrakční metodu specií rtuti z reálných vzorků rybí tkáně a vybraných certifikovaných referenčních materiálů tak, aby byla kompatibilní s vyvinutou metodou RP-HPLC-UV-PVG-QTAAS a zachovávala informaci o speciaci.
4. Ověřit správnost navržené metody stanovení a extrakce na certifikovaném referenčním materiálu a prokázat její použitelnost na reálných vzorcích.
5. Sestavit aparaturu pro elektrochemické generování studené páry rtuti v průtokovém uspořádání a optimalizovat podmínky elektrochemického generování studené páry rtuti (EcVG) z jednotlivých specií rtuti s detekcí pomocí QTAAS. Realizovat spojení RP-HPLC-EcVG-QTAAS a určit analytické charakteristiky za optimálních podmínek. Porovnat výsledky dosažené pomocí RP-HPLC-UV-PVG-QTAAS a RP-HPLC-EcVG-QTAAS a zhodnotit praktickou využitelnost obou metod.

Speciační analýza As

6. Optimalizovat konstrukci generátoru pro UV-generování těkavých sloučenin arsenu z As (III).
7. Optimalizovat podmínky UV-fotochemického generování těkavých sloučenin As z vybraných modelových sloučenin (As(III), As(V), MMAs(III) a DMAs(V) a stanovit základní charakteristiky stanovení těchto analytů danou metodou.

Práce byla rozdělena do několika částí. Hlavním cílem první části bylo vypracovat metodu pro stanovení specií rtuti s dostatečnou citlivostí. Dalším úkolem bylo zlepšení extrakce specií rtuti z reálných vzorků a certifikovaných referenčních vzorků.

Další část práce byla zaměřena na stanovení rtuti pomocí elektrochemického generování studené páry rtuti z různých specií jako možnou konkurenční technikou

k předchozí metodě. Cílem bylo sestavit elektrochemickou generační celu a nalézt optimální podmínky pro stanovení specií rtuti.

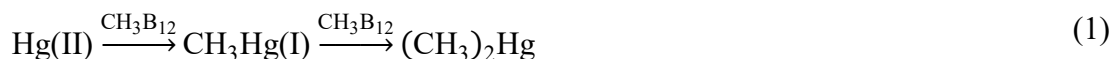
Cílem druhé části této práce bylo optimalizovat UV-fotochemické generování tekavých sloučenin arsenu s využitím vhodného modifikátoru pro potřeby atomové absorpční spektrometrie. Hlavním úkolem byla konstrukce vlastního UV-fotochemického generátoru. Dalším cílem bylo využití UV-fotochemického generování tekavých sloučenin arsenu jako interface (derivatizační jednotky) mezi HPLC a QFAAS pro speciační analýzu.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Sloučeniny rtuti – výskyt a toxicita

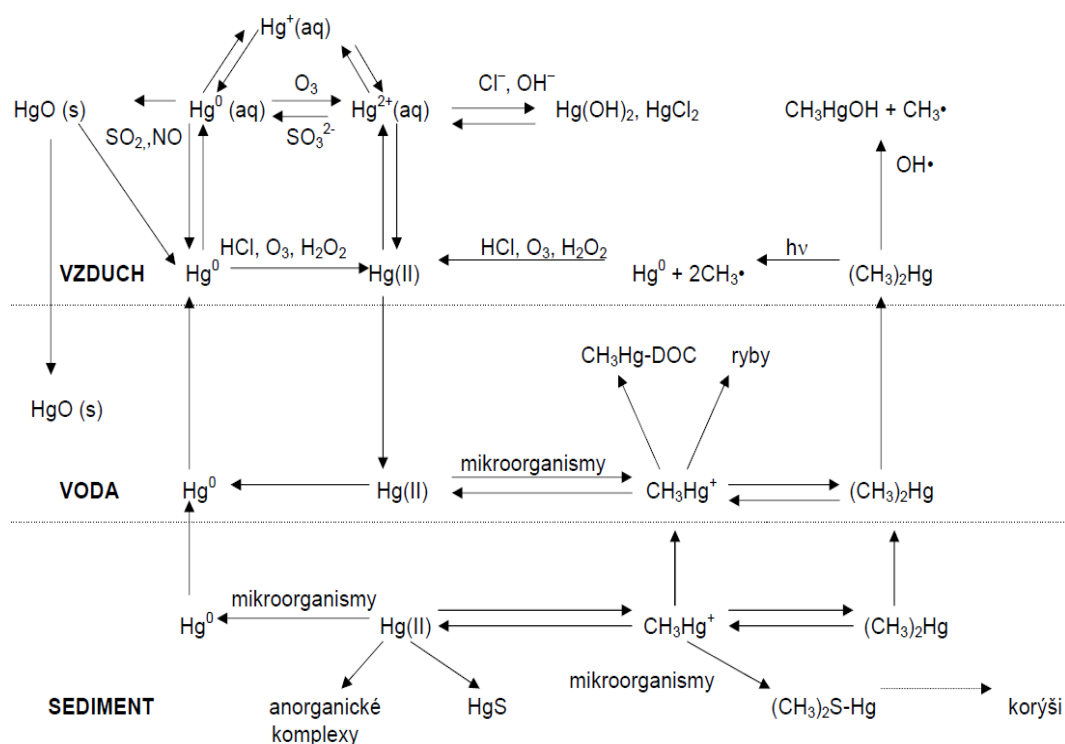
Rtuť je stříbrolesklý kov, který se běžně v přírodě nenachází a za běžných podmínek je jediným kapalným kovem [1,2]. Vyskytuje se pouze ve třech oxidačních stavech (0, I, II). Chemické formy rtuti jsou anorganické (elementární rtuť, rtuťné a rtuťnaté ionty) a organokovové sloučeniny [3]. Rtuť a její sloučeniny jsou přítomny v životním prostředí díky lidské aktivitě (skládky, zubní přípravky, laboratorní využití, uhelné elektrárny), ale i díky přírodním zdrojům jako je vulkanická činnost, a nebo lesní požáry [4]. V oxidačním stavu +II se rtuť vyskytuje v sedimentech [5–7] a v povrchových vodách [8,9]. Z pohledu expozice pro člověka je nejtoxičtější organickou specií methylrtuť ($\text{CH}_3\text{Hg(I)}$). Každá specie má charakteristickou toxikokinetiku a rozdílný vliv na zdraví [10]. Požadavek na provádění speciální analýzy vyplývá právě z faktu, že toxicita různých specií rtuti je rozdílná. Tolerovatelná denní dávka pro dospělého člověka o tělesné hmotnosti 70 kg činí 50 μg celkové rtuti a z toho maximálně 33 μg methylrtuti [11].

Ionty rtuti, převážně Hg(II) , se mohou účastnit v životním prostředí tzv. „methylace“. Tento proces obrany organismů může probíhat jak v jednobuněčných organismech (bakterie), tak i v trávicích soustavách obratlovců. Bakterie jsou schopny přeměnit ionty rtuti na složitější organické specie jako například methylrtuť a dimethylrtuť. Methylace probíhá v přítomnosti různých typů mikroorganismů vyskytujících se v sedimentech za účasti methylkobalaminových sloučenin (CH_3B_{12}) podle rovnice 1 [12,13]. Vzniklé organické sloučeniny rtuti jsou mnohem toxičtější než výchozí sloučeniny. Díky jejich rozpustnosti v tucích mohou být akumulovány především v rybách, planktonu a ptactvu [14].



Rychlost vzniku methylrtuti je závislá na koncentraci methylkobalaminových sloučenin, koncentraci Hg(II) , přítomnosti organických i anorganických komplexotvorných látek, koncentraci kyslíku ve vodě při aerobní methylaci, na teplotě

vody, na množství a druhu mikroorganismů, pH a redoxních podmínkách vodního systému [5,12]. Představa o cirkulaci rtuti v životním prostředí je znázorněna na Obr. 1.



Obr. 1: Přeměny Hg ve složkách vodního ekosystému [12].

aq – kapalná fáze, DOC – rozpuštěné organické látky, s – pevná fáze

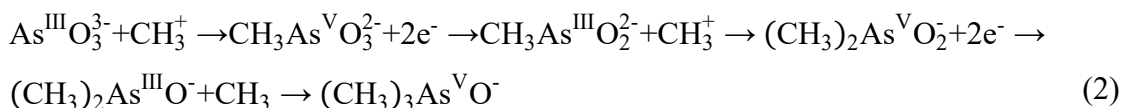
Vliv rtuti a jejích specií na lidský organismus je jednoznačně negativní. Patří mezi kumulativní jedy, nejčastěji se kumuluje v játrech, ledvinách a slezině. Projevy chronické otravy rtutí jsou: vypadávání vlasů, trávicí problémy, neurologické a psychické potíže. Při jednorázové vysoké dávce dochází k bolestem břicha, průjmům a zvracení. Rtuť a její sloučeniny jsou ototoxické, dále může mít negativní vliv na krevní tlak a na klidovou srdeční frekvenci a tím způsobit kardiovaskulární onemocnění [15–17].

2.2 Sloučeniny arsenu – výskyt a toxicita

Arsen je široce rozšířen v přírodě, nejčastěji ve formě anorganických sloučenin, kde může nabývat oxidačních čísel -III, +III a +V. Jedná se o toxický polokovový prvek. Nejvýznamnější rudou arsenu je arsenopyrit (FeAsS) a také löllingit (FeAs_2). V horninách se nachází jako příměs v rudách niklu, kobaltu, stříbra a zlata. Výroba As spočívá v oxidačním pražení arsenopyritu a následném zachycení oxidu arsenitého.

Organické sloučeniny mohou být také trojmocné nebo pětímocné, jako je kyselina arsanilová. Arsen se může dokonce vyskytovat v methylovaných formách následkem biomethylace organismy v půdě, sladké vodě a mořské vodě. Hlavním místem biotransformace specií arsenu jsou játra, kde dochází k redukci As(V) na As(III) a následné methylaci na monomethylarsenitou (MMAs(III)) a dimethylarseničnan (DMAs(V)) [10]. Arsenité sloučeniny jsou přitom toxicitější než arseničné. Jak již bylo popsáno, arsen se vyskytuje v několika chemických formách a oxidačních stavech způsobujících akutní a chronické účinky na zdraví, včetně rakoviny. Nejvíce toxické jsou anorganické sloučeniny arsenu, nejznámějším je oxid arsenitý, arsenik neboli otrušík. Letální dávka (LD_{50}) pro potkana je 15 mg kg^{-1} [18]. Byly však zaznamenány případy přežití po mnohem větší dávce. Smrtelná dávka pro člověka je 60-200 mg. Akutní otrava po požití se projevuje kovovou chutí v ústech, škrábáním a pálením v hltanu. Následuje úporné zvracení a prudké bolesti v břiše, později se dostaví průjem spojený s dehydratací. Později se dostávají další příznaky jako křeče, anurie, zrychlený, nepravidelný tep, paralýza a smrt. Při vyšších dávkách se může otrava projevovat celkovou slabostí, křečemi, ztrátou vědomí a ochrnutím dýchacího centra. Dalšími příznaky jsou poškozený imunitní systém, horečka, anorexie, srdeční arytmie, poškození centrálního nervového systému, poškození jater a cukrovka, což se ovšem projevuje zejména při chronických otravách [10,19–21].

Produkty metabolické přeměny, DMAs(V) a MMAs(III) , mohou být nalezeny v lidské moči po chronické expozici arsenem v pitné vodě. Schéma pro přeměnu As(III) na mono-, di- a trimethylované produkty víceúrovňovým mechanismem oxidativní methylace s následnou redukcí produktu methylace před další biotransformací je následující [22]:



Pentavalentní methylované specie arsenu (MMAs(III) a DMAs(V)) jsou méně toxické než As(III), LD₅₀ pro myši je 916 a 648 mg kg⁻¹ [18]. Více než padesát specií arsenu bylo nalezeno v mořských organismech [23,24]. Většina z nich byla zařazena mezi netoxické jako je např. arsenobetain a část jako potencionálně toxické např. arsenocukry [25,26].

2.3 Možnosti generování těkavých sloučenin

Generování těkavých sloučenin (VSG) je jednou z nejrozšířenějších derivatizačních technik pro ultrastopové a stopové stanovení prvků ve spojení s atomovými spektrálními technikami [27]. Tato technika je nejčastěji využívána pro stanovení prvků, které tvoří těkavé hydridy, tj. As, Bi, Ge, Pb, Sb, Se, Sn a Te [28,29], ale třeba i In a Tl [30]. Struktura některých těkavých sloučenin není přesně známa, v případě Cd [31] se může jednat o páry či hydrid, u řady přechodných prvků se může jednat o nanočástice - Ag [32], Au [33] a Zn [34]. V případě rtuti je dlouho známo, že chemicky a elektrochemicky generovanou těkavou formou je elementární rtuť, která již za laboratorní teploty má tenzi par využitelnou pro stanovení [35–39]. Proto se používá pojem generování studené páry rtuti. V dnešní době je tedy možné využít generování těkavých sloučenin i pro stanovení přechodných a vzácných kovů [40,41]. Prvky jako Co, Fe, Ni, Se jsou schopny vytvářet těkavé karbonyly [42–44]. Těkavé specie mohou vytvářet také I a S [45].

Analytické využití generování těkavých sloučenin má několik výhod: separaci analytu od matrice vzorku (převod do plynné fáze) a tedy z toho plynoucí omezení vlivu interferentů, vysokou transportní účinnost těkavé formy stanovovaného prvku do detektoru, značnou selektivitu, vysokou citlivost a nízké meze detekce [46].

VSG můžeme rozdělit do dvou nezávislých kroků: generování a atomizace/detekce. Generování zahrnuje převedení analytu na těkavou sloučeninu, její uvolnění z kapalně fáze do fáze plynné a transport těkavé sloučeniny pomocí nosného plynu do detektoru [47].

Jako detektory lze využít libovolnou metodu atomové spektrometrie, např.: atomovou absorpční spektrometrii (AAS) [48–54], atomovou fluorescenční spektrometrii (AFS) [55–60], stejně tak metody s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS, ICP-OES) [58,59,61–63]. Nejčastěji se využívá kombinace AAS s atomizací v křemenném atomizátoru (QFAAS) anebo zavedení hydridu analytu do grafitového atomizátoru a jeho *in-situ* záchyt (*in-situ* ETAAS) [64]. V metodě AFS se plynný hydrid zavádí do miniaturního plamenového atomizátoru [65–67]. V ICP-MS a ICP-OES se využívá zavádění vzorku do zmlžovače a následně do plazmatu, jako detektor pak slouží buď hmotnostní nebo optický emisní spektrometr.

Metody generování těkavých sloučenin lze rozdělit na tři skupiny podle způsobu generování. Nejběžnějším a dnes nejrozšířenějším je chemické generování (CVG), další alternativní metodou je elektrochemické generování (EcVG) a poslední, nejmladší metodou je UV-fotochemické generování (UV-PVG).

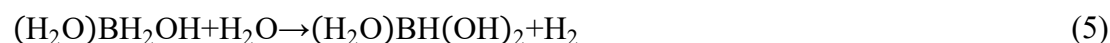
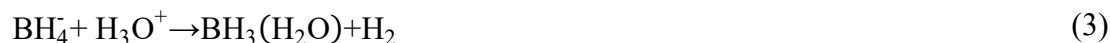
2.3.1 Chemické generování

Chemické generování těkavých sloučenin využívá reakce analytu s redukčními činidly v kyselém prostředí [29]. Nejčastěji se využívá tetrahydridoboritanu sodného (NaBH_4) pro redukci hydridotvorných prvků přechodných a vzácných kovů. Pro prvky tvořící studené páry, jako je rtuť, se využívá jako redukční činidlo také chlorid cínatý (SnCl_2) [68].

Reakce probíhá v kyselém prostředí, které je nezbytné pro rozklad tetrahydridoboritanu a vznik hydridu analytu [69–71]. Roztok tetrahydridoboritanu není stálý, v neutrálním až kyselém prostředí se rozkládá na kyselinu boritou, proto je nutné ho denně připravovat čerstvý, případně ho uchovávat zamražený. Pro stabilizaci redukčního činidla se do roztoku přidává NaOH anebo KOH o koncentraci 0,1 – 1 mol l⁻¹.

Mezi výhody této metody patří vysoká citlivost, absence spektrálních interferencí, nízké provozní náklady, jednoduchost a rychlost. Nevýhodami této techniky je riziko kontaminace analytu z použitého redukčního činidla a jeho nestabilita. Další nevýhodou je potřeba předredukce analytů s vyšším oxidačním číslem [67]. Pro úpravu některých vzorků do požadované oxidační formy je potřeba využití oxidačního činidla, nejčastěji peroxodisíranu draselného [72–75].

Mnoho prací se zabývá chemickým generováním, avšak jen málo z nich vysvětluje možný mechanismus reakce analytu s NaBH₄. Skupina D'Uliva a jeho spolupracovníků publikovala teorii „přenosu vodíku“ [27,71,76]. V této teorii je NaBH₄ postupně hydrolyzován v kyselém prostředí přes hydrolytické meziproducty až na kyselinu boritou a molekulární vodík:

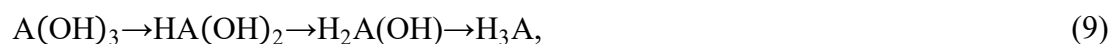


Reakce podle rovnice 6 probíhá pouze v silně kyselém prostředí, kde je koncentrace H₃O⁺ vyšší než 0,5 mol l⁻¹. Proto je hydrolyza NaBH₄ pomalejší, když [H₃O⁺] > 0,5 mol l⁻¹, protože (H₂O)₂BH₂⁺ nehydrolyzuje [70,77].

Všechny reakce lze shrnout do jedné rovnice:



Analyt je převeden na těkavý hydrid reakcí s NaBH₄ nebo kterýmkoliv z produktů hydrolyzy. Reakci lze vyjádřit pomocí schéma:



kde A je atom prvku tvořící těkavý hydrid (As^{III}, Sb^{III}, Bi^{III}) [27,69-71,76,78]

2.3.2 Elektrochemické generování

Elektrochemické generování je jednou z alternativ k chemickému generování těkavých sloučenin. Při elektrochemickém generování je redukční činidlo nahrazeno průchodem elektrického proudu. Výhodou tohoto přístupu je eliminace rizika kontaminace redukčním činidlem. Díky tomu může být dosaženo nižší meze detekce. Navíc není potřeba pracovat s nestabilním redukčním činidlem.

Průtoková elektrochemická cela pro generování těkavých hydridů se skládá ze dvou částí, katodového a anodového prostoru, které jsou nejčastěji odděleny iontově výměnou membránou (většinou z Nafionu) [79–82]. Cely jsou obvykle vyrobené z bloku plexiskla nebo PTFE.

K redukci analytu dochází na katodě nebo v její blízkosti a zároveň dochází k vývoji vodíku [79]. Množství vygenerovaného vodíku je závislé na použitém materiálu katody. Nejvíce využívaným materiálem pro katody je Pt, z důvodu odolnosti vůči interferentům a elektrolytu, dále pak Pb, které umožňuje redukci analytu i z vyšších oxidačních stavů, ale je zde vyšší riziko možných interferencí [83]. Nejběžnějšími elektrolyty jsou roztoky minerálních kyselin (sírová a chlorovodíková) nebo jejich solí [83].

Výhodou elektrochemického generování je použití vysoce čistých minerálních kyselin nebo solí, čímž se snižuje riziko možné kontaminace z činidel. Nevýhodou je možná sorpce interferentů i analytu na povrch katody, což může vést k permanentní změně jejího povrchu – pasivaci a ovlivnění účinnosti generování těkavé sloučeniny [46,84].

Generování probíhá ve vodných roztocích, na katodě kromě redukce analytu dochází k redukci oxoniových iontů na vodík, a na anodě dochází k oxidaci hydroxidových aniontů na kyslík popř. Cl^- na Cl_2 . Reakční mechanismus u elektrochemického generování je založen na třech po sobě jdoucích krocích probíhajících na povrchu elektrody [85].

V první fázi dochází k depozici analytu na povrch elektrody a jeho redukci:



kde M je povrch elektrody a A je analyt.

Následuje reakce mezi redukováným analytem a vodíkem generovaným na povrchu katody a vznik příslušného hydridu.

Třetím krokem je desorpce vzniklého hydridu z povrchu elektrody:



První reakce (10) reakce probíhá v silně kyselém prostředí a jde o reakci přenosu náboje. Jsou popsány dva různé mechanismy reakce mezi redukováným analytem a atomárním vodíkem: elektrokatalytický a elektrochemický mechanismus. O mechanismu, kterým reakce poběží, rozhoduje přepětí vodíku na dané materiálu katody.

Elektrokatalytický mechanismus popisuje reakci atomů vodíku vzniklých na povrchu katody s nízkým přepětím vodíku s redukováným hydridotvorným prvkem (oxidační stav 0). Takto údajně probíhá reakce na platinové elektrodě [84].

Elektrochemický mechanismus zahrnuje deprotonizaci H_3O^+ iontů na povrchu katody s velkým přepětím vodíku. Hydridy se tvoří redukcí hydridotvorného prvku na povrchu elektrody a následnou reakcí s H_3O^+ z katolytu. Na katodách s velkým přepětím vodíku (např. Pb) lze generovat hydridy i z As^V , Se^{VI} a Sb^V .

U katody, která má střední přepětí vodíku, mohou probíhat pravděpodobně obě reakce zároveň [79].

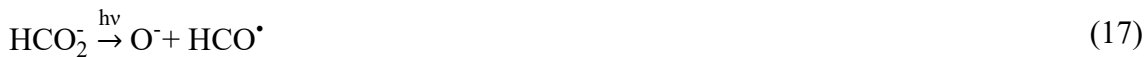
2.3.3 UV-fotochemické generování

UV-fotochemické generování je alternativní způsob ke dvěma předchozím možnostem. Metoda je založena na interakci UV záření s organickými kyselinami přidanými ke vzorku za vzniku volných radikálů, které reagují s analytem za vzniku těkavé formy. První použití UV-fotochemického generování pro analytické stanovení najdeme v pracích Gua et al [86,87]. Těkavé sloučeniny, případně studená pára rtuti, vznikají vlivem UV záření a nejčastěji v přítomnosti nízkomolekulárních organických kyselin (mravenčí, octová a propionová) a alkoholů [45,86–89]. K nízkomolekulárním organickým kyselinám může být přidán fotochemický katalyzátor (TiO_2 , ZrO_2). TiO_2 byl jako fotokatalyzátor pro potřeby UV-PVG využit např. pro stanovení Se [59,60,90–93], Hg [94,95] a Te [60].

Mezi výhody UV-fotochemického generování těkavých sloučenin patří jednoduchost aparatury a eliminace drahých a toxických redukčních činidel. V porovnání s elektrochemickým generováním lze takto generovat těkavé sloučeniny z větší skupiny prvků. Další výhodou je snížení interferenčního vlivu přechodných prvků. Odpadají také nežádoucí jevy na elektrodách.

Reakční mechanismus UV-fotochemického generování těkavých sloučenin je stále předmětem diskusí, protože fotochemické reakce jsou složité [96,97]. Je několik možných reakčních mechanismů. Zatím byl navržen sled možných reakcí, které předpokládají rozklad organických kyselin a vznik volných radikálů, které mají schopnost redukovat specie stanovovaného prvku.

Jako příklad lze uvést rozklad kyseliny mravenčí. Fotolýza kyseliny poskytuje řadu radikálů podílejících se na redukci analytu [98].



Povaha těkavé sloučeniny závisí na použité karboxylové kyselině. V případě použití jiných karboxylových kyselin, jako jsou kyselina octová a propionová, vznikají další radikály CH_3^{\bullet} a $\text{C}_2\text{H}_5^{\bullet}$.

2.4 Detekce AAS a AFS

K detekci stopových a ultrastopových koncentrací prvků lze využít několik spektrometrických analytických metod, např.: atomovou absorpční spektrometrii (AAS) s různými typy atomizátorů (kapitola 2.4.1), atomovou fluorescenční spektrometrii (AFS) s různými druhy atomizačních prostředí (kapitola 2.4.2), hmotnostní spektrometrii s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS), různé varianty optické emisní spektrometrie (OES), nejčastěji s indukčně vázaným plazmatem (ICP-OES) a další metody (neutronovou aktivační analýzu, laserovou a rentgenovou spektrometrii a elektronovou mikroanalýzu).

V této práci byly použity AAS s atomizací v křemenném atomizátoru při 950 °C (QF) a křemenné detekční trubici při 150 °C (QT) a AFS s atomizací v miniaturizovaném difúzním plamenovém atomizátoru, které jsou detailně popsány v následujících kapitolách.

2.4.1 Atomizace v AAS

Dle způsobu atomizace (druh atomizátoru) můžeme atomovou absorpční spektrometrii rozdělit do tří skupin. Jedná se o plamenovou atomizaci (FAAS), elektrotermickou atomizaci (ETAAS) a generování těkavých sloučenin (hydridů) (HGAAS) s atomizací v křemenných atomizátorech (QT-AAS) [46].

Plamenová atomizace (FAAS) se pro účely ultrastopové analýzy nehodí díky nízké účinnosti zmlžování a vysokému stupni naředění volných atomů stanovovaného prvku v plameni. Má ale i několik výhod, jako jsou nízké pořizovací náklady a velká robustnost. S různými prekoncentračními metodami lze využít plamenovou atomizaci ke stanovení velmi nízkých koncentrací např.: Cu, Cd, Pb a Zn [99,100].

Elektrotermická atomizace (ETAAS) je mnohem vhodnější technikou pro ultrastopovou analýzu zejména kovů. Atomizace probíhá nejčastěji v odporově vyhřívané grafitové kyvetě. Kyveta je během teplotního programu vyhřívána až na teplotu 2 500 °C. Výhodou je dosažení o několik řádů vyšší citlivosti než v FAAS, dále pak snadná a výhodná automatizace dávkovacího procesu a teplotního programu. Nevýhodami jsou možné interference způsobené maticí vzorku, delší doba analýzy a vyšší pořizovací i provozní cena než v případě FAAS.

Atomizace v křemenných atomizátorech se využívá v kombinaci s generováním těkavých sloučenin. Výhody hlavně spočívají v eliminaci interferentů díky oddělení stanovovaného prvku od matrice vzorku a jeho převedení do plynné fáze v podobě těkavé sloučeniny. Dosažené citlivosti, meze detekce a stanovitelnosti jsou srovnatelné s ETAAS. Omezení techniky generování těkavých sloučenin je v počtu stanovitelných prvků. Lze ji použít samozřejmě jen pro analyty, které lze převést na těkavé sloučeniny. Jako atomizátor se ve většině případů používá odporově vyhřívaný křemenný atomizátor. Detailně je popsán v kapitole 3.2.1. Další příklady atomizátorů mohou být tzv. multiatomizátor nebo atomizátor typu plamínek v křemenné trubici. Může se taktéž využít plamenových atomizátorů jako jsou miniaturní difúzní plamínek (MDF) [101] nebo plamínek stíněný inertním plynem „flame-in-gas shield“ (FIGS) [65,102]. Poslední dva jmenované atomizátory se však více uplatňují v AFS (viz kapitola 2.4.2). Inovací v atomizaci hydridů s AAS detekcí jsou plazmata nízkého výkonu pracující za atmosférického tlaku, např. dielektrický bariérový výboj (DBD) [98,103–105].

2.4.2 Atomizace v AFS

Jako první se v AFS k atomizaci využívaly klasické plameny ze směsi acetylen-kyslík a vodík-kyslík v kombinaci se zmlžováním kapalných vzorků [106]. Tato atomizace měla nevýhodu ve vysokém šumu základní linie těchto plamenů způsobeném rozptýleným zářením [107]. Proto se AFS detekce dnes využívá jen ve spojení s generováním těkavých sloučenin a jejich atomizací v miniaturizovaných plamenech, jejichž šum je nízký. Miniaturní plamínky jsou dnes nejrozšířenějšími atomizátory v AFS a můžeme je rozdělit na dva typy: miniaturní difúzní plamen (MDF) a plamínek stíněný inertním plynem (FIGS). V poslední době se jako atomizátory využívají i miniaturní plazmata např. dielektrický bariérový výboj (DBD) [47]. DBD atomizátory jsou založeny na elektrickém výboji v plynu mezi dvěma elektrodami oddělenými dielektrickou bariérou a napájenými vysokým střídavým napětím [108]. Díky jejich jednoduchosti a možnosti miniaturizace jsou DBD alternativou k dnes již hojně využívaným plamenovým atomizátorům v AFS [109–111].

FIGS má lepší citlivost v porovnání s MDF, ale experimentální uspořádání je mnohem složitější. Také náklady na provoz jsou u FIGS vyšší díky vyšší spotřebě inertního plynu (argonu) [112,113].

2.5 Speciační analýza

Je to činnost, která má za úkol identifikaci a následné stanovení jedné anebo více chemických specií ve vzorku. Chemická specie je definovaná jako specifická forma prvku podle jeho izotopického složení, elektronového nebo oxidačního stavu, nebo komplexní a oxidační struktury [114].

Existují tři základní přístupy ke speciační analýze s využitím generování hydridů případně těkavých sloučenin.

Selektivní generování těkavé sloučeniny z vybraných specií je založeno na rozdílné účinnosti konverze jednotlivých specií (dle oxidačních stavů) na příslušný hydrid. Tento přístup lze nejčastěji využít ke speciační analýze arsenu, selenu a telluru. Pro detekci lze zvolit jakoukoliv prvkově selektivní spektroskopickou metodu [52,59,115,116].

Dalším přístupem je postkolonové generování hydridů a těkavých sloučenin. Při tomto přístupu není separace založená na generování hydridů, ani na vlastnostech jednotlivých specií, ale na jejich různé afinitě ke stacionární fázi HPLC [23,35,39,117–124]. Důvodů, proč se využívá postkolonové generování ve speciační analýze je několik: zvýšení citlivosti a vzájemné potlačení interferencí při atomizaci. Nevýhodou metody je možnost využití pouze pro hydridotvorné prvky, případně pro prvky tvořící těkavé specie. Pro detekci se nejčastěji využívají techniky ICP-MS, AFS a AAS.

Posledním přístupem je generování substituovaných hydridů. Speciační analýza, která je na tomto generování založená, je použitelná pouze, když jednotlivé specie analytu mohou být převedeny na různé alkyl-substituované hydridy. Směs vygenerovaných substituovaných hydridů je separována podle svých rozdílných bodů varu. Nejčastěji je metoda generování alkyl-substituovaných těkavých sloučenin spojována se separací pomocí plynové chromatografie (GC) a nebo prekoncentrací/separací v kryogenní pasti [125]. K detekci se často používá AAS, ale lze použít i jiné atomově spektrometrické techniky.

2.5.1 Speciační analýza rtuti

V této práci byla využita separace specií rtuti pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie na reverzních fázích (RP-HPLC). V literatuře lze najít separaci specií rtuti i pomocí iontově výměnné chromatografie [126,127], většinou se ale využívá právě RP-HPLC [35,36,39]. K detekci se velmi často využívá ICP-MS, které lze nahradit

méně nákladnou AFS a v neposlední řadě také AAS. Spojení HPLC s AAS a AFS se využívá především v kombinaci s generováním těkavých sloučenin. Jako derivatizační krok je využíváno chemického, UV-fotochemického nebo elektrochemického generování studené páry rtuti.

Pro separaci specií rtuti i následné generování studené páry rtuti je velice důležitá volba mobilní fáze, kde významnou roli hraje 2-merkapt ethanol, jehož přítomnost ovlivňuje nejen separaci na koloně ale i účinnost UV-fotochemického generování [35,128,129].

2.5.2 Speciační analýza arsenu

HPLC ve spojení s hmotnostní spektrometrií s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS) je nejpoužívanější metoda pro stanovení specií arsenu [132]. Generování těkavých hydridů slouží pro zvýšení citlivosti a selektivity [47]. Díky této výhodě může být ICP-MS nahrazeno AFS, se stejnými anebo lepšími mezemi detekce [133]. Postkolonové generování těkavých sloučenin může být využito pouze pro ty specie, které jsou schopné tvořit těkavé hydridy anebo jiné těkavé sloučeniny. Jako derivatizační krok mezi HPLC a detekční technikou se nejvíce využívá chemického generování těkavých sloučenin arsenu [67,118,131]. Méně využívanou technikou je UV-fotochemické generování [89].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Chemikálie

Pro přípravu a ředění všech roztoků byla užívána deionizovaná voda z přístroje Milli Q_{PLUS} (18,2 MΩcm; Millipore, USA). Všechny chemikálie používané při experimentech byly čistoty p.a. anebo vyšší.

3.1.1 Chemikálie použité při UV-fotochemickém generování studené páry rtuti

Standardní roztoky specií rtuti (Hg(II), MeHg(I), EtHg(I) a PhHg(I)) o koncentraci 100 mg l⁻¹ Hg byly připravovány rozpuštěním příslušného množství HgCl₂ (Sigma-Aldrich, USA) v deionizované vodě a MeHgCl (Sigma-Aldrich, USA), EtHgCl (Supelco, Německo) a PhHgCl (Supelco, Německo) v ethanolu. Roztoky byly uchovávány v lednici.

Mobilní fáze byla připravena z pufru, který se skládal z CH₃COOH (Sigma-Aldrich, Německo) a CH₃COONa (Sigma-Aldrich, Německo), dále potom z C₂H₅OH (Merck, Německo, Uvasol) a 2-merkaptoethanolu (Sigma-Aldrich, Německo). Mobilní fáze byla připravována každodenně čerstvá a vzorek jí byl naředěn na požadovanou koncentraci.

Extrakční činidlo bylo složeno z kyseliny chlorovodíkové (37%, Merck, Německo) a hydroxidu tetramethylamonného (25%, Sigma-Aldrich, USA). Jako nosný plyn byl po celou dobu využíván Ar o čistotě 4.8 (Linde Gas, ČR).

3.1.2 Chemikálie použité při EcVG studené páry rtuti

Standardní roztoky specií rtuti byly použity stejné jako pro UV-fotochemické generování.

Pro katodový roztok byla použita 0,5M HCl (Merck, Německo) a jako anodový roztok byla použita 2M H₂SO₄ (Merck, Německo).

3.1.3 Certifikované referenční materiály pro rtuť

Pro ověření přesnosti metody HPLC-UV-PVG-QTAAS byly analyzovány dva certifikované referenční materiály. Jednalo se o ERM-CE464 (tuňák, Sigma-Aldrich, Německo) o obsahu $\text{CH}_3\text{Hg(I)}$ ($5,50 \pm 0,17$) mg kg^{-1} a DOLT-4 (játra malého žraloka, National Research Council of Canada, Kanada) o obsahu Hg ($2,58 \pm 0,22$) mg kg^{-1} a z toho $\text{CH}_3\text{Hg(I)}$ ($1,33 \pm 0,12$) mg kg^{-1} .

3.1.4 Reálné vzorky pro speciální analýzu rtuti

Byly analyzovány vzorky ryb odlovené v roce 2012 z údolní nádrže Pastviny na Divoké Orlici v ČR. Jednalo se o oblast, kde se díky průmyslovému zatížení předpokládala zvýšená koncentrace rtuti v životním prostředí. Konkrétně byly použity vzorky svaloviny ze dvou druhů ryb: jelce tlouště a candáta obecného. Popis extrakční procedury je popsán v kapitole 3.3.6.

3.1.5 Chemikálie použité při UV-PVG arsenu

100 mg l^{-1} byly připraveny rozpuštěním příslušného množství oxidu arsenitého (99,5 %, Sigma–Aldrich, USA) v slabě zásaditém prostředí (KOH, o čistotě 89,0 %, Lach-Ner, ČR), hexahydrátu methylarsenitanu disodného (Supelco, USA) a kyseliny dimethylarseničné (Supelco, USA) v deionizované vodě. Standardní roztok As(V) byl připraven naředěním zásobního standardního roztoku (Merck, Německo) o koncentraci 1 000 mg l^{-1} deionizovanou vodou.

Jako fotochemické činidlo byla používána kyselina mravenčí. Požadovaná koncentrace byla připravena ředěním HCOOH ($\geq 98\%$ puriss. p.a.; Sigma-Aldrich, USA). Bismut ($1000 \text{ mg l}^{-1} \text{ Bi}_2\text{O}_3$ v $2 \text{ mol l}^{-1} \text{ HNO}_3$, Merck, Německo) anebo antimón ($1000 \text{ mg l}^{-1} \text{ Sb}_2\text{O}_3$ v $2 \text{ mol l}^{-1} \text{ HCl}$, Merck, Německo) byly použity jako reakční modifikátory pro zvýšení analytického signálu arsenu, které byly připraveny ze zásobních roztoků naředěním na příslušnou koncentraci pomocí deionizované vody nebo mobilní fáze.

K čištění křemenného atomizátoru a UV-generátoru byla použita kyselina fluorovodíková (Analpur S.D.; Analytika, Praha, ČR) nebo kyselina dusičná (65%, p.a.; Merck, Německo).

Jako nosný plyn byl použit argon o čistotě 4.8 (Linde Gas, ČR). Vodík čistoty 99,0 % (Linde Gas, ČR) byl použit jako reakční plyn během UV-fotochemického generování, kde napomáhal vzniku, popř. převodu těkavých sloučenin do plynné fáze a v atomizátoru k atomizaci.

3.2 Použité přístroje a zařízení

3.2.1 Atomový absorpční spektrometr

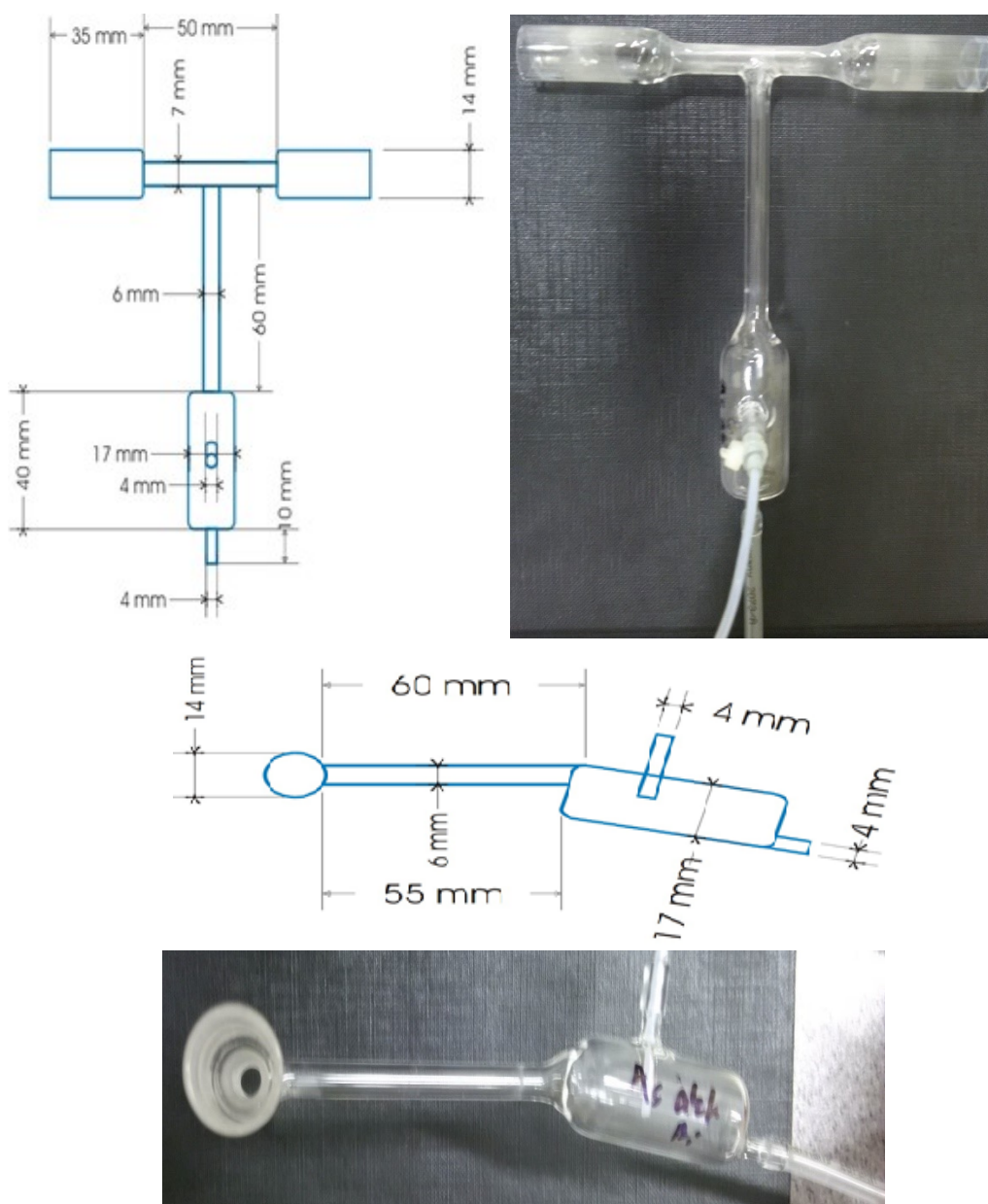
K detekci vygenerovaných těkavých sloučenin byl používán atomový absorpční spektrometr s kontinuálním zdrojem záření (Xe lampa) a vysokou rozlišovací schopností ContrAA 700 (Analytik Jena, Německo). Pro detekci studené páry rtuti byla využita charakteristická vlnová délka 253,6519 nm a pro detekci těkavých sloučenin arsenu 193,696 nm. Pro vyhodnocení byly používány 3 pixely (centrální ± 1) CCD detektoru. K detekci studené páry rtuti sloužila křemenná detekční trubice (QT) vyhřívaná na 150 °C kombinovaná se separátorem fází (GLS). Vnitřní objem separátoru fází byl 9 ml. (Obr. 2).

K detekci a atomizaci těkavých sloučenin arsenu byl použit křemenný atomizátor (QF) s GLS s nuceným odtahem, stejné konstrukce jako pro detekci studené páry. Rozdíl byl pouze v teplotě. Atomizátor byl vyhříván na 950 °C (Obr. 2).

3.2.2 Atomový fluorescenční spektrometr

Jako srovnávací detekční metoda byl využit atomový fluorescenční spektrometr PSA Millenium Excalibur (PSA, UK). Atomizačním prostředím byl miniaturizovaný argon-vodíkový difúzní plamen, použitý atomizátor a separátor fází byly typy komerčně vyráběné pro AFS přístroj Millenium Excalibur. Vnitřní objem GLS byl 29 ml.

Pro stanovení rtuti byl využit speciální systém PSA 10.045 Millennium Merlin Satellite.



Obr. 2: Atomizátor se separátorem fází s nuceným odtahem používaný ve spojení s AAS detekcí

3.2.3 HPLC systém a kolona

Speciální analýzy rtuti probíhaly na kapalinovém chromatografu UHPLC Dionex Ultimate RS3000 (Thermo Fisher Scientific, USA) s QTAAS detekcí. Separace sloučenin rtuti probíhala na koloně Phenomenex Gemini® o velikosti částic 3 μ m, i.d.

kolony 3 mm a velikosti pórů 110 Å a délce kolony 250 mm. Kolona má stacionární fázi C18 a je stabilní v rozsahu pH 1-12.

3.2.4 UV-fotochemický generátor

Pro generování těkavých sloučenin byl využit průtokový UV-fotochemický generátor. Ten se skládal ze zdroje záření, napájecího zdroje a reakční cívky, která byla připevněna ke zdroji záření.

3.2.4.1 Zdroj záření

Jako zdroj záření sloužila nízkotlaká rtuťová výbojka, přičemž v práci byly použity dvě výbojky různých rozměrů a výkonů.

Pro generování studené páry rtuti byla zvolena nízkotlaká rtuťová výbojka (20 W, Ushio, Japonsko) trubcovitého tvaru. Rozměry výbojky byly následující: 590 mm x 35 mm (průměr). Z jejího emisního spektra byla nejvíce využívána vlnová délka 253,7 nm odpovídající vlnové délce nejintenzivnější čáry rtuti. Napájecí zdroj pro výbojku byl zhotoven vlastnoručně v laboratoři z komerčně dostupného zdroje pro kuchyňskou zářivku Modus SB18 (Modus s.r.o., CZE) (Obr. 3A). Výbojka byla obalena hliníkovou fólií a byla umístěna do trubice z tvrdého kartonu pro ochranu operátora před UV zářením. Tento zdroj sloužil především pro generování studené páry rtuti, byl však využit i pro generování těkavých sloučenin arsenu. Pro generování těkavých sloučenin arsenu byla testována stejná výbojka jako pro rtuť, avšak ta se neosvědčila.

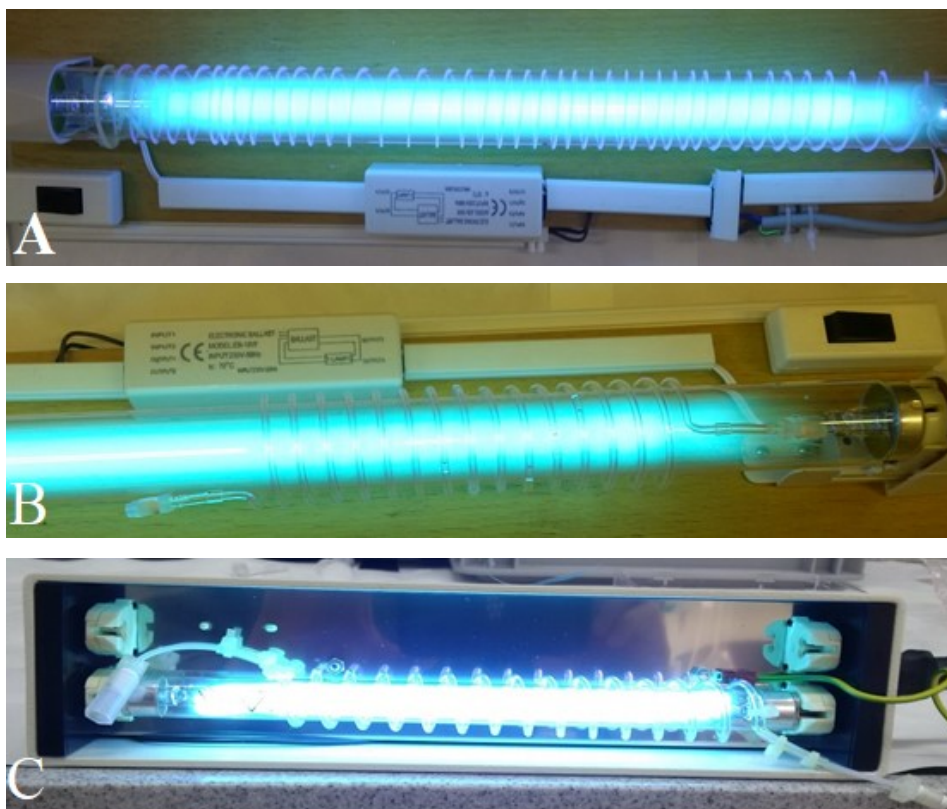
Další testovanou výbojkou pro generování těkavých sloučenin arsenu byla výbojka o charakteristické vlnové délce 254 nm (6 W, A.Krüss Optronic, Germany). Rozměry výbojky byly 212 mm x 160 mm (průměr). Jako napájecí zdroj byl využit komerční zdroj dodávaný k výbojce (Obr. 3C).

3.2.4.2 Reakční cívka

Reakční cívka byla vyrobena z teflonové trubičky (Obr. 3A) nebo křemenné kapiláry (Obr. 3B). Pro UV-fotochemické generování studené páry rtuti byla využita PTFE hadička. Teflonová hadička měla rozměry 1,0 mm i.d./2,0 mm o.d. a délce 1 m

(Supelco, USA). Teflonová trubička byla omotána co nejpevněji okolo rtuťové výbojky (Obr. 3A).

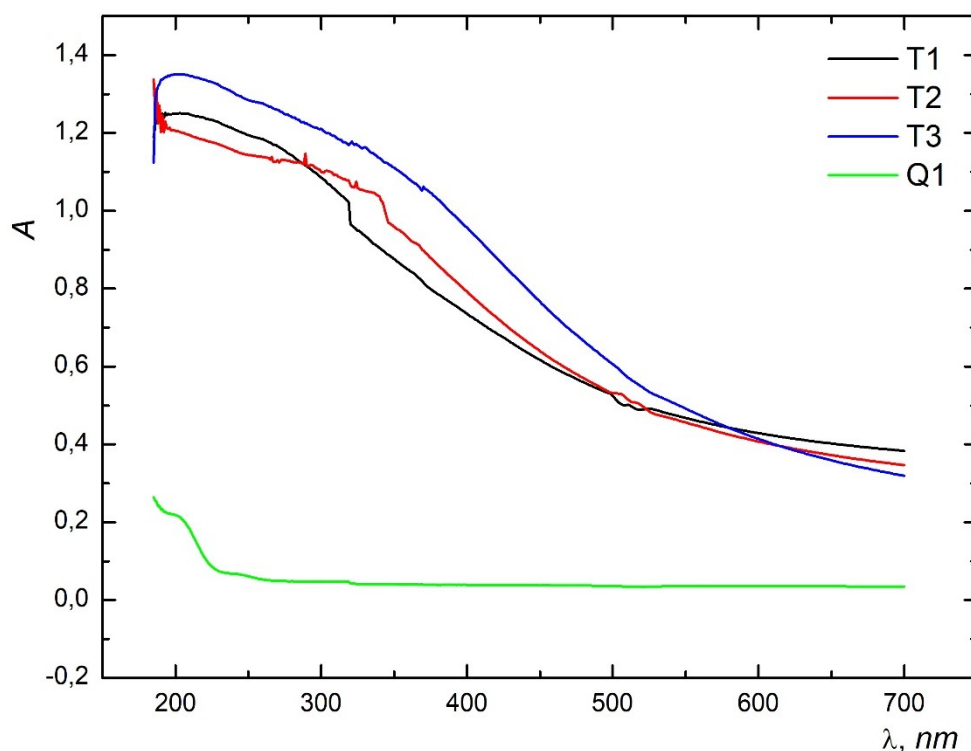
Pro generování těžkých sloučenin arsenu byla využita zejména křemenná kapilára. Křemenná kapilára měla rozměry 1,2 mm i.d./3,0 mm o.d. (Wechance Co., Limited, Čína). Jednalo se o spirálovitě stočenou křemennou trubičku, která se co nejtěsněji dotýkala stěny výbojky. Byly zhotoveny dvě velikosti spirál: pro malou výbojku (Obr. 3C) a pro velkou výbojku (Obr. 3B). Trubičky byly vyrobeny na zakázku a délka reakční cívky byla dána násobkem délky nejmenšího kusu, který byl 0,5 m. Bylo možné zkonstruovat délky 0,5; 1; 1,5 a 2 m na výbojku o výkonu 20 W. Výbojka s výkonem 6 W byla limitována svou velikostí a zde bylo možné pracovat s délkami reakční cívky 0,5 a 1 m.



Obr. 3: UV-fotochemické generátory

UV-fotochemický generátor byl složen z nízkotlaké rtuťové výbojky a vlastního reaktoru. A) UV-generátor tvořený teflonovou hadičkou a výbojkou (20 W, 253,7 nm); B) UV-generátor tvořený křemennou kapilárou a výbojkou (20 W, 253,7 nm); C) UV-generátor tvořený křemennou kapilárou a výbojkou (6 W, 253,7 nm)

Pomocí molekulového absorpčního spektrometru Specord 210plus (Analytick Jena) byly změřeny propustnosti jednotlivých materiálů použitých pro konstrukci reakční cívky. Porovnání propustnosti UV záření jednotlivých PTFE hadiček (rozdílných rozměrů) a křemenného sklíčka (stejná tloušťka jako tloušťka stěny trubiček) je ukázáno na Obr. 4. Experimenty potvrdily, že křemen je pro UV-záření propustnější než teflon. Pokusy také dokazují, že není příliš velký rozdíl v propustnosti různých teflonových trubiček. Průměr a délka má významnější vliv na dobu ozařování vzorku a na rychlost průtoku vzorku cívkou. Měření probíhalo přes jednu stěnu teflonové trubičky.

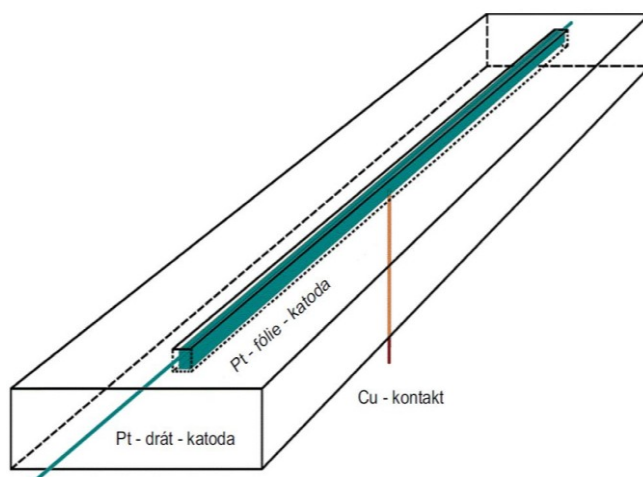


Obr. 4: Absorbance jednotlivých materiálů pro elektromagnetické záření

T1 teflon o rozměrech: i.d. 0,8 o.d. 1,6; *T2* teflon o rozměrech: i.d. 1,0 o.d. 2,0; *T3* teflon o rozměrech: i.d. 0,5 o.d. 1,5; *Q1* křemenné sklíčko o tloušťce: 1,8 mm

3.2.5 Elektrochemická generační cela

Pro elektrochemické generování studené páry rtuti byla použita tenkovrstvá elektrochemická generační cela. Byla tvořena ze dvou bloků plexiskla (Řempe Net, ČR) se dvěma elektrodovými prostory (3 x 3 x 100 mm), které byly vzájemně odděleny iontově výměnnou membránou Nafion® 117 (Aldrich, USA) a sešroubovány k sobě pomocí šesti šroubů. Katoda byla tvořena platinovým drátkem o délce 100 mm a průměru 1,0 mm, aktivní plocha byla 300 mm² (99,99 %, Goodfellow, UK), dále potom platinovým plíškem ze stejného materiálu v průřezu tvaru „U“ o rozměrech 100×9 mm a tloušťce 0,25 mm, s aktivním povrchem 900 mm², který byl vlepěný do katodového prostoru a byl připájený k měděnému kontaktu. Celkový povrch katody tedy činil 1200 mm². Platinový plíšek o rozměrech 100×3 mm, tloušťce 0,25 mm a povrchu 300 mm² byl použit jako anoda (Obr. 5).



Obr. 5: Katodový prostor elektrochemické cely pro generování studené páry rtuti

3.2.6 Ostatní přístroje a zařízení

Pro čerpání kapalných činidel a k odtahu kapalně fáze do odpadu sloužila peristaltická pumpa Masterflex (Cole-Parmer, USA). Průtokové rychlosti nosných plynů přidávaných do aparatury byly regulovány pomocí digitálních regulátorů hmotnostního průtoku (Cole-Parmer, USA).

K manuálnímu dávkování vzorku byl využit šesticestný dávkovací ventil FIA V-451 (Upchurch Scientific, USA) se 100 μ l dávkovací smyčkou. Pro konstrukci aparatur byly použity teflonové hadičky (Sigma-Aldrich, USA) a tygonové čerpací hadičky (Cole-Parmer, USA) o různých průměrech. Spojovací prvky byly z polypropylenu (Supelco, USA).

Pro přípravu (extrakci) vzorků byla použita ultrazvuková lázeň Elmasonic S, E 30 H (ELMA, Německo), k filtraci extraktů injekční filtry o průměru 47 mm s membránou z regenerované celulózy o porozitě 0,45 μ m (Whatman, UK) a injekční stříkačka o objemu 10 ml (Hamilton, USA). Pro vážení všech pevných činidel byly použity analytické váhy RC210D (Sartorius, USA). Pro centrifugaci vyextrahovaného analytu byla použita centrifuga Carl Roth (500 – 12500 ot./min, P-LAB, Česká Republika).

Jako zdroj stejnosměrného elektrického proudu pro elektrochemickou generační celu sloužil laboratorní zdroj LPS 303 (American Reliance, Taiwan).

3.3 Experimentální uspořádání a pracovní postupy

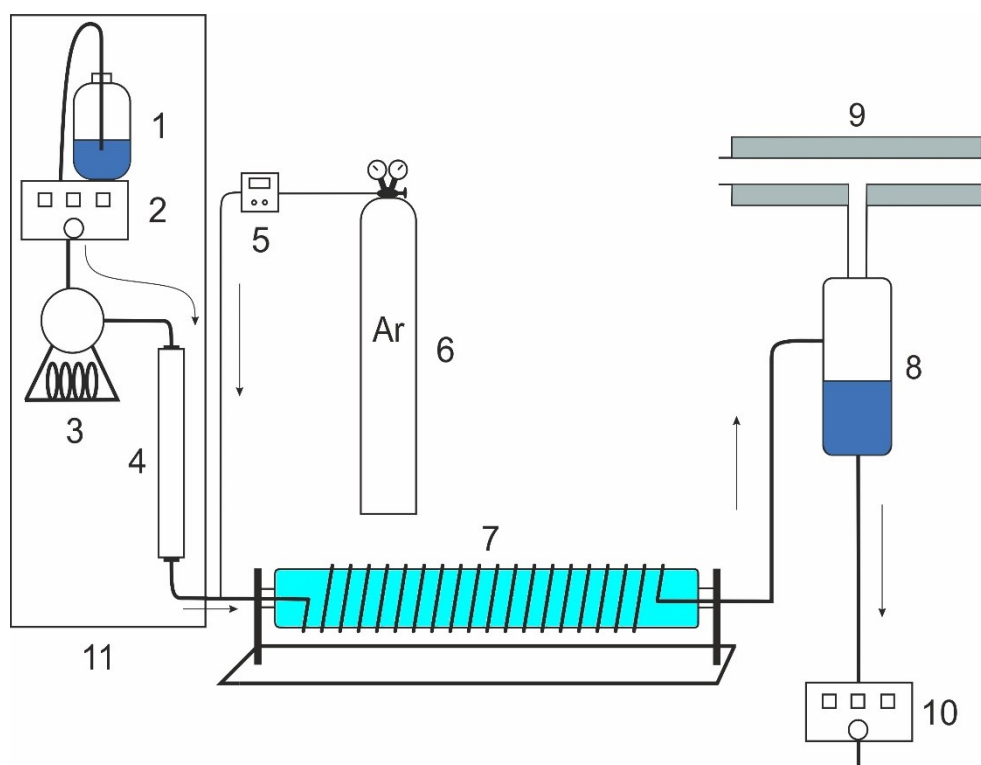
3.3.1 Konstrukce UV-fotochemického generátoru

V první fázi výzkumu byl sestaven UV-fotochemický generátor, který následně tvořil interface mezi vysokoúčinným kapalinovým chromatografem a atomovým absorpčním spektrometrem ContrAA700 s vyhřívanou detekční trubicí (HPLC-UV-PVG-QTAAS) pro stanovení specií rtuti. UV-fotochemický generátor byl tvořen reakční cívkou pevně přichycenou k povrchu zdroje UV záření.

Trochu jiná konstrukce generátoru byla zvolena pro UV-fotochemické generování těkavých sloučenin arsenu.

3.3.2 UV-fotochemické generování studené páry rtuti v kombinaci s HPLC a detekcí AAS

UV-fotochemické generování bylo využito jako derivatizační metoda pro spojení HPLC s AAS detekcí k on-line separaci a stanovení vybraných sloučenin rtuti ve směsi. Schéma aparatury je na Obr. 6. Mobilní fáze byla čerpána za pomoci čerpadla HPLC systému. Vzorek byl nadávkován do toku mobilní fáze a následně rozdělen na koloně. Nosný plyn byl zaváděn do proudu mobilní fáze hned za výstup z kolony. Separovaný vzorek byl dále transportován pomocí toku nosného plynu (argonu) do UV-fotochemického generátoru (viz kapitoly 3.2.4.1 a 3.2.4.2 a Obr. 3), kde byla v důsledku UV záření generována studená pára rtuti. Reakční směs byla dále unášena pomocí nosného plynu do separátoru fází s nuceným odtahem, kde se oddělila kapalná a plynná fáze. Kapalná fáze byla čerpána pomocí peristaltické pumpy do odpadu, plynná fáze byla proudem argonu unášena do křemenné detekční trubice vyhřívané na 150 °C. Předběžné experimenty zaměřené na optimalizaci podmínek UV-fotochemického generování studených par rtuti z různých specií Hg byly provedeny ve zjednodušeném experimentálním uspořádání, kdy HPLC systém byl nahrazen peristaltickou pumpou s nízkotlakým šesticestným ventilem a vzorek byl do fotochemického generátoru dávkován v režimu FIA. Toto uspořádání je popsáno v kapitole 3.3.5.

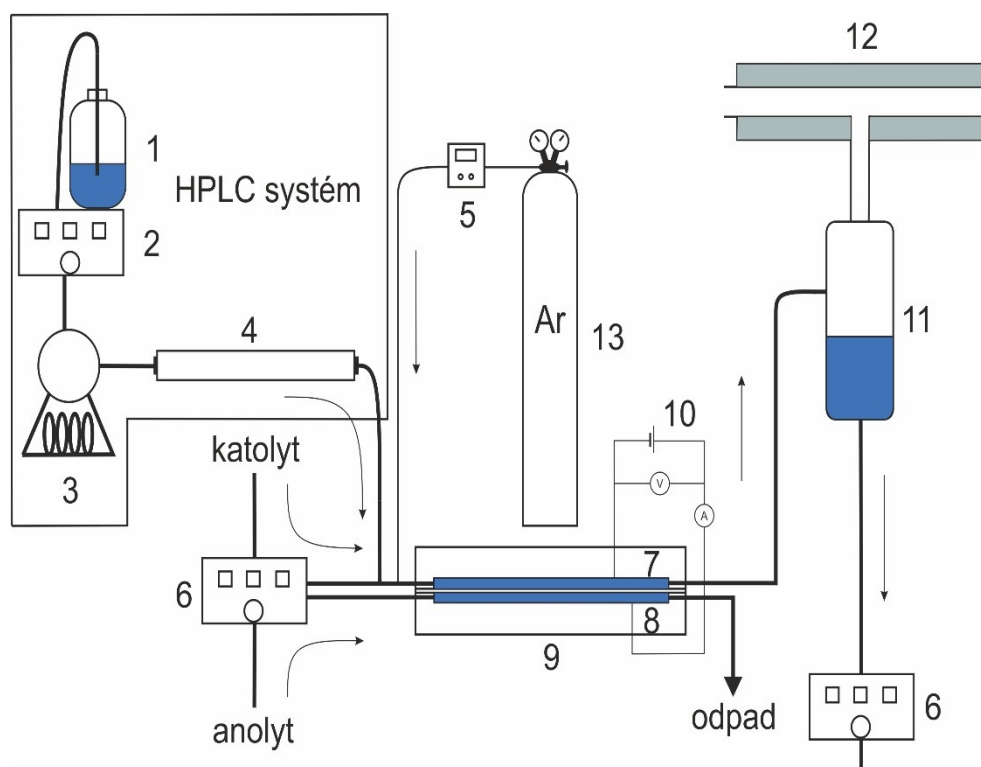


Obr. 6: Schéma aparatury pro HPLC-UV-PVG-QTAAS pro speciální analýzu rtuti
 1 – zásobník mobilní fáze; 2 – vysokotlaká pumpa HPLC systému; 3 – autosampler HPLC systému; 4 – chromatografická kolona; 5 – digitální regulátor průtoku plynu; 6 – láhev se stlačeným s argonem; 7 – UV-fotochemický generátor; 8 – separátor fází; 9 – detekční trubice AAS; 10 – peristaltická pumpa; 11 – HPLC systém

3.3.3 Elektrochemické generování studené páry rtuti

Pro elektrochemické generování studené páry rtuti z vybraných sloučenin bylo použito stejné zapojení aparatury jako v případě pro UV-fotochemické generování, kde byl UV-fotochemický generátor vyměněn za elektrochemickou celu. Daná aparatura je znázorněna na Obr. 7. Katodový roztok (HCl) a anodový roztok (H₂SO₄) byly čerpány vždy stejnou rychlostí pomocí peristaltické pumpy do příslušných prostorů elektrochemické generační cely. Nosný plyn spolu s plynnými produkty katodové redukce byly transportovány do separátoru fází a dále do detekční trubice vyhřívané na 150 °C. Předběžné experimenty zaměřené na optimalizaci podmínek elektrochemického generování studených par rtuti z různých specií Hg byly provedeny opět ve zjednodušeném experimentálním uspořádání. HPLC systém byl nahrazen peristaltickou

pumpou s nízkotlakým šesticestným ventilem a vzorek byl do fotochemického generátoru dávkován v režimu FIA.



Obr. 7: Aparatura pro elektrochemické generování studené páry rtuti (HPLC-EcVG-QTAAS)

1 – zásobník s mobilní fází; 2 – vysokotlaká pumpa HPLC systému; 3 – autosampler HPLC; 4 – HPLC kolona; 5 – digitální regulátor průtoku plynu; 6 – peristaltická pumpa; 7 – katoda; 8 – anoda; 9 – elektrochemická generační cela; 10 – zdroj napětí pro celu; 11 – separátor fází; 12 – křemenná detekční trubice; 13 - tlaková láhev s argonem

3.3.4 Extrakce rtuti

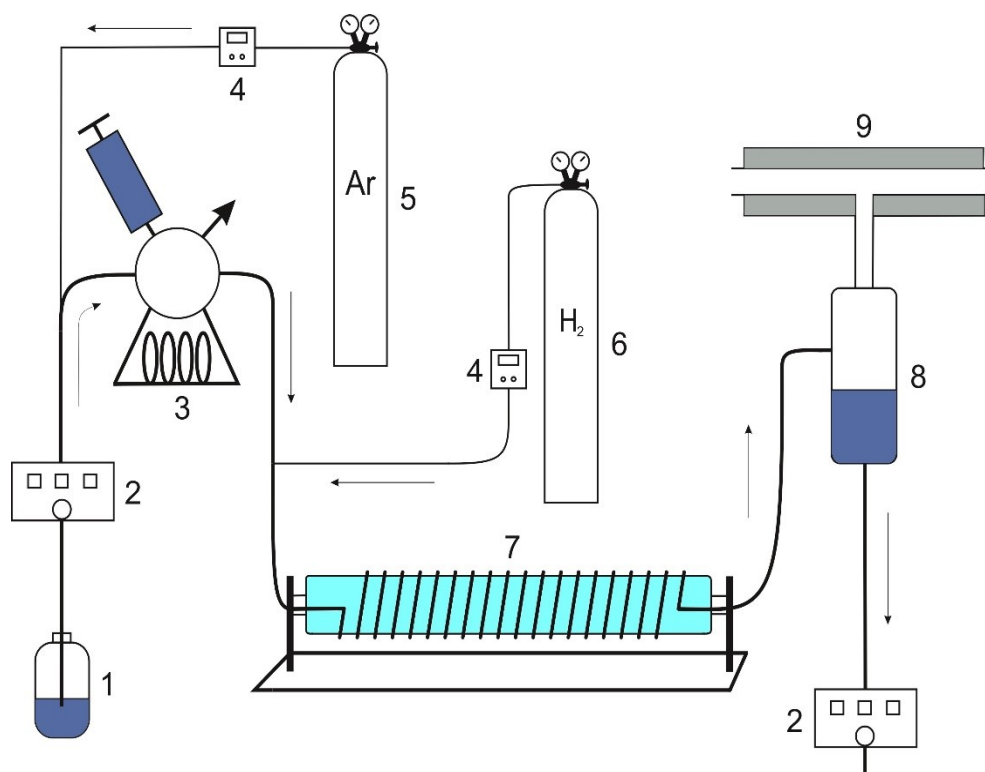
V rámci této práce bylo testováno celkem devět různých extrakčních postupů specií rtuti ze svaloviny ryb a certifikovaných referenčních materiálů. Zkoušené extrakční metody shrnuje tabulka číslo 4 v kapitole 4.3.

Jako nejlepší byl vybrán postup extrakce pomocí směsi $0,05 \text{ mol l}^{-1}$ HCl a 6,25 % (v/v) TMAH. Extrakce specií rtuti ze vzorků probíhala za zvýšené teploty v topném

hnízdě a pod zpětným chladičem. Bylo odváženo přesně asi 200 mg vzorku. Do varné baňky byl umístěn předem zvážený vzorek a bylo přidáno extrakční činidlo (2 ml). Byl instalován zpětný chladič, do kterého byla přiváděna studená voda. Vzorek byl po dobu 30 minut zahříván na teplotu přibližně 75 °C. Poté byl extrakt centrifugován po dobu 30 minut při 12 500 rpm a supernatant byl kvantitativně převeden přes injekční filtr do vialky.

3.3.5 UV-fotochemické generování těkavých sloučenin arsenu

Aparatura pro UV-fotochemické generování těkavých sloučenin arsenu ve FIA režimu je znázorněna na Obr. 8. Vzorek připravený v deionizované vodě byl pomocí nízkotlakého šesticestného ventilu dávkován do proudu roztoku nízkomolekulární organické kyseliny s přidavkem reakčního modifikátoru. Roztok organické kyseliny byl kontinuálně čerpán do aparatury pomocí peristaltické pumpy. Do proudu organické kyseliny byl před dávkovací ventil zaveden nosný plyn (argon). Za dávkovací ventil, avšak před UV reaktor byl zaveden tok vodíku – reakčního plynu. Vygenerovaná těkáva sloučenina arsenu byla transportována pomocí obou plynů do separátoru fází, kde došlo k jejímu oddělení od kapalně matrice a následně k detekci As v atomizátoru vyhřívaném na 950 °C. Kapalná fáze byla pomocí peristaltické pumpy čerpána do odpadu.



Obr. 8: Schéma aparatury pro UV-PVG-QFAAS ve FIA módu pro generování těkavých sloučenin arsenu

1 – zásobník s roztokem kyseliny mravenčí; 2 – peristaltické čerpadlo; 3 – dávkovací ventil s dávkovací smyčkou (100 μ l); 4 – digitální regulátor průtoku plynu; 5 – tlaková láhev s argonem; 6 – tlaková láhev s vodíkem; 7 – UV-fotochemický generátor; 8 – separátor fází; 9 – externě vyhřívaný křemenný atomizátor AAS

3.3.6 Vyhodnocení a zpracování dat

K záznamu dat byl použit program ASpectCS. V tomto softwaru není modul HPLC komerčně dostupný a byl poskytnut dodavatelem jako pilotní verze pro detekci v HPLC režimu. Sběr dat probíhal v co nejkratším možném čase a s co nejmenším možným počtem bodů za sekundu, protože software nezvládal přenos velkého množství dat. Záznam ve FIA režimu byl záznam dlouhý 3 minuty a záznam v HPLC módu byl dlouhý 10 minut. Signál byl vyjádřen ve formě bezrozměrné veličiny absorbance. Další programy použité pro zpracování naměřených dat byly od Microsoft Office (Microsoft Corporation, USA): Word a Excel.

Import dat byl napřed proveden do Microsoft Excel a následně do Microcal Origin 8.1 Profesional (Microcal Software Inc., USA), který byl použit pro integraci píků a

FIA záznamů. Měření bylo za stejných podmínek opakováno třikrát. Body, které jsou vyneseny v grafech, jsou aritmetické průměry z naměřených hodnot. Chybové úsečky pro dané body znázorňují směrodatné odchylky.

Kalibrace byla provedena za optimálních pracovních podmínek. Byla připravena série standardů o vzrůstající koncentraci specií rtuti či arsenu. Z naměřených hodnot byla sestrojena kalibrační závislost plochy píku na koncentraci dané specie. Následně byla regresní analýzou získána rovnice regrese. Obecná rovnice pro lineární funkci je:

$$y = a + bx \quad (22)$$

kde y je odezva přístroje, x je koncentrace analytu, b je směrnice přímky (sklon regresní přímky) a a je signál vzorku (úsek) neobsahujícího analyt (teoreticky by měl být nulový).

Citlivost je jednou z nejdůležitějších vlastností měřícího přístroje. Je definována jako odezva analytického přístroje vztažená oproti změně měřené veličiny. Je směrnicí kalibrační závislosti v lineárním rozsahu. Je vyjádřena vztahem:

$$S = \frac{dy}{dx} \quad (23)$$

kde y značí odezvu a x měřenou veličinu. Ve všech uváděných výpočtech bylo vyhodnocováno z ploch píků.

Mez detekce je definována jako nejnižší koncentrace analytu ve vzorku, kterou lze danou analytickou metodou rozpoznat od slepého pokusu (blanku). Vybrána byla koncentrace, která byla jasně odlišitelná od šumu základní linie. Mez detekce byla určena jako trojnásobek směrodatné odchylky signálů modelového vzorku o této koncentraci σ vydělené směrnicí kalibrační závislosti b podle vzorce:

$$LOD = \frac{3 \cdot \sigma}{b} \quad (24)$$

kde sigma je směrodatná odchylka a b je konstanta. Podobným způsobem lze určit i **mez stanovitelnosti**. Ta je definována jako nejmenší koncentrace analytu ve vzorku, kterou lze stanovit s určitou pravdivostí a precizností za daných podmínek měření [132]. Je vyjádřena rovnicí:

$$LOQ = \frac{10 \cdot \sigma}{b} \quad (25)$$

Ve všech uváděných výpočtech bylo vyhodnocováno z ploch píků.

Opakovatelnost je vyjádřena jako relativní směrodatná odchylka (RSD, %) deseti měření vzorku o stejné koncentraci analytu. Koncentrace byla volena v lineárním rozsahu kalibrační křivky. Získané hodnoty absorbance byly přepočteny na koncentraci a z těchto hodnot byl vypočten aritmetický průměr a směrodatná odchylka. Opakovatelnost byla vyjádřena jako podíl směrodatné odchylky (σ) a aritmetického průměru (\bar{x}) vynásobený stokrát pro vyjádření v %.

$$\text{RSD} = 100 \cdot \frac{\sigma}{\bar{x}} \quad (26)$$

4 Výsledky a diskuze

Jednotlivé podkapitoly jsou věnovány stručnému shrnutí nejdůležitějších výsledků dosažených v oblasti generování studené páry rtuti a jejich aplikace pro speciální analýzu rtuti (4.1 až 4.3) a UV-fotochemického generování těžkých sloučenin arsenu (kapitola 4.4). Podrobné informace obsahují publikace v odborných časopisech (**Přílohy 1 a 3**).

4.1 Speciální analýza rtuti pomocí RP-HPLC-UV-PVG-QTAAS

V experimentech provedených již dříve na školícím pracovišti sice byly nalezeny optimální podmínky pro speciální analýzu rtuti pomocí metody RP-HPLC-UV-PVG-QTAAS [133], avšak s použitím konvenčního AAS spektrometru (Varian, Austrálie) s čárovým zdrojem záření (výbojka s dutou katodou). Navíc použitelnost metody byla demonstrována pouze na vzorcích s jednoduchou maticí pitné a říční vody [133]. Cílem této části práce bylo ověřit, zda jsou dříve nalezené optimální experimentální podmínky vhodné i pro spojení s AAS spektrometrem s kontinuálním zdrojem záření a vysokou rozlišovací schopností (ContrAA700). Za ověřených optimálních podmínek pak bylo nutné stanovit základní analytické charakteristiky metody a porovnat je s těmi získanými v předešlých pracích [133,134].

Takto ověřená metoda byla následně využita pro stanovení specií rtuti v reálných vzorcích ryb a certifikovaných referenčních materiálech. Nejprve bylo nutné najít spolehlivou metodu extrakce specií rtuti ze vzorků s takto komplikovanou maticí, neboť nejběžněji používanou extrakci pomocí L-cysteinu nelze v kombinaci s UV-fotochemickým generováním použít kvůli negativnímu vlivu tohoto extrakčního činidla na účinnost generování studené páry rtuti z jednotlivých specií. Výsledky stanovení byly porovnány s výsledky, které byly stanoveny referenční metodou HPLC-ICP-MS.

4.1.1 Optimální podmínky pro speciální analýzu rtuti pomocí RP-HPLC-UV-PVG-QTAAS

Podrobná optimalizace podmínek separace a UV-fotochemického generování jednotlivých specií rtuti včetně diskuse a výsledků je uvedena v článku, který je **Přílohou 3** této práce.

Jako optimální experimentální podmínky byly zvoleny kompromisní hodnoty získané měřeními UV-PVG-QTAAS ve FIA režimu (tj. bez chromatografické separace) a následně po připojení HPLC systému. Výsledné hodnoty všech optimalizovaných parametrů jsou uvedeny v Tab. 1 a 2.

Tab. 1: Složení mobilní fáze pro stanovení specií rtuti pomocí metody RP-HPLC-UV-PVG-QTAAS

Parametr	Optimální hodnota
Objemové procento ethanolu (v/v) (%)	40
Objemové procento 2-mercaptoethanolu (v/v) (%)	0,1
Koncentrace CH ₃ COOH/CH ₃ COONa (mmol l ⁻¹)	20/20
pH	4,75

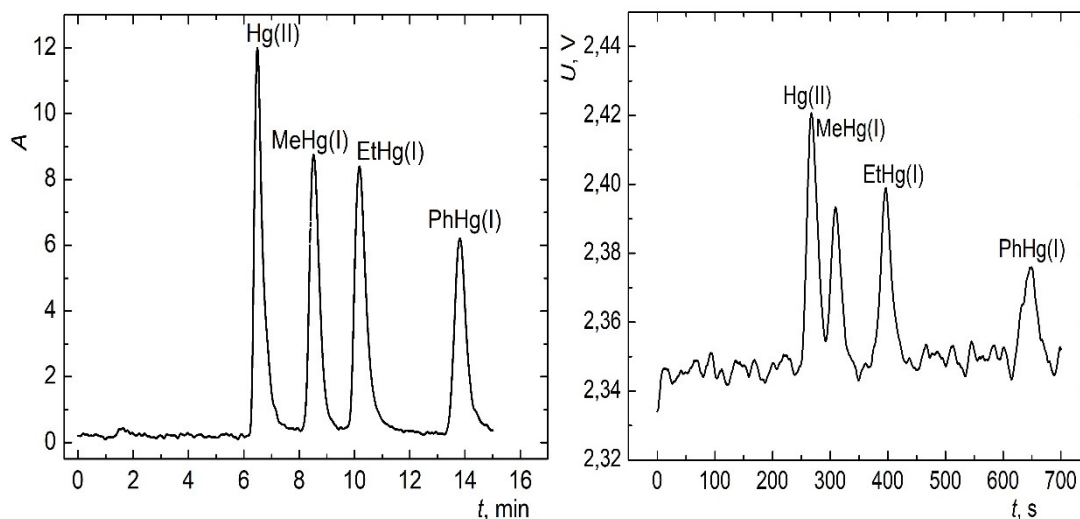
Tab. 2: Optimální pracovní podmínky pro stanovení specií rtuti pomocí metody RP-HPLC-UV-PVG-QTAAS

Parametr	Optimální hodnota
Průtoková rychlost argonu (ml min ⁻¹)	95
Průtoková rychlost mobilní fáze (ml min ⁻¹)	0,3
Dávkovaný objem (μl)	50
Teplota vyhřívání kolony (°C)	40
Teplota detekční trubice (°C)	150
Rozměry reakční cívky (mm)	1000 x 0,1 i.d. x 0,2 o.d.

Porovnání dvou chromatogramů naměřených za optimálních podmínek s detekcí pomocí AAS spektrometru Varian SpectrAA300 s čárovým zdrojem záření [133] a s využitím spektrometru ContrAA700 s kontinuálním zdrojem záření a vysokou rozlišovací schopností je zobrazeno na Obr. 9. Z obrázku vyplývá, že při stejné koncentraci specií rtuti jsou signály naměřené spektrometrem ContrAA700 vyšší a mají lepší poměr signál šum.

Použitím delší kolony vedlo k lepšímu rozlišení píků oproti krátké koloně, kde nebylo dosaženo separace Hg(II) a MeHg(I) na základní linii. Experimentálně bylo zjištěno, že nebylo možné zlepšit rozlišení jinak než změnou délky kolony při zachování stejného

separačního mechanismu. Díky tomu analýza trvala delší dobu. Použitím citlivější a selektivnější detekce (HR-CS-AAS) vedlo ke zlepšení poměru signálu k šumu Obr. 9. Zpracování dat se na jednotlivých spektrometrech lišilo, proto nebylo možné přesné porovnání výšky a plochy píků.



Obr. 9: Porovnání chromatogramů při koncentraci všech specií rtuti $50 \mu\text{g l}^{-1}$ získaných za stejných experimentálních podmínek:

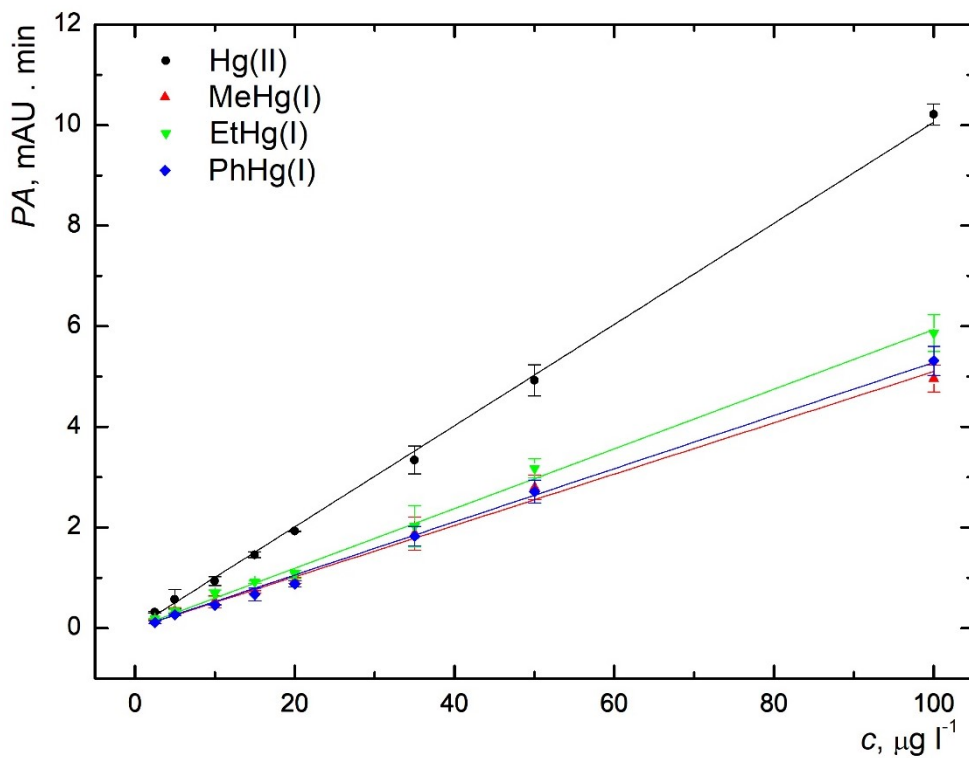
Vlevo: AAS ContrAA700; kolona Phenomenex Gemini® o velikosti částic $3 \mu\text{m}$, i.d. kolony 3 mm a délce kolony 250 mm

Vpravo: AAS SpectrAA300 Varian; kolona Gemini o velikosti částic $5 \mu\text{m}$, i.d. kolony 2,4 mm a délka 150 mm.

4.1.2 Základní charakteristiky metody

Za optimálních pracovních podmínek uvedených v Tab. 1 a 2 byly zjištěny základní analytické charakteristiky metody RP-HPLC-UV-PVG-QTAAS pro stanovení specií rtuti. Základní charakteristiky byly porovnány s hodnotami dosaženými v minulých experimentech s použitím konvenčního AAS přístroje s čárovým zdrojem záření a publikovaných v diplomové práci [133]. Kalibrační závislosti jsou zobrazeny na Obr. 10. V Tab. 3 je patrné, že s použitím spektrometru ContrAA700 lze dosáhnout přibližně 20-krát lepších a v případě MeHg(I) až 40-krát lepších mezí detekce než s použitím spektrometru Varian SpectrAA300. Citlivosti stanovení na obou přístrojích

nelze z důvodu různých jednotek vzájemně jednoduše porovnat. Pro využití ContrAA700 hovoří vyšší odstup signálu od šumu základní linie a z toho důvodu i širší možný pracovní rozsah.



Obr. 10: Kalibrační závislosti – stanovení specií rtuti pomocí RP-HPLC-UV-PVG-QTAAS pro ContrAA700

$Q_{Ar} = 95 \text{ ml min}^{-1}$; $Q_{MF} = 0,3 \text{ ml min}^{-1}$; $V_{vz} = 50 \mu\text{l}$; $\varphi_{EtOH} = 40 \%$ (v/v); $t_{kolony} = 40 \text{ }^\circ\text{C}$;

$c_{\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}} = 20 \text{ mmol l}^{-1}$; $\text{pH } 4,5$; $\varphi_{ME} = 0,1 \%$

4.2 Detekce pomocí AFS

S cílem zlepšit citlivost stanovení byla využita AFS jako detekční metoda pro stanovení specií rtuti pomocí RP-HPLC-UV-PVG. Pro stanovení rtuti pomocí AFS byl využit speciální systém popsáný v kapitole 3.2.2.

Nové zapojení bylo nejdříve testováno ve FIA módu. Bohužel s daným zapojením nebylo dosaženo požadovaných výsledků. Docházelo ke kondenzaci kapaliny mezi GLS a vlastním detekčním prostorem. To mohlo být způsobeno velkým rozdílem teplot, kdy analyt v plynné fázi spolu s mobilní fází jsou zahřívány v UV-fotochemickém generátoru, kdežto atomizátor byl pokojové teploty. Dalším možným vysvětlením je délka vedení mezi GLS a detekční trubicí, kdy v AFS musí projít přibližně 30 cm dlouhou sušící trubičkou, oproti tomu v AAS je vzdálenost mezi GLS a detekční trubicí minimální, viz Obr. 2. Z jednoho z výše uvedených důvodů nebyl získán žádný signál. Ke zlepšení by mohlo vést zkrácení transportní cesty mezi GLS a detektorem, vložení absorbentu vlhkosti nebo použití křemenné kapiláry s namotaným odporově vyhřívaným drátem. Žádná z těchto uvedených variant nevedla ke zlepšení výsledků stanovení. Vzhledem ke komplikovanosti dané aparatury a špatným výsledkům bylo od detekce pomocí AFS upuštěno.

4.3 Extrakční metoda a extrakční činidlo

Všechny testované extrakční metody a extrakční činidla jsou vypsány v článku uvedeném v **Příloze pod číslem 3**.

Na základě literární rešerše a výsledků z předešlých studií bylo otestováno několik dalších extrakčních metod, které byly vybrány jako potenciálně vhodné pro metodu RP-HPLC-UV-PVG-QTAAS. Všechny vyzkoušené extrakční metody jsou shrnuty v Tab. 4. Všechny způsoby extrakce byly testovány ve FIA módu z důvodu ochrany HPLC kolony a úspory času.

Jako nejvhodnější extrakční činidlo byla použita směs $0,05 \text{ mol l}^{-1}$ HCl a 6,25 % (v/v) TMAH [134]. Po navážení bylo k reálným vzorkům či CRM přidáno extrakční činidlo a specie rtuti byly extrahovány za zvýšené teploty (přibližně $75 \text{ }^{\circ}\text{C}$) pod

zpětným chladičem po dobu 30 minut. Vzorek byl po extrakci centrifugován a přefiltrován přes filtr (regenerovaná celulóza) o průměru 47 mm a o porozitě 0,45 μm .

Tab. 4: Testovaná extrakční činidla

	Extrakční metoda	Extrakční činidlo	Zdroj
1	Ultrasonifikace 7 min	7,5 ml 2% (v/v) HCl a 10% (v/v) EtOH	[135]
2	Mikrovlňná extrakce 8 min, laboratorní teplota	3 ml 0,1% (v/v) 2-merkptoethanolu	[136]
3	3 h třepání a 45 min utrasonifikace	25% (m/v) KOH v methanolu 1,5 ml HCl a 6 ml dichlormetanu	[35]
4	Rozklad za laboratorní teploty	6,25 g CuSO ₄ a 4,5 g KBr s 1,25 ml H ₂ SO ₄	[137]
5	Zahřívání po dobu 2 hodin při 50 °C – 60 °C	5 ml 0,2% (m/v) L-cysteinu	[124]
6	Zahřívání po dobu 2 hodin při 50 °C – 60 °C	0,2% (v/v) 2-merkptoethanolu v 2% (v/v) methanolu	[138]
7	Zahřívání po dobu 2 hodin při 50 °C – 60 °C	5 ml 0,2% (m/v) pyrrolidindithiokarbamátu sodného	[139]
8	Mikrovlňná extrakce	2 ml 6,25% TMAH a 0,05 mol l ⁻¹ HCl	[140]
9	Zahřívání na 75 °C	2 ml 6,25% TMAH a 0,05 mol l ⁻¹ HCl	[141]

4.3.1 Stanovení reálných vzorků a CRM

Jako modelové vzorky byly zvoleny tkáně dvou různých druhů ryb. Jednalo se o svalovinu jelce tlouště a candáta obecného.

Každý vzorek byl extrahován metodou popsanou v předchozí kapitole a pomocí RP-HPLC-UV-PVG-QTAAS byly stanoveny obsahy specií rtuti v jednotlivých vzorcích ryb.

Výsledky byly porovnány s výsledky získanými metodou HPLC-ICP-MS. Mírně rozdílné výsledky ve speciační analýze rtuti souvisí s rozdílnou metodou extrakce. V případě HPLC-ICP-MS byla použita extrakce L-cysteinem, jež se často používá při speciační analýze Hg [124,135]. V kombinaci s UV-fotochemickým generátorem však nelze L-cystein použít, neboť jeho přítomnost má výrazně negativní vliv na účinnost

generování studené páry rtuti, jak dokazuje práce Leng a spol. [136]. Účinnost extrakce rtuti v obou metodách byla kvantifikována porovnáním s metodou AMA 254, pomocí které byl stanoven celkový obsah rtuti.

Výsledky obou stanovení byly ověřeny také na certifikovaných referenčních materiálech ERM-CE464 (svalovina tuňáka) a DOLT-4 (žraločí játra). Porovnání výsledků je uvedeno v Tab. 5. Z tabulky vyplývá, že účinnost extrakce specií rtuti činí pro obě metody cca 70-90 % a že při použití ani jedné z testovaných metod nedochází k významné změně speciální informace.

Tab. 5: Výsledky analýz vzorků ryb a CRM metodou RP-HPLC-UV-PVG-QTAAS, srovnávací metodou HPLC-ICP-MS a celkový obsah Hg stanovený metodou AMA 254

Vzorek	Specie	Certifikovaná hodnota	HPLC-UV-PVG-QTAAS (mg kg ⁻¹)	HPLC-ICP-MS (mg kg ⁻¹)	AMA 254 (mg kg ⁻¹)	Účinnost extrakce (%)
DOLT-4	Hg(II)	1,25 [#]	1,16 ± 0,03	1,14 ± 0,04		93 / 91*
	MeHg(I)	1,33 ± 0,12	0,96 ± 0,03	1,08 ± 0,01		72 / 81
	Hg _{celková}	2,58 ± 0,22	2,12 ± 0,04	2,23 ± 0,05	2,53 ± 0,15	82 / 88
ERM-CE464	Hg(II)	-	0,72 ± 0,08	0,15 ± 0,01	-	
	MeHg(I)	5,50 ± 0,17	3,63 ± 0,19	4,08 ± 0,05	-	66 / 74
	Hg _{celková}	5,24 ± 0,10	4,35 ± 0,21	4,24 ± 0,06	5,03 ± 0,21	86 / 84
Jelec Tloušť'-svalovina	Hg(II)	-	0,22 ± 0,01	<LOQ	-	
	MeHg(I)	-	0,41 ± 0,02	0,56 ± 0,02	-	
	Hg _{celková}	-	0,63 ± 0,01	0,56 ± 0,02	0,71 ± 0,02	89 / 79
Candát'-svalovina	Hg(II)	-	0,05 ± 0,01	<LOQ	-	
	MeHg(I)	-	0,98 ± 0,03	1,12 ± 0,02	-	
	Hg _{celková}	-	1,02 ± 0,03	1,12 ± 0,02	1,30 ± 0,08	79 / 86

* extrakční účinnost pro: RP-HPLC-UV-PVG-QTAAS / HPLC-ICP-MS

[#] vypočítaná hodnota (rozdíl Hg_{celková} - MeHg(I))

4.4 Elektrochemické generování studené páry rtuti

V další části disertační práce byla ověřována možnost využití elektrochemického generování studené páry rtuti (EcVG) s detekcí QTAAS pro stanovení specií rtuti a následná možnost postkolonového elektrochemického generování v metodě RP-HPLC-EcVG-QTAAS.

Zvolen byl klasický přístup průtokové analýzy za použití průtokové elektrochemické generační cely, kde byl separátor fází součástí atomizátoru jako v případě UV-PVG-QTAAS.

Jako nejvhodnější cely pro generování studených par rtuti byla vybrána ta, která měla dvě katody (plíšek a drát). Daná katoda je zobrazena na Obr. 5 v kapitole 3.2.5.

Optimální podmínky byly částečně převzaty z již dříve publikovaných prací [80,140]. V rámci této práce bylo optimalizováno jen složení katodového roztoku, průtok nosného plynu (argonu) a místo jeho zapojení. Za optimálních pracovních podmínek byly zjištěny základní charakteristiky stanovení specií rtuti. Následně byly hodnoty porovnány s UV-fotochemickým generováním studené páry rtuti.

Jako hodnotící parametr byla zvolena dosažená citlivost (směrnice kalibrační křivky), mez detekce a mez stanovitelnosti. Ve FIA režimu byl vyhodnocován signál vyjádřený jako plocha píku při dané koncentraci a daném dávkovaném objemu.

4.4.1 Předběžné pokusy

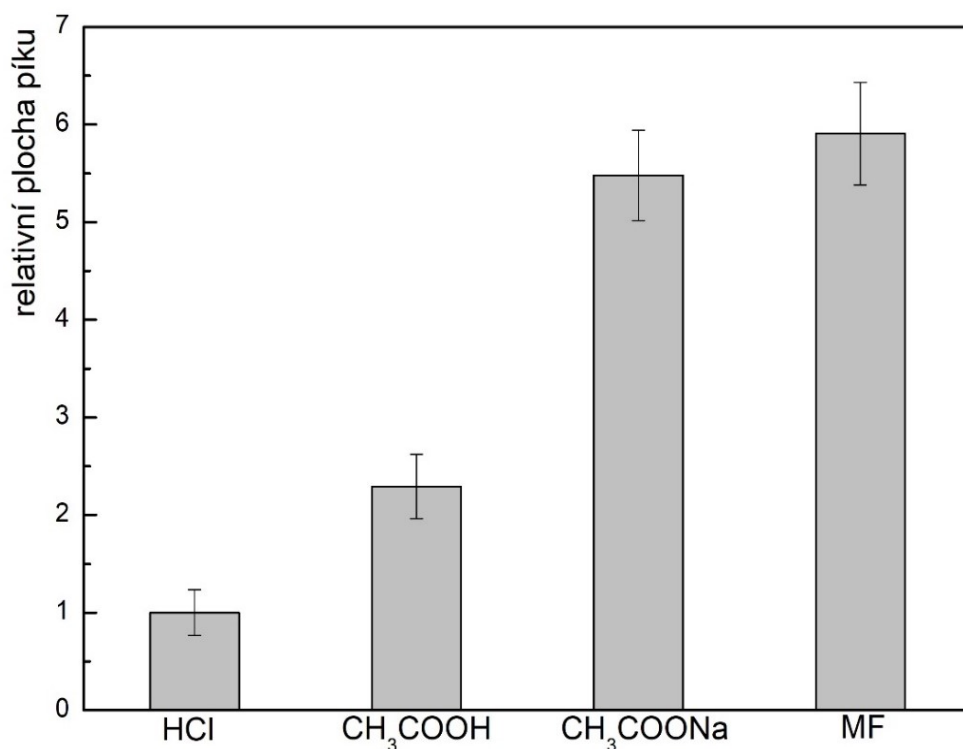
V přípravné fázi byla optimalizována experimentální aparatura popsána v kapitole 3.3.2. Předběžné pokusy ukázaly, že je možné elektrochemicky generovat studenou páru rtuti ze všech vybraných specií rtuti (Hg(II), MeHg(I), EtHg(I) a PhHg(I)) s dostatečnou účinností. Během všech experimentů byla teplota přívodní a detekční trubice nastavena na 150 °C. Bylo zjištěno, že při nižších teplotách dochází ke kondenzaci vody uvnitř přívodní trubice k atomizátoru a dochází ke ztrátě a zkreslení signálu.

4.4.2 Vliv složení katolytu

Katodový roztok (katolyt) se podílí na průběhu elektrochemické reakce, a tedy na vzniku studené páry rtuti. Bylo testováno několik možných složení katolytu s cílem přiblížit se co nejvíce složení mobilní fáze pro HPLC separaci a také možnosti porovnání s RP-HPLC-UV-PVG-QTAAS. Na základě literární rešerše byla jako první testována HCl [80]. Jako další možné katolyty byly použity roztoky CH₃COONa, CH₃CCOH a jako poslední bylo využito mobilní fáze pro UV-PVG. Všechny testované roztoky poskytovaly dostatečnou vodivost. Optimalizace byla provedena v režimu průtokové injekční analýzy.

Vyhodnocována byla velikost plochy píku Hg(II). Výsledky byly vztaženy k velikosti plochy píku pro nejběžnější katolyt 1 mol l⁻¹ HCl. Uvedené porovnání je zobrazeno na Obr. 11. Ze získaných výsledků je vidět, že nevyšší citlivosti bylo dosaženo s mobilní fází pro UV-PVG. Hodnota analytického signálu je přibližně šestkrát větší než pro 1 mol l⁻¹ HCl. Pravděpodobným faktorem ovlivňujícím dosažený výsledek je rozdílné pH, kdy s rostoucím pH roste signál rtuti.

Jako anodový roztok (anolyt) byla použita 2M H₂SO₄. Průtokové rychlosti elektrodových roztoků neměly významný vliv na signál analytu ani na šum základní linie. Z tohoto důvodu byly průtoky elektrolytů voleny vždy stejné. Koncentrace H₂SO₄ významně neovlivňovala citlivost metody, avšak její koncentrace nesměla být nižší než 0,5 M, aby bylo dosaženo dostatečná vodivosti roztoku.



Obr. 11: Porovnání vlivu složení katolytu na signál Hg(II) vztažený k signálu 1 M HCl

$Q_{Ar} = 60 \text{ ml min}^{-1}$; $Q_{MF, \text{ katolytu}} = 1 \text{ ml min}^{-1}$; $Q_{H_2SO_4, \text{ analyt}} = 1 \text{ ml min}^{-1}$; $V_{vz} = 100 \text{ } \mu\text{l}$;

$I = 1 \text{ A}$; $c_{H_2SO_4} = 2 \text{ mol l}^{-1}$;

$c_{HCl} = 1 \text{ mol l}^{-1}$

$c_{CH_3COOH} = 5 \text{ mmol l}^{-1}$

$c_{CH_3COONa} = 40 \text{ mmol l}^{-1}$

MF: $\varphi_{EtOH} = 40 \text{ } \%$ (v/v); $c_{CH_3COOH/CH_3COONa} = 20 \text{ mmol l}^{-1}$; $pH \text{ } 4,5$; $\varphi_{ME} = 0,1 \text{ } \%$;

4.4.3 Optimální podmínky stanovení specií rtuti pomocí RP-HPLC-EcVG-QTAAS

Zapojení nosného plynu (Ar) bylo vždy realizováno před elektrochemickou generační celou do proudu katolytu a nosného roztoku. V pozdějších experimentech byl nosný plyn zaváděn do proudu mobilní fáze (katolytu). Nosný plyn v elektrochemické generační cele napomáhal desorpci vznikající elementární rtuti z povrchu katody, produkcí bublin zvyšoval plochu fázového rozhraní plyn/kapalina, čímž urychloval převod Hg^0 do plynné fáze a sloužil i k transportu páry Hg^0 do detekční trubice.

Nalezené optimální podmínky stanovení specií Hg pomocí RP-HPLC-EcVG-QTAAS jsou uvedeny v Tab. 6.

Tab. 6: Optimální podmínky pro stanovení specií rtuti pomocí RP-HPLC-EcCVG-QTAAS

Parametr	Optimální hodnota
Průtoková rychlost argonu (ml min ⁻¹)	60
Průtoková rychlost katolytu (ml min ⁻¹)	1
Dávkovaný objem (μl)	100
Průtoková rychlost anolytu (ml min ⁻¹)	1
Teplota detekční trubice (°C)	150
Koncentrace H ₂ SO ₄ v anolytu (mol l ⁻¹)	2
Generační proud (A)	1

4.4.4 Základní charakteristiky stanovení vybraných specií Hg metodou RP-HPLC-EcVG-QTAAS

Základní charakteristiky metody RP-HPLC-EcVG-QTAAS byly stanoveny za optimálních podmínek uvedených v Tab. 6 při použití katolytu o stejném složení jako je mobilní fáze používaná v UV-PVG.

Kalibrační závislosti byly lineární do koncentrace 300 μg l⁻¹. Z Obr. 12 je patrné, že nejvyšší citlivosti bylo dosaženo pro Hg(II) a nejnižší pro EtHg(I).

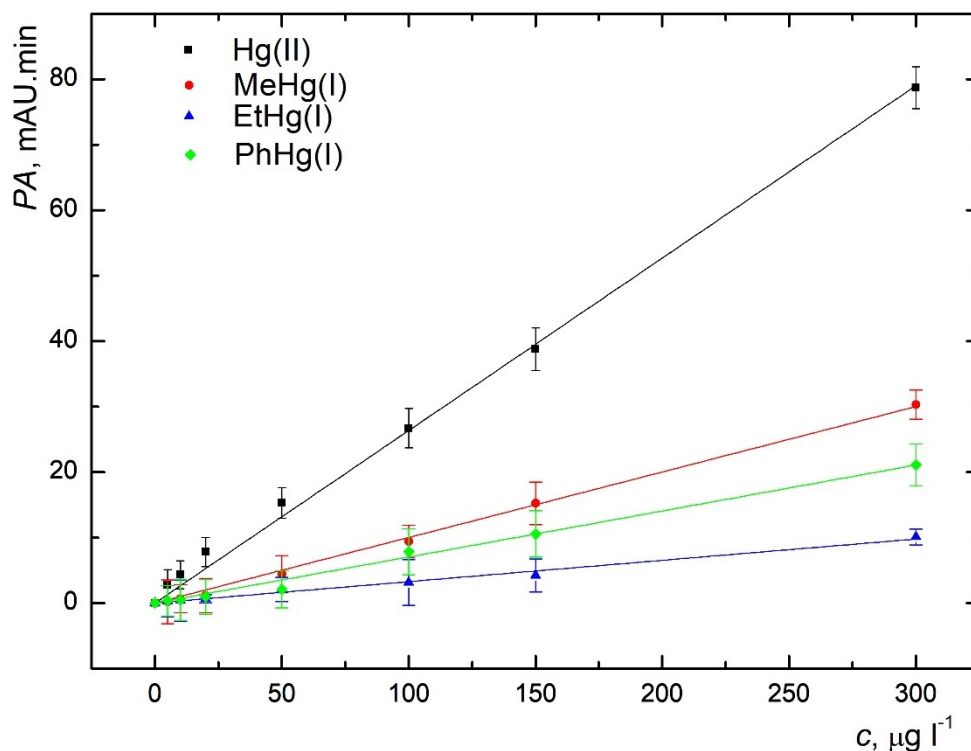
Ze získaných kalibračních závislostí byly určeny příslušné citlivosti, meze detekce, meze stanovitelnosti a opakovatelnost. Základní charakteristiky stanovení specií rtuti získané metodou RP-HPLC-EcVG-QTAAS jsou shrnuty v Tab. 7. Zároveň tato tabulka ukazuje dané hodnoty získané pro stanovení specií rtuti metodou RP-HPLC-UV-PVG-QTAAS.

Opakovatelnost je signifikantně horší pro elektrochemické generování, protože dochází k rozmytí píků a tedy k horší opakovatelnosti signálů. Z uvedených výsledků je patrné, že získané hodnoty meze detekce a meze stanovitelnosti jsou výrazně lepší v případě RP-HPLC-UV-PVG-QTAAS.

Kvůli velkému vnitřnímu objemu generační cely, kde dochází k rozmývání píků i vlivem turbulentních toků plynů a kapalin, není uspořádání RP-HPLC-EcVG-QTAAS

vhodné pro speciální analýzu rtuti. Nejen z důvodu lepšího rozlišení, ale i vyšších signálů, lepší citlivosti, opakovatelnosti a nižších LOD a LOQ je výhodnější metoda RP-HPLC-UV-PVG-QTAAS viz Tab. 7 s parametry metody.

Z důvodu výsledků předešlého zkoumání v kapitole 4.2 nebyla použita AFS k detekci těkavých sloučenin rtuti.

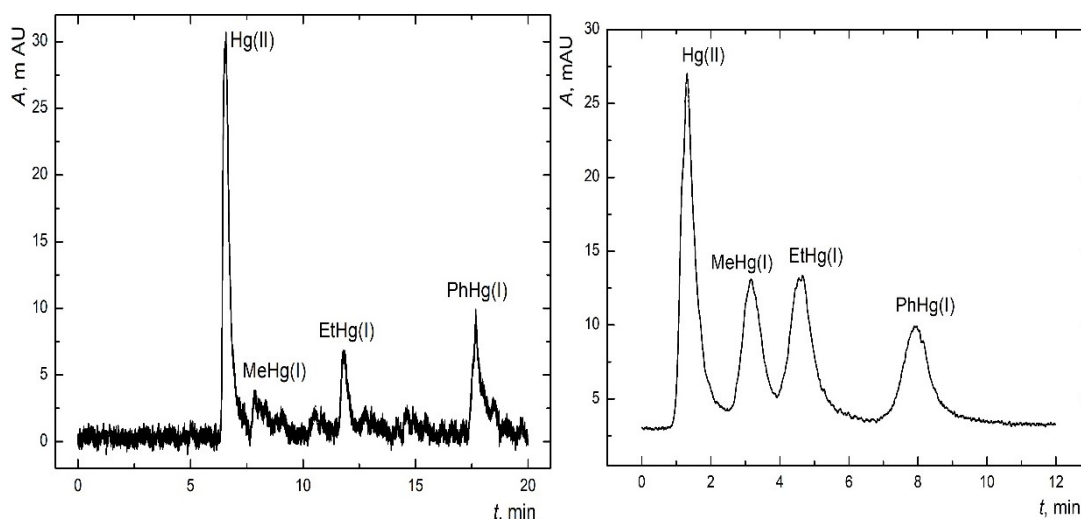


Obr. 12: Kalibrační závislosti stanovení specií rtuti metodou RP-HPLC-EcVG-QTAAS

$Q_{Ar} = 60 \text{ ml min}^{-1}$; $Q_{MF, \text{katolytu}} = 1 \text{ ml min}^{-1}$; $Q_{H_2SO_4, \text{anolyt}} = 1 \text{ ml min}^{-1}$; $V_{vz} = 100 \text{ } \mu\text{l}$;

$I = 1 \text{ A}$; $c_{H_2SO_4} = 2 \text{ mol l}^{-1}$; $t_{kolony} = 40 \text{ } ^\circ\text{C}$; MF: $\varphi_{EtOH} = 40 \text{ } \%$ (v/v);

$c_{CH_3COOH/CH_3COONa} = 20 \text{ mmol l}^{-1}$; pH 4,5; $\varphi_{ME} = 0,1 \text{ } \%$



Obr. 13: Porovnání chromatogramů při koncentraci všech specií rtuti $100 \mu\text{g l}^{-1}$ získaných pro RP-HPLC-EcVG-QTAAS a RP-HPLC-UV-PVG-QTAAS

RP-HPLC-EcVG-QTAAS:

$Q_{Ar} = 60 \text{ ml min}^{-1}$; $Q_{MF, \text{katolytu}} = 1 \text{ ml min}^{-1}$; $Q_{\text{H}_2\text{SO}_4, \text{anolyt}} = 1 \text{ ml min}^{-1}$; $V_{vz} = 100 \mu\text{l}$;

$I = 1 \text{ A}$; $c_{\text{H}_2\text{SO}_4} = 2 \text{ mol l}^{-1}$; $t_{\text{kolony}} = 40 \text{ }^\circ\text{C}$; MF: $\varphi_{\text{EtOH}} = 40 \text{ } \%$ (v/v);

$c_{\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}} = 20 \text{ mmol l}^{-1}$; pH 4,5; $\varphi_{\text{ME}} = 0,1 \text{ } \%$

RP-HPLC-UV-PVG-QTAAS:

$Q_{Ar} = 95 \text{ ml min}^{-1}$; $Q_{MF} = 0,3 \text{ ml min}^{-1}$; $V_{vz} = 50 \mu\text{l}$; $\varphi_{\text{EtOH}} = 40 \text{ } \%$ (v/v); $t_{\text{kolony}} = 40 \text{ }^\circ\text{C}$;

$c_{\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}} = 20 \text{ mmol l}^{-1}$; pH 4,5; $\varphi_{\text{ME}} = 0,1 \text{ } \%$

Obr. 13 porovnává chromatogramy všech specií rtuti získané pro RP-HPLC-EcVG-QTAAS a RP-HPLC-UV-PVG-QTAAS. Retenční časy nemají vypovídající hodnotu z důvodu nutnosti využití dvou ovládacích programů, pro HPLC a pro ContrAA700. Spektrometr měl omezené časové okno, proto byl záznam spouštěn se zpožděním, po nadávkování. Interval, kdy eluují specie rtuti při elektrochemickém generování, je o 3 min delší než při UV-fotochemickém generování, přestože cesta vzorku je kratší. Toto může být způsobeno zadržením analytu z důvodu většího průřezu v elektrochemické cele oproti reakční cívce UV-fotochemického generátoru a samozřejmě též interakcí s elektrodou a elektrickým polem v roztoku.

Tab. 7: Porovnání základních charakteristik stanovení specií rtuti pomocí RP-HPLC-UV-PVG-QTAAS a RP-HPLC-EcVG-QTAAS

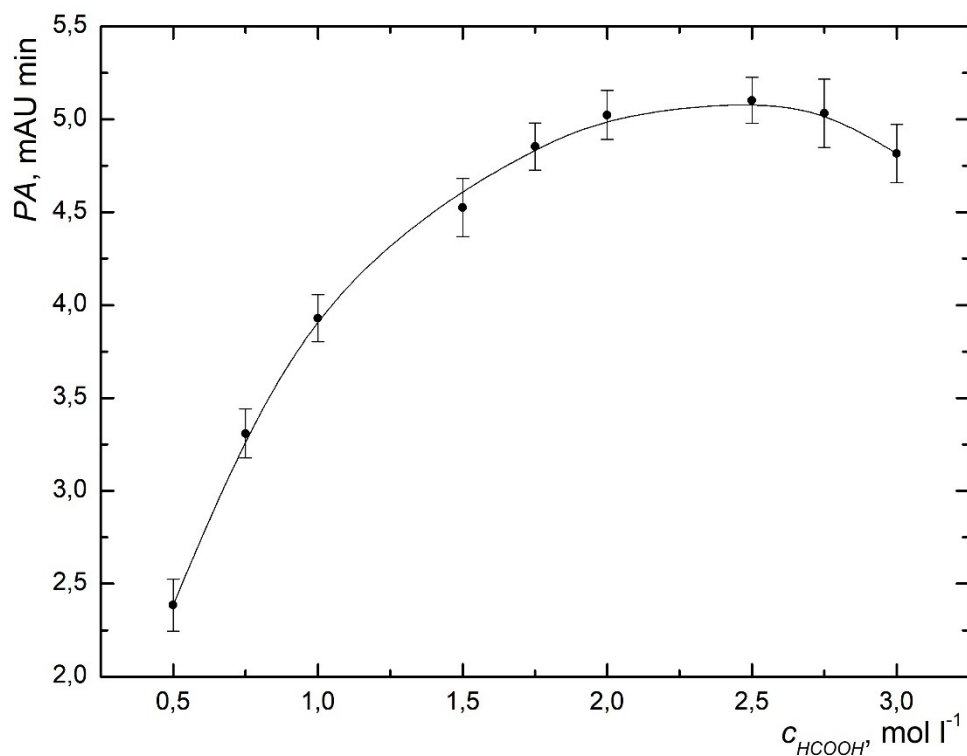
Parametr	RP-HPLC-UV-PVG-QTAAS				RP-HPLC-EcVG-QTAAS			
	Hg(II)	MeHg(I)	EtHg(I)	PhHg(I)	Hg(II)	MeHg(I)	EtHg(I)	PhHg(I)
Citlivost (mAU l μg^{-1} min)	0,10	0,05	0,06	0,05	0,05	0,03	0,02	0,03
LOD ($\mu\text{g l}^{-1}$)	0,17	0,84	0,80	2	4,1	7,8	5,9	4,9
LOQ ($\mu\text{g l}^{-1}$)	0,57	2,8	2,7	6,5	14	26	20	16
Opakovatelnost (%)	3,6	4,1	6,2	4,5	7,6	15	12	14
WDR do ($\mu\text{g l}^{-1}$)	100	100	100	100	300	300	300	300
Korelační koeficient	0,998	0,997	0,999	0,999	0,997	0,998	0,994	0,995

4.5 UV-fotochemické generování těkavých sloučenin arsenu

Tato část disertační práce se zaměřuje na konstrukci UV-fotochemického generátoru a nalezení nejvhodnějších podmínek pro generování těkavých specií arsenu. Nejprve byly provedeny předběžné pokusy pouze s As(III) jako modelovou specií. Všechny experimenty byly provedeny v režimu FIA (viz. kapitola 3.3.5 a Obr. 8) a byly při nich optimalizovány podmínky UV-fotochemického generování.

4.5.1 Volba reakčního (fotochemického) činidla

Jako fotochemická činidla pro UV-generování těkavých specií z As(III) ve FIA režimu byly testovány: kyselina mravenčí, kyselina octová a kyselina propionová. Ukázalo se, že kyselina octová a kyselina propionová nejsou vhodná reakční činidla, jelikož v jejich přítomnosti nebyl pozorován žádný signál. Zkoušena byla i jejich směs v různých poměrech, avšak opět nebyl pozorován žádný analytický signál. Vliv kyseliny mravenčí a její koncentrace na analytický signál byl zkoumán v rozsahu od 0,5 do 3 mol l⁻¹ (viz Obr. 14), přičemž analytický signál narůstal s rostoucí koncentrací kyseliny mravenčí. Nejvyšší signál byl pozorován při koncentraci kyseliny přibližně 2,6 mol l⁻¹ což odpovídá 10 % (v/v) HCOOH.

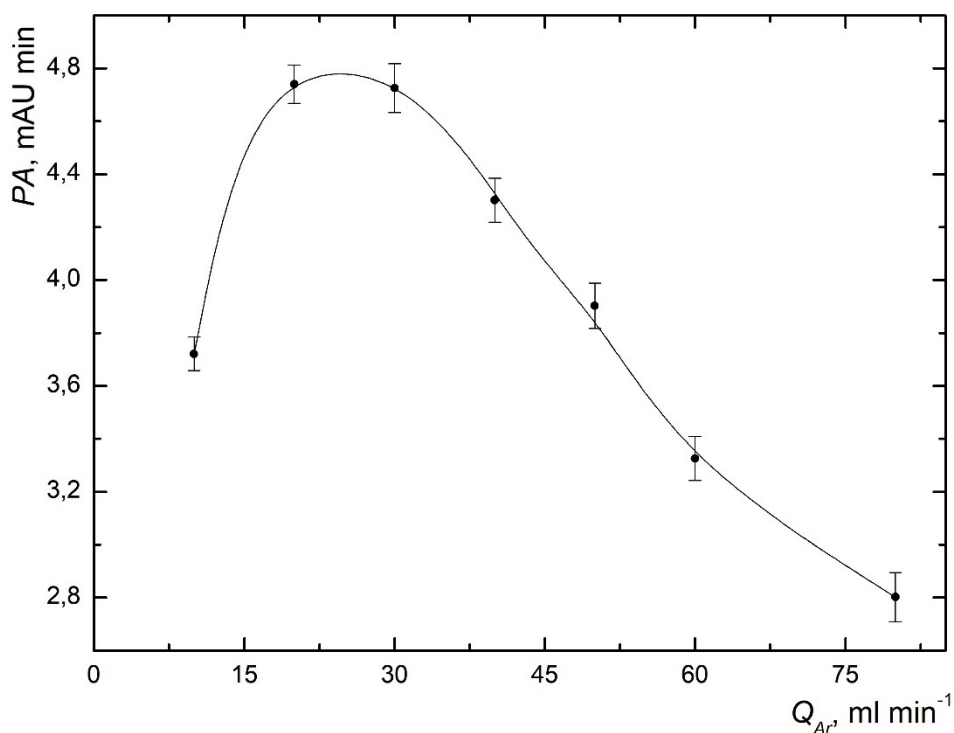


Obr. 14: Závislost signálu As na koncentraci HCOOH

$Q_{Ar} = 35 \text{ ml min}^{-1}$; $Q_{H_2} = 30 \text{ ml min}^{-1}$; $Q_{MF} = 1 \text{ ml min}^{-1}$; $V_{vz} = 100 \text{ } \mu\text{l}$; $t_{atm} = 950 \text{ } ^\circ\text{C}$;
 $c_{As(III)} = 200 \text{ } \mu\text{g l}^{-1}$; $P = 6 \text{ W}$

4.5.2 Průtoková rychlost nosného plynu

Bylo experimentálně zjištěno, že přítomnost nosného plynu v UV fotochemickém generátoru je nutná pro efektivní uvolnění těkavých specií As z kapalně fáze a jeho kvantitativní transport do atomizátoru. Průtoková rychlost nosného plynu ovlivňuje dobu, po kterou je analyt vystaven v UV-fotochemickém generátoru UV záření. Závislost signálu As(III) na průtoku nosného plynu byla studována v rozsahu od 10 do 80 ml min⁻¹. Nosný plyn nemá vliv pouze na separaci plynné a kapalně fáze, ale také na děje během UV-PVG. Základní linie nebyla stabilní při nízkých průtocích Ar (do 10 ml min⁻¹). Absorbance rostla s rostoucím průtokem nosného plynu až do 25 ml min⁻¹, pak rapidně klesala, jak ukazuje Obr. 15. To může být způsobeno zkracující se dobou ozařování analytu. Hodnota 25 ml min⁻¹ byla zvolena jako optimální.

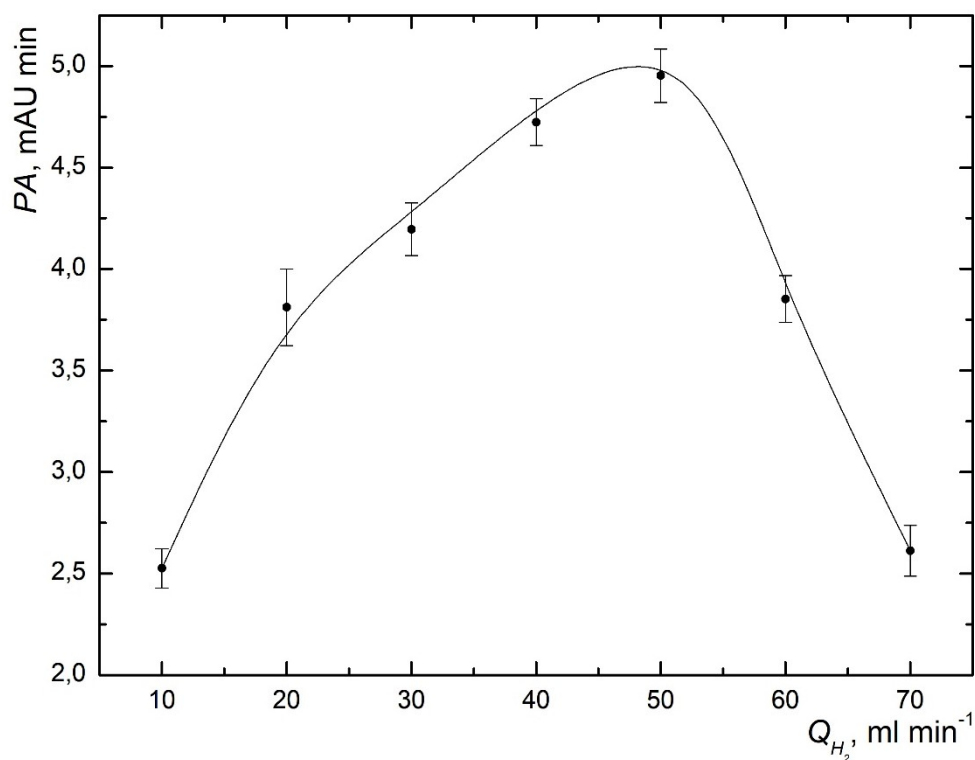


Obr. 15: Závislost signálu As na průtoku nosného plynu (Ar)

$Q_{H_2} = 30 \text{ ml min}^{-1}$; $Q_{MF} = 1 \text{ ml min}^{-1}$; $V_{vz} = 100 \text{ } \mu\text{l}$; $t_{atm} = 950 \text{ } ^\circ\text{C}$; $\varphi_{HCOOH} \text{ (v/v)} = 10 \%$; $c_{As(III)} = 200 \text{ } \mu\text{g l}^{-1}$; $P = 6 \text{ W}$

4.5.3 Průtoková rychlost reakčního plynu

Přítomnost vodíkových radikálů je pro UV-fotochemické generování těkavých sloučenin arsenu nezbytná, stejně tak i pro jejich atomizaci. Byla také provedena optimalizace místa zavádění vodíku do aparatury. Bylo zjištěno, že vodík mírně napomáhal generování těkavé sloučeniny arsenu. Z tohoto důvodu byl vodík zaveden před UV-fotochemický generátor. Pokud nebyl vodík zaváděn do aparatury, signál arsenu byl velmi nízký nebo nulový. Ze závislosti na Obr. 16 je vidět, že s rostoucím průtokem vodíku roste signál As. Nejvyšší hodnota signálu byla v rozmezí 45 – 55 ml min⁻¹ H₂, poté signál prudce klesal. Toto lze opět vysvětlit zvýšenou průtokovou rychlostí, a tedy krátkou dobou setrvání analytu v generátoru. Dále může vznikat nadbytek vodíkových radikálů, které mohou negativně ovlivňovat vznik těkavých sloučenin arsenu. Pro další experimenty byla zvolena průtoková rychlost 50 ml min⁻¹ H₂.

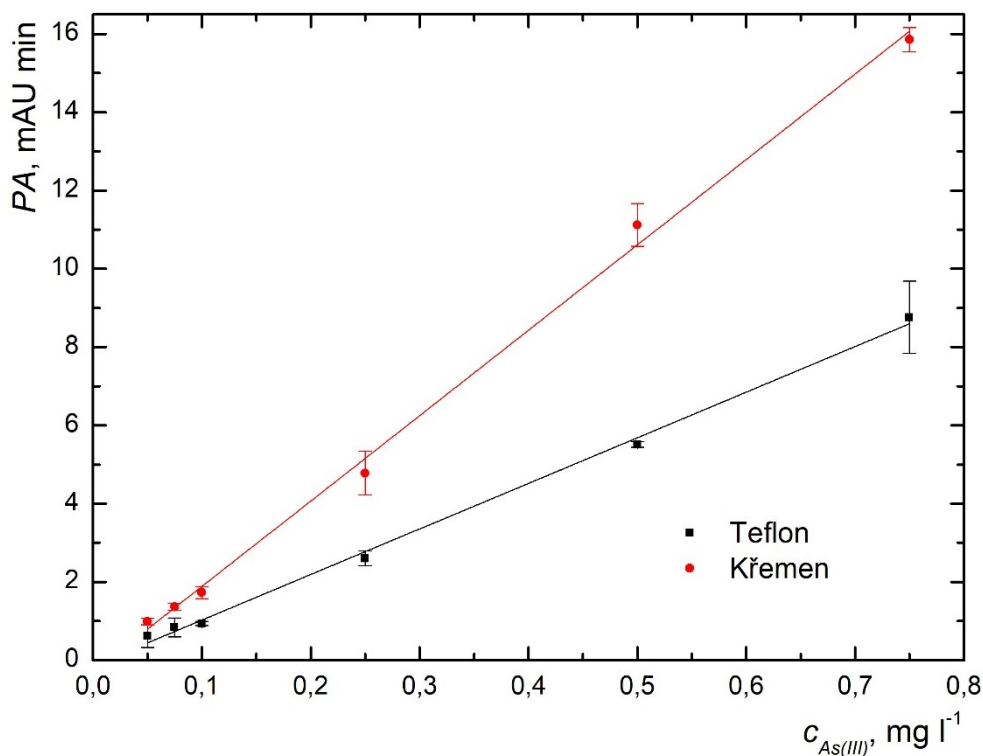


Obr. 16: Závislost signálu As na průtoku reakčního plynu (H₂)

$Q_{Ar} = 25 \text{ ml min}^{-1}$; $Q_{MF} = 1 \text{ ml min}^{-1}$; $V_{vz} = 100 \text{ } \mu\text{l}$; $t_{atm} = 950 \text{ } ^\circ\text{C}$; $\varphi_{HCOOH} \text{ (v/v)} = 10 \%$; $c_{As(III)} = 200 \text{ } \mu\text{g l}^{-1}$; $P = 6 \text{ W}$

4.5.4 Reakční cívka

Byly testovány dva druhy materiálů reakční cívky: Teflon a křemenná trubička. Obě reakční cívky byly rozměrově podobné pro snadnější porovnání jejich vlivu na generování těkavých sloučenin arsenu. Přesné rozměry jsou uvedeny v kapitole 3.2.4.2 Pro porovnání byl použit Teflon **T2** (viz Obr. 4 na str. 36) a nízkotlaká rtuťová výbojka o výkonu 20 W. Předpokládalo se, že křemen bude propustnější pro UV záření oproti Teflonu, který je však zase vhodnější z důvodu snazší manipulace. Na Obr. 17 je vidět vliv materiálu reakční cívky na směrnici kalibračních křivek As(III). Jako vhodnější materiál byl zvolen křemen, neboť dosahovaná citlivost stanovení v reakční cívce z křemenného skla byla cca dvojnásobná ve srovnání s cívkou stejných parametrů z Teflonu.



Obr. 17: Porovnání vlivu různých materiálů reakční cívky na analytický signál As
 $Q_{Ar} = 25 \text{ ml min}^{-1}$; $Q_{H_2} = 50 \text{ ml min}^{-1}$; $Q_{MF} = 1 \text{ ml min}^{-1}$; $V_{vz} = 100 \text{ } \mu\text{l}$; $t_{atm} = 950 \text{ } ^\circ\text{C}$;
 $\varphi_{HCOOH} \text{ (v/v)} = 10 \%$; $P = 20 \text{ W}$

4.5.5 Zdroj záření

Pro potřebu UV-fotochemického generování těkavých sloučenin arsenu byly testovány dva zdroje UV záření o rozdílných rozměrech a výkonech (6 W a 20 W). Pro porovnání byly použity křemenné reakční cívky. Bližší popis použitých UV výbojek a jejich napájecích zdrojů je uveden v kapitole 3.2.4.1.

Na základě experimentálních výsledků se zdroj s výkonem 6 W a menšími rozměry výbojky nakonec ukázal jako vhodnější pro generování těkavých sloučenin arsenu.

4.5.6 Průtoková rychlost roztoku reakčního činidla a délka reakční cívky

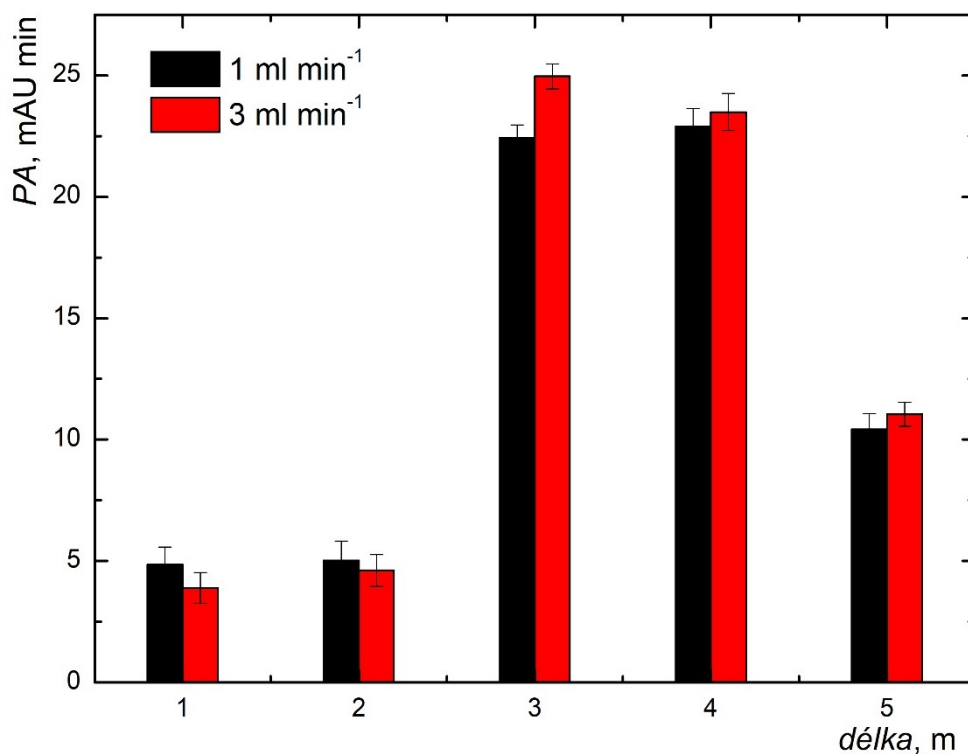
Dalším optimalizovaným parametrem byla průtoková rychlost roztoku reakčního činidla. Byly zvoleny dvě hodnoty, 1 a 3 ml min⁻¹, kompatibilní s průtokovými rychlostmi pro používaný HPLC systém. Průtoková rychlost má vliv na dobu, kterou analyt setrvá v UV-fotochemickém reaktoru, i když ne tak velký jako průtoky nosného a

reakčního plynu. Zároveň ovlivňuje disperzi vzorku v roztoku kyseliny mravenčí a výsledný tvar signálu. Na Obr. 18 je porovnání průtokových rychlostí a délky reakční cívky (viz kapitola 4.5.7) UV-fotochemického generátoru, která s dobou ozařování zóny vzorku také souvisí.

Velmi důležitý parametr ovlivňující účinnost UV-fotochemického generování je délka reakční cívky. Spolu s jejím vnitřním průměrem, průtokovou rychlostí reakčního činidla a průtokovou rychlostí nosného a reakčního plynu výrazně ovlivňuje dobu ozařování vzorku. Jak bylo popsáno v kapitole 3.2.4.2, pro generování těkavých sloučenin arsenu byla použita křemenná trubička stočená do spirály.

Délka reakční cívky byla dána rozměry vlastní křemenné trubičky. Její nejkratší část měřila 0,5 m, tedy její testované délky mohly být 0,5; 1; 1,5 a 2 až do 5 m. Maximální délka reakční cívky byla také dána vlastním UV-fotoreaktorem, pro 6 W to byla délka 1 m a pro 20 W 5 m.

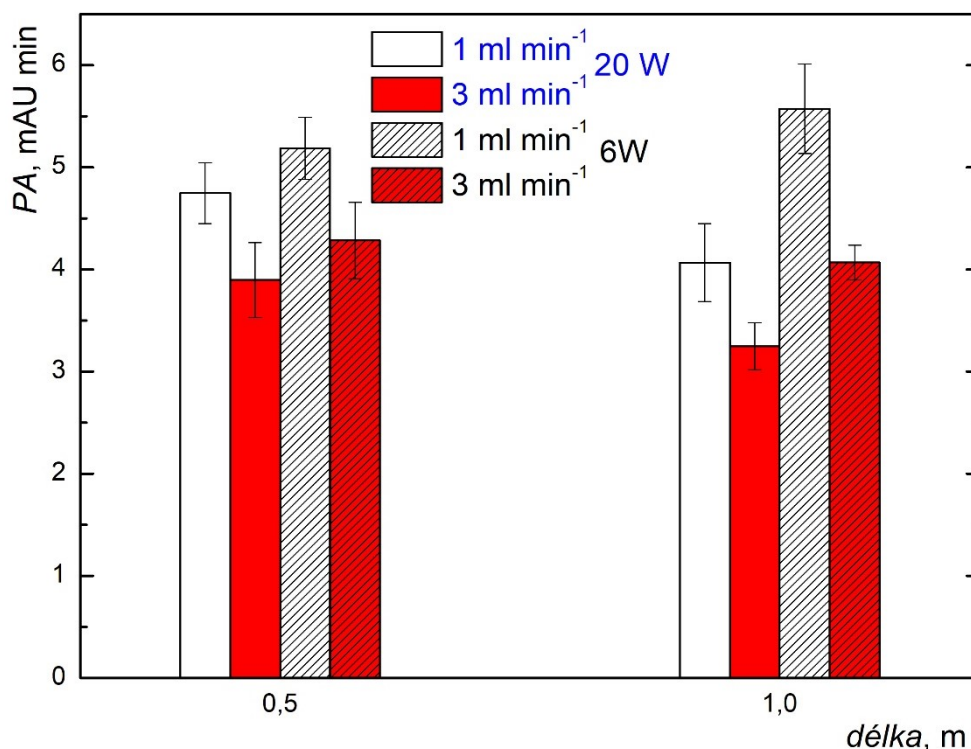
Na Obr. 18 je zobrazena závislost analytického signálu As na průtoku roztoku reakčního činidla a délce reakční cívky pro UV-fotoreaktor o výkonu 20 W. Ze závislosti je patrné, že s prodlužující se délkou reakční cívky roste analytický signál až do 3 m. Vliv průtokové rychlosti reakčního činidla na signál, však není tak významný jako u plynů. Pro maximální délku je vidět pokles signálu pro oba průtoky. Je to dáno dobou, kterou je analyt vystaven UV-záření, a tedy i reakční době. Reakční doba musí být nezbytně dlouhá, aby zajistila maximální konverzi specíe arsenu na těkavou sloučeninu, nesmí ale dojít k rozkladu sloučeniny v plynné fázi vlivem UV-záření.



Obr. 18: Porovnání vlivu délky reakční cívky a průtoku roztoku reakčního činidla na analytický signál As s 20 W zdrojem

$Q_{Ar} = 25 \text{ ml min}^{-1}$; $Q_{H_2} = 50 \text{ ml min}^{-1}$; $V_{vz} = 100 \text{ } \mu\text{l}$; $t_{am} = 950 \text{ } ^\circ\text{C}$; $\varphi_{HCOOH} \text{ (v/v)} = 10 \%$; $c_{As(III)} = 500 \text{ } \mu\text{g l}^{-1}$; $P = 20 \text{ W}$

Pro UV-fotoreaktor o výkonu 6 W byly z důvodu rozměru zdroje záření testovány pouze dvě délky reakční cívky: 0,5 a 1 m. Dosažené hodnoty ploch pík analytických signálů pro As(III) byly nepatrně vyšší než pro 20 W. Pro 6 W zdroj UV-záření a zejména pro delší reakční cívku (1 m) se zdá být výhodnější nižší průtoková rychlost roztoku reakčního činidla (1 ml min⁻¹). Avšak tvar pík (20 W) byl z důvodu disperze zcela nevhodný pro HPLC analýzu. Chvostování pík mohlo být způsobeno difuzními efekty v dlouhé reakční cívce. Proto byla zvolena reakční cívka o délce 1 m a UV-fotoreaktor o výkonu 6 W. Na Obr. 19 je porovnání délky 0,5 a 1 m a průtoků 1 a 3 ml min⁻¹ pro 6 a 20 W. Průtoky byly zvoleny tak, aby pokryly průtoky používané v HPLC a měly dostatečnou vypovídající hodnotu.



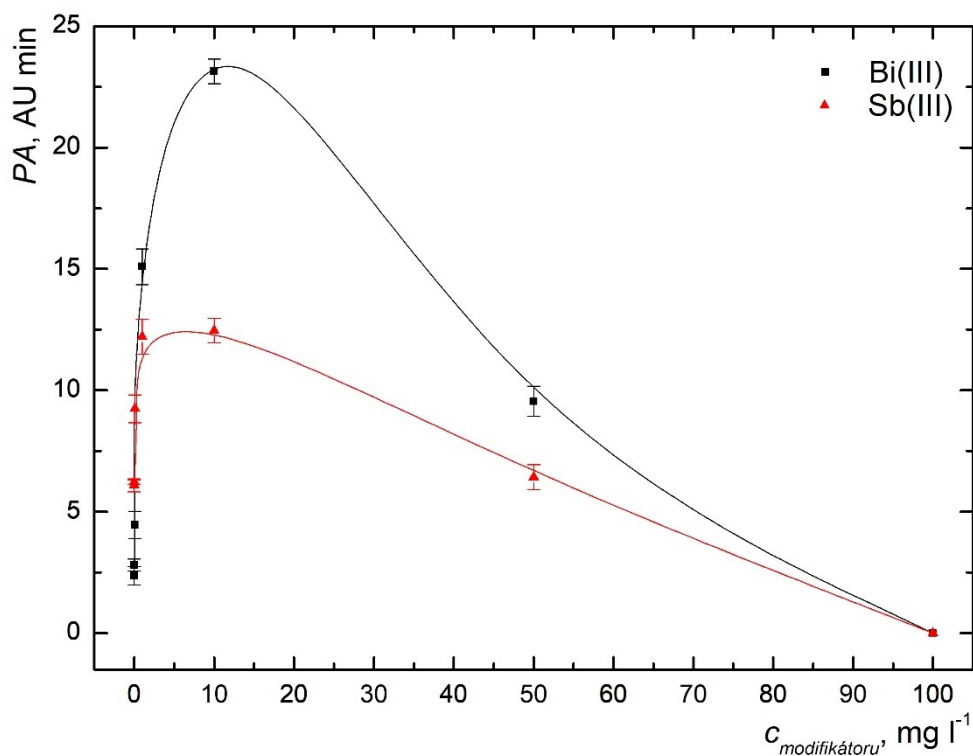
Obr. 19: Porovnání vlivu délky reakční cívky, průtoku reakčního činidla a různých zdrojů na analytický signál As

$Q_{Ar} = 25 \text{ ml min}^{-1}$; $Q_{H_2} = 50 \text{ ml min}^{-1}$; $V_{vz} = 100 \text{ } \mu\text{l}$; $t_{am} = 950 \text{ } ^\circ\text{C}$; $\varphi_{HCOOH} \text{ (v/v)} = 10 \%$; $c_{As(III)} = 500 \text{ } \mu\text{g l}^{-1}$

4.5.7 Reakční modifikátor Bi(III)

Při předběžných experimentech zaměřených na možný vliv matrice na UV-fotochemické generování těkavých sloučenin arsenu byly nalezeny dva potencionální reakční modifikátory: Bi(III) a Sb(III).

Přítomnost obou kationtů výrazně zvýšila citlivost stanovení As(III). Bi(III) je mnohem lepší modifikátor v porovnání s Sb(III), a proto byl o koncentraci 10 mg l^{-1} vybrán jako vhodný reakční modifikátor (viz Obr.20). Důvod zvýšení citlivosti Bi(III) více než Sb(III) nebyl předmětem zkoumání této dizertační práce.



Obr.20: Porovnání reakčních modifikátorů Bi(III) a Sb(III)

$Q_{Ar} = 25 \text{ ml min}^{-1}$; $Q_{H_2} = 50 \text{ ml min}^{-1}$; $Q_{MF} = 1 \text{ ml min}^{-1}$; $V_{vz} = 100 \text{ } \mu\text{l}$; $t_{atm} = 950 \text{ } ^\circ\text{C}$;

$\varphi_{HCOOH} \text{ (v/v)} = 10 \%$; $c_{As(III)} = 200 \text{ } \mu\text{g l}^{-1}$; $P = 6 \text{ W}$; $l = 1 \text{ m}$

4.5.7.1 Modifikace stanovení As(III) pomocí Bi(III)

Při dalších experimentech byl zkoumán vliv Bi(III) na UV-fotochemické generování těkavých sloučenin arsenu. Byly zvoleny tři přístupy pro porovnání:

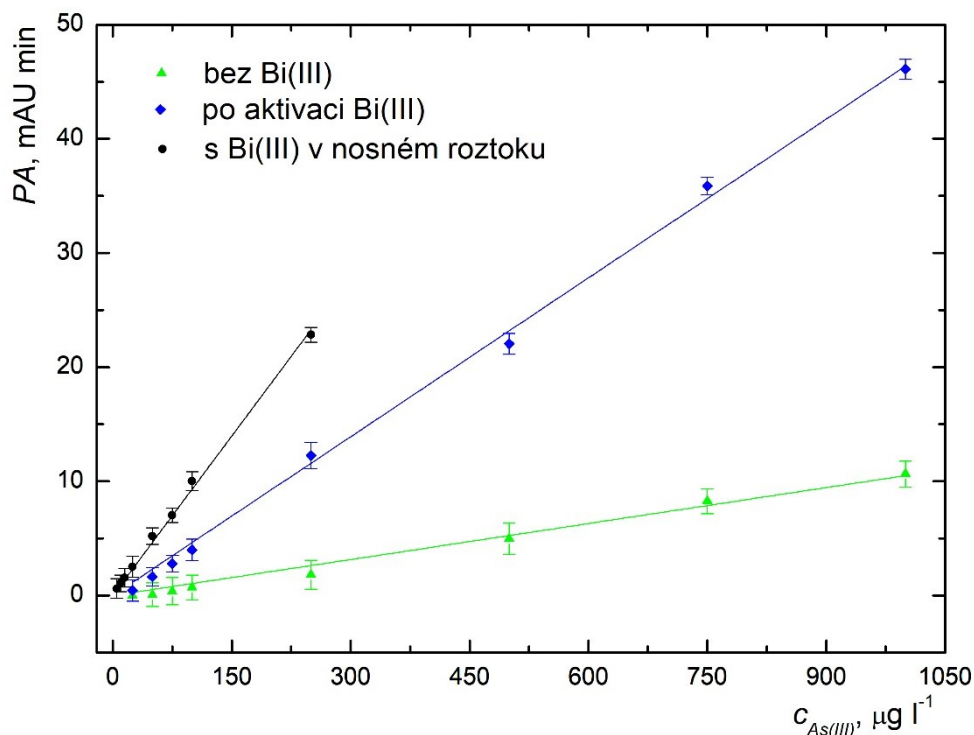
- 1) bez jakékoliv přítomnosti Bi(III)
- 2) po aktivaci Bi(III)
- 3) v přítomnosti Bi(III) v reakčním činidle.

První přístup byl realizován úplným vymytím celé aparatury pomocí koncentrované kyseliny dusičné a kyseliny fluorovodíkové s následným změřením signálu As(III) pouze s kyselinou mravenčí jako fotochemickým činidlem.

V druhém případě byla aparatura proplachována roztokem Bi(III) o koncentraci 10 mg l^{-1} v 10% (v/v) HCOOH po dobu deseti minut a poté byl změřen signál As. Ukázalo se, že po aktivaci se citlivost analytické metody zvýšila přibližně pětikrát. Takováto modifikace aparatury byla stabilní po celý den měření, tzn. přibližně 6 hodin, pak docházelo k poklesu signálu a aktivace se musela opakovat.

Poslední varianta spočívala v přítomnosti Bi(III) o koncentraci 10 mg l^{-1} v reakčním činidle (10 % (v/v) HCOOH) po celou dobu měření. Opět došlo ke zlepšení citlivosti analytické metody přibližně o devítinásobek oproti metodě bez Bi(III). Tento způsob použití chemického modifikátoru se ukázal jako nejvhodnější.

Byly změřeny kalibrační závislosti pro As(III) s různým dávkováním chemického modifikátoru Bi(III), které jsou znázorněny na Obr. 21.



Obr. 21: Porovnání kalibračních závislosti stanovení As(III) s různým využitím chemického modifikátoru Bi(III) pomocí metody FIA-UV-PVG-QFAAS

$$Q_{Ar} = 25 \text{ ml min}^{-1}; Q_{H_2} = 50 \text{ ml min}^{-1}; Q_{MF} = 1 \text{ ml min}^{-1}; V_{vz} = 100 \mu\text{l}; t_{atm} = 950 \text{ }^\circ\text{C};$$

$$\varphi_{HCOOH} (v/v) = 10 \%; P = 6 \text{ W}; l = 1 \text{ m}$$

Základní charakteristiky pro rozdílné způsoby použití Bi(III) jako chemického modifikátoru jsou uvedeny v Tab. 8. Z uvedených výsledků je patrné, že s Bi(III) v reakčním činidle bylo dosaženo cca 13-krát nižší meze detekce než v případě použití pouze kyseliny mravenčí.

Tab. 8: Základní charakteristiky stanovení As(III) pomocí FIA-UV-PVG-QFAAS s využitím Bi(III) a bez Bi(III)

Parametr	Bez Bi(III)	Po aktivaci Bi(III)	Bi(III) v nosném roztoku
Citlivost (mAU l μg^{-1} min)	$1,1 \times 10^{-2}$	$4,6 \times 10^{-2}$	$9,3 \times 10^{-2}$
LOD ($\mu\text{g l}^{-1}$)	28	5,3	2,9
LOQ ($\mu\text{g l}^{-1}$)	93	18	9,7
Opakovatelnost (%)	14	11	8,2
WDR do ($\mu\text{g l}^{-1}$)	1 000	1 000	250
Korelační koeficient	0,992	0,998	0,998

4.5.8 Optimální podmínky pro generování těkavých sloučenin arsenu

V Tab. 9 jsou shrnuty optimalizované podmínky pro stanovení As(III) pomocí metody FIA-UV-PVG-QFAAS v režimu průtokové injekční analýzy.

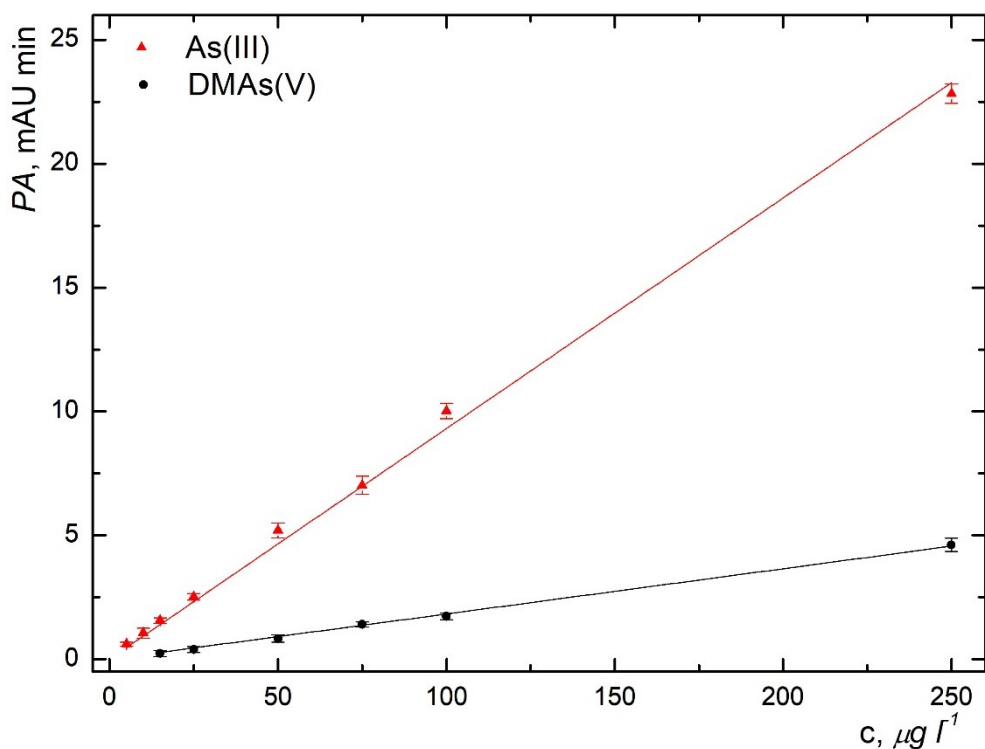
Tab. 9: Optimální podmínky pro generování těkavých sloučenin arsenu pomocí FIA-UV-PVG-QFAAS

Parametr	Optimální hodnota
Průtoková rychlost argonu (ml min^{-1})	25
Průtoková rychlost vodíku (ml min^{-1})	50
Dávkovaný objem (μl)	100
Teplota atomizátoru ($^{\circ}\text{C}$)	950
Koncentrace Bi(III) (mg l^{-1})	10
Průtoková rychlost roztoku HCOOH (ml min^{-1})	1
Délka reakční cívky (křemenné trubice) (m)	1
Výkon Hg-výbojky (W)	6
Objemové procento HCOOH (v/v) (%)	10

4.5.9 Základní charakteristiky stanovení As(III) a DMAs(V)

Za optimálních podmínek uvedených v Tab. 9 bylo testováno generování dalších specií As: As(III), As(V), DMAs(V) a MMAs(III). Byly získány signály pro As(III) a DMAs(V). As(V) a MMAs(III) poskytovaly velmi nízké signály, které nebylo možné odlišit od šumu základní linie. Bez detailní známosti mechanismu reakce pro UV-fotochemické generování těkavých sloučenin As je vysvětlení rozdílné účinnosti generování jednotlivých specií velice obtížné, ne-li nereálné.

Byly získány hodnoty základních charakteristik stanovení specií arsenu metodou UV-PVG-QFAAS v režimu FIA. Ze získaných ploch píků byly sestrojeny kalibrační závislosti (z ploch píků) (viz Obr. 22). Pracovní dynamický rozsah byl zvolen od 0 do 250 $\mu\text{g l}^{-1}$. Z důvodu potřeby získání kalibrační závislosti v oblasti nízkých koncentrací nebylo potřeba pracovat s vyšší koncentrací.



Obr. 22: Lineární část kalibrační závislosti stanovení As(III) a DMAs(V) pomocí metody FIA-UV-PVG-QFAAS

$$Q_{Ar} = 25 \text{ ml min}^{-1}, Q_{H_2} = 50 \text{ ml min}^{-1}, Q_{MF} = 1 \text{ ml min}^{-1}, V_{vz} = 100 \mu\text{l}, t_{atm} = 950 \text{ }^\circ\text{C}$$

$$\varphi_{HCOOH} (v/v) = 10 \%; P = 6 \text{ W}; l = 1 \text{ m}; c_{Bi(III)} = 10 \text{ mg l}^{-1}$$

Ze získaných kalibračních závislostí byly určeny citlivosti, opakovatelnost, meze detekce a stanovitelnosti. Základní charakteristiky pro metodu stanovení specií arsenu pomocí UV-PVG-QFAAS v režimu FIA jsou uvedeny v Tab. 10.

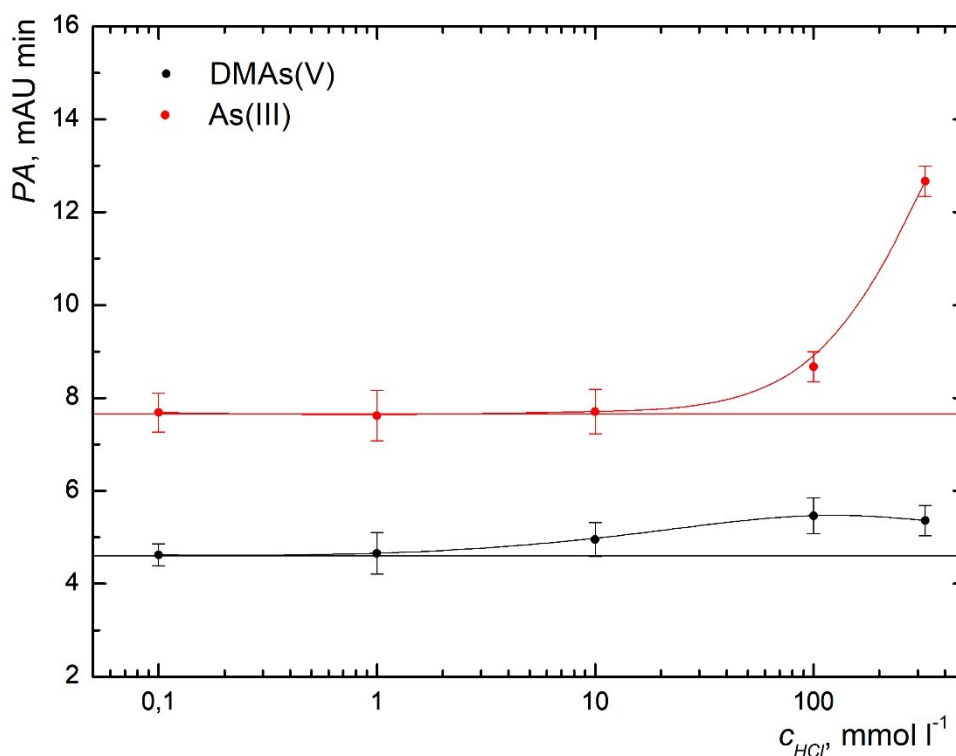
Tab. 10: Základní charakteristiky stanovení As(III) a DMAs(V) pomocí FIA-UV-PVG-QFAAS

Parametr	As(III)	DMAs(V)
Citlivost (mAU l μg^{-1} min)	$9,3 \times 10^{-2}$	$1,8 \times 10^{-2}$
LOD ($\mu\text{g l}^{-1}$)	2,9	14
LOQ ($\mu\text{g l}^{-1}$)	9,7	45
Opakovatelnost (%)	8,2	9,04
Korelační koeficient	0,998	0,998

4.5.10 Vliv přidavku kyseliny chlorovodíkové a dusičné

Cílem této studie bylo zjistit vliv matrice při UV-fotochemickém generování těkavých sloučenin arsenu. Zkoumána byla otázka, zda tyto kyseliny (přítomné v zásobním roztoku Bi(III) a Sb(III)) působí jako interferent či jako reakční modifikátor. Zásobní roztok Sb(III) je stabilizován HCl a zásobní roztok Bi(III) HNO₃, a proto byl zkoumán vliv kyseliny chlorovodíkové a kyseliny dusičné na analytický signál As(III) a DMAs(V). Kyseliny byly přidány k analytu As(III) nebo DMAs(V) o koncentraci 200 $\mu\text{g l}^{-1}$. V uvedených grafech je zobrazena vodorovná linka, která znázorňuje signál pro nulovou koncentraci kyseliny.

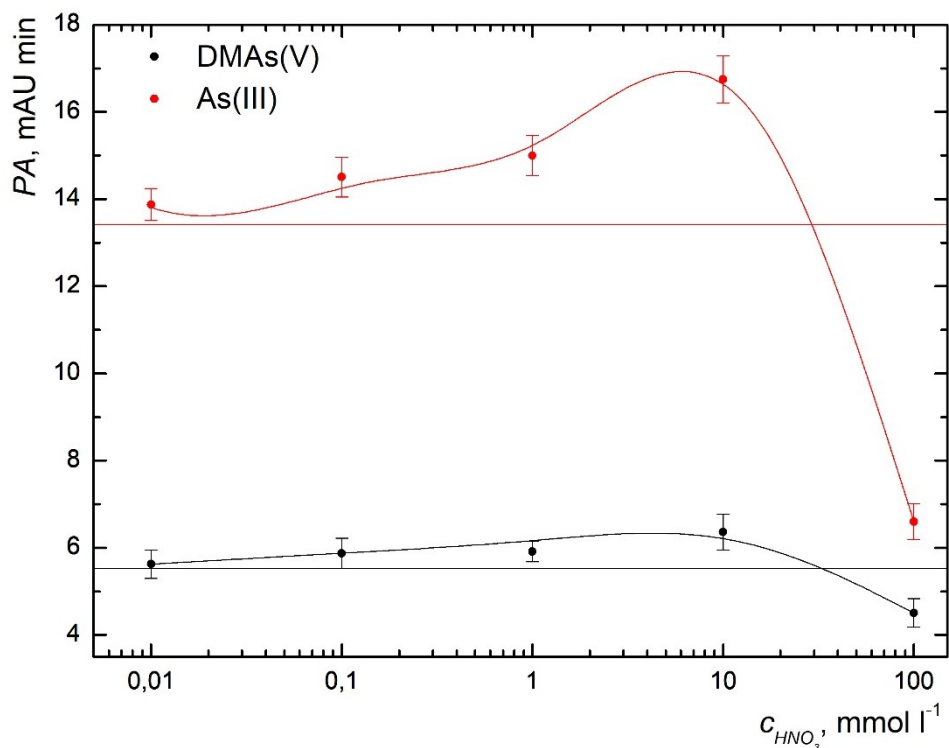
Vliv kyselin byl zkoumán pro koncentrace kyselin 0; 1; 10; 100 a 325 mmol l^{-1} . Z Obr. 23 je vidět, že kyselina chlorovodíková nemá výrazný vliv na analytický signál DMAs(V), avšak při vyšší koncentraci zvyšuje analytický signál získaný pro As(III).



Obr. 23: Vliv kyseliny chlorovodíkové na analytický signál pro As(III) a DMAs(V)

$Q_{Ar} = 25 \text{ ml min}^{-1}$, $Q_{H_2} = 50 \text{ ml min}^{-1}$, $Q_{MF} = 1 \text{ ml min}^{-1}$, $V_{vz} = 100 \text{ } \mu\text{l}$, $t_{atm} = 950 \text{ } ^\circ\text{C}$
 $\varphi_{HCOOH} \text{ (v/v)} = 10 \text{ } \%$; $c_{As(III)} = c_{DMAs(V)} = 200 \text{ } \mu\text{g l}^{-1}$; $P = 6 \text{ W}$; $l = 1 \text{ m}$; $c_{Bi(III)} = 10 \text{ mg l}^{-1}$

Závislost analytického signálu pro As(III) a DMAs(V) na koncentraci kyseliny dusičné je zobrazena na Obr. 24. S rostoucí koncentrací kyseliny dusičné roste signál As(III) až do maxima kolem 10 mmol l^{-1} . V případě DMAs(V) není nárůst signálu tak výrazný. Můžeme konstatovat, že kyselina dusičná v nízkých koncentracích pozitivně ovlivňuje měření a zvyšuje citlivost FIA-UV-PVG-QFAAS. Další zvýšení koncentrace kyseliny dusičné nad 10 mmol l^{-1} analytický signál obou specií potlačuje. Obdobná závislost již byla popsána v literatuře např. pro selen a jiné prvky [48,59,86,143,144].



Obr. 24: Vliv kyseliny dusičné na analytický signál As(III) a DMAs(V) FIA-UV-PVG-QFAAS

$Q_{Ar} = 25 \text{ ml min}^{-1}$, $Q_{H_2} = 50 \text{ ml min}^{-1}$, $Q_{MF} = 1 \text{ ml min}^{-1}$, $V_{vz} = 100 \text{ } \mu\text{l}$, $t_{atm} = 950 \text{ } ^\circ\text{C}$
 $\varphi_{HCOOH} \text{ (v/v)} = 10 \text{ } \%$; $c_{As(III)} = c_{DMAs(V)} = 200 \text{ } \mu\text{g l}^{-1}$; $P = 6 \text{ W}$; $l = 1 \text{ m}$; $c_{Bi(III)} = 10 \text{ mg l}^{-1}$

Koncentrace kyseliny dusičné a kyseliny chlorovodíkové ve výsledné mobilní fázi je přibližně 20 mmol l^{-1} . Z Obr. 23 a 24 vyplývá, že vliv iontů NO_3^- a Cl^- na signál As(III) a DMAs(V) jsou zanedbatelné a neovlivňují výsledný signál. Na základě výsledků této studie je patrné, že modifikace PVG je způsobena ionty Sb^{3+} anebo Bi^{3+} v mobilní fázi, jak je vidět na Obr. 20.

5 Závěr

Disertační práce se zabývá UV-fotochemickým generováním těkavých sloučenin arsenu a studené páry rtuti, jako alternativní metody k elektrochemické a chemické generování. Jako analyty byly zvoleny čtyři specíe rtuti: Hg(II), MeHg(I), EtHg(I) a PhHg(I) a dvě specíe arsenu: As(III) a DMAs(V).

Byly ověřeny optimální parametry pro stanovení specií rtuti pomocí RP-HPLC-UV-PVG-QTAAS s využitím nového atomového absorpčního spektrometru ContraAA700. Byly stanoveny základní charakteristiky dané metody pro tento detektor. Dále byla ověřena modifikovaná extrakční metoda. Praktická využitelnost a přesnost stanovení a extrakce byla ověřena analýzou referenčních materiálů a reálných vzorků. Výsledky byly ověřeny dvěma nezávislými metodami, a to stanovením celkového obsahu rtuti pomocí AMA 254 a nezávisle provedenou speciační analýzou pomocí HPLC-ICP-MS po extrakci specií Hg L-cysteinem. Výsledky potvrdily dostatečnou extrakční účinnost i dobrou shodu naměřených dat.

Za účelem porovnání UV-fotochemického generování studené páry rtuti byla použita metoda elektrochemického generování studené páry rtuti z vybraných specií. Byly nalezeny optimální parametry pro elektrochemické generování studené páry rtuti v módu průtokové injekční analýzy. Na jejich základě byly nalezeny také optimální podmínky pro RP-HPLC-EcVG-QTAAS a následně získány základní charakteristiky metody. Při použití RP_HPLC-EcVG-QTAAS dochází k výraznému chvostování píků, a tedy ke zhoršení rozlišení a opakovatelnosti. Navíc citlivost RP-HPLC-EcVG-QTAAS je přibližně 3 krát nižší oproti RP-HPLC-UV-PVG-QTAAS. Z výše uvedených důvodů není metoda RP-HPLC-EcVG-QTAAS vhodná pro stanovení specií rtuti.

Další část práce byla zaměřena na možnost využití UV-PVG ke stanovení specií arsenu. V neposlední řadě byly optimalizovány parametry pro UV fotochemický generátor, jako výkon zdroje záření, průtok analytu, materiál a délka reakční cívky. Bylo experimentálně zjištěno, že vhodnější zdroj pro UV-fotochemické generování těkavých sloučenin arsenu byl o výkonu 6 W.

Jako vhodné fotochemické činidlo pro stanovení As(III) byla nalezena kyselina mravenčí. Reakční produkty vznikající rozpadem nízkomolekulárních organických kyselin pomocí UV záření jsou dostačující pro vznik těkavé sloučeniny arsenu. V kyselině octové a propionové nebylo dosaženo žádných analytických signálů. Doba

setrvání analytu v UV-fotochemickém generátoru je dána kombinací těchto parametrů: rychlostí nosného plynu a reakčního plynu, průtokovou rychlostí roztoku reakčního činidla a délkou reakční cívky. Bylo zjištěno, že průtoková rychlost roztoku kyseliny není významným parametrem.

Vliv matrice na studované specie arsenu může mít zásadní vliv na citlivost stanovení při UV-fotochemickém generování. V přítomnosti Sb(III) a Bi(III) byl pozorován pozitivní efekt na analytický signál, proto byly tyto ionty brány jako reakční modifikátory. Při použití Bi(III) byl analytický signál As(III) výrazně vyšší. Koncentrace 10 mg l^{-1} byla zvolena jako optimální hodnota. Citlivost stanovení As(III) metodou FIA-UV-PVG-QFAAS při koncentraci Bi(III) 10 mg l^{-1} v 10 % (v/v) kyselině mravenčí je přibližně 9krát vyšší, než když je přítomna pouze samotná kyselina mravenčí.

Pomocí metody FIA-UV-PVG-QFAAS byly úspěšně stanoveny dvě specie arsenu: As(III) a DMAs(V). Z As(V) a MMAs(III) se těkavé sloučeniny generovat nepodařilo, a to ani při použití předredukčního kroku. Dosažené výsledky však zatím neumožňují speciální analýzu arsenu pomocí HPLC systému.

6 Literatura:

- [1] Cotton, F. A.; Wilkinson, G.; Gaus, P. L.: *Basic Inorganic Chemistry*. New York: John Wiley & Sons, Ltd, 3rd edn.1996vol. 73.
- [2] Klikorka, J.; Hájek, B.; Votinský, J.: *Obecná a anorganická chemie*. (ed.) Literatury, S.-N. technické Praha: 1989.
- [3] Lukeš, I.: *Systematická anorganická chemie*. Praha: Karolinum, 1. vyd.2009.
- [4] Lutter, R.; Irwin, E.: Mercury in the environment: a volatile problem. *Environment*:44(9), 24–41 (2002).
- [5] Ravichandran, M.: Interactions between mercury and dissolved organic matter - A review. *Chemosphere* **55**:3, 319–331 (2004).
- [6] Ordóñez, A.; Álvarez, R.; Loredó, J.: Asturian mercury mining district (Spain) and the environment: A review. *Environ Sci Pollut Res* **20**:11, 7490–7508 (2013).
- [7] Kainz, M.; Lucotte, M.: Mercury concentrations in lake sediments - Revisiting the predictive power of catchment morphometry and organic matter composition. *Water Air Soil Pollut* **170**:1–4, 173–189 (2006).
- [8] Centineo, G.; González, E. B.; Sanz-Medel, A.: Multielemental speciation analysis of organometallic compounds of mercury, lead and tin in natural water samples by headspace-solid phase microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A* **1034**:1–2, 191–197 (2004).
- [9] Muñoz, J.; Gallego, M.; Valcárcel, M.: Solid-phase extraction-gas chromatography-mass spectrometry using a fullerene sorbent for the determination of inorganic mercury(II), methylmercury(I) and ethylmercury(I) in surface waters at sub-ng/ml levels. *J Chromatogr A* **1055**:1–2, 185–190 (2004).
- [10] Casarett, L.; Doull, J.; Klaassen, C.: *Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons*. New York: McGraw-Hill Medical Pub. Division, 6th ed.2001.
- [11] Velíšek, J.: *Chemie potravin*. Tábor: OSSIS, Vyd. 1.1999.
- [12] Houserová, P.; Janák, K.; Kubáň, P.; et al.: Chemické formy rtuti ve vodních ekosystémech - vlastnosti, úrovně, koloběh a stanovení. *Chem List* **100**, 862–876 (2006).
- [13] Celo, V.; Lean, D. R. S.; Scott, S. L.: Abiotic methylation of mercury in the aquatic environment. *Sci Total Environ* **368**:1, 126–137 (2006).
- [14] Urban, P.: Aktuální problémy neurotoxicity rtuti. *Neurol pro praxi* **5**, 251–253

(2006).

[15] Valera, B.; Dewailly, E.; Poirier, P.; et al.: Influence of mercury exposure on blood pressure, resting heart rate and heart rate variability in French Polynesians: a cross-sectional study. *Environ Heal* **10**:1, 99 (2011).

[16] Hoshino, A. C. H.; Ferreira, H. P.; Malm, O.; et al.: A systematic review of mercury ototoxicity. *Cad Saude Publica* **28**:7, 1239–1248 (2012).

[17] Virtanen, J. K.; Rissanen, T. H.; Voutilainen, S.; Tuomainen, T.-P.: Mercury as a risk factor for cardiovascular diseases. *J Nutr Biochem* **18**:2, 75–85 (2007).

[18] Hughes, M. F.: Arsenic toxicity and potential mechanisms of action. *Toxicol Lett* **133**:1, 1–16 (2002).

[19] Rahman, M.; Tondel, M.; Ahmad, S. a; Axelson, O.: Diabetes mellitus associated with arsenic exposure in Bangladesh. *Am J Epidemiol* **148**:2, 198–203 (1998).

[20] Tondel, M.; Rahman, M.; Magnuson, A.; et al.: The relationship of arsenic levels in drinking water and the prevalence rate of skin lesions in Bangladesh. *Environ Health Perspect* **107**:9, 727–729 (1999).

[21] Smith, A. H.; Lingas, E. O.; Rahman, M.: Contamination of drinking-water by arsenic in Bangladesh: A public health emergency. *Bull World Health Organ* **78**:9, 1093–1103 (2000).

[22] Valenzuela, O. L.; Borja-Aburto, V. H.; Garcia-Vargas, G. G.; et al.: Urinary trivalent methylated arsenic species in a population chronically exposed to inorganic arsenic. *Environ Health Perspect* **113**:3, 250–254 (2005).

[23] Nischwitz, V.; Pergantis, S. A.: Optimisation of an HPLC selected reaction monitoring electrospray tandem mass spectrometry method for the detection of 50 arsenic species. *J Anal At Spectrom* **21**:11, 1277 (2006).

[24] Francesconi, K. a.: Arsenic species in seafood: Origin and human health implications. *Pure Appl Chem* **82**:2, 373–381 (2010).

[25] Feldmann, J.; Krupp, E. M.: Critical review or scientific opinion paper: Arsenosugars-a class of benign arsenic species or justification for developing partly speciated arsenic fractionation in foodstuffs? *Anal Bioanal Chem* **399**:5, 1735–1741 (2011).

[26] Taylor, V.; Goodale, B.; Raab, A.; et al.: Human exposure to organic arsenic species from seafood. *Sci Total Environ* **580**, 266–282 (2017).

- [27] D'Ulivo, A.: Mechanism of generation of volatile species by aqueous boranes: Towards the clarification of most controversial aspects. *Spectrochim Acta - Part B At Spectrosc* **65**:5, 360–375 (2010).
- [28] Blanco, R.; Villanueva, M.: Field sampling, preconcentration and determination of mercury species in river waters. *Anal Chim Acta* **419**, 137–144 (2000).
- [29] Dědina, J.; Tsalev, D.: *Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry*. Chichester: Wiley, 1995.
- [30] Matusiewicz, H.; Krawczyk, M.: Hydride Generation - in situ Trapping - flame Atomic Absorption Spectrometry Hybridization for Indium and Thallium Determination. *J Braz Chem Soc* **18**:2, 304–311 (2007).
- [31] Lu, Y. kai; Sun, H. W.; Yuan, C. G.; Yan, X. P.: Simultaneous determination of trace cadmium and arsenic in biological samples by hydride generation-double channel atomic fluorescence spectrometry. *Anal Chem* **74**:7, 1525–1529 (2002).
- [32] Matoušek, T.; Sturgeon, R. E.: Surfactant assisted chemical vapour generation of silver for AAS and ICP-OES: a mechanistic study. *J Anal At Spectrom* **18**:5, 487–494 (2003).
- [33] Arslan, Y.; Matousek, T.; Kratzer, J.; et al.: Gold volatile compound generation: optimalization, efficiency and characterization of the generated form. *J. Anal. At. Spectrom* **26**:4, 828-837 (2011).
- [34] Sun, H.; Suo, R.; Lu, Y.: Determination of zinc in food using atomic fluorescence spectrometry by hydride generation from organized media. *Anal Chim Acta* **457**:2, 305–310 (2002).
- [35] Yin, Y.; Liu, J.; He, B.; et al.: Mercury speciation by a high performance liquid chromatography—atomic fluorescence spectrometry hyphenated system with photo-induced chemical vapour generation reagent in the mobile phase. *Microchim Acta* **167**, 289–295 (2009).
- [36] Gao, Y.; Shi, Z.; Long, Z.; et al.: Determination and speciation of mercury in environmental and biological samples by analytical atomic spectrometry. *Microchem J* **103**, 1–14 (2012).
- [37] Hou, X.; Ai, X.; Jiang, X.; et al.: UV light-emitting-diode photochemical mercury vapor generation for atomic fluorescence spectrometry. *Analyst* **137**:3, 686–690 (2012).
- [38] de Jesus, A.; Zmozinski, A. V.; Vieira, M. A.; et al.: Determination of mercury in

- naphtha and petroleum condensate by photochemical vapor generation atomic absorption spectrometry. *Microchem J* **110**, 227–232 (2013).
- [39] de Quadros, D. P. C.; Campanella, B.; Onor, M.; et al.: Mercury speciation by high-performance liquid chromatography atomic fluorescence spectrometry using an integrated microwave/UV interface. Optimization of a single step procedure for the simultaneous photo-oxidation of mercury species and photo-generation . *Spectrochim Acta Part B At Spectrosc* **101**, 312–319 (2014).
- [40] Feng, Y. L.; Lam, J. W.; Sturgeon, R. E.: Expanding the scope of chemical vapor generation for noble and transition metals. *Analyst* **126**, 1833–1837 (2001).
- [41] Sturgeon, R. E.; Guo, X.; Mester, Z.: Chemical vapor generation: are further advances yet possible? *Anal Bioanal Chem* **382**:4, 881–883 (2005).
- [42] Rybínová, M.; Červený, V.; Hraníček, J.; Rychlovský, P.: Uv-fotochemické generování těžkých sloučenin pro potřeby atomových spektrometrických metod. *Chem List* **109**:12, 930–937 (2015).
- [43] Grinberg, P.; Sturgeon, R. E.; Gardner, G.: Identification of volatile iron species generated by UV photolysis. *Microchem J* **105**, 44–47 (2012).
- [44] Grinberg, P.; Mester, Z.; Sturgeon, R. E.; Ferretti, A.: Generation of volatile cobalt species by UV photoreduction and their tentative identification. *J Anal At Spectrom* **23**:4, 583 (2008).
- [45] Guo, X.; Sturgeon, R. E.; Mester, Z.; Gardner, G. J.: Vapor generation by UV irradiation for sample introduction with atomic spectrometry. *Anal Chem* **76**:8, 2401–5 (2004).
- [46] Welz, B.; Sperling, M.: *Atomic Absorption Spectrometry*. Wiley-VCH, 3rd edn.1999.
- [47] Dědina, J.: Generation of Volatile Compounds for Analytical Atomic Spectroscopy. In: *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, (ed.) Meyers, R. A. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2010, p. 1–39.
- [48] Zheng, C.; Sturgeon, R. E.; Hou, X.: UV photochemical vapor generation and in situ preconcentration for determination of ultra-trace nickel by flow injection graphite furnace atomic absorption spectrometry. *J Anal At Spectrom* **24**:10, 1452 (2009).
- [49] Figueroa, R.; García, M.; Lavilla, I.; Bendicho, C.: Photoassisted vapor generation in the presence of organic acids for ultrasensitive determination of Se by electrothermal-

- atomic absorption spectrometry following headspace single-drop microextraction. *Spectrochim Acta - Part B At Spectrosc* **60**:12, 1556–1563 (2005).
- [50] Nóbrega, J. A.; Sturgeon, R. E.; Grinberg, P.; et al.: UV photochemical generation of volatile cadmium species. *J Anal At Spectrom* **26**:12, 2519 (2011).
- [51] Matoušek, T.; Hernández-Zavala, A.; Svoboda, M.; et al.: Oxidation state specific generation of arsines from methylated arsenicals based on l-cysteine treatment in buffered media for speciation analysis by hydride generation-automated cryotrapping-gas chromatography-atomic absorption spectrometry with the multi. *Spectrochim Acta - Part B At Spectrosc* **63**:3, 396–406 (2008).
- [52] Musil, S.; Matoušek, T.: On-line pre-reduction of pentavalent arsenicals by thioglycolic acid for speciation analysis by selective hydride generation-cryotrapping-atomic absorption spectrometry. *Spectrochim Acta - Part B At Spectrosc* **63**:6, 685–691 (2008).
- [53] Hraníček, J.; Červený, V.; Rychlovský, P.: Determination of Ultratrace Selenium and Arsenic in Drinking Water by Electrochemical Hydride Generation Coupled with Quartz Furnace - Atomic Absorption Spectrometry. *Chem List* **104**, 1196–1203 (2010).
- [54] Becker, E. M.; Dessuy, M. B.; Boschetti, W.; et al.: Development of an analytical method for the determination of arsenic in gasoline samples by hydride generation-graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Spectrochim Acta - Part B At Spectrosc* **71–72**, 102–106 (2012).
- [55] Huang, Y.; Shan, J.; Fan, B.; et al.: Determination of inorganic arsenic in rice by solid phase extraction and hydride generation atomic fluorescence spectrometry. *Anal Methods* **7**:20, 8896–8900 (2015).
- [56] Chen, M. L.; Zou, A. M.; Yu, Y. L.; He, R. H.: Hyphenation of flow injection/sequential injection with chemical hydride/vapor generation atomic fluorescence spectrometry. *Talanta* **73**:4, 599–605 (2007).
- [57] Zu, W.; Wang, Z.: Ultra-trace determination of methylmercury in seafood by atomic fluorescence spectrometry coupled with electrochemical cold vapor generation. *J Hazard Mater* **304**, 467–473 (2016).
- [58] Li, H.; Luo, Y.; Li, Z.; et al.: Nanosemiconductor-based photocatalytic vapor generation systems for subsequent selenium determination and speciation with atomic fluorescence spectrometry and inductively coupled plasma mass spectrometry. *Anal*

Chem **84**:6, 2974–2981 (2012).

[59] Zheng, C.; Wu, L.; Ma, Q.; et al.: Temperature and nano-TiO₂ controlled photochemical vapor generation for inorganic selenium speciation analysis by AFS or ICP-MS without chromatographic separation. *J Anal At Spectrom* **23**:4, 514 (2008).

[60] Zheng, C.; Ma, Q.; Wu, L.; et al.: UV photochemical vapor generation-atomic fluorescence spectrometric determination of conventional hydride generation elements. *Microchem J* **95**:1, 32–37 (2010).

[61] de Quadros, D. P. C.; Borges, D. L. G.: Direct analysis of alcoholic beverages for the determination of cobalt, nickel and tellurium by inductively coupled plasma mass spectrometry following photochemical vapor generation. *Microchem J* **116**, 244–248 (2014).

[62] Sun, Y. C.; Chang, Y. C.; Su, C. K.: On-line HPLC-UV/nano-TiO₂-ICPMS system for the determination of inorganic selenium species. *Anal Chem* **78**:8, 2640–2645 (2006).

[63] Shih, T. T.; Hsu, I. H.; Wu, J. F.; et al.: Development of chip-based photocatalyst-assisted reduction device to couple high performance liquid chromatography and inductively coupled plasma-mass spectrometry for determination of inorganic selenium species. *J Chromatogr A* **1304**, 101–108 (2013).

[64] Rybínová, M.; Červený, V.; Rychlovský, P.: UV-photochemical vapour generation with in situ trapping in a graphite tube atomizer for ultratrace determination of selenium. *J Anal At Spectrom* **30**:8, 1752–1763 (2015).

[65] Marschner, K.; Musil, S.; Dědina, J.: Flame-in-gas-shield and miniature diffusion flame hydride atomizers for atomic fluorescence spectrometry: Optimization and comparison. *Spectrochim Acta - Part B At Spectrosc* **109**, 16–23 (2015).

[66] Marschner, K.; Musil, S.; Dědina, J.: Demethylation of Methylated Arsenic Species during Generation of Arsanes with Tetrahydridoborate(1-) in Acidic Media. *Anal Chem* **88**:12, 6366–6373 (2016).

[67] Marschner, K.; Musil, S.; Dědina, J.: Achieving 100% Efficient Postcolumn Hydride Generation for As Speciation Analysis by Atomic Fluorescence Spectrometry. *Anal Chem* **88**:7, 4041–4047 (2016).

[68] Wu, P.; He, L.; Zheng, C.; et al.: Applications of chemical vapor generation in non-tetrahydroborate media to analytical atomic spectrometry. *J Anal At Spectrom* **25**,

1217 (2010).

[69] D'Ulivo, A.; Mester, Z.; Sturgeon, R. E.: The mechanism of formation of volatile hydrides by tetrahydroborate(III) derivatization: A mass spectrometric study performed with deuterium labeled reagents. *Spectrochim Acta - Part B At Spectrosc* **60**:4, 423–438 (2005).

[70] D'Ulivo, A.; Onor, M.; Pitzalis, E.: Role of hydroboron intermediates in the mechanism of chemical vapor generation in strongly acidic media. *Anal Chem* **76**:21, 6342–6352 (2004).

[71] D'Ulivo, A.: Chemical vapor generation by tetrahydroborate(III) and other borane complexes in aqueous media: A critical discussion of fundamental processes and mechanisms involved in reagent decomposition and hydride formation. *Spectrochim Acta - Part B At Spectrosc* **59**:6, 793–825 (2004).

[72] Ramalhosa, E.; Río Segade, S.; Pereira, E.; et al.: Simple methodology for methylmercury and inorganic mercury determinations by high-performance liquid chromatography-cold vapour atomic fluorescence spectrometry. *Anal Chim Acta* **448**:1–2, 135–143 (2001).

[73] Río-Segade, S.; Bendicho, C.: On-line high-performance liquid-chromatographic separation and cold vapor atomic absorption spectrometric determination of methylmercury and inorganic mercury. *Talanta* **48**, 477–484 (1999).

[74] Wu, L.; Long, Z.; Liu, L.; et al.: Microwave-enhanced cold vapor generation for speciation analysis of mercury by atomic fluorescence spectrometry. *Talanta* **94**, 146–151 (2012).

[75] Da Silva, D. G.; Portugal, L. A.; Serra, A. M.; et al.: Determination of mercury in rice by MSFIA and cold vapour atomic fluorescence spectrometry. *Food Chem* **137**:1–4, 159–163 (2013).

[76] D'Ulivo, A.; Baiocchi, C.; Pitzalis, E.; et al.: Chemical vapor generation for atomic spectrometry. A contribution to the comprehension of reaction mechanisms in the generation of volatile hydrides using borane complexes. *Spectrochim Acta - Part B At Spectrosc* **59**:4, 471–486 (2004).

[77] Wang, F. T.; Jolly, W. L.: A Kinetic Study of the Intermediates in the Hydrolysis of the Hydroborate Ion. *Inorg Chem* **11**:8, 1933–1941 (1972).

[78] D'Ulivo, A.; Mester, Z.; Meija, J.; Sturgeon, R. E.: Mechanism of generation of

- volatile hydrides of trace elements by aqueous tetrahydroborate(III). Mass spectrometric studies on reaction products and intermediates. *Anal Chem* **79**:7, 3008–3015 (2007).
- [79] Červený, V.; Rychlovský, P.; Hraníček, J.; Šíma, J.: Elektrochemické generování těkavých sloučenin pro potřeby spektrálních analytických metod. *Chem List* **103**, 652–660 (2009).
- [80] Červený, V.; Rychlovský, P.; Netolická, J.; Šíma, J.: Electrochemical generation of mercury cold vapor and its in-situ trapping in gold-covered graphite tube atomizers. *Spectrochim Acta - Part B At Spectrosc* **62**:3 SPEC. ISS., 317–323 (2007).
- [81] Šíma, J.; Rychlovský, P.; Dědina, J.: The efficiency of the electrochemical generation of volatile hydrides studied by radiometry and atomic absorption spectrometry. *Spectrochim Acta - Part B At Spectrosc* **59**:1, 125–133 (2004).
- [82] Šíma, J.; Rychlovský, P.: Electrochemical selenium hydride generation with in situ trapping in graphite tube atomizers. *Spectrochim Acta - Part B At Spectrosc* **58**:5, 919–930 (2003).
- [83] Denkhaus, E.; Golloch, A.; Guo, X. M.; Huang, B.: Electrolytic hydride generation (EC-HG) - a sample introduction system with some special features. *J Anal At Spectrom* **16**, 870–878 (2001).
- [84] Laborda, F.; Bolea, E.; Castillo, J. R.: Electrochemical hydride generation as a sample-introduction technique in atomic spectrometry: fundamentals, interferences, and applications. *Anal Bioanal Chem* **388**:4, 743–51 (2007).
- [85] Denkhaus, E.; Beck, F.; Bueschler, P.; et al.: Electrolytic hydride generation atomic absorption spectrometry for the determination of antimony, arsenic, selenium, and tin -mechanistic aspects and figures of merit. *Fresenius J Anal Chem* **370**, 735–743 (2001).
- [86] Guo, X.; Sturgeon, R. E.; Mester, Z.; Gardner, G. J.: UV vapor generation for determination of selenium by heated quartz tube atomic absorption spectrometry. *Anal Chem* **75**:9, 2092–2099 (2003).
- [87] Guo, X.; Sturgeon, R. E.; Mester, Z.; Gardner, G. J.: Photochemical Alkylation of Inorganic Selenium in the Presence of Low Molecular Weight Organic Acids. *Environ Sci Technol* **37**:24, 5645–5650 (2003).
- [88] Guo, X.; Sturgeon, R. E.; Mester, Z.; Gardner, G. J.: Photochemical alkylation of inorganic arsenic : Part 1. Identification of volatile arsenic species. *J Anal At Spectrom*

20:8, 702 (2005).

[89] McSheehy, S.; Guo, X.-M.; Sturgeon, R. E.; Mester, Z.: Photochemical alkylation of inorganic arsenic : Part 2. Identification of aqueous phase organoarsenic species using multidimensional liquid chromatography and electrospray mass spectrometry. *J Anal At Spectrom* **20**:8, 709 (2005).

[90] Jia, J.; Long, Z.; Zheng, C.; et al.: Metal organic frameworks CAU-1 as new photocatalyst for photochemical vapour generation for analytical atomic spectrometry. *J Anal At Spectrom* **30**:2, 339–342 (2015).

[91] Deng, D.; Zhou, J.; Ai, X.; et al.: Ultrasensitive determination of selenium by atomic fluorescence spectrometry using nano-TiO₂ pre-concentration and in situ hydride generation. *J Anal At Spectrom* **27**:2, 270–275 (2012).

[92] Yang, W.; Gao, Y.; Wu, L.; et al.: Preconcentration and in-situ photoreduction of trace selenium using TiO₂ nanoparticles, followed by its determination by slurry photochemical vapor generation atomic fluorescence spectrometry. *Microchim Acta* **181**:1–2, 197–204 (2014).

[93] Nováková, E.; Linhart, O.; Červený, V.; et al.: Flow injection determination of Se in dietary supplements using TiO₂ mediated ultraviolet-photochemical volatile species generation. *Spectrochim Acta - Part B At Spectrosc* **134** (2017).

[94] Wang, X.; Pehkonen, S. O.; Ray, A. K.: Photocatalytic reduction of Hg(II) on two commercial TiO₂ catalysts. *Electrochim Acta* **49**:9–10, 1435–1444 (2004).

[95] Yin, Y.; Liang, J.; Yang, L.; Wang, Q.: Vapour generation at a UV/TiO₂ photocatalysis reaction device for determination and speciation of mercury by AFS and HPLC-AFS. *J Anal At Spectrom* **22**, 330–334 (2007).

[96] Yin, Y.; Liu, J.; Jiang, G.: Photo-induced chemical-vapor generation for sample introduction in atomic spectrometry. *TrAC - Trends Anal Chem* **30**:10, 1672–1684 (2011).

[97] Sturgeon, R. E.; Grinberg, P.: Some speculations on the mechanisms of photochemical vapor generation. *J Anal At Spectrom* **27**:2, 222–231 (2012).

[98] Sturgeon, R. E.: Photochemical vapor generation: a radical approach to analyte introduction for atomic spectrometry. *J Anal At Spectrom* **32**, 2319–2340 (2017).

[99] Teo, K. C.; Chen, J.: Determination of manganese in water samples by flame atomic absorption spectrometry after cloud point extraction. *Analyst* **126**:4, 534–537

(2001).

[100] Ferreira, S. L. C.; Lemos, V. A.; Moreira, B. C.; et al.: An on-line continuous flow system for copper enrichment and determination by flame atomic absorption spectroscopy. *Anal Chim Acta* **403**:1–2, 259–264 (2000).

[101] Dedina, J.; D’Ulivo, A.; Lampugnani, L.; et al.: Selenium hydride atomization, fate of free atoms and spectroscopic temperature in miniature diffusion flame atomizer studied by atomic absorption spectrometry. *Spectrochim acta, Part B At Spectrosc* **53**:13, 1777–1790 (1998).

[102] D’Ulivo, A.; Dědina, J.; Lampugnani, L.; Matoušek, T.: Mechanism of selenium hydride atomization, fate of free atoms and temperature distribution in an argon shielded, highly fuel-rich, hydrogen–oxygen diffusion micro-flame studied by atomic absorption spectrometry. *J Anal At Spectrom* **17**:3, 253–257 (2002).

[103] Leng, A.-Q.; Tian, Y.-F.; Wang, M.-X.; et al.: A sensitive and compact mercury analyzer by integrating dielectric barrier discharge induced cold vapor generation and optical emission spectrometry. *Chinese Chem Lett* **28**:2, 189–196 (2017).

[104] Duben, O.; Boušek, J.; Dědina, J.; Kratzer, J.: Dielectric barrier discharge plasma atomizer for hydride generation atomic absorption spectrometry - Performance evaluation for selenium. *Spectrochim Acta - Part B At Spectrosc* **111**, 57–63 (2015).

[105] Hou, X.; Ai, X.; Jiang, X.; et al.: UV light-emitting-diode photochemical mercury vapor generation for atomic fluorescence spectrometry. *Analyst* **137**:3, 686–90 (2012).

[106] Winefordner, J. D.; Vickers, T. J.: Atomic Fluorescence Spectrometry as a Means of Chemical Analysis. *Anal Chem* **36**:1, 161–165 (1964).

[107] Winefordner, J. D.; Staab, R. A.: Determination of Zinc, Cadmium, and Mercury by Atomic Fluorescence Flame Spectrometry. *Anal Chem* **36**:1, 165–168 (1964).

[108] Brandt, S.; Schütz, A.; Klute, F. D.; et al.: Dielectric barrier discharges applied for optical spectrometry. *Spectrochim Acta - Part B At Spectrosc* **123**, 6–32 (2016).

[109] Xing, Z.; Wang, J.; Zhang, S. C.; Zhang, X. R.: Determination of bismuth in solid samples by hydride generation atomic fluorescence spectrometry with a dielectric barrier discharge atomizer. *Talanta* **80**:1, 139–142 (2009).

[110] Xing, Z.; Kuermaiti, B.; Wang, J.; et al.: Simultaneous determination of arsenic and antimony by hydride generation atomic fluorescence spectrometry with dielectric barrier discharge atomizer. *Spectrochim Acta - Part B At Spectrosc* **65**:12, 1056–1060

(2010).

[111] Zhu, Z.; Liu, J.; Zhang, S.; et al.: Determination of Se, Pb, and Sb by atomic fluorescence spectrometry using a new flameless, dielectric barrier discharge atomizer. *Spectrochim Acta - Part B At Spectrosc* **63**:3, 431–436 (2008).

[112] Dědina, J.: Atomization of volatile compounds for atomic absorption and atomic fluorescence spectrometry: On the way towards the ideal atomizer. *Spectrochim Acta Part B At Spectrosc* **62**:9, 846–872 (2007).

[113] Dědina, J.; D'Ulivo, A.: Argon shielded, highly fuel-rich, hydrogen-oxygen diffusion microflame - A new hydride atomizer. *Spectrochim Acta - Part B At Spectrosc* **52**:12, 1737–1746 (1997).

[114] Templeton, D. M.; Ariese, F.; Cornelis, R.; et al.: Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects, and methodological approach (IUPAC Recommendations 2000). *Clin Chem* **72**:8, 1453–1470 (2000).

[115] Musil, S.; Pétursdóttir, Á. H.; Raab, A.; et al.: Speciation without chromatography using selective hydride generation: Inorganic arsenic in rice and samples of marine origin. *Anal Chem* **86**:2, 993–999 (2014).

[116] Suzuki, T.; Sturgeon, R. E.; Zheng, C.; et al.: Influence of Speciation on the Response from Selenium to UV-Photochemical Vapor Generation. *Anal Sci* **28**:8, 807–811 (2012).

[117] Sanchez, D.; Martin, R.; Morante, R.; et al.: Preconcentration speciation method for mercury compounds in water samples using solid phase extraction followed by reversed phase high performance. *Talanta* **52**, 671–679 (2000).

[118] Cai, Y.: Speciation and analysis of mercury, arsenic, and selenium by atomic fluorescence spectrometry. *TrAC Trends Anal Chem* **19**:1, 62–66 (2000).

[119] Harrington, C. F.: The speciation of mercury and organomercury compounds by using high-performance liquid chromatography. *Trends Anal Chem* **19**, 167–179 (2000).

[120] Rai, R.; Maher, W.; Kirkowa, F.: Measurement of inorganic and methylmercury in fish tissues by enzymatic hydrolysis and HPLC-ICP-MS. *J Anal At Spectrom* **17**:11, 1560–1563 (2002).

[121] Gomez-Ariza, J. L.; García-Barrera, T.; Lorenzo, F.: Simultaneous determination of mercury and arsenic species in natural freshwater by liquid chromatography with on-

- line UV irradiation, generation of hydrides and cold vapor and tandem atomic fluorescence detection. *J Chromatogr A* **1056**, 139–144 (2004).
- [122] Bramanti, E.; Lomonte, C.; Onor, M.; et al.: Mercury speciation by liquid chromatography coupled with on-line chemical vapour generation and atomic fluorescence spectrometric detection (LC-CVGAFS). *Talanta* **66**:3, 762–8 (2005).
- [123] Novotná, J.: *Speciace rtuti v sedimentech HPLC-AFS*. Brno: 2006.
- [124] Hight, S. C.; Cheng, J.: Determination of methylmercury and estimation of total mercury in seafood using high performance liquid chromatography (HPLC) and inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS): Method development and validation. *Anal Chim Acta* **567**:2, 160–172 (2006).
- [125] Juhászová, L.: *Speciační analýza rtuti pomocí generování těkavých specií s vymrazováním a detekcí ICP-MS*. Bakalářská práce. Univerzita Karlova, 2017.
- [126] Sarzanini, C.; Sacchero, G.; Aceto, M.: Ion chromatographic separation and on-line cold vapour atomic absorption spectrometric determination of methylmercury, ethylmercury and inorganic mercury. *Anal Chim Acta* **284**, 661–667 (1994).
- [127] Liu, Q.: Determination of mercury and methylmercury in seafood by ion chromatography using photo-induced chemical vapor generation atomic fluorescence spectrometric detection. *Microchem J* **95**:2, 255–258 (2010).
- [128] Yin, Y.; Qiu, J.; Yang, L.; Wang, Q.: A new vapor generation system for mercury species based on the UV irradiation of mercaptoethanol used in the determination of total and methyl mercury in environmental and biological samples by atomic fluorescence spectrometry. *Anal Bioanal Chem* **388**, 831–836 (2007).
- [129] López, I.; Cuello, S.; Cámara, C.; Madrid, Y.: Approach for rapid extraction and speciation of mercury using a microtip ultrasonic probe followed by LC-ICP-MS. *Talanta* **82**:2, 594–599 (2010).
- [130] Francesconi, K. A.; Kuehnelt, D.: Determination of arsenic species: A critical review of methods and applications, 2000-2003. *Analyst* **129**:5, 373–395 (2004).
- [131] Chen, Y. W.; Belzile, N.: High performance liquid chromatography coupled to atomic fluorescence spectrometry for the speciation of the hydride and chemical vapour-forming elements As, Se, Sb and Hg: A critical review. *Anal Chim Acta* **671**:1–2, 9–26 (2010).
- [132] Plzák, Z.; Milde, D.: *Názvosloví v oblasti metrologie a zabezpečování kvality*.

Chem List **106**, 41–44 (2012).

[133] Linhart, O.: Speciační analýza vybraných sloučenin rtuti pomocí HPLC, UV-fotochemického generování studené páry rtuti a její detekce AAS. Diplomová práce. Univerzita Karlova, 2013.

[134] Kolorosová, A.: Extrakce vybraných sloučenin rtuti z reálných vzorků pro speciační analýzu pomocí RP-HPLC-UV-CVG-QTAAS. Diplomová práce. Univerzita Karlova, 2015.

[135] DE SOUZA, S.; CAMPIGLIA, A. D.; BARBOSA, F.: : A simple method for methylmercury, inorganic mercury and ethylmercury determination in plasma samples by high performance liquid chromatography–cold-vapor-inductively coupled plasma mass spectrometry. *Anal Chim Acta* **761**, 11–17 (2013).

[136] Leng, G.; Feng, L.; Li, S.-B.; et al.: Speciation analysis of mercury in sediments by HPLC using HPLC hyphenated to vapour generation atomic fluorescence spectrometry following microwave-assisted extraction. *LC GC Eur* **26**:5, 250–258 (2013).

[137] Yun, Z.; He, B.; Wang, Z.; et al.: Evaluation of different extraction procedures for determination of organic Mercury species in petroleum by high performance liquid chromatography coupled with cold vapor atomic fluorescence spectrometry. *Talanta* **106**, 60–5 (2013).

[138] CHANG, L.-F.; JIANG, S.-J.; Sahayam, A. C.: Speciation analysis of mercury and lead in fish samples using liquid chromatography–inductively coupled plasma mass spectrometry. *J Chromatogr A* **1176**:1–2, 143–148 (2007).

[139] Falter, R.; Schöler, H.: Determination of mercury species in natural waters at picogram level with on-line RP C18 preconcentration and HPLC-UV-PCO-CVAAS. *Fresenius J Anal Chem* **353**, 34–38 (1995).

[140] Vidler, D. S.; Jenkins, R. O.; Hall, J. F.; Harrington, C. F.: The determination of methylmercury in biological samples by HPLC coupled to ICP-MS detection. *Appl Organomet Chem* **21**:5, 303–310 (2007).

[141] Zheng, W.; Hintelmann, H.: Isotope fractionation of mercury during its photochemical reduction by low-molecular-weight organic compounds. *J Phys Chem A* **114**, 4246–4253 (2010).

[142] Červený, V.; Horváth, M.; Broekaert, J. a C.: Determination of mercury in water

samples by electrochemical cold vapor generation coupled to microstrip microwave induced helium plasma optical emission spectrometry. *Microchem J* **107**, 10–16 (2013).

[143] Liu, L.; Deng, H.; Wu, L.; et al.: UV-induced carbonyl generation with formic acid for sensitive determination of nickel by atomic fluorescence spectrometry. *Talanta* **80**:3, 1239–1244 (2010).

[144] Zheng, C.; Sturgeon, R. E.; Brophy, C. S.; et al.: High-Yield UV-Photochemical Vapor Generation of Iron for Sample Introduction with Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry. *Anal Chem* **82**:7, 2996–3001 (2010).