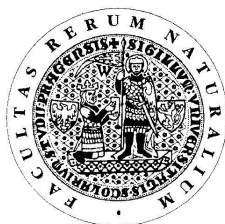


UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie životního prostředí



Barbora Kramulová

SPECIAČNÍ ANALÝZA SLOUČENIN SELENU

Speciation analysis of selenium compounds

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Doc. RNDr. Petr Rychlovský, CSc.

Praha 2011

Tato diplomová práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MSM0021620857.

Prohlášení

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

V Praze dne 2. 5. 2011

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému školiteli Doc. RNDr. Petru Rychlovskému, CSc. za odborné vedení, rady, připomínky a v neposlední řadě za jeho ochotu a trpělivost. Poděkování patří také příteli a rodině, kteří při mě stáli a vždy mě podporovali v práci.

ABSTRAKT

Cílem předkládané práce bylo vyvinout metodu pro speciální stanovení anorganických (seleničitan sodný, selenan sodný) a organických sloučenin (selenomočovina, selenocystin, selenomethionin) selenu. Pro separaci jednotlivých specií selenu byla použita iontově výměnná kapalinová chromatografie s kolonou s navázaným silným anexem. Metoda elektrochemického generování těkavých sloučenin byla použita jako následná derivatizační technika pro spojení kapalinové chromatografie s prvkově specifickým detektorem – atomovým absorpčním spektrometrem s křemenným atomizátorem.

Nejprve byly optimalizovány parametry aparatury pro elektrochemické generování těkavých forem selenu pro jednotlivé zkoumané specie selenu. Následně byly nalezeny optimální separační podmínky pro oddělení daných sloučenin selenu technikou HPLC. V optimalizované kombinované aparatuře HPLC-EcHG-QFAAS byly proměřeny kalibrační závislosti pro dané specie selenu a byly určeny základní analytické charakteristiky pro jednotlivé sloučeniny selenu.

Na závěr byla navržená speciální metoda kombinovaného stanovení jednotlivých specií selenu testována na vzorcích moči. Vzorky moči byly spikovány a byly porovnány získané směrnice kalibračních závislostí se směrnicemi získanými u modelových roztoků. Na základě těchto srovnání je možné říci, že navržená kombinovaná metoda umožňuje stanovení vybraných specií selenu jak ve vodné matrici, tak i v matrici moči.

Předmětová slova:

Spektroskopie, analytická chemie

Klíčová slova:

Atomová absorpční spektrometrie, elektrochemické generování těkavých sloučenin, selen, speciální analýza selenu, iontově výměnná chromatografie

ABSTRACT

Previously, selenium was known as an element with negative properties. However, in the last century, the significant positive effects on human health were detected. Currently, the function, behavior and toxicity of selenium are still not well known. The key to understand it is to do speciation analysis.

The aim of this diploma thesis is to develop method for determination inorganic (sodium selenite and selenate) and organic (selenourea, selenocystine, selenomethionine) selenium compounds. Parameters of apparatus for electrochemical hydride generation with atomic absorption spectrometry detector were optimized, final conditions were set and optimal conditions for separation process using HPLC were investigated.

Calibration dependences for selenium compounds were measured and analytical figures of merit were investigated. In conclusion, a coupled method HPLC- ECHG- QFAAS for determination of individual selenium compounds was proposed, and it was tested on urea samples. Calibrations for these measurements were investigated and analytic characteristics were calculated. Based on these comparisons it can be said that proposed method allows the determination of selected selenium compounds in both aqueous and urea matrices.

Subject words:

Spectroscopy, analytical chemistry

Key words:

Atomic absorption spectrometry, electrochemical generation of volatile compounds, selenium, speciation analysis of selenium, ion exchange chromatography

Obsah

Seznam zkratk a symbolů.....	8
1. Úvod.....	10
1.1 Cíle diplomové práce	10
2. Teoretická část	11
2.1 Metody stopové prvkové analýzy	11
2.2 Speciační analýza	11
2.3 Atomová absorpční spektrometrie	12
2.4 Generování těkavých sloučenin pro potřeby metody AAS.....	15
2.5 Techniky generování těkavých sloučenin	16
2.5.1 Chemické generování.....	16
2.5.2 Elektrochemické generování	17
2.6 Význam stanovení Se.....	28
2.7 Metody průtokové analýzy.....	29
2.7.1 Kontinuální průtoková analýza (CFA).....	29
2.7.2 Průtoková injekční analýza (FIA).....	30
2.8 Iontově výměnná HPLC.....	31
2.9 Statistické zpracování výsledků	32
2.9.1 Kvantitativní vyjádření měření	32
2.9.2 Šum	33
2.9.3 Kalibrace a regrese.....	33
2.9.4 Statistické odhady	34
2.9.5 Mez detekce a mez stanovitelnosti.....	35
2.9.6 Opakovatelnost.....	36
3. Experimentální část.....	37
3.1 Instrumentace	37
3.2 Používaná elektrolytická cela.....	38
3.3 Aparatura pro kontinuální EcHG-QTA-AAS	39
3.4 Aparatura pro HPLC-EcHG-QTA-AAS	40
3.5 Použité chemikálie	41
4. Výsledky a diskuze	43
4.1 Optimalizace pracovních podmínek derivatizačního kroku.....	44

4.1.1 Průtoková rychlost nosného plynu	44
4.1.2 Vložený generační proud	45
4.1.3 Koncentrace katolytu	46
4.1.4 Průtoková rychlost katolytu/vzorku	47
4.2 Kalibrace	49
4.2.1 Kalibrační závislost SeIV	49
4.2.2 Kalibrace SeVI	50
4.2.3 Kalibrace SeU	51
4.2.4 Kalibrace SeCys	52
4.2.5 Kalibrace SeMet	52
4.3 Optimalizace HPLC	53
4.3.1 Vliv koncentrace fosfátového pufru na retenční časy sloučenin selenu ...	54
4.3.2 Vliv pH mobilní fáze na separaci sloučenin selenu	56
4.3.3 Vliv průtoku mobilní fáze na separační proces	59
4.3.4 Vliv velikosti dávkovaného objemu vzorku	60
4.3.5 Souhrn nalezených optimálních podmínek	61
4.4 Zjištění základních analytických charakteristik kombinovaného stanovení jednotlivých specií selenu	63
4.4.1 Kalibrace SeIV	64
4.4.2 Kalibrace SeVI	66
4.4.3 Kalibrace SeCys	67
4.4.4 Kalibrace SeMet	69
4.5 Analýza praktického vzorku moči	71
4.5.1 Kalibrace SeIV v moči	71
4.5.2 Kalibrace SeVI v moči	73
4.5.3 Kalibrace SeCys v moči	74
4.5.4 Kalibrace SeMet v moči	76
5. Závěr	77
6. Použitá literatura	78

Seznam zkratek a symbolů

A	Absorbance
AAS	Atomová absorpční spektrometrie
AES	Atomová emisní spektrometrie
AFS	Atomová fluorescenční spektrometrie
anolyt	Roztok protékající anodovým prostorem elektrolytické cely
ASV	Elektrochemická rozpouštěcí voltametrie
CFA	Kontinuální průtoková analýza
c	Koncentrace analytu v absorpčním prostředí
c_{kat}	Koncentrace katolytu
CZE	Kapilární zónová elektroforéza
DF	Atomizátor s difúzním plamínkem
DPV	Diferenční pulzní voltametrie
EMA	Elektronová mikroanalýza
ET-AAS	AAS s elektrotermickou atomizací
FIA	Průtoková injekční analýza
FIGS	Atomizátory typu plamének v křemenné trubici
F-AAS	AAS s plamenovou atomizací
HCL	Výbojka s dutou katodou
HG-AAS	AAS s generací těkavých sloučenin
I	Generační elektrický proud
ICP	Indukčně vázaná plazma
IEC	Iontově výměnná chromatografie
IR	Infračervená spektrometrie
katolyt	Roztok protékající katodovým prostorem elektrolytické cely
l	Délka absorpčního prostředí
LOD	Mez detekce
LOQ	Mez stanovitelnosti
MIP	Mikrovlně indukovaná plazma
MS	Hmotnostní spektrometrie
NAA	Neutronová aktivační analýza

NMR	Nukleární magnetická rezonance
RFS	Rentgenová fluorescenční spektrometrie
$R_{1/2}$	Rozlišení
v_{vz}	Průtoková rychlost vzorku
v_{Ar}	Průtoková rychlost nosného plynu
Se^{IV}	Seleničitanový anion
Se^{VI}	Selenanový anion
SeCys	Selenocystin
SeMet	Selenomethionin
SeU	Selenomočovina
t_R	Retenční čas
t_M	Mrtvý čas
w_b	Šířka píku při základně
β_c	Účinnost konverze analytu na těkavou sloučeninu
β_g	Účinnost generace těkavé sloučeniny
β_p	Účinnost převodu generované těkavé sloučeniny z kapalně do plynné fáze
β_t	Účinnost transportu těkavé sloučeniny
κ	Atomový absorpční koeficient
ϕ	Intenzita záření prošlého analytem
ϕ_0	Intenzita záření nezeslabeného analytem

1. Úvod

1.1 Cíle diplomové práce

Tato diplomová práce pokračuje v systematickém studiu možností elektrochemického generování těkavých sloučenin pro potřeby atomové absorpční spektrometrie. Vzhledem k tomu, že při elektrochemickém generování je potlačena celá řada nevýhod chemického generování, je dnes velice studovanou a čím dál rozšířenější technikou.

Elektrochemické generování slouží k zavádění vzorku v plynné fázi do atomizátoru a může být také využito jako derivatizační technika při spojení kapalinové chromatografie s prvkově selektivním detektorem ve speciální analýze.

Funkce, chování a toxicita selenu nejsou v současné době stále dokonale známy a vzhledem k tomu, že se objevují informace o údajné karcinogenitě, jinde o funkci protirakovinné, jsou odpovědi na tyto otázky velice aktuální. Abychom pochopili chování a funkce selenu, je užitečné použít speciální analýzu – toxicita obecně závisí na sloučenině, ve které se selen vyskytuje.

Jedním z cílů této práce je optimalizace parametrů aparatury spojující elektrochemické generování těkavé sloučeniny s detekcí atomovou absorpční spektrometrií pro stanovení anorganických i organických sloučenin selenu.

Dalším úkolem je pak nalezení vhodných separačních podmínek pro dělení vybraných sloučenin selenu a v neposlední řadě také zjištění základních charakteristik stanovení jednotlivých specií selenu.

2. Teoretická část

2.1 Metody stopové prvkové analýzy

Vzhledem k tomu, že v dnešní době je nutné znát stopové koncentrace daných prvků – ať už při kontrole kvality životního prostředí, při rozboru biologických, geologických nebo medicínských vzorků – stávají se metody stopové prvkové analýzy významným odvětvím analytické chemie.

Mezi metody stopové a ultrastopové prvkové analýzy patří atomová absorpční spektrometrie (AAS) nejčastěji buď s elektrotermickou atomizací (ETA), nebo ve spojení s generováním těkavých sloučenin (HG), atomová emisní spektrometrie (AES) s různými budícími zdroji – elektrická jiskra, indukčně vázané plazma (ICP), mikrovlnně vázané plazma (MIP), atomová fluorescenční spektrometrie (AFS), hmotnostní spektrometrie s indukčně vázanou plazmou použitou jako budící zdroj (ICP-MS), neutronová aktivační analýza (NAA), metody laserové a rentgenové spektrometrie, tj. elektronová mikroanalýza (EMA) a rentgenová fluorescenční spektrometrie (RFS). Z elektrochemických metod sem můžeme zařadit elektrochemickou (anodická, adsorpční) rozpouštěcí voltametrii (ASV, AdSV) a elektroanalytické metody za nestacionárních podmínek, jako je např. diferenční pulzní voltametrie (DPV).

U těchto metod je vyžadována vysoká citlivost (meze detekce (LOD) a meze stanovitelnosti (LOQ) v řádu jednotek ppb či ppt, tedy $\mu\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$ či $\text{ng}\cdot\text{dm}^{-3}$), vysoká reprodukovatelnost a opakovatelnost měření a samozřejmě i robustnost analytického procesu¹.

2.2 Speciační analýza

V dnešní době ovšem není dostačující informace o celkové koncentraci daného prvku, ve většině případů je důležité zjistit formu, ve které se analyt nachází. Některé formy daného analytu mohou být totiž toxické, jiné nikoliv, a v těchto případech je informace o koncentraci veškerého analytu nedostatečná².

Příkladem může být právě v této práci studovaný selen. Jeho vlastnosti a chování v ekosystémech i lidských organismech jsou často diskutované³ – selen je považován za antioxidant, jindy za karcinogen, za důležitý pro mužskou plodnost, prevenci před kardiovaskulárními onemocněními a odpověď můžeme získat pouze znalostí dané formy. Podobně jako např. u arsenu mají nejvyšší toxicitu anorganické formy selenu, přičemž Se^{IV} je toxicitější než Se^{VI} . Z organických sloučenin selenu vykazuje nejvyšší toxicitu trimethylselenoniový ion.

Speciální analýzou tedy míníme stanovení jednotlivých specií daného analytu. Co se týká postupu, nejdříve obvykle provedeme separační krok a oddělíme jednotlivé specie. K tomu je zpravidla použita chromatografie nebo některá z elektromigračních metod. Z chromatografických metod se používá iontově výměnná chromatografie (IEC), chromatografie na reverzních fázích (RP-HPLC) gelová permeační chromatografie (SEC), kapilární zónová elektroforéza (CZE).

Poté použijí k detekci prvkově selektivní detektor, jako např. některou z metod atomové spektrometrie, a nakonec k identifikaci formy např. hmotnostní spektrometrii (MS), nukleární magnetickou rezonanci (NMR) nebo infračervenou spektrometrii (IR).

Speciální analýza může být prováděna buď **offline** – jednotlivé kroky jsou odděleny, nebo **online** – instrumentace je propojena. Nejčastější jsou tandemové techniky⁴ GC-ICP-MS, GC-AFS, HPLC-HG-AAS, HPLC-HG-AFS. Upřednostňovány jsou obecně online techniky před offline technikami.

2.3 Atomová absorpční spektrometrie

Jedná se o metodu patřící mezi mladší fyzikálně-chemické metody. První atomový spektrometr byl zkonstruován až roku 1953 Walshem⁵. Metoda atomové absorpční spektrometrie využívá ke stanovení absorpce elektromagnetického záření volnými atomy daných prvků nacházejících se v plynném stavu. Každý druh atomu je charakterizován určitou energetickou hladinou fotonů a počet absorbovaných fotonů je přímo úměrný koncentraci stanovovaných atomů. Metoda umožňuje stanovení více než 60 prvků, kovových prvků a metaloidů a v současnosti patří k nejpoužívanějším metodám prvkové analýzy a to zejména z důvodů dobré selektivity, rychlosti a vysoké citlivosti, což je

typické zvláště pro použití elektrochemické atomizace. Toto spojení je díky jmenovaným charakteristikám využíváno pro stopovou a ultrastopovou prvkovou analýzu řady vzorků z oblasti biologické, medicínské, geologické, environmentální analýzy, ale i pro kontrolu v řadě odvětví potravinářského, elektrotechnického i chemického průmyslu.

Instrumentace pro atomovou absorpční spektrometrii je složena obecně z následujících částí:

- **zdroj záření** – jde o zdroj, který dokáže emitovat záření o stejné vlnové délce jako analyt, a tudíž umožňuje absorpci záření analytem. Jedná se o čárový zdroj záření, což znamená, že emituje intenzivní zářivou energii soustředěnou do úzkých spektrálních intervalů. V praxi se jedná vždy o žhavený stanovovaný kov a jsou používány: výbojka s dutou katodou (HCL), bezelektrodová výbojka, popř. superlampa. Pro korekci nescifické absorpce pozadí je používána deuteriová výbojka, popř. lepší a cenově méně dostupné systémy (Smith-Hieftje, korekce s použitím Zeemanova jevu).
- **atomizátor** – zde dochází k tvorbě volných atomů v základním energetickém stavu, které absorbují záření z primárního zdroje.
- **optický systém spektrometru** – slouží k vymezení záření o určitém intervalu vlnových délek. Paprsek záření je veden ze zdroje přes absorpční prostředí do disperzního prvku. Po výstupu z disperzního prvku je záření fokusováno na detektor. Disperzní systém je tvořen zrcadly, odraznou mřížkou a štěrbinami.
- **detektor** – zařízení převádějící energii záření v jinou, lépe měřitelnou veličinu – nejčastěji elektrický proud. Nejrozšířenější jsou v současné době polovodičový detektor fungující na základě vnitřního fotoelektrického jevu nebo fotonásobič využívající vnější fotoelektrický jev. Detektor měří střídavě intenzitu dopadajícího primárního záření, atomizátorem prošlého záření a intenzitu pozadí zeslabeného záření z deuteriové výbojky.

Vlastní signál se potom vyjádří jako rozdíl intenzit těchto paprsků a je pro něj platný **Lambertův-Beerův** zákon:

$$A = -\log \frac{\Phi}{\Phi_0} = \kappa \cdot c \cdot l, \quad (1)$$

kde A je absorbance, Φ je intenzita záření prošlého analytem, Φ_0 je intenzita záření nezeslabeného analytem, κ je atomový absorpční koeficient, c je koncentrace analytu v absorpčním prostředí a l je délka (tloušťka) absorpčního prostředí.

Podle toho, jakým způsobem dojde k převodu prvku do atomárního stavu, dělíme metody atomové absorpční spektrometrie do tří skupin⁶:

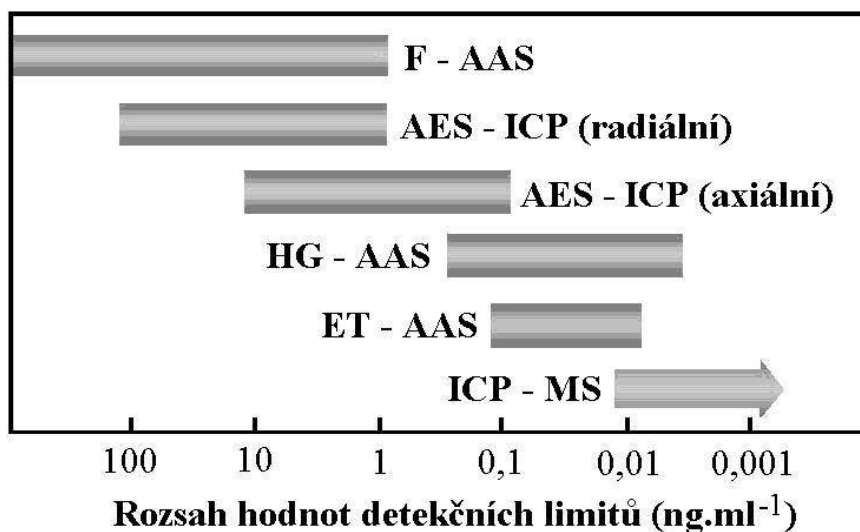
- AAS s plamenovou atomizací: F-AAS
- AAS s elektrotermickou atomizací: ET-AAS
- AAS s generací těkavých sloučenin: HG-AAS

Výhodami **plamenové atomizace** jsou nízké pořizovací náklady, robustnost a menší sklony k interferencím. Ovšem vzhledem k tomu, že detekční limit je podstatně horší než u ostatních způsobů atomizace, není tato metoda vhodná pro ultrastopová stanovení.

Elektrotermická atomizace je často používanou technikou, a to zejména díky vysoké citlivosti a minimální spotřebě vzorku. Nevýhodami jsou naopak velké interference, vysoké pořizovací náklady a nízká robustnost. Ačkoliv bývá tato metoda často nahrazována hmotnostní spektrometrií s indukčně vázaným plazmatem (ICP- MS), stále patří mezi jednu z nejcitlivějších metod, jak můžeme vidět na Obr. 2.1.

Metoda **generování těkavých sloučenin** spojuje výhody obou předešlých technik, a to zejména citlivost⁷ (obzvláště při použití technik kolekce vygenerované těkavé sloučeniny), omezení interferencí zakoncentrováním analytu v optické dráze spektrometru a separací analytu od matrice vzorku. Jediná zásadnější nevýhoda spočívá v tom, že touto technikou je možno stanovit jen analyty tvořící těkavé sloučeniny.

Typické rozsahy hodnot detekčních limitů pro nejrozšířenější metody atomové spektrometrie



Obr. 2.1 Porovnání mezi detekce nejběžnějších atomových spektrálních metod

2.4 Generování těkavých sloučenin pro potřeby metody AAS

Skutečnost tvorby kovalentních těkavých hydridů je známa již více než 150 let a to díky provedení Marshovy a Gutzeitovy zkoušky⁷. Vodíkový radikál byl získán reakcí Zn s kyselinou (nejčastěji chlorovodíkovou) a následně tento radikál reagoval se sloučeninou As za vzniku arsanu.

Využití této reakce pro analytické účely ovšem nastalo až na přelomu šedesátých a sedmdesátých let minulého století při snaze překonat obtíže spojené s plamenovou atomizací sloučenin arsenu a selenu.

Problémy spočívaly zejména v potřebě použití vysokých teplot potřebných k atomizaci. Jedná se totiž o polokovy, a tudíž je nutná vyšší teplota atomizace než u kovů. Významné analytické čáry leží na vlnových délkách 193,7 nm a 196 nm a vzhledem k tomu, že při plamenné atomizaci dochází k pohlcování záření okolní atmosférou, vede to ke snížení citlivosti stanovení.

Nejčastěji generovanými těkavými sloučeninami jsou tedy už zmíněné kovalentní hydridy arsenu a selenu a dále také antimonu⁸, bismutu, teluru, germania, cínu⁹, olova, india, thalia¹⁰ a sloučeniny některých drahých a přechodných kovů¹¹.

Mezi speciální techniky pak patří generování studených par rtuti¹² a kadmia, kde je generován těkavý elementární analyt.

Dále je možno generovat těkavé cheláty, alkyly, karbonyly, oxidy a halogenidy.

Účinnost generace těkavé sloučeniny β_g můžeme charakterizovat jako¹³:

$$\beta_g = \beta_c \cdot \beta_p \cdot \beta_t, \quad (2)$$

kde β_c představuje účinnost konverze analytu na těkavou sloučeninu, β_p účinnost převodu generované těkavé sloučeniny z kapalně do plynné fáze a β_t účinnost transportu těkavé sloučeniny.

2.5 Techniky generování těkavých sloučenin

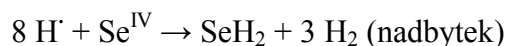
Techniky generování obvykle dělíme podle toho, zda byl hydrid vytvořen přímým přenosem, nebo byla předtím použita technika kolekce analytu.

Do přímého přenosu řadíme dávkové metody a průtokové metody. Nejčastěji používanými průtokovými metodami jsou metody průtokové injekční analýzy (FIA) a kontinuální průtokové analýzy (CFA). K zakoncentrování analytu je v současné době nejoblíbenější kolekce vymražováním. Techniky generování těkavých sloučenin (nejčastěji hydridů) můžeme dělit dle způsobu tvorby těkavé sloučeniny na:

2.5.1 Chemické generování

Při tvorbě hydridu chemicky je použito redukční činidlo, v současnosti nejčastěji tetrahydroboritan sodný. Roztok NaBH_4 se obvykle připravuje v zásaditém prostředí, dále se filtruje a uchovává se zmražený. Atomární vodík potřebný k tvorbě hydridu vzniká reakcí redukčního činidla s kyselinou (nejčastěji chlorovodíkovou),

jak vidíme z této rovnice: $\text{NaBH}_4 + 3 \text{H}_2\text{O} + \text{HCl} \rightarrow \text{H}_3\text{BO}_3 + \text{NaCl} + 8 \text{H}^{\cdot}$



Vzhledem k tomu, že vývin vodíku je velice intenzivní, dochází ke zvýšení průtokové rychlosti hydridu a vodíku a účinnost transportu se zvyšuje.

Přestože je tato technika stále nejčastěji využívána, má i své nevýhody.

Touto technikou není možné stanovat všechny oxidační stavy analytů. Při stanovení As^{V} , Sb^{V} a Se^{VI} je nutno provést předredukční krok a převést je do nižšího mocenství, jinak je stanovení nemožné. Pro předredukci As^{V} a Sb^{V} se v praxi nejčastěji používá L-cystein nebo jodid draselný¹⁴. Pro Se^{VI} to není možné; tam se využívá zahřátí vzorku na 30 min v 6M HCl ve vodní lázni (95 - 100°C). Všechny tyto operace zvyšují čas stanovení a vybízí tak k použití alternativní techniky elektrochemického generování.

2.5.2 Elektrochemické generování

Při této technice vzniká těkavá sloučenina průchodem elektrického proudu vzorkem v přítomnosti pouze velice čistých kyselin. Jak je na první pohled zjevné, hlavní výhodou této techniky je zejména omezení problému s přítomností redukčního činidla – tetrahydroboritanu sodného. Jediné, co se přidává ke vzorku, je katolyt - kyselina chlorovodíková o vysoké čistotě, takže pravděpodobnost kontaminace vzorku se značně snižuje. To umožňuje dosáhnout velice nízkých hodnot mezi detekce a stanovitelnosti. Také je možno tuto techniku využít u atomové emisní spektrometrie s mikrovlnně indukovaným plazmatem (MIP-AES) nebo indukčně vázaným plazmatem (ICP-AES) a hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS). Navíc touto technikou není problematické stanovení analytů s vyšší valencí, a není tedy nutnost provádět předredukci těchto analytů.

Účinnost generování těkavých sloučenin je závislá na konstrukci elektrochemické cely, na druhu použitého katodového materiálu a na ploše elektrody. Dalšími aspekty ovlivňujícími účinnost je průtoková rychlost vzorku a nosného plynu a dále velikost generačního elektrického proudu. Problematikou účinnosti se zabývá řada autorů¹⁵. Elektrochemické generování těkavých hydridů v dávkovém uspořádání bylo zavedeno do metod atomové spektrometrie Riginem¹⁶ a jeho spolupracovníky v 70. letech minulého století. Kontinuální generování se pak používá od poloviny 90. let.

Aparatura pro elektrochemické generování se skládá z následujících částí: průtokového systému, průtokové elektrolytické cely, zdroje konstantního proudu, separátoru fází, zásobníku s nosným plynem a spojovacího materiálu.

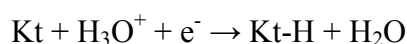
2.5.2.1 Reakční mechanismus elektrochemického generování

Mechanismus tvorby těkavých produktů na povrchu generační elektrody můžeme popsat třemi po sobě probíhajícími procesy¹⁷:

- **Depozice analytu** na povrchu katody a jeho redukce **na výsledný oxidační stav 0**.
- **Reakce deponovaného analytu s vodíkovým radikálem**, který vzniká na povrchu katody.
- V posledním kroku je vzniklá těkavá sloučenina **desorbována** z povrchu elektrody.

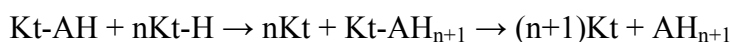
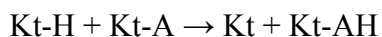
V prvním kroku dochází k depozici analytu na povrch elektrody a následně je analyt redukován na oxidační stav 0. Jedná se o přenos náboje a tato reakce probíhá v silně kyselém prostředí. Účinnost depozice a následující redukce je závislá na velikosti negativního potenciálu na katodě. Nejnegativnějšího potenciálu můžeme dosáhnout na elektrodách, kde je největší přepětí vodíku a zároveň malá proudová hustota. Zde vidíme pro ilustraci, jak roste přepětí vodíku u často používaných elektrodoých materiálů: Pt < Au < Ag < skelný uhlík < Cd < Hg-Ag < Pb .

Druhý proces může probíhat dvěma mechanismy, jak ve své práci popisuje Denkhaus, a to podle velikosti přepětí vodíku na dané elektrodě při elektrochemickém generování. U katod s nízkým přepětím vodíku jako je Pd, Pt, Au, Ag probíhá reakce **elektrokatalytickým mechanismem**, zatímco u katod, kde je na povrchu přepětí velké, jako je u Cd, Pb, Hg, dochází k průběhu reakce **mechanismem elektrochemickým**. Oba mechanismy se zakládají na Volmerově reakci, která předpokládá vznik vodíkových atomů deponovaných na povrchu katody:

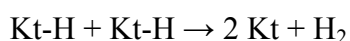


kde Kt je katoda.

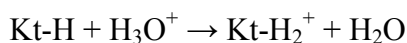
Elektrokatalytický mechanismus probíhá v několika krocích. Počátečními reaktanty jsou vodíkové atomy deponované na katodě s nasorbovanými redukovanými atomy hydridotvorného prvku (A). K desorpci z povrchu katody může dojít pouze u konečného produktu.



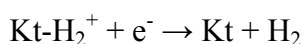
Tyto reakce mohou být doplněny rekombinační reakcí adsorbovaných atomů vodíku na molekulární vodík, tzv. Tafelovou reakcí:



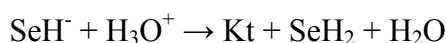
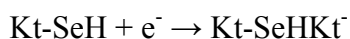
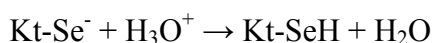
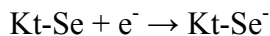
Hlavním předpokladem **elektrochemického** mechanismu je reakce deponovaných atomů vodíku s H_3O^+ ionty probíhající v roztoku katolytu:



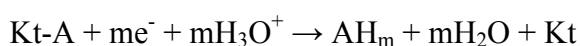
Vodík je pak desorbován z povrchu katody redukcí, tzv. Heyrovského reakcí:



Hydridy potom vznikají redukcí hydridotvorného prvku adsorbovaného na povrchu elektrody a jeho následnou reakcí s H_3O^+ ionty obsaženými v katolytu a to přes řadu meziproductů:



Souhrnně můžeme tyto procesy popsat reakcí:



Jak již bylo zmíněno, všechny tyto procesy probíhají na povrchu katody. Deponování z povrchu katody je možné až u konečného produktu. Vzhledem k tomu, že se velmi špatně určuje hranice, kdy probíhá ještě reakce mechanismem elektrokatalytickým a kdy už mechanismem elektrochemickým, je pravděpodobné, že na elektrodách se středními hodnotami přepětí vodíku probíhají současně oba tyto mechanismy.

Oba tyto mechanismy nám objasňují nižší účinnost elektrochemického generování při použití elektrod s nižším přepětím vodíku. Tafelova i Heyrovského reakce jsou kompetitivní s reakcemi, při kterých se tvoří hydridy. Protože při elektrokatalytickém mechanismu je sorpce vodíku na povrch katody snazší než

sorpce analytu, je při tomto mechanismu účinnost nižší. Ta je způsobena i prostorovými efekty na povrchu záporné elektrody – musí zde být v těsné blízkosti deponován jak redukovaný analyt, tak i vodík. Při elektrochemickém mechanismu může být k navázání analytu využita celá plocha elektrody.

2.5.2.2 Transportní systém

Transportní systém zajišťuje pohyb roztoku, který protéká katodovým prostorem (katolyt) a anodovým prostorem (anolyt) elektrolytické průtokové cely. Tvoří ho multikanálová peristaltická pumpa a příslušné čerpací hadičky. Zapojení je pak uzpůsobeno používané technice. Možnosti zapojení vzorku jsou buď injekčně do proudu katolytu dávkovacím ventilem dávkovací smyčkou daného objemu nebo solenoidovým ventilem z dalšího kanálu (doba sepnutí určuje nadávkovaný objem) nebo je vzorek kontinuálně přiváděn dalším kanálem s katolytem (spojeno přes „T“ spojku) nebo místo katolytu. Možnosti čerpání analytu jsou buď kontinuální proudění, nebo recirkulace^{18,19}.

2.5.2.3 Elektrolytická průtoková cela

Průtoková elektrolytická cela je místem, kde dochází ke vzniku těžké sloučeniny. Jejími základními složkami jsou dvě části – katodový a anodový prostor. Vzhledem k tomu, že není vhodné, aby produkty tvořící se v anodovém prostoru pronikaly do prostoru katodového, je nutno tyto prostory oddělit. K oddělení se používají iontově výměnné membrány (Nafion 117, Nafion 112, Nafion 417, Tailore 1010 aj.)^{20,21,22,23,24,25,26,27,28} či keramické porézní trubice. Ty oddělují reakční prostory průtokové cely a zároveň dovolují průchod elektrického proudu celou.

Co se konstrukce týká, nejčastěji používaná je tenkovrstvá průtoková cela zkonstruovaná Linem a Brockmannem. Lze je nalézt s celou řadou modifikací^{29,30,31,32,33}. Společným prvkem těchto cel je katodový a anodový prostor, který bývá zhotoven z různého materiálu (plexisklo, teflon, polypropylen). Cely mají dále přívodní a odvodní kanálky s příslušnými konektory. Oba prostory jsou od sebe odděleny iontově výměnnou membránou a jsou spojeny pomocí svěrek nebo šroubů.

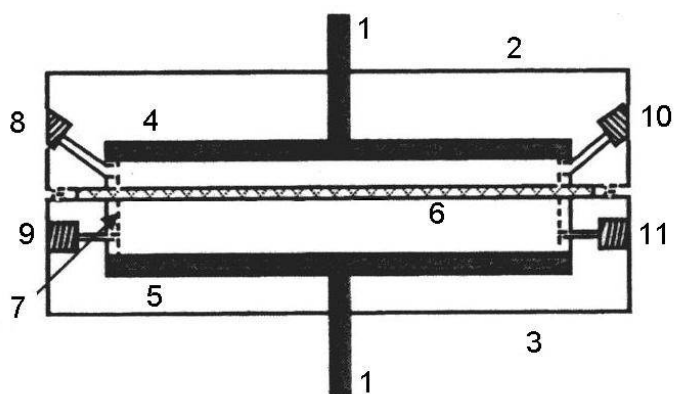
Tvary, velikosti a materiály elektrod jsou odlišné. Materiálem pro katodu může být stříbro, platina, platinou potažené stříbro, amalgamové stříbro, měď, skelný

uhlík, retikulární uhlík, pyrolytický grafit, olovem potažené uhlíkové vlákno či olovo. Při výběru materiálu elektrody obecně platí, že neexistuje univerzální materiál vhodný pro všechny reakce. Nejvyšší účinnost generování poskytuje olovo, ale reakce je zatížena interferencemi. Naopak uhlík a platina poskytují nižší účinnosti generování než olovo, ale u platiny pak byly zjištěny nejmenší interferenční efekty různých prvků přítomných v matrici vzorku.

Tvary katod mohou být nejčastěji folie nebo desky³⁴, vlákna, dráty³⁵ nebo granule^{36,37}. Anody bývají nejčastěji vyrobeny z fólie nebo drátu.

Elektrody bývají upevněny v katodovém i anodovém prostoru a jsou konektory napojeny do elektrického obvodu. Pro zlepšení těsnosti cely bývá mezi anodovou a katodovou částí umístěno teflonové těsnění. Tím je zabráněno nechtěnému úniku katolytu a anolytu z cely mimo vstupní a výstupní otvory k tomu určené.

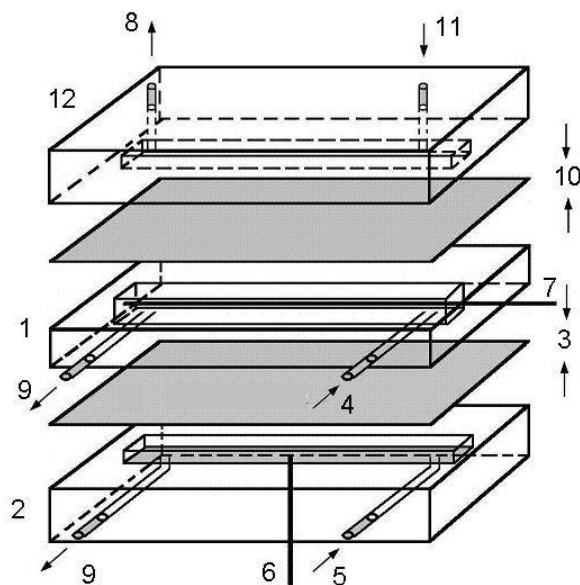
Původní konstrukci tenkovrstvé průtokové cely podle Brockmanna si můžeme prohlédnout na Obr. 2.2.



Obr. 2.2 Tenkovrstvá průtoková elektrolytická cely podle Brockmanna

1 – kontakt, 2 – katodový prostor, 3 – anodový prostor, 4 – katoda, 5 – anoda, 6 – nafionová membrána, 7 – těsnění, 8 – přívod katolytu, 9 – přívod anolytu, 10 – odvod katolytu, 11 – odvod anolytu

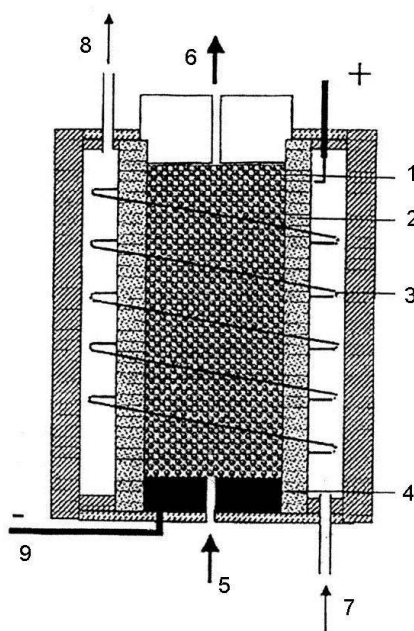
Mezi další používané typy patří kompaktní integrovaná cely s membránovým separátorem fází; ta je k vidění na Obr. 2.3.



Obr. 2.3 Tenkovrstvá průtoková cela s integrovaným membránovým separátorem fází

1 – katodový prostor, 2 – anodový prostor, 3 – nafionová membrána, 4 – přívod katolytu, 5 – přívod anolytu, 6 – platinová anoda s měděným kontaktem, 7 – katoda z olověného drátku, 8 – odvod do atomizátoru, 9 – odvod do odpadu, 10 – teflonová membrána, 11 – přívod nosného plynu, 12 – separátor fází

Používá se ale i průtoková cela s odlišnou konstrukcí – tubulární generátor znázorněný na Obr. 2.4. Katoda je zde složena z porézního skelného uhlíku a je naplní keramické porézní trubice, která odděluje katodový a anodový prostor. Anodou bývá platinový drátek a je obtočen kolem keramické trubice, celek je upevněn v teflonové trubici. Katolyt proudí skrz porézní katodu a anolyt pak prostorem mezi keramickou a teflonovou trubicí.



Obr. 2.4 Příčný řez průtokovým tubulárním generátorem

1 – porézní keramická trubice, 2 – porézní skelný uhlík nebo rozemletý porézní skelný uhlík, 3 – platinová drátová anoda, 4 – grafitový elektrický kontakt, 5 – přívod katolytu, 6 – odvod katolytu, 7 – přívod anolytu, 8 – odvod anolytu, 9 – elektrický kontakt

2.5.2.4 Zdroj konstantního proudu

Jako zdroj konstantního elektrického proudu nebo napětí můžeme použít libovolný stabilizovaný laboratorní zdroj, který má potřebný vstupní příkon.

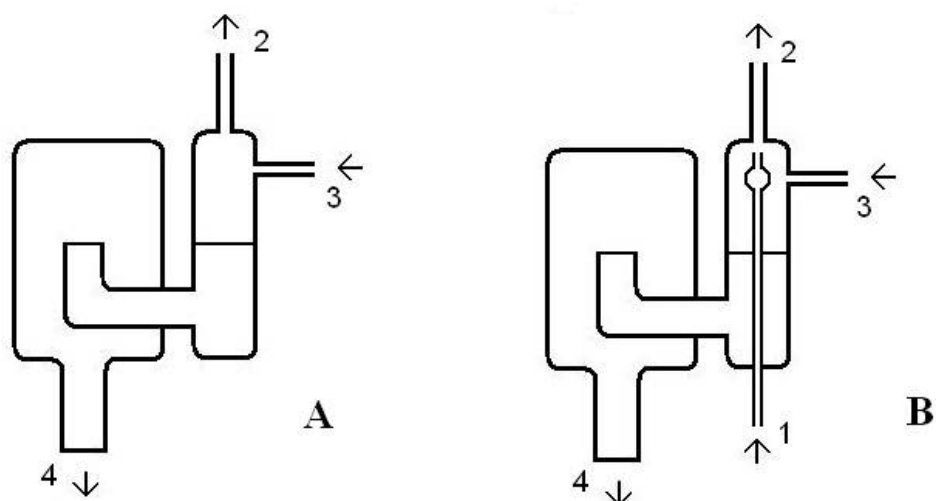
2.5.2.5 Separátor fází

Vzniklý těkavý hydrid je nutno oddělit od kapalné matrice. K rozdělení těchto plynných produktů (těkavý hydrid a vodík) se využívá celá řada separátorů fází^{38,39,40,41}. Jednotlivé typy separátorů fází můžeme rozdělit do následujících skupin:

- **hydrostatický separátor fází**

Tento separátor fází (Obr. 2.5) funguje na principu sifonu, skládá se z U trubice, plyn odchází do atomizátoru a kapalina je tlačena do odpadu⁴². Výhodou hydrostatického separátoru je jeho jednoduchost, nevýhodami jsou špatná odolnost

vůči přetlaku a velký mrtvý objem. Při použití s FIA zvětšuje disperzi, ale je vhodný pro kontinuální generování.



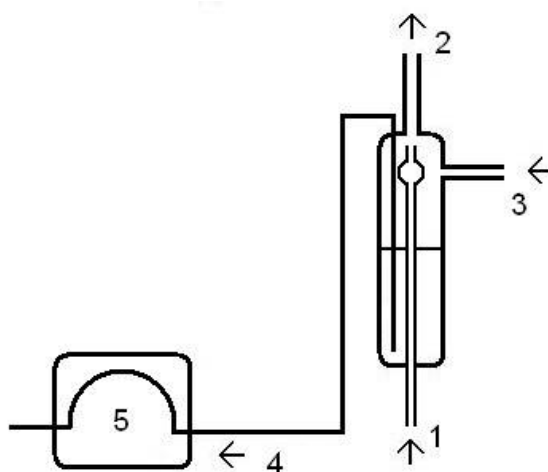
Obr. 2.5 Hydrostatický separátor fází obyčejný (A), s možností zavedení inertního plynu (B)

1 – přívod inertního plynu, 2 – odvod plynné fáze do atomizátoru, 3 – přívod reakční směsi, 4 – odvod do odpadu

- **separátor fází s nuceným odtahem**

Tento separátor se skládá z malé nádoby, do které je přiváděna reakční směs, dále obsahuje ještě další dva otvory a to na odvod kapaliny do odpadu a plynu do atomizátoru (Obr. 2.6). Použitím separátoru s nuceným odtahem se zbavíme hlavních nevýhod hydrostatického separátoru – není problém s podtlakem ani s velkým vnitřním objemem. Hlavní výhodou je zamezení vniknutí kapaliny do atomizátoru.

Nevýhodou je ale nutnost zařazení další pumpy a dále je důležité sledovat odtahovou rychlost, ta musí být v rovnováze s rychlostí přítoku směsi, aby nedošlo k odsávání části plynných produktů, a tudíž i analytu.

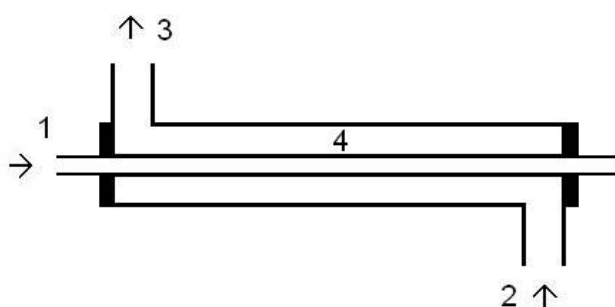


Obr. 2.6 Hydrostatický separátor fází s nuceným odtahem

1 – přívod inertního plynu, 2 – odvod plynné fáze do atomizátoru, 3 – přívod reakční směsi, 4 – odvod do odpadu, 5 – peristaltická pumpa

- **membránový separátor fází**

Membránový separátor je složen z dvou trubiček, které jsou v sobě. Vnitřní je ze semipermeabilní membrány a propouští plyn, zatímco kapalina zůstává v trubičce. Vnější trubička je pak nepropustná a slouží k odvodu plynné složky. Membránový separátor fází si můžeme prohlédnout na Obr. 2.7. Předností membránových separátorů fází je odstranění jemného aerosolu, ten se v jiných typech separátorů dostává až do atomizátoru. Problémem bývá ovšem stabilita membrány a nízká reprodukovatelnost.



Obr. 2.7 Membránový separátor fází

1 – přívod reakční směsi, 2 – přívod inertního plynu, 3 – odvod plynné fáze do atomizátoru, 4 – membrána

- **sprejový separátor fází**

Jde spíše o mlžnou komoru. Tento separátor má hlavní oblast využití při plamenové atomizaci.

2.5.2.6 Nosný plyn

Nosný plyn se používá na urychlení desorpce hydridu z povrchu elektrody a bývá přiváděn na vstup elektrolytické cely. Dále může být zaveden u výstupu z elektrolytické cely, před vstupem do separátoru nebo až do atomizátoru. V těchto případech je transportním médiem pomáhajícím pohybu těžkého hydridu do atomizátoru. Nejčastěji je jím argon nebo dusík.

2.5.2.7 Spojovací materiál

Spojovacím materiálem bývá nejčastěji teflon. Co se týká délky spojovacího vedení mezi jednotlivými částmi aparatur, snažíme se samozřejmě co nejvíce o zkrácení jakýchkoliv spojů, protože tím snižujeme povrch, kde může dojít k sopci hydridu na povrchu neinertního materiálu.

2.5.2.8 Atomizace těžkých sloučenin

K atomizaci těžkých sloučenin se používá mnoho typů atomizátorů, jejichž vlastnosti by ideálně měly být: kompletní konverze těžké sloučeniny na atomy, vysoká citlivost, minimální šum pozadí a odolnost vůči interferencím.

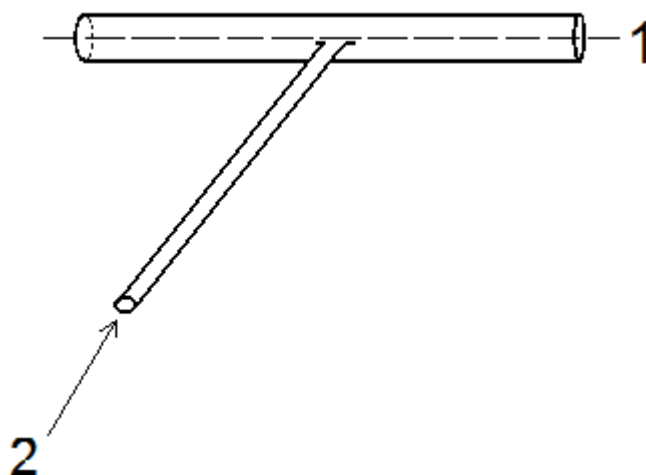
V praxi jsou nejčastěji používané křemenné atomizátory^{43,44} (s difúzním plamínkem typu inertní plyn – vodík (DF), atomizátory typu FIGS (flame in gas shield atomizer)), externě vyhřívané křemenné atomizátory, atomizátory typu mnohonásobného mikroplaménku (multiatomizátor) a grafitové atomizátory.

Atomizátor používající **difúzní plamínek typu inertní plyn - vodík** patří ke starším aparaturám pro atomizaci. Jde o křemennou trubičku s kolmým přívodním ramenem pro hydrid, vodík a nosný plyn. K atomizaci dochází reakcí hydridu s volnými vodíkovými radikály. Výhodami této metody je kompletní atomizace a

odolnost vůči interferencím, nevýhodou je ovšem horší mez detekce způsobená krátkou optickou dráhou.

Flame in gas shield atomizátor vychází z vertikální trubice, stejně jako je to u difúzního plamínku, navíc je ale uprostřed kapilára sloužící k přívodu malého množství kyslíku. Mechanismus je analogický jako u difúzního plamínku.

V mých experimentech byl využíván **externě vyhřívaný křemenný atomizátor** ve tvaru „T“ (Obr. 2.8). Atomizační rameno je umístěno v optické ose atomového absorpčního spektrometru a atomizátor může být vyhříván buď plamenem (acetylen – vzduch), nebo elektricky (odporově). Výhodami tohoto atomizátoru je dobrá citlivost, kompletní atomizace, nízké meze detekce, naopak drobné úskalí spočívá v možnosti nelinearity kalibračních křivek – mimo oblak vodíkových radikálů mohou volné atomy reagovat.



Obr. 2.8 Křemenný, externě vyhřívaný atomizátor těkavých sloučenin

1. optická osa, 2. vstup těkavé sloučeniny, nosného plynu a vodíku

Základem **multiatomizátoru** je také křemenná vyhřívaná trubice, ale optická trubice má dvojitě stěny, vnitřní je děrovaná. Malými otvory se dostanou molekuly kyslíku do celého objemu trubice a vznikne mnoho oblaků vodíkových radikálů, kde může docházet k atomizaci. Tento atomizátor se nejvíce blíží představě ideálního atomizátoru.

Poslední typ atomizace je s použitím **grafitové kyvety**. Těkavou sloučeninu lze buď přímo atomizovat, nebo použít akumulární techniku (in-situ trapping). U přímé

atomizace je generovaná těkavá sloučenina přímo zaváděna do zahřátého atomizátoru na atomizační teplotu. Citlivost u přímé atomizace je nižší než u atomizace s in-situ kolekcí analytu, kde dojde k prekoncentraci rozložením hydridu na stěnách kyvety – analyt zůstane.

2.6 Význam stanovení Se

V přírodě se selen vyskytuje v několika formách⁴⁵. Rozpuštěný anorganický selen se nachází ve vodách jako Se(-II), jako elementární selen Se(0), jako anionty seleničité HSeO_3^- a $(\text{SeO}_3)^{2-}$, selenany $(\text{SeO}_4)^{2-}$. V živých organismech se vyskytuje ve formě selenoproteinů, nejběžnější sloučeninou přítomnou u člověka a savců je selenocystein. Ten také se selenomethioninem a dalšími organoselenovými sloučeninami vzniká v rostlinách a do živočišných organismů se dostává ve formě stravy⁴⁶. V lidském organismu je známo asi 35 selenoproteinů, z nichž některé mají významné enzymové funkce. Tyto enzymy jsou na selenu závislé, zvláště, je-li na aktivním místě enzymu selenocystein. Selen zde má úlohu redoxního centra. V lidské plazmě je selen přítomen jako selenocystein v selenoproteinu P a glutathion peroxidáze a jako selenomethionin v albuminu. V moči byl selen identifikován jako seleničitan a trimethylselenoniový ion. Specie zastoupené v živých organismech zobrazuje Tab. 2. 1.

Tab. 2.1 Specie selenu v živých organismech

<i>Selen v proteinech</i>	
Selenoproteiny	selenocysteinylové zbytky
Se- obsahující proteiny	selenomethionylové zbytky
<i>Neproteinové selenové specie</i>	
Anorganické selenové specie	seleničnan (SeO_3^{2-}), selenan (SeO_4^{2-})
Methylované sloučeniny selenu	monomethylselenol, dimethylselenid, trimethylselenoniové ionty
Selenoaminokyseliny	selenocystin, selenomethionin, Se-methylselenocystein, selenoglutathion

Z historického hlediska se názor na selen začal měnit až v průběhu minulého století. Dlouho byl považován pouze za prvek pro savce toxický⁴⁷. Ve 30. letech minulého století se ukázalo, že je selen zodpovědný za některá onemocnění, o to překvapivější pak bylo, když Schwarz a Foltz v roce 1957 publikovali skutečnost, že selen je prevencí nekrózy jater. Postupem času se přišlo na to, že selen je možno využít k prevenci srdečních chorob, má důležitou roli v otázkách plodnosti, je důležitou výživou pro HIV pozitivní jedince a plní významné funkce v imunitním systému. Je totiž součástí glutathion peroxidázy (GSHPx nebo GPx), enzymu, který v těle mění toxický a karcinogenně působící peroxid vodíku na neškodnou vodu a molekulární kyslík. Bylo prokázáno, že ke své aktivaci potřebuje malá množství selenu, který pravděpodobně substituuje v molekule glutathionu síru za vzniku modifikovaného enzymu GPx4. Nejnovější lékařské výzkumy ukázaly, že GPx4 mj. chrání spermie před mutagenními účinky volných radikálů.

Je ovšem samozřejmé, že ne všechny sloučeniny selenu jsou toxické, stejně tak všechny nejsou léčivé – vždy záleží na formě. Abychom kompletně pochopili cyklus selenu v přírodě a metabolismus v organismech, je nutná speciální analýza vzorků obsahujících selen. Z tohoto důvodu dochází k vývoji analytických technik umožňující tato stanovení.

2.7 Metody průtokové analýzy

Nejčastěji používanými metodami průtoková analýzy jsou kontinuální průtoková analýza (CFA) a průtoková injekční analýza (FIA). Výhodami metod průtokové analýzy je jednoduchost, možná miniaturizace, snadná automatizace, hospodárnost a eliminace nepříznivých vlivů jako působení těkavých rozpouštědel.

2.7.1 Kontinuální průtoková analýza (CFA)

Tato technika umožňuje vzorek kontinuálně přivádět do proudu reagentu, analytický signál je odečítán v ustáleném stavu, kdy již signál dále neroste ani neklesá. Čerpání roztoků (vzorku i činidel) se nejčastěji uskutečňuje pomocí peristaltické pumpy. K zavádění vzorků může buď sloužit automatický dávkovač, nebo mohou být vzorky čerpány do aparatury ponořením přívodní trubičky do

roztoku. Nevýhodou CFA uspořádání je obvykle pulzování toku roztoků a také obtížnější dosažení reprodukovatelného zavádění vzorků⁴⁸ (ve srovnání s FIA), jak si můžeme prohlédnout na Tab. 2.2.

2.7.2 Průtoková injekční analýza (FIA)

V metodě FIA jsou malé objemy vzorků postupně injektovány pomocí dávkovacího ventilu s vyměnitelnou smyčkou do proudu reagentu. Získaný analytický signál má tvar nesymetrického píku, jehož plocha i výška jsou přímo úměrné koncentraci analytu ve vzorku. Při měření v režimu FIA není dosaženo ustáleného (rovnovážného) stavu. Vzhledem k tomu, že není dosaženo chemické rovnováhy, je snížena citlivost stanovení oproti CFA. Na druhou stranu se FIA vyznačuje lepší opakovatelností a reprodukovatelností výsledků stanovení.

Vyhodnocovat lze výšku píku, plochu píku, šířku píku ve zvolené výšce, dobu od nadávkování vzorku po maximum píku. Homogenní míchání reagentů a dosažení chemické rovnováhy zde není nezbytné, avšak vlastní měření musí být vždy provedeno za stejných experimentálních podmínek. Do FIA aparatury může být zařazena kolonka s iontoměničem, extrakční, dialyzační nebo prekoncentrační jednotka.

Tab. 2.2 Porovnání parametrů kontinuální průtokové analýzy (CFA) a průtokové injekční analýzy (FIA)

Sledovaný parametr	Metoda CFA	Metoda FIA
Dávkování vzorku	nasávání	vstřík
Objem vzorku	obvykle 0,2 - 2,0 ml	obvykle 10 - 100 μ l
Doba odečtu signálu	řádově minuty	řádově sekundy
Spotřeba činidel	vysoká	nízká
Detekce	v rovnovážném stavu	v konstantním čase
Vyhodnocení	výška	výška, plocha, šířka
Citlivost	vyšší ve srovnání s FIA	nižší ve srovnání s CFA

2.8 Iontově výměnná HPLC

K separaci studovaných sloučenin selenu byla použita metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC).

K separaci iontů touto technikou iontově výměnné chromatografie dochází díky třem procesům, seřazených podle důležitosti:

- Difúze iontů mobilní fázi (nejpomalejší, tj. řídicí krok v HPLC)
- Difúze iontů částicemi měniče iontů
- Vlastní iontová výměna

Různé vlivy na výměnu iontů lze shrnout do následujících pravidel. Při nízkých koncentracích vodných roztoků a normální teplotě roste afinita k měniči iontů s nábojem a hmotností⁴⁹. Při vysokých koncentracích rozdíly v afinitě k měniči iontu mezi ionty o různém náboji klesají.

Velké organické ionty jsou tedy obecně k náplni kolony vázány silněji. Do značné míry to lze ale ovlivnit složením mobilní fáze.

Jako mobilní fáze se nejčastěji používají vodné roztoky pufrů v rozmezí koncentrací 10 – 100 mmol.dm⁻³, jejichž pH by mělo být blízké hodnotám pK separovaných látek. Ionty v roztoku jsou v dynamické rovnováze s ionty tvořícími iontové páry s výměnnými místy měniče (protiionty). Rovnováha závisí na pH, iontové síle mobilní fáze, teplotě a náboji a velikosti zúčastněných iontů. Mezi ionty, které mají stejný náboj a přibližně stejnou velikost, je podle Guldbergova-Waageova zákona nejvíce zadržován ion přítomen v nejvyšší koncentraci. Je-li nejvyšší koncentrace protiiontu, bude se analyt eluovat rychleji. Snižováním koncentrace protiiontu v mobilní fázi tedy dochází k zvyšování retenčního času. Při separaci směsi s látkami, které mají rozdílné retenční časy, můžeme využít gradientovou eluci a zvyšovat koncentraci protiiontu v čase.

Zatímco silně kyselé nebo zásadité měniče jsou plně ionizovány při všech obvyklých hodnotách pH, slabě kyselé, slabě zásadité měniče a většina analytů jsou ionizovány jen částečně. Protože stupeň interakce analytu s měničem je funkcí koncentrace iontů vzniklých disociací molekul analytu v roztoku, ne celkové koncentrace analytu, je změna pH velice důležitým faktorem. Proto změna pH způsobující vyšší disociaci analytu způsobí zvýšení retence, zatímco změna pH vedoucí ke snížení disociace vede k snížení retenčních časů.

K separaci kationtů se jako náplně chromatografických kolon používají kationtové měniče (katexy), jako např.:

-SO₃H, -COOH. Anionty obvykle separujeme na aniontových měničích (anexech), jako např. tetraalkylamoniová skupina.

Základní charakteristikou v separačních metodách je retenční čas t_R , což je doba trvající od nástřiku látky do detektoru. Pro nezadržovanou látku je retenční čas označen jako „mrtvý čas“ t_M . Základní vztahy můžeme popsat:

$$t_R' = t_R - t_M ; \quad k = \frac{t_R'}{t_M} ; \quad r_{1,2} = \alpha_{1,2} = \frac{k_2}{k_1} ; \quad R_{1,2} = \frac{2 \cdot (t_{R2}' - t_{R1}')}{w_{b1} + w_{b2}} ; \quad n = 16 \cdot \left(\frac{t_R'}{w_b} \right) \quad (3)$$

kde t_M je mrtvý čas, t_R retenční čas, t_R' je čistý retenční čas, $r_{1,2}$ ($\alpha_{1,2}$) separační faktory pro látky 1 a 2, k je kapacitní faktor, $R_{1,2}$ je rozlišení, n charakterizuje počet teoretických pater, w_b je šířka píku při základně ve stejných jednotkách času jako t_R' .

2.9 Statistické zpracování výsledků

Zpracování výsledků a správné vyhodnocení výsledků je samozřejmě stejně významné jako samotná práce v laboratoři. Tato kapitola je tvořena drobnými kapitolami zahrnujícími informace o kvantitativním vyjádření měření, o šumu, kalibraci, regresi, statistických odhadech, mezích detekce a stanovitelnosti a opakovatelnosti.

2.9.1 Kvantitativní vyjádření měření

Abychom mohli prezentovat informace získané měřením, vyjadřujeme je číselnou formou v určitých jednotkách. Hodnota, kterou naměříme, je buď přímo námi požadovanou informací, častěji ale musí být na danou informaci převedena⁵⁰. Častý je případ výpočtu hodnoty požadované veličiny z výsledků měření. Obvykle je souvislost mezi množstvím sledované látky c a měřenou hodnotou veličiny y vyjádřena matematickým vztahem:

$$y = n + p \cdot c^x \quad (4)$$

kde n , p jsou konstanty související s experimentálním uspořádáním.

Jednou z nejdůležitějších vlastností měřicího přístroje je **citlivost**, která vyjadřuje změnu signálu na výstupu měřicí soustavy vyjádřenou oproti změně měřené veličiny, jak ukazuje následující vztah:

$$S = \frac{dy}{dx}, \quad (5)$$

kde y značí odezvu a x měřenou veličinu.

Citlivost je součinem konstrukčních a pro analyt specifických vlastností. Lze ji vyjádřit jako směrnici kalibrační funkce.

2.9.2 Šum

Šum se projevuje jako náhodné zvýšení nebo snížení měřeného signálu. Při měření můžeme narazit na několik typů šumů. Šum, jehož suma je nulová v časovém intervalu pozorování, se označuje jako **bílý šum**. Je-li suma šumu nenulová, jedná se o **náhodný šum**. Posledním případem je šum, jehož suma vykazuje časovou závislost v následných intervalech pozorování, ten označujeme jako **drift**.

2.9.3 Kalibrace a regrese

Kalibrace je empirickým postupem zjištění závislosti mezi měřenou veličinou a požadovanou informací. Uplatňuje se nejčastěji v instrumentální analýze. K získané intenzitě signálu y hledáme odpovídající obsah stanovované složky analytu x_A . To můžeme vyjádřit příslušnou regresní závislostí a jedná se o kalibrační závislost. Nejčastěji bývá touto závislostí přímka, tuto **lineární regresi** můžeme popsat vztahem:

$$y_i = \alpha + \beta x_i + \varepsilon_i \quad (6)$$

kde α a β jsou parametry uvedené lineární regresní rovnice a ε_i je náhodná chyba.

Odhady parametrů α, β lze za podmínky nejmenšího počtu čtverců určit podle rovnic:

$$b = \frac{\left(\sum_i x_i\right)\left(\sum_i y_i\right) - n \sum_i x_i y_i}{\left(\sum_i x_i\right)^2 - n \sum_i x_i^2} \quad (7)$$

Pro zpracování regresních závislostí je podstatné, jestli známe nebo neznáme tvar závislosti. V případě, že ho známe, se pak jedná pouze o hledání parametrů této závislosti. Pokud tento tvar neznáme, je nutno hledat vhodný model pro jeho vyjádření.

Kalibraci vždy provádíme pomocí standardů se známým obsahem analytu nebo pomocí referenčních materiálů se známým celkovým složením. Standardy můžeme dělit podle způsobu použití na vnitřní a vnější. **Vnější standardy** bývají samostatné vzorky známého složení analyzované současně se vzorky neznámého složení. **Vnitřní standard** je látkou, která se přidává přímo do analyzovaného neznámého vzorku. Nejvýhodnější bývá použití sady **referenčních materiálů** jako vnějších standardů, ne vždy jsou ale k dispozici.

2.9.4 Statistické odhady

Z výsledků opakovaného měření za stejných podmínek odhadneme správnou hodnotu pomocí aritmetického průměru, který je dán vztahem:

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i \quad (8)$$

kde n je počet měření a x_i naměřená hodnota sledované veličiny při i -tém měření.

Aritmetický průměr je nestranný, velmi vydatný ukazatel odhadu očekávané hodnoty, který téměř úplně odstraní vliv náhodných chyb. Pro malá n však není příliš robustní. Je-li $n < 7$, bývá raději použit medián \tilde{x} , a to z důvodu větší robustnosti. **Medián** získáme jako střední hodnotu z výběru seřazeného podle velikosti, pro sudý počet n medián spočítáme medián jako průměr dvou prostředních hodnot seřazeného výběru.

Náhodnou chybu měření charakterizujeme tzv. **směrodatnou odchylkou**:

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \quad (9)$$

K odhadu přesnosti výsledků můžeme dále použít rozpětí, nevýhodou je ovšem malá vydatnost a robustnost:

$$R = x_{\max} - x_{\min} \quad (10)$$

kde x_{\max} a x_{\min} je největší a nejmenší hodnota celého náhodného výběru.

Směrodatná odchylka je charakteristikou přesnosti výsledků, tj. charakterizuje náhodné chyby. Pro normálně rozdělené výsledky lze směrodatnou odchylku vypočítat z rozpětí:

$$s_R = k_n \cdot R \quad (11)$$

kde k_n je koeficient pro dané n .

Charakteristikou relativní hodnoty náhodné chyby je relativní směrodatná odchylka, kterou můžeme vyjádřit jako:

$$s_r = \frac{s}{\bar{x}} \quad (12)$$

respektive v procentech:

$$s_r(\%) = 100 \cdot \frac{s}{\bar{x}} \quad (13)$$

2.9.5 Mez detekce a mez stanovitelnosti

Mez detekce a mez stanovitelnosti jsou základními charakteristikami metod stopové a ultrastopové analýzy pro její použití při kvalitativní, respektive kvantitativní analýze. Kvalitativně můžeme prokázat pouze takové množství analytu

odpovídající minimálnímu signálu, který ještě lze rozlišit od šumu nulového vzorku nebo slepého pokusu y_0 .

Mez detekce je koncentrace analytu, které odpovídá signál rovný trojnásobku směrodatné odchylky ($3s$) signálu nulového vzorku. Je to nejmenší koncentrace analytu, kterou lze danou analytickou metodou detekovat.

Mez stanovitelnosti je koncentrace analytu, která odpovídá signálu rovnému desetinásobku směrodatné odchylky (10σ) signálu nulového vzorku. Je to nejmenší koncentrace analytu, kterou je ještě možno danou analytickou metodou stanovit ve vzorku s požadovanou přesností.

Experimentálně se mez detekce a stanovitelnosti určuje z deseti měření signálu stejného nulového vzorku. Tato měření se provádějí rychle za sebou za stejných podmínek konkrétní spektrometrické metody. Dále je nutno sestavit kalibrační přímku pro dané vzorky v oboru nízkých koncentrací. Mez detekce, respektive mez stanovitelnosti se pak určí z této přímky jako koncentrace analytu odpovídající signálu 3σ , resp. 10σ .

2.9.6 Opakovatelnost

Opakovatelnost měření obecně vyjadřujeme směrodatnou odchylkou výsledků analýz provedených v určité laboratoři na stejném vzorku za stejných podmínek. V této práci je opakovatelnost O získána jako relativní směrodatná odchylka deseti nejtěsněji za sebou naměřených hodnot.

$$O(\%) = 100 \cdot \frac{s}{x} \quad (14)$$

3. Experimentální část

3.1 Instrumentace

Při experimentální práci byly používány následující přístroje a zařízení:

Atomový absorpční spektrometr **Varian SpectrAA-300A** (Varian, Mulgrave, Austrálie). Zdrojem primárního záření byly nekódované výbojky s dutou katodou pro Se (Photron, Austrálie) a byl použit napájecí proud 8 mA, šířka spektrálního intervalu byla 1 nm a vlnová délka 196 nm.

Ke korekci nespecifické absorpce pozadí sloužila **deuteriová výbojka**.

Atomizace hydridů probíhala při teplotě 950 °C na vnitřních stěnách externě vyhřívaného **křemenného atomizátoru** (QTA), EHA 10 (firma RMI, ČR) ve tvaru „T“, délka atomizačního ramene 170 mm a vnitřní průměr trubice 12 mm, uprostřed zúžená část délky 60 mm o vnitřním průměru 6 mm. Atomizátor byl odporově vyhříván na teplotu 950 °C a byl umístěn v optické ose atomového absorpčního spektrometru.

Průtok nosného plynu byl regulován **průtokoměrem** 112-02 (Cole-Parmer, Vernon Hills, USA).

Jako **zdroj konstantního elektrického proudu** sloužil LPS 303 (AMREL, Taiwan).

Čerpání katolytu a anolytu zajišťovala programovatelná **peristaltická pumpa** (Cole-Parmer) s osmikanálovou hlavou a tygonovými čerpacími hadičkami.

Pro separaci Se^{IV} , Se^{VI} , Secys, Semet sloužila **HPLC kolona PRP X100**; (250 mm x 4,6 mm ID, velikost částic 5 μm).

Pro čerpání mobilní fáze do HPLC kolony byla použita HPLC **pumpa LKB 2150** (BROMMA, Sweden).

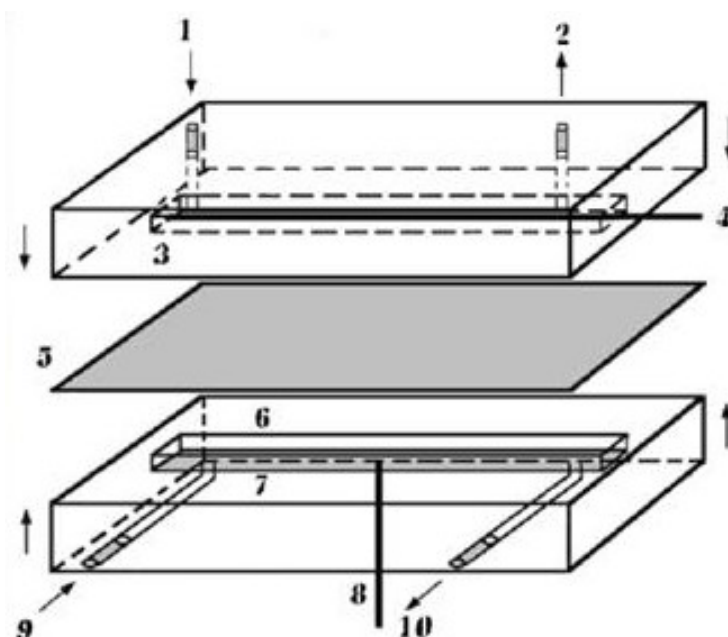
Dále byl pro HPLC použit **dávkovací ventil 7125** (Rheodyne) s dávkovacími smyčkami (teflonové, kovové, objemy od 20 μl do 1000 μl). Roztoky byly vedeny teflonovými a tygonovými hadičkami spojenými spojkami z polyethylenu (Supelco). Délka vedení byla minimalizována pro každé zapojení.

K utěsnění elektrodových prostorů byla použita plynotěsná teflonová těsnicí páska (100% PTFE, 19 x 0,2 mm a 12 x 0,1 mm).

K oddělení vzniklého hydridu od původní matrice byl použit **separátor fází s nuceným odtahem** laboratorní konstrukce.

3.2 Používaná elektrolytická cela

Během měření této diplomové práce byla použita tenkovrstvá průtoková elektrolytická generační cela (Obr. 3.1).



Obr. 3.1 Elektrochemický průtokový tenkovrstvý generátor těkavé formy selenu:

1 – přívod katolytu, 2 – odvod anolytu k separátoru fází, 3 – katodový prostor, 4 – olověná katoda, 5 – vodivá membrána (Nafion 117), 6 – anodový prostor, 7 – platinová anoda, 8 – měděný kontakt anody, 9 – přívod anolytu, 10 – odtok anolytu do odpadu

Tato cela se skládá z anodového a katodového prostoru o vnitřních objemech 900 μl . Oba prostory jsou od sebe odděleny iontově výměnnou membránou z Nafionu 117 (Aldrich, USA). Tato membrána je tvořena polymerem, jehož základ tvoří tetrafluorethylen s navázanými sulfoskupinami, a je částečně propustná pro plyny. Obě části cely (vyrobené z plexiskla) včetně membrány jsou vzájemně pevně

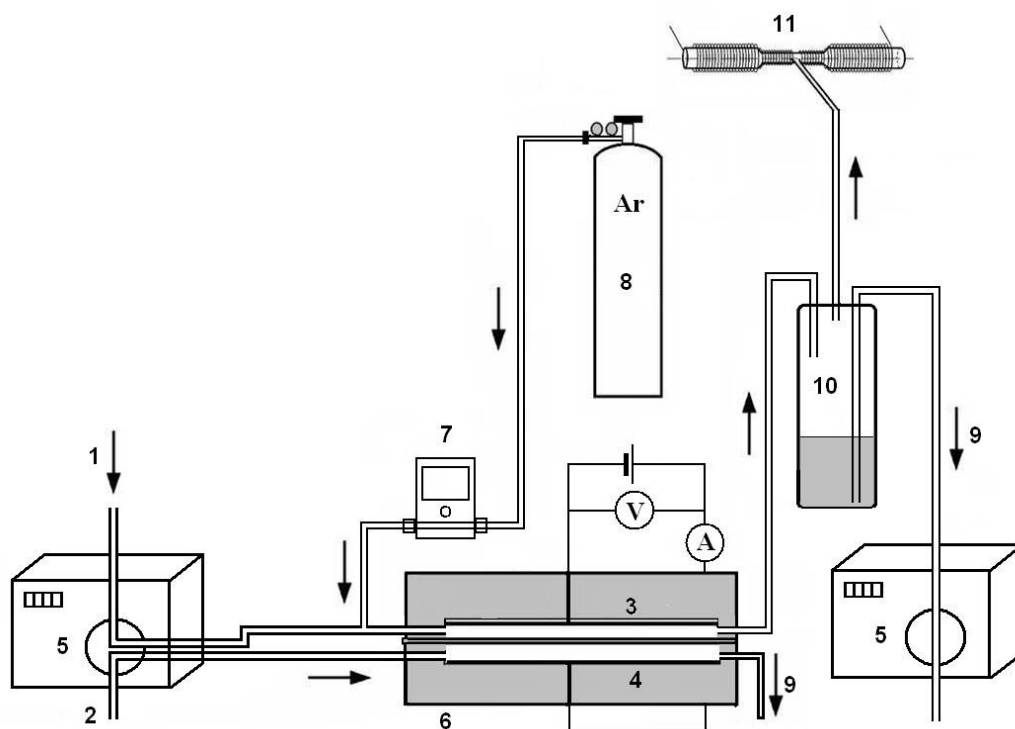
spojeny 6 šrouby. Pro zvýšení těsnosti cely, je mezi katodovým a anodovým prostorem použito teflonové těsnění. Jako katodový materiál byl použit olověný drátek (průměr 1 mm, povrch 345 mm², 99,99%, Good-Fellow, Velká Británie). Anodovým materiálem byl platinový plíšek o tloušťce 0,3 mm (99,99%, povrch 300 mm², Safina, Vestec u Prahy).

3.3 Aparatura pro kontinuální EcHG-QTA-AAS

Elektrolytické generování bylo prováděno v režimu kontinuální průtokové analýzy (CFA). Schéma tohoto zapojení je zobrazeno na Obr. 3.2.

Katolyt a anolyt byl peristaltickým čerpadlem zaváděn do tenkovrstvé průtokové elektrolytické cely. Vzorek byl vždy nasáván čerpací hadičkou po dobu 60 sekund. V mezičase byl nasáván promývací roztok (čistý katolyt).

Do proudu vzorku (popř. katolytu) před elektrolytickou celou byl zaváděn nosný plyn (argon). V elektrolytické cele docházelo na povrchu katody ke generování těkavých sloučenin selenu a vývinu nadbytku vodíku a na povrchu anody pak k uvolňování kyslíku. Vodík a nosný plyn pomáhaly unášet hydrid do separátoru fází s nuceným odtahem, kde docházelo k oddělení plynné fáze od kapalné. Plynná fáze pak byla vedena nosným plynem do externě vyhřívaného křemenného atomizátoru (QTA), kde docházelo při teplotě 950 °C za přítomnosti H₂ a stop O₂ ke katalytické atomizaci hydridů selenu. Kapalná fáze z katodového prostoru i anolyt odcházely do odpadu.



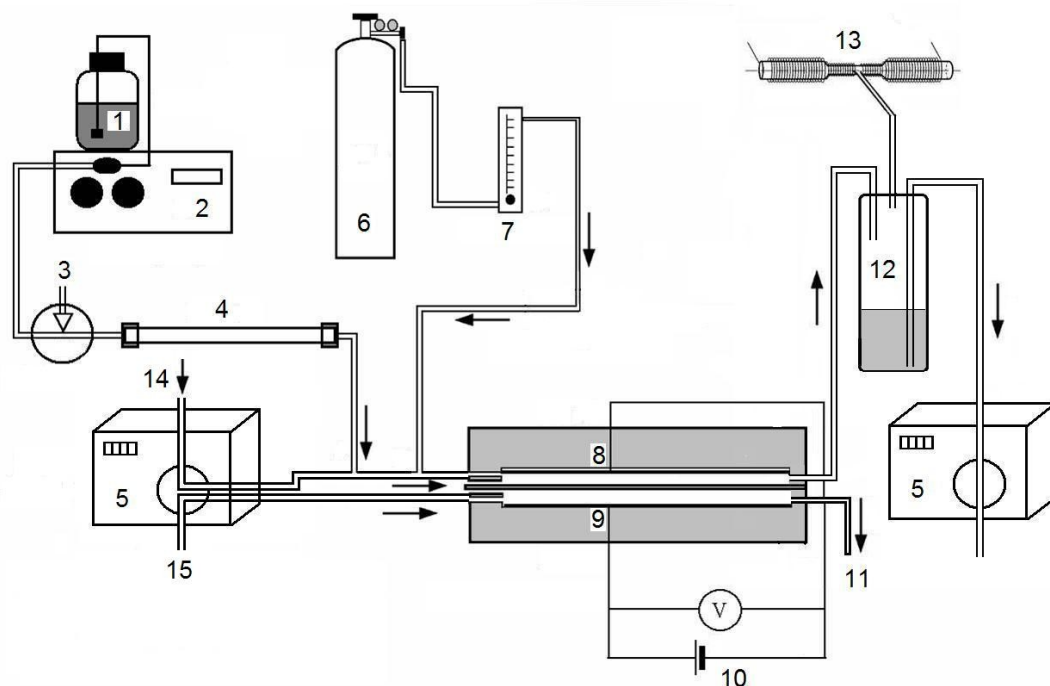
Obr. 3.2 Schéma aparatury pro kontinuální EcHG-QTA-AAS

1 – *přívod katolytu*, 2 – *přívod anolytu*, 3 – *katoda*, 4 – *anoda*, 5 – *peristaltická pumpa*, 6 – *tenkovrstvá průtoková cela*, 7 – *elektronický průtokoměr*, 8 – *nosný plyn*, 9 – *odpad*, 10 – *separátor fází*, 11 – *atomizátor*

3.4 Aparatura pro HPLC-EcHG-QTA-AAS

Elektrolytické generování bylo prováděno stejně jako v předchozím případě, vzorek byl však nejprve rozdělen HPLC kolonou.

Specie selenu Se^{IV} , Se^{VI} , SeCys a SeMet byly dávkovány do HPLC kolony s navázaným aniontovým měničem, kde došlo k jejich rozdělení. Jednotlivé specie pak procházely tenkovrstvou elektrolytickou generační celou, kde došlo k jejich derivatizaci na těkavou sloučeninu – hydrid. Pro urychlení eluce specií selenu s vyšším retenčním časem byla použita skoková změna mobilní fáze v určitém čase analýzy. Pro změnu mobilní fáze byl použit přepínací solenoidový ventil. Celkové zapojení derivatizační jednotky s HPLC kolonou je uvedené na Obr. 3.3.



Obr. 3.3 Schéma HPLC-EchHG-QTA-AAS:

1 – zásobník mobilní fáze, 2 – vysokotlaké čerpadlo, 3 – šesticestý dávkovací ventil, 4 – HPLC kolona s aniontovým měničem, 5 – peristaltické čerpadlo, 6 – tlaková láhev se stlačeným Ar, 7 – průtokoměr, 8 – katoda, 9 - anoda, 10 – zdroj proudu, 11–do odpadu 12 – separátor s nuceným odtahem, 13 – odporově vyhřívaný křemenný atomizátor , 14 – přívod katolytu, 15 – přívod anolytu

3.5 Použité chemikálie

Zásobní roztoky SeMet, SeCys, Se^{IV}, Se^{VI}, SeU o koncentraci 1000 ppm Se byly připravovány přesným navážením substance (Sigma Aldrich, čistota SeU 98%, SeMet, SeCys, Se^{IV} ≥99%, Se^{VI} 99.999%) a naředěním deionizovanou vodou připravenou zařízením Milli QPLUS firmy Millipore (USA) na požadovanou koncentraci. Roztok SeCys byl připraven rozpuštěním substance v 3% HCl.

Všechny pracovní roztoky pak byly připraveny naředěním zásobních roztoků zředěným roztokem HCl (katolytem) o požadované koncentraci (zjišťování optimálních podmínek pro generování).

Ve spojení s HPLC kolonou byly roztoky připravovány pouze v deionizované vodě bez přídavku kyseliny.

Fosfátový pufr byl připraven navážením kyselé a zásadité složky – NaH_2PO_4 a Na_2HPO_4 (Sigma Aldrich, Německo) a následným naředěním deionizovanou vodou na požadovanou koncentraci a požadované pH.

Jako katolyt byl používán roztok HCl , jako anolyt pak roztok H_2SO_4 (čistota Suprapure) firmy Merck, Německo.

Praktické vzorky moči byly připraveny naředěním odebraného vzorku moči v poměru 1:1 deionizovanou vodou a následně byly spikovány jednotlivé specie.

K čištění elektrod a křemenného atomizátoru byl používán roztok kyseliny dusičné o koncentraci $1,0 \text{ mol.l}^{-1}$ (Merck, BRD). V ojedinělých případech byl atomizátor čištěn kyselinou fluorovodíkovou zředěnou v poměru 1:1 destilovanou vodou.

K regeneraci anexové HPLC kolony byl použit metanol s přídavkem 1% HNO_3 .

Nosným plynem byl argon (99,998%) se stopami zejména O_2 , H_2O a N_2 (Linde Technoplyn, Praha).

4. Výsledky a diskuze

Jak již bylo zmíněno v úvodní části, tato diplomová práce je zaměřená na speciální analýzu selenu. Pro speciaci byly k dispozici následující sloučeniny selenu: z anorganických solí seleničitan sodný (Se^{IV}) a selenan sodný (Se^{VI}); z organických sloučenin potom selenocystin (SeCys), selenomethionin (SeMet) a selenomočovina (SeU).

V první fázi řešení zadaného úkolu bylo potřeba proměřit a poté nastavit optimální podmínky pro elektrochemické generování těkavých sloučenin selenu (derivatizační krok). Zjištění těchto optimálních podmínek bylo prováděno v zapojení bez HPLC kolony.

Sledovanými parametry, kterými lze ovlivnit dosaženou výslednou citlivost generování těkavé formy analytu – derivačního kroku, byl průtok nosného plynu, velikost vloženého generačního proudu a koncentrace katolytu – kyseliny chlorovodíkové. Podobně byla také proměřena závislost průtokové rychlosti katolytu (vzorku) generační celou. Optimální podmínky pro generování – derivatizaci – byly proměřeny pro všechny specie selenu.

Po zjištění optimálních podmínek pro generování byly proměřeny kalibrační závislosti pro jednotlivé sloučeniny a byla u nich zjištěna mez detekce a mez stanovitelnosti (bez použití HPLC kolony).

Ve druhé části práce byla do aparatury připojena iontově výměnná HPLC kolona a byly hledány optimální podmínky pro dělení jednotlivých specií selenu. V daném případě bylo optimalizováno složení mobilní fáze – koncentrace fosfátového pufru (ten byl zvolen na základě provedené rešerše⁵⁴) a jeho pH. Podobně pak také průtoková rychlost mobilní fáze.

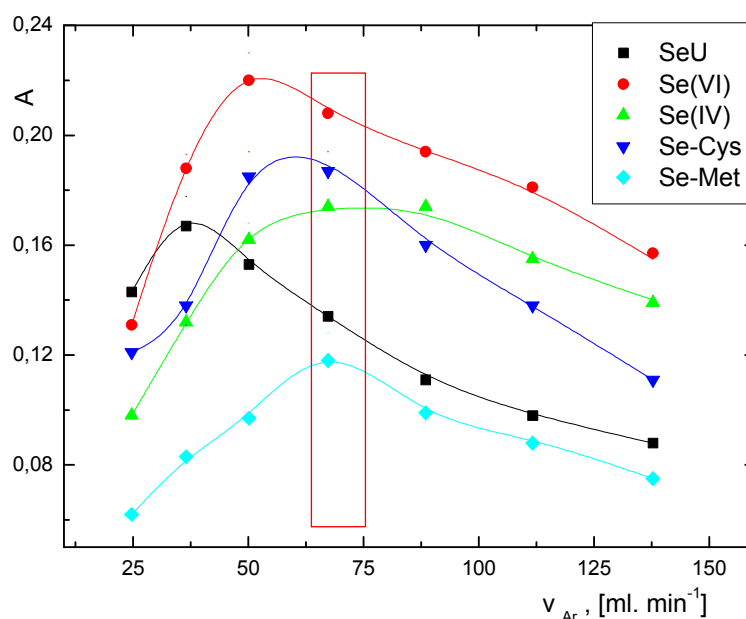
V závěrečné části práce pak byly určeny základní analytické charakteristiky speciálního stanovení jednotlivých sloučenin selenu a navržená kombinovaná metoda HPLC-ECHG-QFAAS pak byla testována na analýze spikovaného vzorku moči.

4.1 Optimalizace pracovních podmínek derivatizačního kroku

Jak již bylo dříve řečeno, bylo nejprve nutné optimalizovat pracovní podmínky derivatizačního kroku – techniku elektrochemického generování těkavých forem selenu. Cílem optimalizace bylo dosáhnout co nejvyšší citlivosti stanovení a nejnižších hodnot meze detekce pro jednotlivé sloučeniny selenu při jejich přímém stanovení EcHG-QFAAS bez HPLC kolony. Při optimalizaci jednotlivých parametrů bylo potřeba mít stále na paměti, že vybraný parametr by měl být optimální pro stanovení všech sloučenin selenu. To ale nebylo vždy možné, takže výsledný doporučený optimální pracovní parametr je často kompromisem.

4.1.1 Průtoková rychlost nosného plynu

Jako první parametr byla testována průtoková rychlost nosného plynu – argonu. Byla proměřována průtoková rychlost v rozmezí od 20 ml. min⁻¹ do 140 ml. min⁻¹. Výslednou závislost dosaženého signálu pro všech pět stanovovaných specií je vidět na Obr. 4.1. Červeně je zde zvýrazněn průtok nosného plynu, který byl používán pro další měření. Jak je vidět, křivky vykazují u všech studovaných sloučenin podobný průběh. SeU vykazuje nejlepší signál pro průtok kolem 36 ml. min⁻¹, Se^{VI} při průtoku 50 ml.min⁻¹ Se^{IV}, SeMet a SeCys při průtoku 67 ml. min⁻¹. Vzhledem k tomu, že SeMet byla dávkována poměrně vysoká koncentrace a že maximum na závislosti je poměrně výrazné, byla průtoková rychlost 67 ml.min⁻¹ zvolena pro další měření jako optimální.

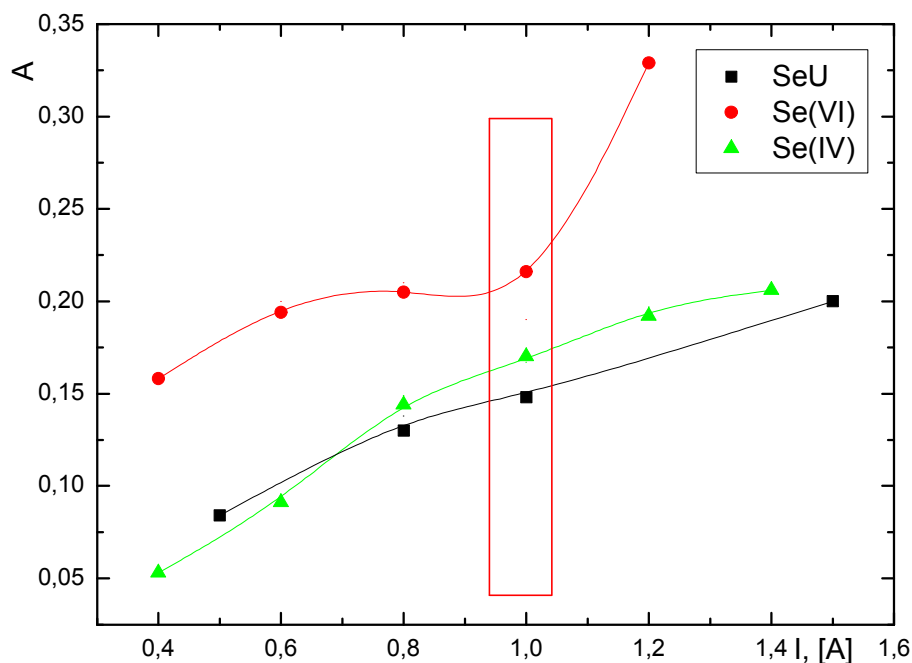


Obr. 4.1 Závislost absorbance na průtokové rychlosti nosného plynu

$I = 1A$, $c_{kat} = 1 \text{ mol.dm}^{-3}$, $v_{vz} = 1,5 \text{ ml.min}^{-1}$, $c_{Se(IV)} = 60 \text{ ng.ml}^{-1}$, $c_{Se(VI)} = 300 \text{ ng.ml}^{-1}$,
 $c_{SeCys} = 300 \text{ ng.ml}^{-1}$, $c_{SeU} = 100 \text{ ng.ml}^{-1}$, $c_{SeMet} = 900 \text{ ng.ml}^{-1}$

4.1.2 Vložený generační proud

Druhým sledovaným parametrem byl vložený generační proud. Velikost generačního proudu byla proměřena od 0,4 A do 1,4 A. Výsledná závislost je vidět na Obr. 4.2. U tohoto parametru jsme museli při určování optimální hodnoty vzít v úvahu omezené možnosti instrumentace. Při zvyšování hodnoty generačního proudu dochází sice ke zvýšení citlivosti, ovšem také ke zvyšování vkládaného napětí. Toto vložené napětí může ale při velkém požadavku na hodnotu generačního proudu překročit maximální hodnotu, kterou dovoluje vložit zdroj laboratorního napětí, a ten již pak není schopný udržet konstantní hodnotu generačního proudu. Podobně také při aplikaci vysokých hodnot generačního proudu dochází k silnému zahřívání elektrolytů a výrazně se snižuje životnost generační cely. Vzhledem k těmto skutečnostem byl pro další experimenty zvolen generační proud 1 A.



Obr. 4.2 Závislost absorbance na velikosti vloženého proudu

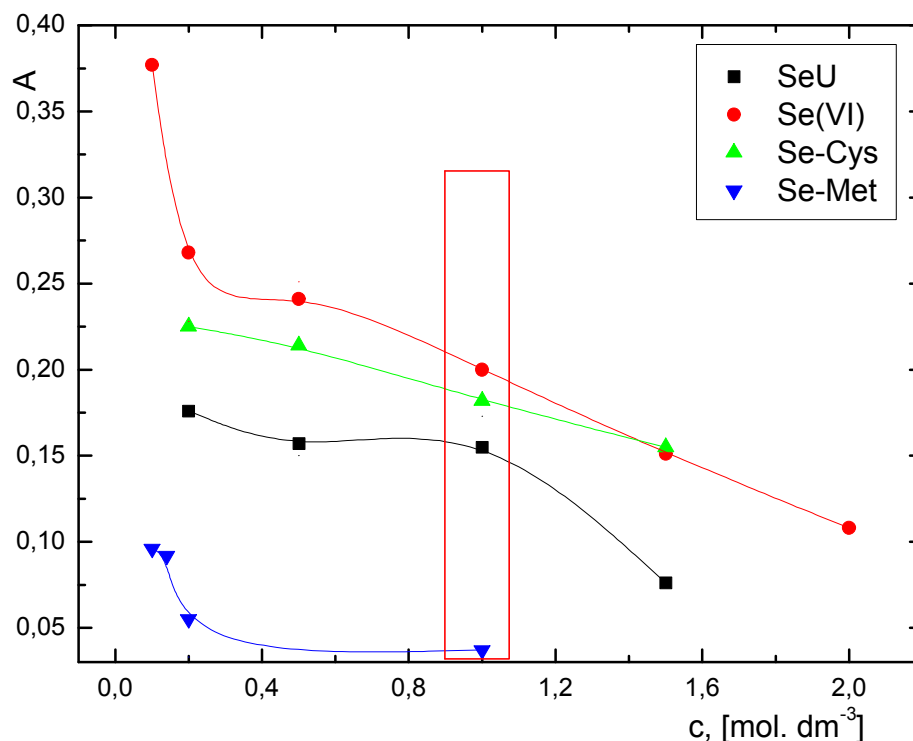
$$v_{Ar} = 67 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}, \quad c_{kat} = 1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}, \quad v_{vz} = 1,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}, \quad c_{Se(IV)} = 60 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1},$$

$$c_{Se(VI)} = 300 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}, \quad c_{SeU} = 100 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$$

4.1.3 Koncentrace katolytu

Pro zjištění vlivu tohoto parametru byly jednotlivé sloučeniny selenu připraveny v různé koncentraci katolytu – kyselině chlorovodíkové v intervalu od $0,2 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ do $2 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a byly proměřeny příslušné odezvy. Získaná závislost je vidět na Obr. 4.3. Je z ní zřejmé, že čím použijeme slabší roztok kyseliny při generování, tím vyšší odezvu analytického signálu dostaneme. Toto je v soulase s dřívějšími poznatky, že se zvyšující se koncentrací kyseliny v roztoku klesá účinnost elektrochemického generování těkavé sloučeniny. Ovšem stejně jako v případě vkládaného generačního proudu, musíme i v případě koncentrace kyseliny v katolytu zvolit takovou koncentraci, aby vkládané napětí nepřekročilo mezní hodnotu a aby nedocházelo k přílišnému ohřevu elektrolytů a tedy i následnému poškození generační cely. Optimální koncentrace kyseliny chlorovodíkové v katolytu byla nakonec zvolena $1,0 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. K nejmarkantnějšímu poklesu citlivosti se

zvyšující se koncentrací kyseliny v katolytu došlo u SeMet, kdy při překročení koncentrace přes $1,5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ už nebyl signál vůbec znatelný.



Obr. 4.3 Závislost absorbance na koncentraci katolytu

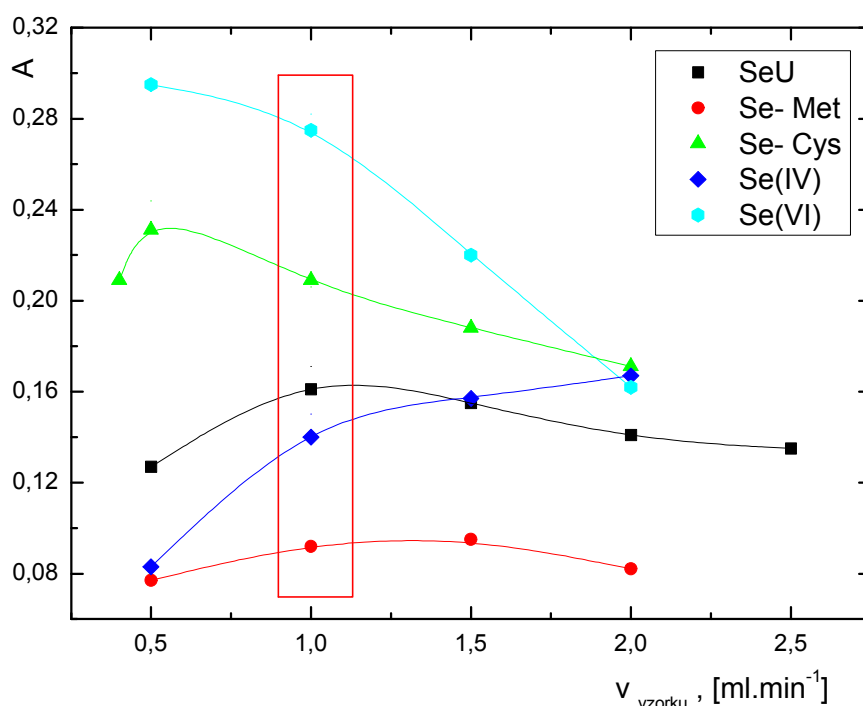
$$v_{Ar} = 67 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}, I = 1 \text{ A}, v_{vz} = 1,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}, c_{\text{Se(VI)}} = 300 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}, c_{\text{SeCys}} = 300 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}, \\ c_{\text{SeU}} = 100 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}, c_{\text{SeMet}} = 900 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$$

4.1.4 Průtoková rychlost katolytu/vzorku

Průtoková rychlost katolytu/vzorku byla testována v intervalu $0,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ až $2,0 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. Výsledná závislost je vidět na Obr. 4.4. Vliv průtokové rychlosti byl jediný z proměřovaných parametrů, kdy se průběh závislosti pro jednotlivé specie výrazně lišil. V případě Se^{VI} závislost dosahovala maxima u nejnižšího proměřeného průtoku $0,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ a se zvyšujícím se průtokem signál prudce klesal (při průtoku $2,0 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ byl signál již jen poloviční). Analytický signál Se^{IV} naopak se zvyšující se průtokovou rychlostí stoupal až do nejvyšší proměřené rychlosti $2,0 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. Signál SeCys měl nejvyšší hodnotu při průtoku katolytu $0,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ a s dalším zvyšováním průtoku docházelo naopak k postupnému snižování signálu. Signál SeU dosáhl svého maxima při průtokové rychlosti $1,0 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ a při dalším zvyšování

průtoku již jen pomalu klesal. SeMet vykazoval maximální analytický signál při průtokové rychlosti 1,5 ml. min⁻¹. Vzdělání signálu oproti průtoku 1,0 ml.min⁻¹ byl ale pouze nepatrný (0,003 absorbanční jednotky).

Optimální průtoková rychlost katolytu/vzorku byla tedy nakonec zvolena 1,0 ml·min⁻¹, jak je vidět na Obr. 4.4. Tato hodnota byla vybrána na základě kompromisu. Při volbě nižší průtokové rychlosti by již došlo ke zhoršení meze detekce SeU a SeMet a při volbě vyšší průtokové rychlosti by se pak výrazně zhoršila mez detekce u Se^{VI}.



Obr. 4.4 Závislost absorbance na průtokové rychlosti katolytu

$$v_{Ar} = 67 \text{ ml.min}^{-1}, I = 1 \text{ A}, c_{kat} = 1 \text{ mol. dm}^{-3}, c_{Se(IV)} = 60 \text{ ng.ml}^{-1}, c_{Se(VI)} = 300 \text{ ng.ml}^{-1},$$

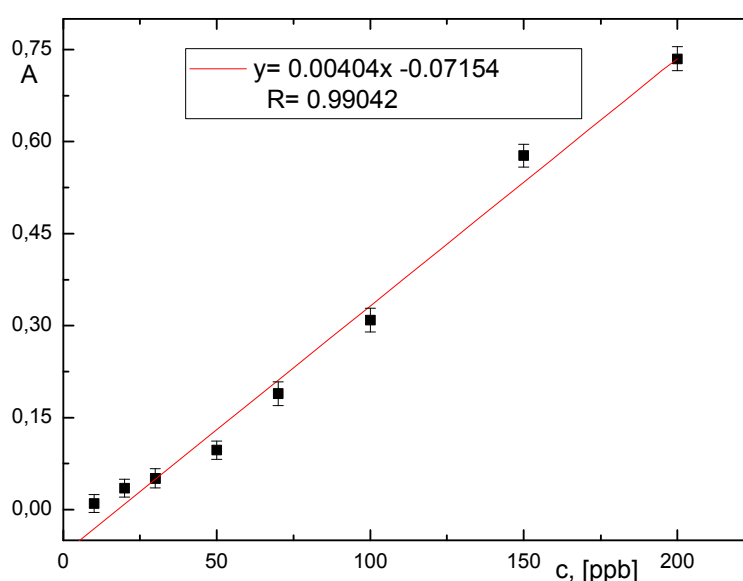
$$c_{SeCys} = 300 \text{ ng.ml}^{-1}, c_{SeU} = 100 \text{ ng.ml}^{-1}, c_{SeMet} = 900 \text{ ng.ml}^{-1}$$

4.2 Kalibrace

Po zjištění optimálních podmínek pro generování těkavých sloučenin z jednotlivých forem selenu Se^{IV} , Se^{VI} , SeCys, SeU a SeMet byly proměřeny kalibrační závislosti kombinovanou metodou HPLC-EcHG-QFAAS.

4.2.1 Kalibrační závislost Se^{IV}

Kalibrační závislost Se^{IV} byla proměřena v koncentračním rozsahu 10 až 200 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$. Ze získaných výsledků byla sestrojena kalibrační závislost, která je vidět na Obr. 4.5.



Obr. 4.5 Kalibrační závislost pro stanovení Se^{IV} za optimálních experimentálních podmínek pro stanovení dané substance

$$I = 1 \text{ A}, c_{\text{kat}} = 1,0 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}, v_{\text{vz}} = 1,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}, v_{\text{Ar}} = 67 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$$

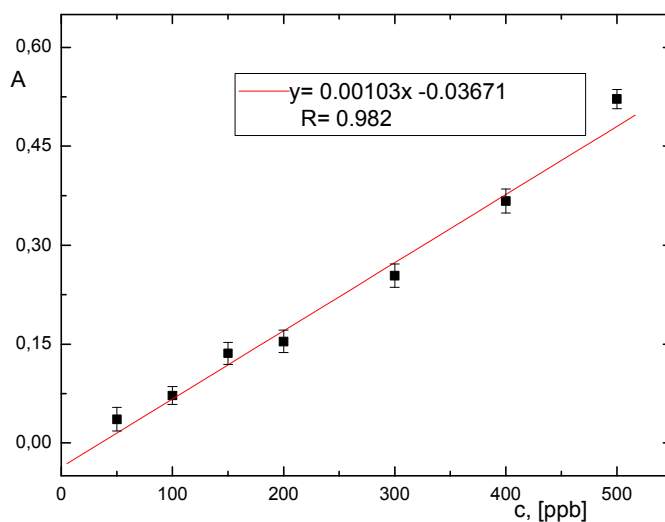
Z proměřené kalibrační závislosti pro všechny sloučeniny byly určeny základní charakteristiky stanovení jednotlivých specií selenu. Tyto získané charakteristiky jsou shrnuty v Tab. 4.1. Jak vyplývá z uvedené tabulky, stanovení Se^{IV} je nejcitlivější ze všech specií selenu ($0,004 \text{ ml} \cdot \text{ng}^{-1}$), mez detekce a mez stanovitelnosti jsou také velice nízké ($12,5 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ a $41,8 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$) a stanovení má velice dobrou opakovatelnost (2,2 %).

Tab. 4.1 Porovnání charakteristik stanovení pro jednotlivé sloučeniny, opakovatelnost pro $100 \text{ ng.ml}^{-1} \text{ Se}^{\text{IV}}$ a SeCys , $200 \text{ ng.ml}^{-1} \text{ SeU}$, $300 \text{ ng.ml}^{-1} \text{ Se}^{\text{VI}}$ a $1000 \text{ ng.ml}^{-1} \text{ SeMet}$

Sloučenina	Citlivost [$\text{ml} \cdot \text{ng}^{-1}$]	LOD [ng.ml^{-1}]	LOQ [ng.ml^{-1}]	Opakovatelnost [% RSD]
Se^{IV}	$4 \cdot 10^{-3}$	12,5	41,8	2,2
Se^{VI}	$1 \cdot 10^{-3}$	12,2	40,6	2,8
SeU	$7 \cdot 10^{-4}$	10,8	36,1	3,9
SeCys	$4 \cdot 10^{-4}$	16,8	56,1	5,1
SeMet	$5 \cdot 10^{-5}$	87,8	292,5	5,1

4.2.2 Kalibrace Se^{VI}

V případě Se^{VI} byly proměřeny vzorky v koncentračním rozmezí 50 až 500 ng.ml^{-1} . Z naměřených dat byla opět sestrojena kalibrační závislost, která je vidět na Obr. 4.6.



Obr. 4.6 Kalibrační závislost pro stanovení Se^{VI} za optimálních experimentálních podmínek pro stanovení dané substance

$$I = 1 \text{ A}, c_{\text{kat}} = 1 \text{ mol. dm}^{-3}, v_{\text{vz}} = 1,5 \text{ ml.min}^{-1}, v_{\text{Ar}} = 67 \text{ ml.min}^{-1}$$

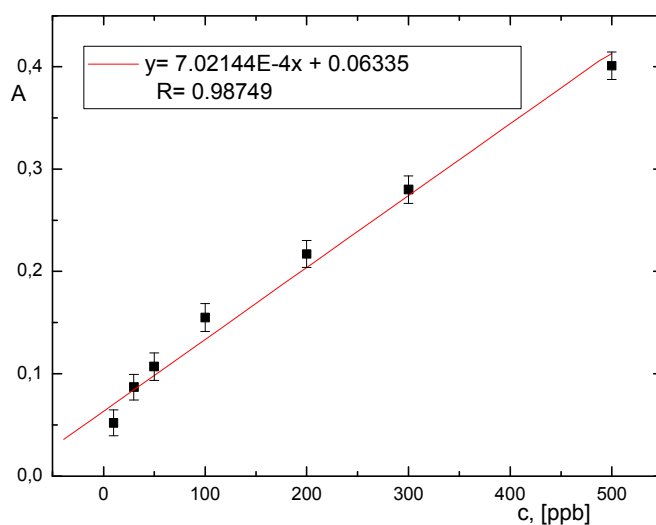
Ze získaných základních charakteristik stanovení Se^{VI} , které si lze opět prohlédnout v Tab. 4.1, je zřejmé, že i stanovení druhé anorganické sloučeniny

selenu – Se^{VI} kombinovanou technikou EcHG-QFAAS vykazuje výbornou citlivost $1 \cdot 10^{-3} \text{ ml} \cdot \text{ng}^{-1}$. Mez detekce a mez stanovitelnosti jsou prakticky totožné ($12,2 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1} / 40,6 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$) s hodnotami pro Se^{IV} . Stejně výborná je i opakovatelnost měření (2,8 %).

4.2.3 Kalibrace SeU

Podobně jako u anorganických sloučenin selenu, byly proměřeny standardy SeU v rozmezí koncentrací od 30 do $500 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ a následně byla sestrojena kalibrační závislost (Obr. 4.7).

Porovnáme-li získané základní charakteristiky stanovení SeU charakterizované v Tab. 4.1, vidíme, že citlivost stanovení SeU je horší než v případě obou anorganických sloučenin ($7 \cdot 10^{-4} \text{ ml} \cdot \text{ng}^{-1}$). Zároveň ale stanovení SeU vykazuje nejlepší mez detekce a mez stanovitelnosti ($10,8 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1} / 36,1 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$). Opakovatelnost stanovení je také relativně nízká (3,9 %).



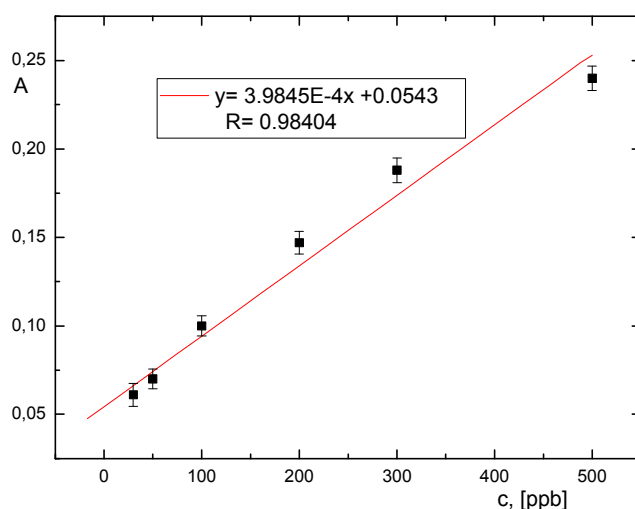
Obr. 4.7 Kalibrační závislost pro stanovení SeU za optimálních experimentálních podmínek pro stanovení dané substance

$$I = 1 \text{ A}, c_{kat} = 1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}, v_{vz} = 1,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}, v_{Ar} = 67 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$$

4.2.4 Kalibrace SeCys

Kalibrační závislost SeCys byla proměřena v rozsahu od 30 do 500 ng.ml⁻¹. Výsledná kalibrační přímka je znázorněna na Obr. 4.8.

Pokud se týká charakteristik kombinovaného stanovení SeCys, citlivost stanovení je oproti anorganickým speciím přibližně o řád nižší (4.10⁻⁴ ml.ng⁻¹); mez detekce a mez stanovitelnosti jsou jen o málo horší (16,8 ng.ml⁻¹/56,1 ng.ml⁻¹). Opakovatelnost stanovení je také horší – 5,1 %.

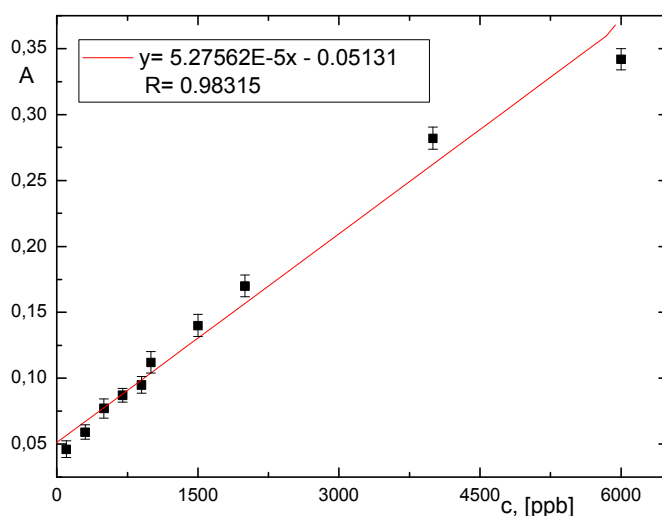


Obr. 4.8 Kalibrační závislost pro stanovení SeCys za optimálních experimentálních podmínek pro stanovení dané substance

$$I = 1 \text{ A}, c_{kat} = 1 \text{ mol. dm}^{-3}, v_{vz} = 1,5 \text{ ml.min}^{-1}, v_{Ar} = 67 \text{ ml.min}^{-1}$$

4.2.5 Kalibrace SeMet

Kalibrační závislost pro stanovení SeMet byla opět sestrojena z dat získaných proměřením odezev dané specie v koncentračním rozsahu od 100 do 2000 ng.ml⁻¹. Výsledná závislost je zobrazena na Obr. 4.9. Základní charakteristiky tohoto stanovení jsou oproti všem ostatním sloučeninám selenu o řád horší. Citlivost stanovení je např. 5·10⁻⁵ ml.ng⁻¹, mez detekce a mez stanovitelnosti se pohybují skoro v řádech ppm – 87,8 ng.ml⁻¹/292,5 ng.ml⁻¹. Opakovatelnost dosahuje stejné hodnoty jako u SeCys – 5,1%.



Obr. 4.9 Kalibrační závislost pro stanovení SeMet za optimálních experimentálních podmínek pro stanovení dané substance

$$I = 1 \text{ A}, c_{kat} = 0,1 \text{ mol. dm}^{-3}, v_{vz} = 1,5 \text{ ml.min}^{-1}, v_{Ar} = 67 \text{ ml.min}^{-1}$$

4.3 Optimalizace HPLC

Po zjištění optimálních podmínek pro generování těkavých sloučenin a proměření základních charakteristik stanovení EchG-QFAAS jednotlivých sloučenin selenu bylo možné přistoupit k zařazení a optimalizaci separačního kroku. Pro separaci sloučenin selenu se často používají HPLC kolony s reverzní fází (RP)^{51,52} nebo HPLC kolony s navázaným iontoměničem (IEC)^{53,54}. V této diplomové práci byla použita pro separaci sloučenin selenu aniontově výměnná kolona Hamilton PRP X-100. Jedná se o kolonu obsahující silný aniontový měnič. Mobilní fáze byla čerpána vysokotlakým čerpadlem a vzorek byl dávkován šesticestným ventilem smyčkami různých velikostí.

V první řadě bylo nutno ověřit, zda platí zjištěné optimální podmínky pro generování jako při měření bez HPLC.

V další fázi práce byla provedena vlastní optimalizace separačního kroku po připojení chromatografické kolony. Cílem optimalizace separačního kroku bylo dosažení dokonalého oddělení jednotlivých sloučenin a to v co nejkratším čase

analýzy. Testována byla koncentrace a pH pufru v mobilní fázi, její průtoková rychlost a velikost dávkovaného objemu vzorku.

Během optimalizačního kroku se ukázalo, že oddělení SeU ve směsi ostatních sloučenin selenu kolonou Hamilton PRP X-100 není možné. Ani v literatuře nebyly nalezeny uspokojivé podmínky pro oddělení SeU a nikdy ne s použitím kolony Hamilton PRP X100. Použita byla například kolona se silným aniontovým měničem SAX Dionex AS 11⁵⁵, která ovšem pro naše měření nebyla k dispozici.

Nadále tedy byly hledány optimální separační podmínky pro čtyři sloučeniny selenu: Se^{IV} a Se^{VI} z anorganických sloučenin a SeCys a SeMet z organických sloučenin. Jako mobilní fáze byl použit fosfátový pufr^{56,57}. Druhým nejčastěji používaným pufrem v literatuře byl uhličitan⁵⁸.

4.3.1 Vliv koncentrace fosfátového pufru na retenční časy sloučenin selenu

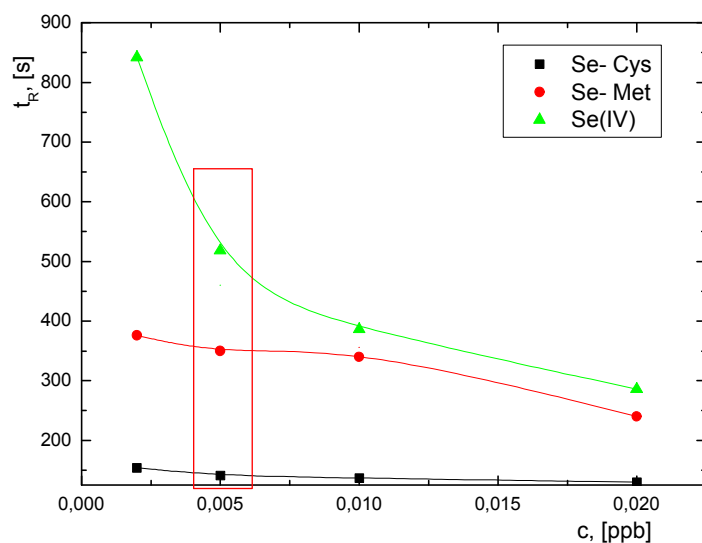
Při zjišťování optimální koncentrace fosfátového pufru pro současné stanovení daných sloučenin byl použit pufr o pH 6,0. Byla hledána optimální koncentrace fosfátového pufru dovolující oddělení daných specií až na základní linii v co nejkratším čase.

U sloučenin Se^{IV}, SeCys a SeMet byly největším problémem blízké retenční časy, které způsobily překrývání jednotlivých píků.

Se^{VI} měl ovšem při koncentracích pufru dostačujících k oddělení zbylých látek (Se^{IV}, SeCys, SeMet) retenční čas 45 minut, což nebylo pro reálnou analýzu únosné. Snaha snížit retenční čas Se^{VI} použitím fosfátového pufru o vyšší koncentraci vedla naopak k výraznému zhoršení separace zbylých tří specií.

Proto bylo nutné přistoupit k eluci pomocí dvou rozdílných mobilních fází. Protože nebyla k dispozici gradientová pumpa, byl do aparatury zařazen systém pro přepojení mobilní fáze v určitém čase analýzy.

Nejprve byl použit pufr o nižší koncentraci solí (viz dále) k oddělení SeCys, Se^{IV} a SeMet a následně v čase 320 s bylo čerpání tohoto pufru zaměněno za pufr o koncentraci 100 mmol·dm⁻³.



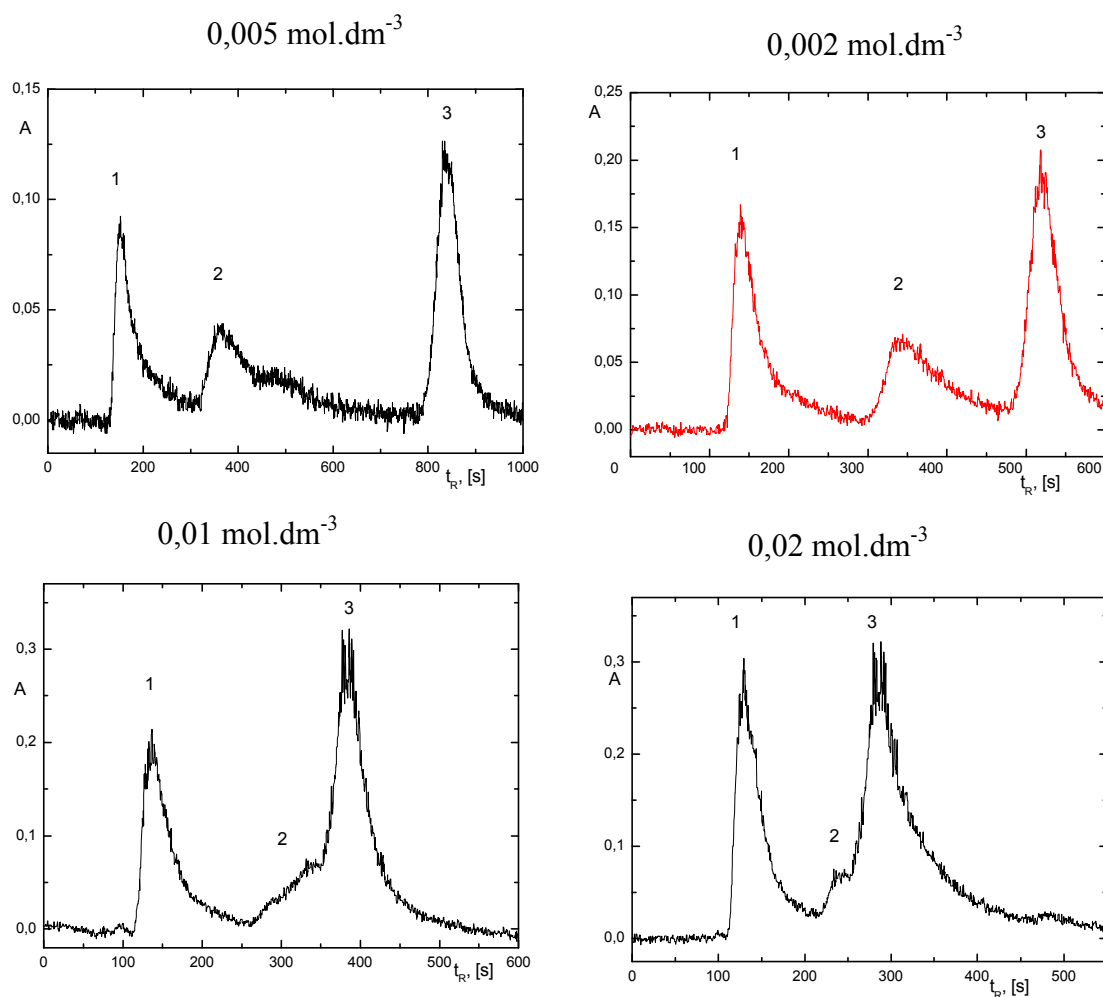
Obr. 4.10 Závislost retenčních časů Se^{IV} , SeCys, SeMet na koncentraci fosfátového pufru

$$pH = 6,0, I = 1A, v_{\text{pufr}} = 1,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}, c_{\text{kat}} = 1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}, v_{\text{kat}} = 1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1},$$

$$v_{\text{Ar}} = 67 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$$

S touto aparaturou byla hledána optimální koncentrace fosfátového pufru pro optimální separaci SeCys, SeMet a Se^{IV} . Byla provedena speciální analýza s mobilní fází o koncentraci pufru v rozmezí od 2,0 do 20 $\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Výsledná závislost je vidět na Obr. 4.10. Z proměřené závislosti jasně vyplývá, že při vzrůstu koncentrace pufru došlo ke zhoršení rozlišení, ale pořadí píků zůstalo nezměněno. V našem případě se látky separovaly v pořadí SeCys – SeMet – Se^{IV} . Jednotlivé získané chromatogramy jsou zobrazeny na Obr. 4.11. Jak je vidět ze zmíněných záznamů, jako optimální koncentrace pufru v mobilní fázi byla zvolena koncentrace 5,0 $\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Při této koncentraci pufru došlo k dostatečnému oddělení jednotlivých sloučenin při dodržení nízkého retenčního času (513 s). Použití pufru o koncentraci 2,0 $\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ by znamenalo dosažení retenčního času poslední látky až 850 s, což už by bylo nevyhovující.

Při použití koncentrovanějších pufrů již bylo rozlišení nedostatečné; např. použití pufru o koncentraci 10 $\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ vedlo k splynutí píku Se^{IV} a SeMet.



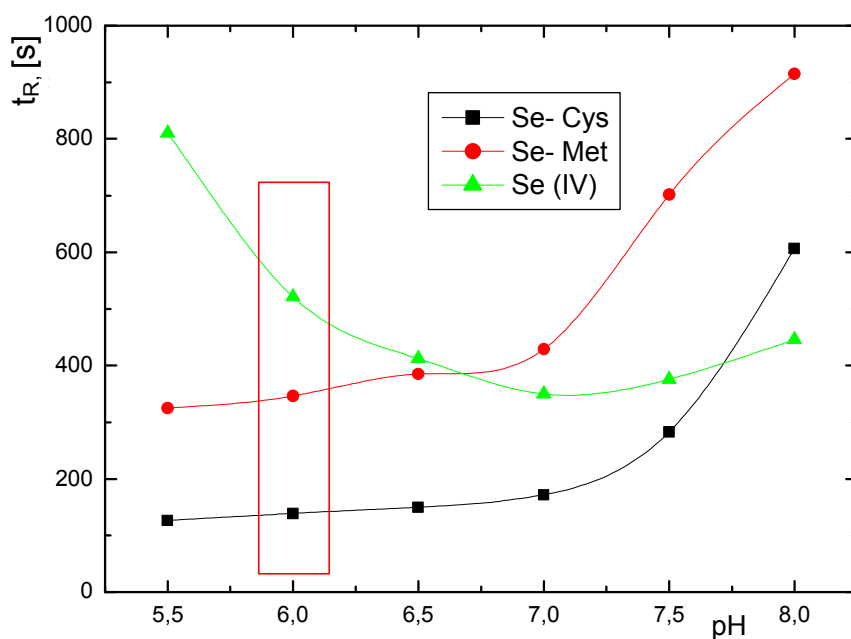
Obr. 4.11 Vliv koncentrace fosfátového pufru v mobilní fázi na separaci tří sloučenin selenu SeIV, SeCys, SeMet, $pH=6$, $I=1A$, $v_{puf}=1,5\text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, $c_{kat}=1\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$, $v_{kat}=1\text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, $v_{Ar}=67\text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, $c_{SeCys}(1)=50\text{ ppm}$, $c_{SeMet}(2)=500\text{ ppm}$, $c_{SeIV}(3)=500\text{ ppb}$

4.3.2 Vliv pH mobilní fáze na separaci sloučenin selenu

Pro studium vlivu pH mobilní fáze byl použit fosfátový pufr o koncentraci $0,005\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$. Pro proměření závislosti retenčních časů jednotlivých specií na pH mobilní fáze byly použity roztoky fosfátového pufru o pH v intervalu od 5,5 do 8,0 s krokem 0,5 pH. Jak je vidět ze souhrnného Obr. 4.12, se změnou pH dochází nejen ke změnám retenčních časů, ale i ke změně pořadí eluovaných látek.

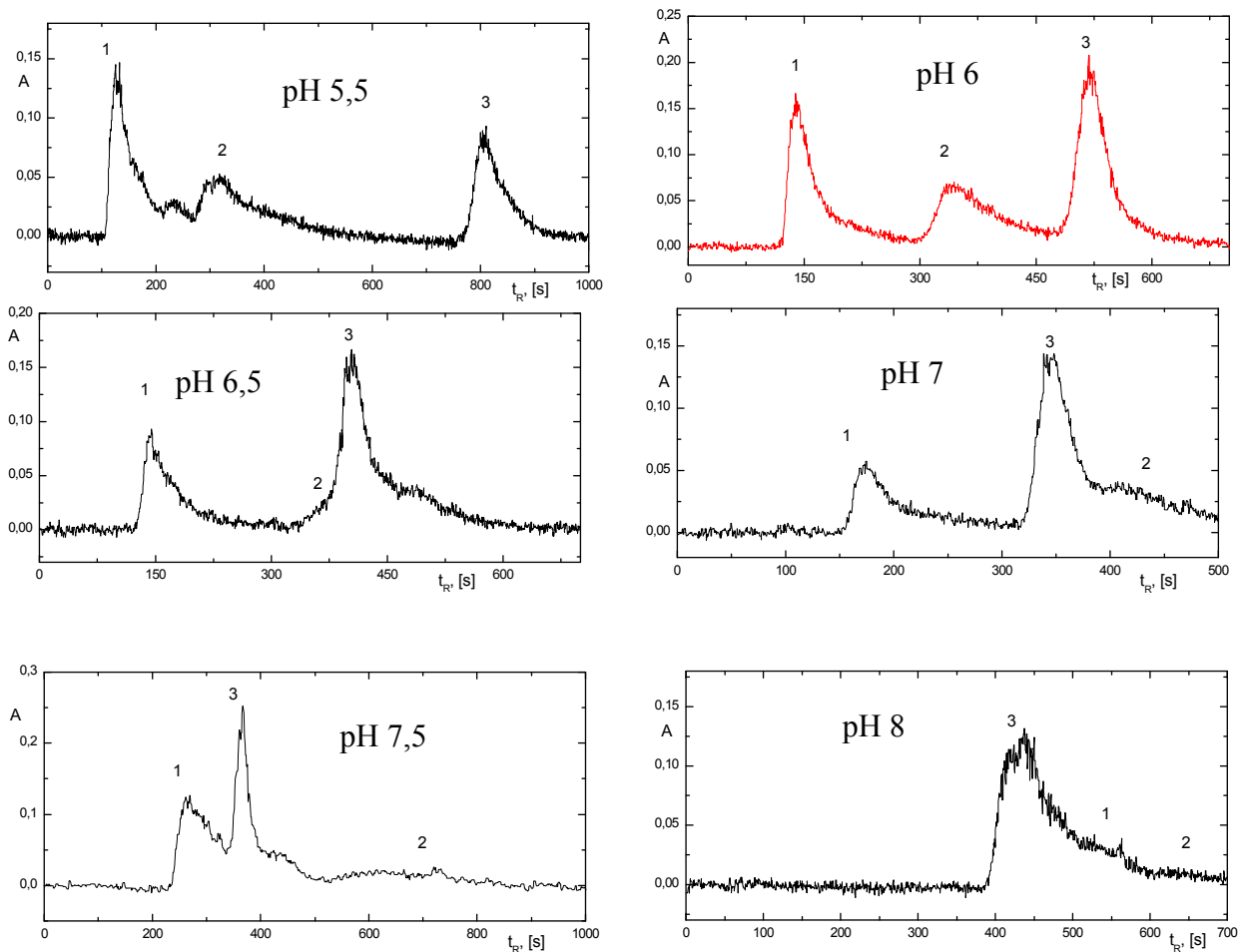
Vzhledem k tomu, že z Obr. 4.12 není možné vyhodnotit šířku píků a není vidět, kdy docházelo k jejich překrytí, je přidán Obr. 4.13 skládající se z jednotlivých chromatogramů pro daná pH.

Podíváme-li se na první chromatogram znázorňující speciální analýzu s použitím fosfátového pufru o pH 5,5, je vidět, že všechny tři dané sloučeniny byly odděleny a to v pořadí retenčních časů SeCys – SeMet – Se^{IV}. Problematický zůstával prakticky jen zbytečně vysoký retenční čas Se^{IV}, který bohužel zhoršoval celkový čas potřebný pro analýzu (viz. Obr. 4.12).



Obr. 4.12 Závislost retenčních časů SeIV, SeCys, SeMet na pH fosfátového pufru

$$c = 5 \text{ mmol.dm}^{-3}, \quad I = 1 \text{ A}, \quad v_{\text{pufr}} = 1,5 \text{ ml.min}^{-1}, \quad c_{\text{kat}} = 1 \text{ mol.dm}^{-3}, \quad v_{\text{kat}} = 1 \text{ ml.min}^{-1}, \\ v_{Ar} = 67 \text{ ml.min}^{-1}$$



Obr. 4.13 Závislost retenčních časů Se^{IV} , SeCys , SeMet na pH fosfátového pufru

$c = 5 \text{ mmol. dm}^{-3}$, $I = 1 \text{ A}$, $v_{\text{pufr}} = 1,5 \text{ ml. min}^{-1}$, $c_{\text{kat}} = 1 \text{ mol. dm}^{-3}$, $v_{\text{kat}} = 1 \text{ ml. min}^{-1}$,
 $v_{\text{Ar}} = 67 \text{ ml. min}^{-1}$, $c_{\text{SeCys}} (1) = 50 \text{ ppm}$, $c_{\text{SeMet}} (2) = 500 \text{ ppm}$, $c_{\text{SeIV}} (3) = 500 \text{ ppb}$

Podíváme-li se na další chromatogram s pufrům o pH 6, můžeme si povšimnout stejného pořadí eluce látek jako u pufru o pH 5,5. Rozdílný je ovšem v tomto případě retenční čas Se^{IV} , který se snížil z 820 s na 513 s.

Dále byl testován pufr o pH 6,5. Obecně docházelo při použití pufru s větší hodnotou pH k posunu retenčních časů k vyšším hodnotám. To ještě nebylo u tohoto

pufru tak významné; problémem se však stal Se^{IV} , jehož pík se přiblížil k píku SeMet nakolik, že ho téměř překryl.

Při použití pufru s pH 7,0 došlo k dalšímu zkrácení retenčního času Se^{IV} a dokonce již došlo k záměně pořadí eluce sloučenin: SeCys – Se^{IV} – SeMet.

Podíváme-li se na Obr. 4.13, je ale vidět, že vzhledem k velice blízkým retenčním časům Se^{IV} a SeMet nedošlo k úplnému oddělení píků. Dalo se předpokládat, že při použití pufru s ještě vyšší hodnotou pH dojde k úplné záměně pořadí těchto dvou látek a dokonalému oddělení na základní linii, proto bylo dále pracováno s pufrem o pH 7,5.

Tato domněnka se potvrdila, ovšem zároveň došlo k překryvu píku SeCys a Se^{IV} . Navíc, jak už bylo řečeno, během měření celé této závislosti docházelo pomalu ke zvyšování retenčních časů SeCys a SeMet a celková doba analýzy se prodlužovala.

Nakonec bylo pracováno s fosfátovým pufrem o pH 8,0 a plně se potvrdily výše zmíněné trendy. Retenční čas Se^{IV} se snížil tak, že došlo k další změně pořadí eluce látek na Se^{IV} – SeCys – SeMet. Z Obr. 4.13 je ale vidět, že píky nejsou vůbec odděleny a prakticky se jedná o jeden beztvary pík.

Z předchozího rozboru je jasné, že optimální pH pufru pro separování sloučenin selenu je pH 6,0. V tomto případě celková analýza trvala nejkratší dobu 513 s a byl to jediný případ, kdy byly látky od sebe dokonale odděleny.

4.3.3 Vliv průtoku mobilní fáze na separační proces

Tato podkapitola se věnuje optimalizaci průtokové rychlosti mobilní fáze. Při optimalizaci tohoto parametru jsme narazili na technické možnosti naší postarší HPLC pumpy.

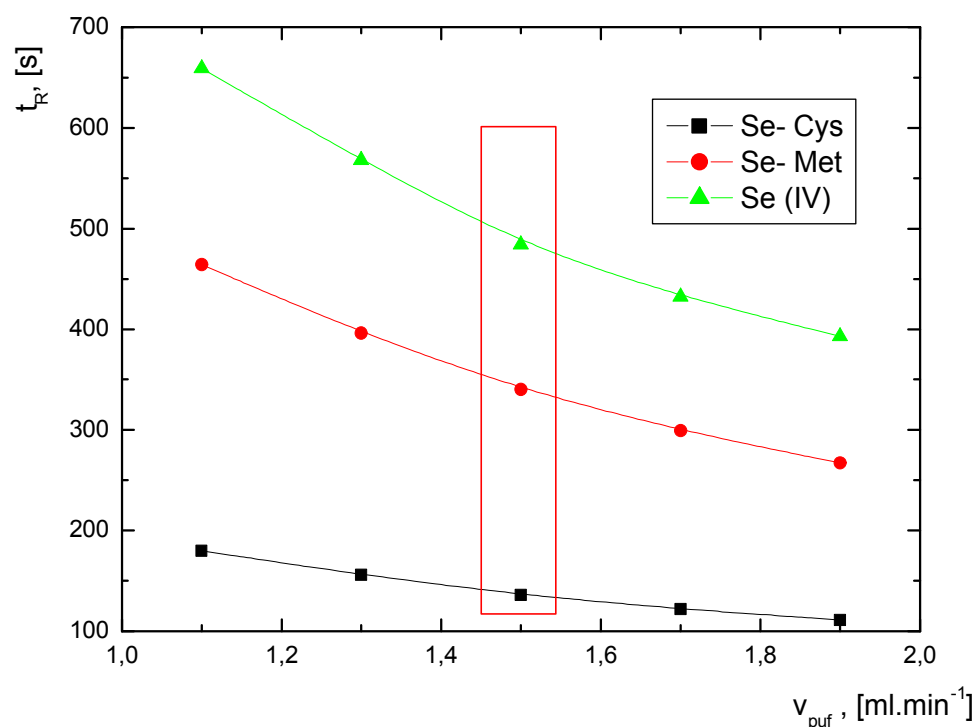
Úkolem bylo, stejně jako u ostatních optimalizací, nalézt takovou průtokovou rychlost mobilní fáze, při které jsou dokonale odděleny všechny sloučeniny selenu a zároveň je čas analýzy pokud možno co nejkratší.

Byly testovány průtokové rychlosti v intervalu od 1,1 do 1,9 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ a to s krokem 0,2 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$.

Jak můžeme vidět na Obr. 4.14, nebylo problematické oddělit všechny píky, ty byly při všech testovaných průtokových rychlostech odděleny až na základní linii.

Obecně se podle předpokladu potvrdilo, že při vyšších průtokových rychlostech docházelo ke snížení retenčních časů a také ke zvýšení odezvy signálu.

Bohužel ale v praxi nebylo možné pro speciální analýzu použít vyšší průtokovou rychlost než $1,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, protože v tomto případě stacionární fáze kladla tak velký odpor, že byl velmi často překračován přednastavený maximální tlak na pumpě. Proto byla jako optimální určena průtoková rychlost $1,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$; retenční časy jednotlivých sloučenin byly relativně nízké a měření bylo technicky bez problémů.



Obr. 4.14 Závislost retenčních časů SeIV, SeCys, SeMet na průtokové rychlosti mobilní fáze

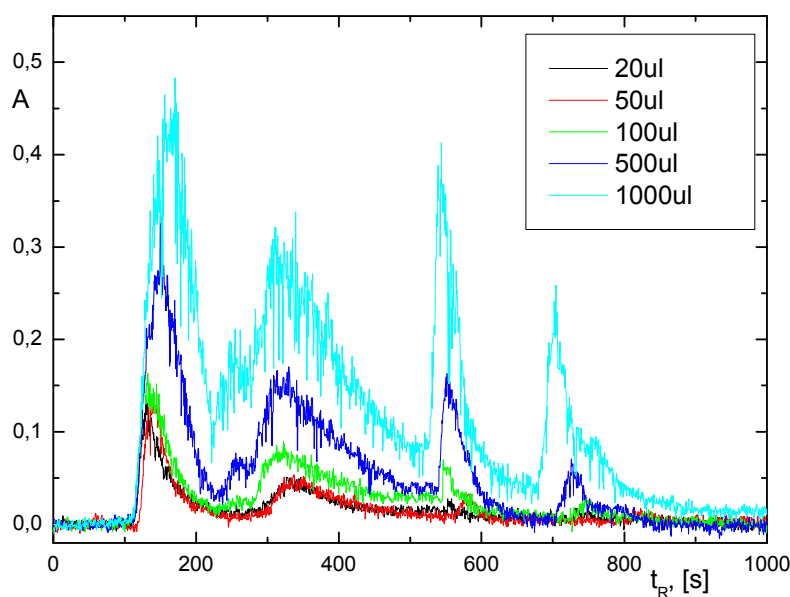
$$c = 5 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}, I = 1 \text{ A}, \text{pH} = 6, c_{kat} = 1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}, v_{kat} = 1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}, v_{Ar} = 67 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$$

4.3.4 Vliv velikosti dávkovaného objemu vzorku

Vzhledem k tomu, že vzorky byly dávkovány do proudu mobilní fáze dávkovacími smyčkami, bylo vhodné zjistit, jak velký objem vzorku dávkovat tak, aby bylo dosaženo pokud možno co nejvyšší citlivosti, nebyla překročena kapacita

kolony ani nedošlo ke zhoršení separace jednotlivých specií. Směs SeCys, SeMet a Se^{IV} byla dávkována smyčkami velikostí 20μl, 50μl, 100μl, 500μl a 1000μl.

Jak si můžeme všimnout na Obr. 4.15, platí předpoklad, že výška analytického signálu (citlivost) roste se zvyšujícím se nadávkovaným objemem. Proto byla pro další práci zvolena smyčka o velikosti 1000 μl, tedy největší smyčka, kterou jsme měli k dispozici. Dávkovaný objem 1000 μl ještě zároveň nepředstavoval problém s přílišnou spotřebou vzorku.



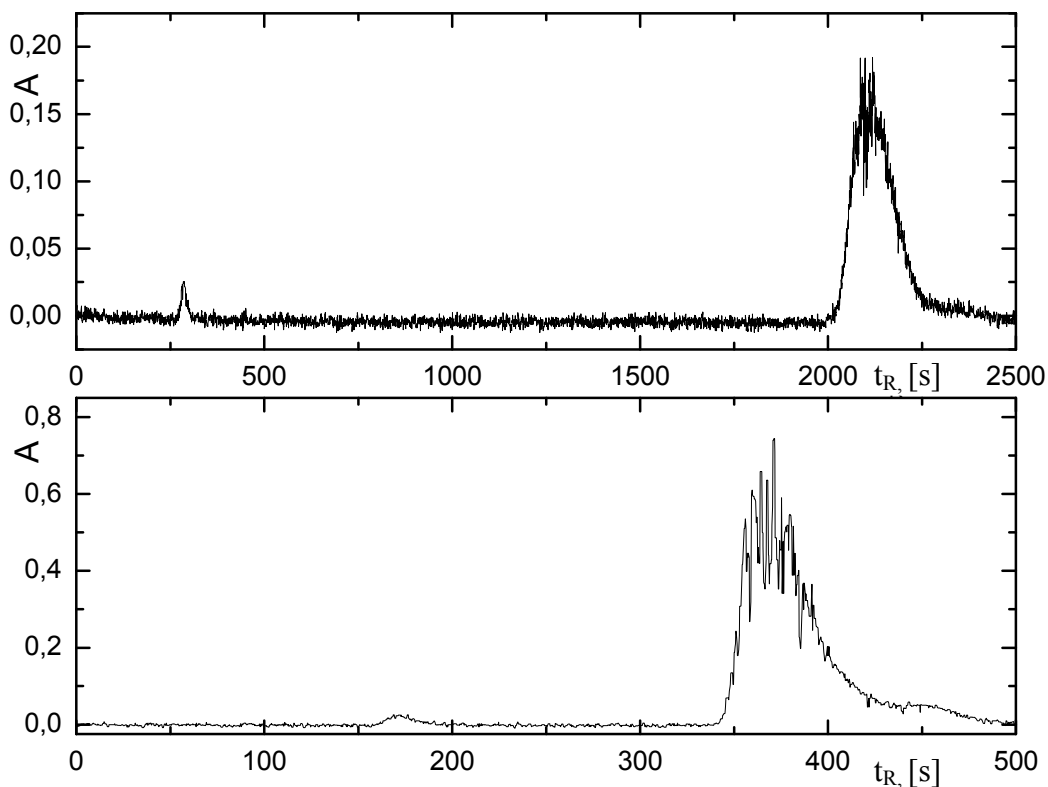
Obr. 4.15 Závislost absorbance na velikosti dávkovací smyčky

$$c = 5 \text{ mmol. dm}^{-3}, \quad I = 1A, \quad v_{\text{puf}} = 1,5 \text{ ml.min}^{-1}, \quad c_{\text{kat}} = 1 \text{ mol.dm}^{-3}, \quad v_{\text{kat}} = 1 \text{ ml.min}^{-1}, \\ v_{Ar} = 67 \text{ ml.min}^{-1}, \quad c_{\text{SeCys}} = 50 \text{ ppm}, \quad c_{\text{SeMet}} = 500 \text{ ppm}, \quad c_{\text{SeIV}} = 500 \text{ ppb}$$

4.3.5 Souhrn nalezených optimálních podmínek

Po nalezení optimálního průtoku, pH a složení mobilní fáze a vhodného dávkovaného objemu vzorku pro směs SeCys, SeMet a Se^{IV} bylo nutné připojit možnost přepínání mobilní fáze, aby bylo možno simultánně stanovovat i Se^{VI}. Při hledání optimální koncentrace pufru pro analýzu Se^{VI} byly testovány pufrы od koncentrace 50 mmol.dm⁻³ (Obr. 4.16).

S touto koncentrací byl retenční čas Se^{VI} kolem 2200 s, což bylo stále příliš. Proto byla koncentrace pufru v mobilní fázi zvýšena na hodnotu $100 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$. V tomto případě se retenční čas snížil na 365 s, a proto byla tato koncentrace pufru v mobilní fázi použita pro další měření.

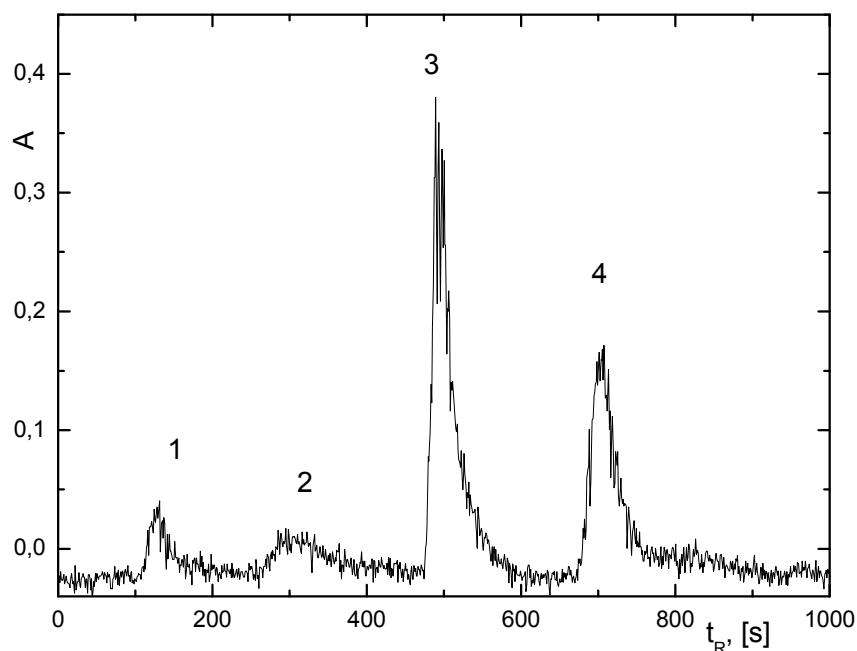


Obr. 4.16 Chromatogramy Se^{VI} , horní: $c = 0,05 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$,
spodní: $c = 0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$

$c_{\text{SeVI}} = 500 \text{ ppm}$, $c = 5 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $\text{pH} = 6$, $I = 1 \text{ A}$, $v_{\text{puf}} = 1,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, $c_{\text{kat}} = 1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$,
 $v_{\text{kat}} = 1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, $v_{\text{Ar}} = 67 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$

Po nalezení vhodné koncentrace pufru pro separaci Se^{VI} bylo nutné najít optimální čas pro přepnutí složení mobilní fáze tak, aby se píky Se^{IV} a Se^{VI} nepřekrýly, ale aby zároveň byl výsledný retenční čas co nejmenší. Jako optimální čas pro přepnutí složení mobilní fáze byl zvolen čas 320 s od nástřiku vzorku.

Chromatogram zobrazující speciační analýzu všech čtyřech sloučenin selenu za optimálních pracovních podmínek je vidět na Obr. 4.17.



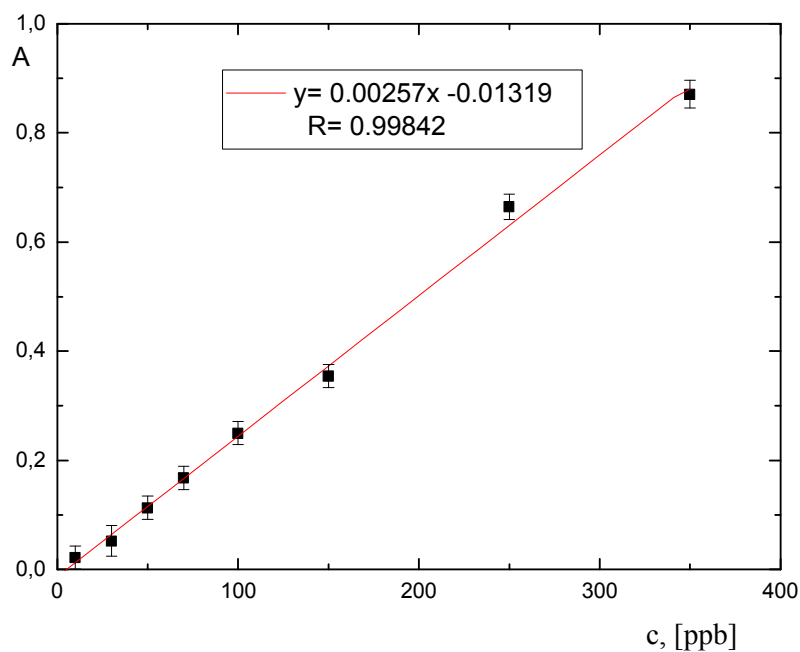
Obr. 4.17 Oddělení SeCys, SeMet, Se^{IV} a Se^{VI} za optimálních podmínek
 $pH=6$, $c_{puf}=0,005\text{ mol.dm}^{-3}/0,1\text{ mol. dm}^{-3}$, $V_{smyčka}=1000\text{ }\mu\text{l}$, $I=1\text{ A}$,
 $v_{puf}=1,5\text{ ml.min}^{-1}$, $c_{kat}=1\text{ mol.dm}^{-3}$, $v_{kat}=1\text{ ml.min}^{-1}$, $v_{Ar}=67\text{ ml.min}^{-1}$,
 $c_{SeCys}(1)=50\text{ ppm}$, $c_{SeMet}(2)=500\text{ ppm}$, $c_{SeIV}(3)=500\text{ ppb}$, $c_{SeVI}(4)=200\text{ ppm}$

4.4 Zjištění základních analytických charakteristik kombinovaného stanovení jednotlivých specií selenu

Po zjištění optimálních experimentálních podmínek pro rozdělení směsi bylo možné proměřit kalibrační závislosti pro jednotlivé specie selenu a získat základní analytické charakteristiky stanovení. Charakteristiky stanovení byly zjišťovány vyhodnocením jak výšek píků, tak i jejich ploch.

4.4.1 Kalibrace Se^{IV}

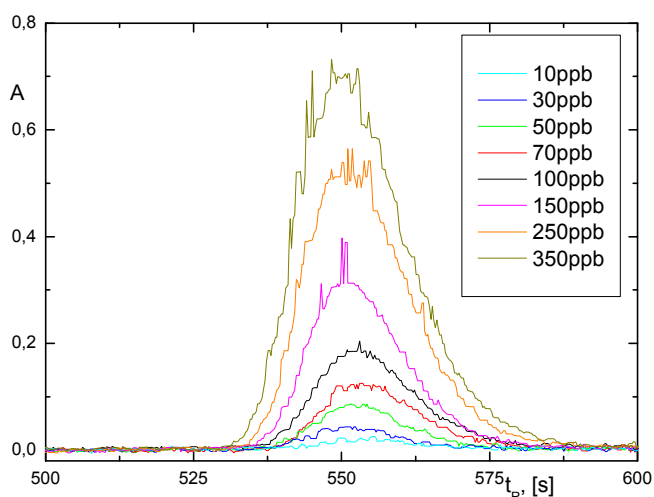
Byla proměřena výsledná kalibrační závislost speciální analýzy Se^{IV} kombinovanou technikou HPLC-EcHG-QFAAS analýzou standardů v rozsahu 10 ng.ml⁻¹ až 350 ng.ml⁻¹. Ta je zobrazena na Obr. 4.18.



Obr. 4.18 Kalibrační závislost pro stanovení Se^{IV}

$I = 1 \text{ A}$, $pH = 6$, $c_{kat} = 1 \text{ mol.dm}^{-3}$, $v_{puf} = 1,5 \text{ ml.min}^{-1}$, $v_{Ar} = 67 \text{ ml.min}^{-1}$,
 $c_{puf} = 0,005/0,1 \text{ mol. dm}^{-3}$

Zároveň byla mez detekce a mez stanovitelnosti určena z ploch píků; souhrnný chromatogram ploch píků je na Obr. 4.19.



Obr. 4.19 Chromatogram píkú Se^{IV} o různé koncentraci pro určení ploch píkú, $I = 1 \text{ A}$, $\text{pH} = 6$, $c_{\text{kat}} = 1 \text{ mol. dm}^{-3}$, $v_{\text{puf}} = 1,5 \text{ ml.min}^{-1}$, $v_{\text{Ar}} = 67 \text{ ml.min}^{-1}$, $c_{\text{puf}} = 0,005/0,1 \text{ mol. dm}^{-3}$

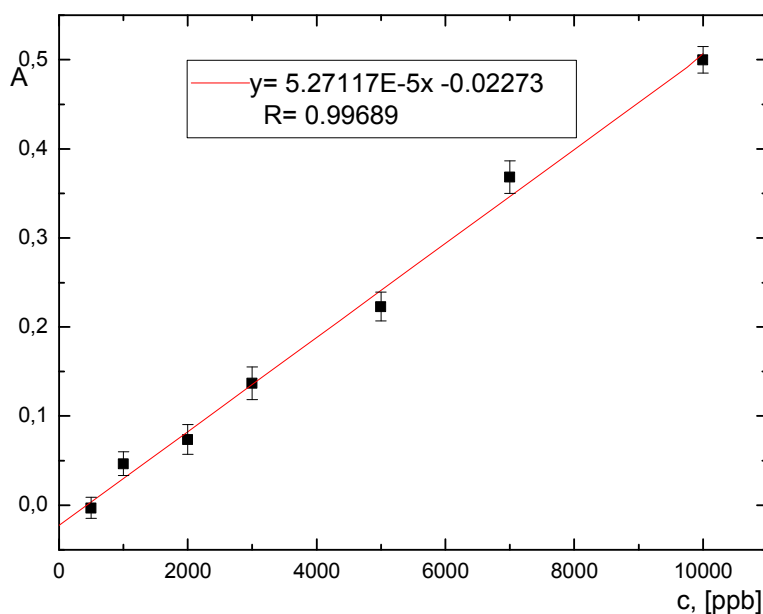
Pokud se týká základních analytických charakteristik metody, podle očekávání došlo ke zhoršení parametrů oproti parametrům bez zapojení HPLC kolony. Ovšem zvláště v případě Se^{IV} se jedná pouze o změnu v rámci jednoho řádu o několik jednotek. Opakovatelnost zůstává stále výborná (3,3%). Výsledné analytické charakteristiky stanovení jsou uvedeny pro porovnání s ostatními speciiemi v Tab. 4.2.

Tab. 4.2 Porovnání charakteristik stanovení pro jednotlivé sloučeniny, opakovatelnost pro $100 \text{ ng.ml}^{-1} \text{ Se}^{\text{IV}}$, $10 \text{ } \mu\text{g.ml}^{-1} \text{ Se}^{\text{VI}}$, $5 \text{ } \mu\text{g.ml}^{-1} \text{ SeCys}$ a $100 \text{ } \mu\text{g.ml}^{-1} \text{ SeMet}$

Sloučenina	Citlivost [ml.ng ⁻¹]	LOD/LOQ výška [ng.ml ⁻¹]	LOD/LOQ plocha [ng.ml ⁻¹]	Opakovatelnost [% RSD]
SeIV	$2,5 \cdot 10^{-3}$	7,3/25,1	5,7/19	3,3
SeVI	$5 \cdot 10^{-5}$	291/970	250,2/834	4,7
SeCys	$9 \cdot 10^{-6}$	538/1794	471/1570	3,1
SeMet	$7 \cdot 10^{-7}$	5660/18900	5084/16946	1,9

4.4.2 Kalibrace Se^{VI}

Po zjištění optimálních pracovních podmínek stanovení byla změřena také kalibrační závislost Se^{VI} v koncentračním rozsahu 500 - 10000 ng.ml⁻¹. Získanou kalibrační závislost pro tuto specii zobrazuje Obr. 4.20.



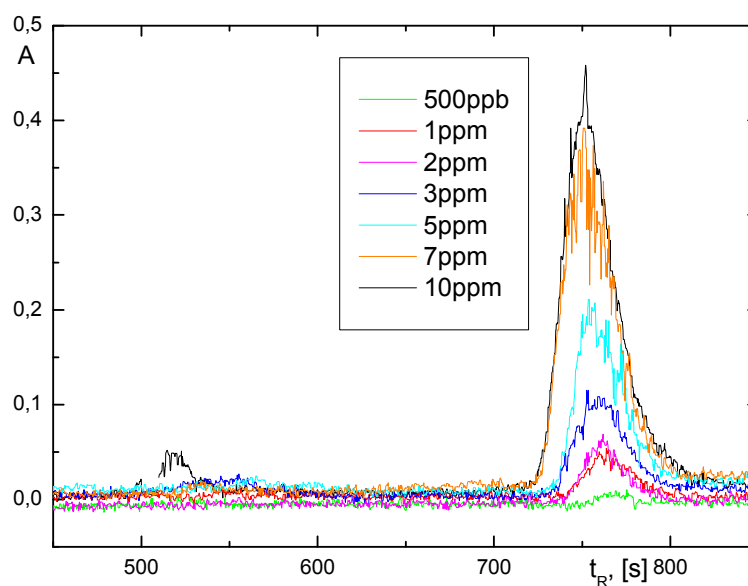
Obr. 4.20 Kalibrační závislost pro stanovení Se^{VI}

$$I = 1 \text{ A}, \text{pH} = 6, c_{kat} = 1 \text{ mol. dm}^{-3}, v_{puf} = 1,5 \text{ ml.min}^{-1}, v_{Ar} = 67 \text{ ml.min}^{-1},$$

$$c_{puf} = 0,005/0,1 \text{ mol. dm}^{-3}$$

Jak je patrné z Tab. 4.2, v případě Se^{VI} došlo k viditelnějšímu zhoršení charakteristik kombinovaného stanovení. Meze detekce a mez stanovitelnosti se oproti měření bez separační kolony zvýšily v řádu desítek procent (291 ng.ml⁻¹ / 970 ng.ml⁻¹) a citlivost se snížila o dva řády ($5 \cdot 10^{-5}$ ml. ng⁻¹). Opakovatelnost měření byla v tomto případě ze všech specií nejhorší - 4,7%. I tato hodnota je ale snadno akceptovatelná.

Meze detekce a mez stanovitelnosti byly opět určeny z ploch píků. Výsledky v Tab. 4.2 potvrzují zpracovaná data z výšek píků. Meze detekce a mez stanovitelnosti z ploch píků byly určeny jako 250,2 ng.ml⁻¹ a 834 ng.ml⁻¹. Příslušné chromatogramy jsou pro ilustraci uvedeny na Obr. 4.21.



Obr. 4.21 Chromatogram píkú Se^{VI} o různé koncentraci pro určení ploch píkú

$$I = 1 \text{ A}, \text{pH} = 6, c_{\text{kat}} = 1 \text{ mol. dm}^{-3}, v_{\text{puf}} = 1,5 \text{ ml.min}^{-1}, v_{\text{Ar}} = 67 \text{ ml.min}^{-1},$$

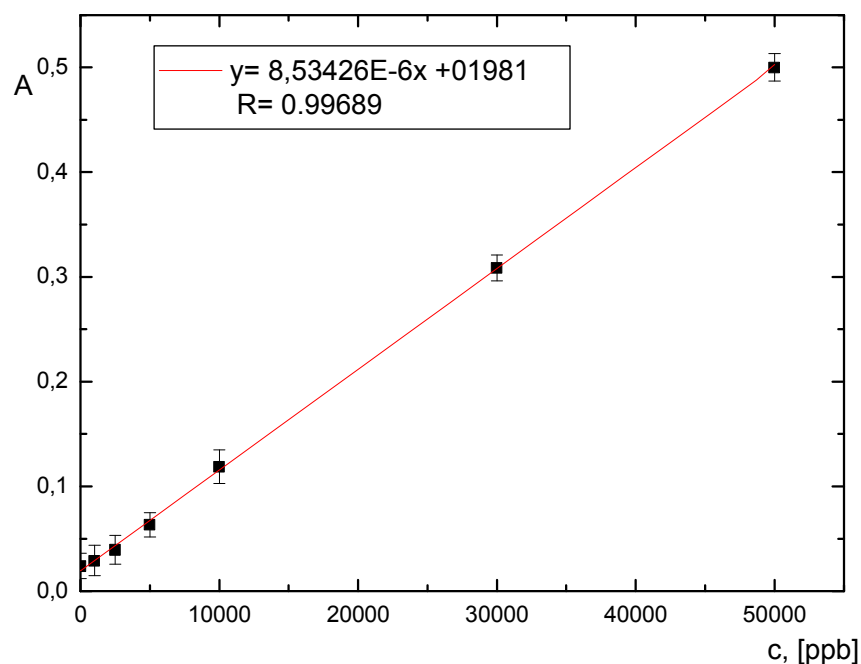
$$c_{\text{puf}} = 0,005/0,1 \text{ mol. dm}^{-3}$$

Jak je z Obr. 4.21 znatelné, vzorek Se^{VI} obsahoval minoritní obsah Se^{IV} , zvláště u vyšších koncentrací je v retenčním čase charakteristickém pro Se^{IV} mírně zvýšen signál.

Před kalibrací byla vyzkoušena oxidace Se^{IV} přidáním $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ v kyselém prostředí HCl ; signály při retenčních časech Se^{IV} však nevymizely.

4.4.3 Kalibrace SeCys

Podobně i po zjištění optimálních podmínek stanovení kombinovanou metodou HPLC-ECHG-QFAAS bylo přistoupeno k proměření kalibrační závislosti SeCys. Získanou kalibrační závislost v rozsahu 500 ng.ml^{-1} - 50000 ng.ml^{-1} zobrazuje Obr. 4.22.

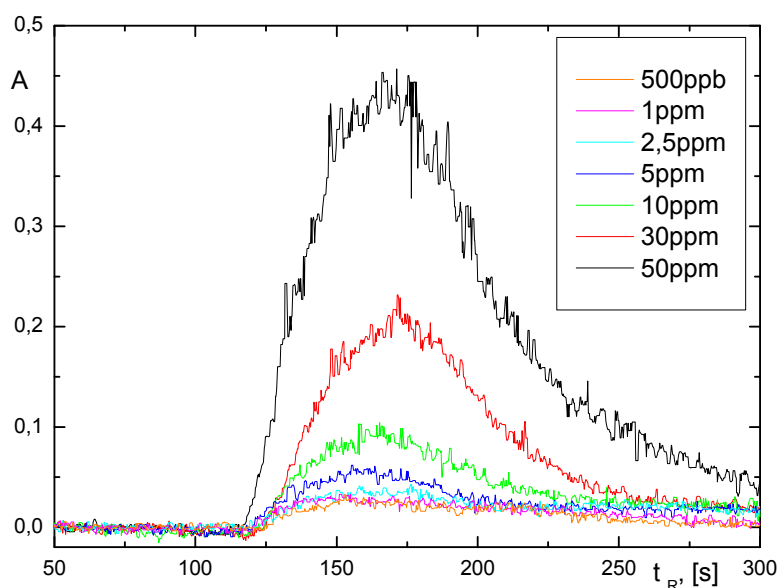


Obr. 4.22 Kalibrační závislost pro stanovení SeCys

$I = 1 \text{ A}$, $\text{pH} = 6$, $c_{\text{kat}} = 1 \text{ mol. dm}^{-3}$, $v_{\text{puf}} = 1,5 \text{ ml.min}^{-1}$, $v_{\text{Ar}} = 67 \text{ ml.min}^{-1}$,

$c_{\text{puf}} = 0,005/0,1 \text{ mol. dm}^{-3}$

V Tab. 4. 2. je opět možné vidět parametry stanovení v porovnání s ostatními speciemi. Oproti prostému stanovení SeCys bez separačního kroku byla citlivost kombinovaného stanovení přibližně o dva řády nižší ($9 \cdot 10^{-6} \text{ ml.ng}^{-1}$). V celkovém porovnání všech citlivostí mělo stanovení SeCys lepší citlivost než stanovení SeMet, ale horší než stanovení anorganických sloučenin selenu. Mez detekce a mez stanovitelnosti byla stanovena na 538 ng.ml^{-1} a 1794 ng.ml^{-1} při použití výšek píků a 471 ng.ml^{-1} a 1570 ng.ml^{-1} při vyhodnocení z ploch píků (Obr. 4.23). V celkovém porovnání charakteristik jsou meze detekce a meze stanovitelnosti opět lepší než v případě SeMet a naopak horší ve srovnání s anorganickými sloučeninami selenu. Opakovatelnost stanovení této specie byla výborná – 3,1%.



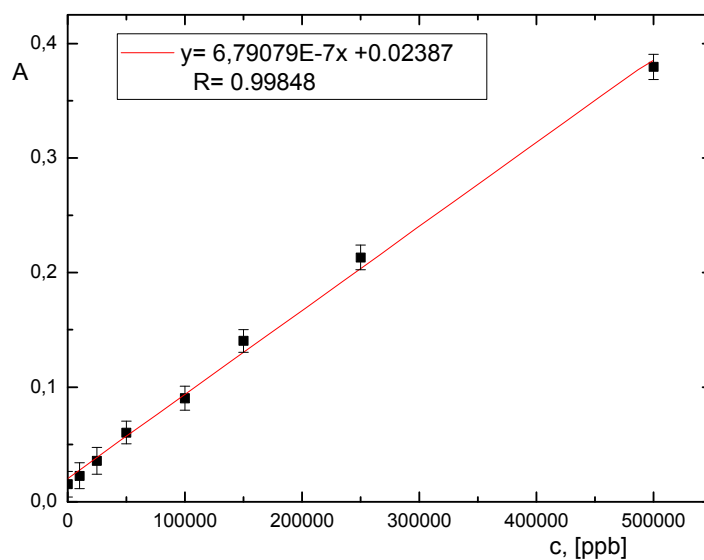
Obr. 4.23 Chromatogram píkú SeCys o různé koncentraci pro určení ploch píkú

$I = 1 \text{ A}$, $pH = 6$, $c_{kat} = 1 \text{ mol. dm}^{-3}$, $v_{puf} = 1,5 \text{ ml. min}^{-1}$, $v_{Ar} = 67 \text{ ml. min}^{-1}$,
 $c_{puf} = 0,005/0,1 \text{ mol. dm}^{-3}$

4.4.4 Kalibrace SeMet

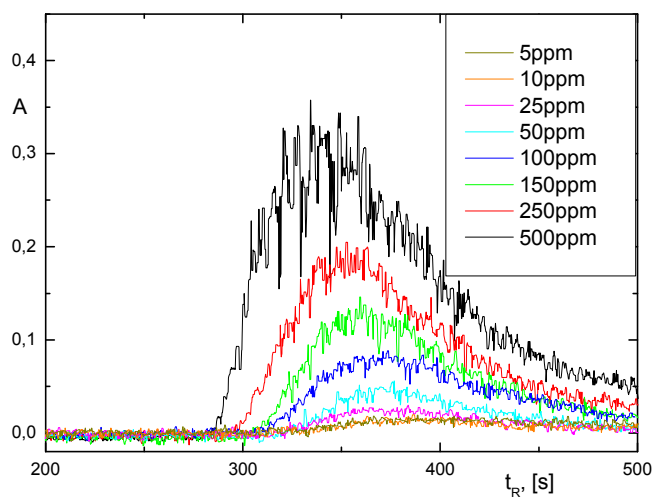
Jako poslední byla proměřena kalibrační závislost pro stanovení SeMet. Kalibrace byla proměřena v koncentračním rozsahu $5,0 \mu\text{g. ml}^{-1}$ až $50 \mu\text{g. ml}^{-1}$. Výslednou závislost zobrazuje Obr. 4.24. Citlivost měření byla určena jako $7 \cdot 10^{-7} \text{ ml. ng}^{-1}$. V porovnání s ostatními speciemi (viz. Tab. 4.2) byla tato citlivost nejnižší. Zhoršení citlivosti oproti stanovení bez separačního kroku nebylo větší než u ostatních sloučenin; přibližně o dva řády.

Mez detekce a mez stanovitelnosti byly určeny jak z výšek píkú (5660 ng. ml^{-1} a $18900 \text{ ng. ml}^{-1}$) tak i z ploch píkú (5084 ng. ml^{-1} a $16946 \text{ ng. ml}^{-1}$). Chromatogram ukazující píky použité k určení ploch je pro ilustraci uveden na Obr. 4.25. V porovnání s charakteristikami ostatních sloučenin selenu byly dosažené meze detekce SeMet výrazně nejhorší. Oproti měření bez použití separační kolony došlo ke zvýšení mezí detekce z $87,8 \text{ ng. ml}^{-1}$ na 5660 ng. ml^{-1} . Opakovatelnost stanovení byla ale naopak velmi dobrá – 1,9%.



Obr. 4.24 Kalibrační závislost pro stanovení SeMet

$I = 1 \text{ A}$, $pH = 6$, $c_{kat} = 1 \text{ mol. dm}^{-3}$, $v_{puf} = 1,5 \text{ ml.min}^{-1}$, $v_{Ar} = 67 \text{ ml.min}^{-1}$,
 $c_{puf} = 0,005/0,1 \text{ mol. dm}^{-3}$



Obr. 4.25 Chromatogram pík SeMet o různé koncentraci pro určení ploch píků,

$I = 1 \text{ A}$, $pH = 6$, $c_{kat} = 1 \text{ mol. dm}^{-3}$, $v_{puf} = 1,5 \text{ ml.min}^{-1}$, $v_{Ar} = 67 \text{ ml.min}^{-1}$,
 $c_{puf} = 0,005/0,1 \text{ mol. dm}^{-3}$

4.5 Analýza praktického vzorku moči

Po optimalizaci celého kombinovaného stanovení a proměření kalibračních závislostí a zjištění základních charakteristik tohoto speciálního stanovení bylo přistoupeno k analýze praktického vzorku moči.

Snažili jsme se najít certifikovaný referenční materiál obsahující dané sloučeniny selenu. Bohužel v současné době není na trhu vhodný referenční materiál. Jediným certifikovaným referenčním materiálem bohatým na selen byl CRM 402, analyzovaný např. v článku⁵⁹. I zde ovšem autoři byli nuceni vzorek spikovat jednotlivými organickými speciemi. CRM 402 je totiž vyroben z jetele plazivého pěstovaného na půdě bohaté na selen a je u něj deklarován pouze celkový obsah selenu a dále celkový obsah arzenu, kobaltu a molybdeny. Dále ještě Moreno⁶⁰ publikoval analýzu za použití FI-HG-AFS, kde použil referenční materiály RM 602 a RM 603, kde je také popsán pouze celkový obsah Se.

Protože jsme tedy neměli k dispozici standardní referenční materiál moči s deklarovaným obsahem jednotlivých specií, museli jsme přistoupit k analýze spikovaného vzorku moči. Před vlastním spikováním byl celý objem vzorku moči přefiltrován přes 0,2 μm filtr. Tento vzorek byl pak spikován jednotlivými speciemi selenu.

Od každé specii bylo ke vzorku postupně přidáno 5-7 přídavek standardu a následně byly proměřeny odezvy a sestrojeny příslušné přímky standardního přídávku (kalibrační závislosti). Směrnice získaných kalibračních závislostí byly porovnány se směnicemi kalibračních přímek vzorků připravených v destilované vodě – takto byla porovnána dosažená citlivost stanovení. Podobně byly porovnány i meze detekce a meze stanovitelnosti.

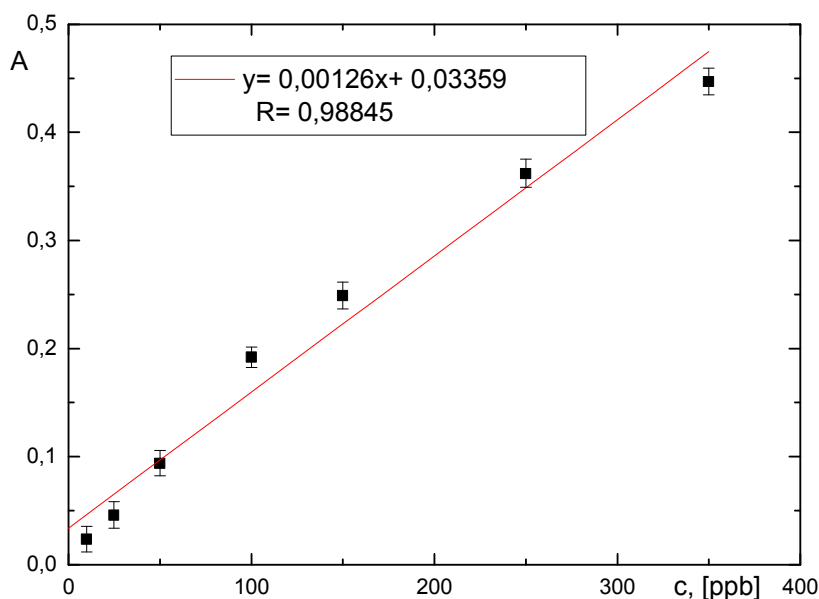
4.5.1 Kalibrace SeIV v moči

Podobně jako u stanovení vodných roztoků byl vzorek moči se standardem dávkován 1 ml smyčkou šesticestným dávkovacím ventilem. V případě Se^{IV} byly proměřeny koncentrace v rozsahu od 10 do 350 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$. Byla sestavena kalibrační závislost z výšek i z ploch píků a následně byly získány základní charakteristiky stanovení. Kalibrační přímka je zobrazena na Obr. 4.26. Podíváme-li se na Tab. 4.3, uvidíme jednotlivé charakteristiky měření.

Tab. 4.3 Porovnání charakteristik stanovení v matrici moči pro jednotlivé sloučeniny, opakovatelnost pro $100 \text{ ng.ml}^{-1} \text{ Se}^{\text{IV}}$, $10 \text{ } \mu\text{g.ml}^{-1} \text{ Se}^{\text{VI}}$, $5 \text{ } \mu\text{g.ml}^{-1} \text{ SeCys}$ a $100 \text{ } \mu\text{g.ml}^{-1} \text{ SeMet}$

Sloučenina	Citlivost [ml.ng^{-1}]	LOD/ LOQ výška [ng.ml^{-1}]	LOD/ LOQ plocha [ng.ml^{-1}]	Opakovatelnost [% RSD]
SeIV	$1,3 \cdot 10^{-3}$	7 / 23,4	8,03 / 26,8	3,5
SeVI	$4,0 \cdot 10^{-5}$	216,9 / 723	185 / 614,5	4,8
SeCys	$7,0 \cdot 10^{-6}$	648 / 2162	340 / 1130	3,4
SeMet	$5,0 \cdot 10^{-7}$	5730 / 19100	5566 / 18554	3,2

Citlivost stanovení Se^{IV} byla určena jako $1,3 \cdot 10^{-3} \text{ ml.ng}^{-1}$, což byla stejně jako u stanovení ve vodě nejvyšší citlivost v porovnání s ostatními specii. Meze detekce a mez stanovitelnosti byly opět vyjádřeny z výšek i ploch píků. Z výšek píků pak 7 ng.ml^{-1} a $23,4 \text{ ng.ml}^{-1}$; z ploch píků potom $8,03 \text{ ng.ml}^{-1}$ a $26,8 \text{ ng.ml}^{-1}$. Opakovatelnost byla potom 3,5%.



Obr. 4.26 Kalibrační závislost pro stanovení Se^{IV} v moči

$I = 1 \text{ A}$, $\text{pH} = 6$, $c_{\text{kat}} = 1 \text{ mol. dm}^{-3}$, $v_{\text{puf}} = 1,5 \text{ ml.min}^{-1}$, $v_{\text{Ar}} = 67 \text{ ml.min}^{-1}$,
 $c_{\text{puf}} = 0,005/0,1 \text{ mol. dm}^{-3}$

Nejdůležitější je však porovnání dosažených směrnic obou kalibrací (citlivostí stanovení). To (včetně porovnání dosažených mezí detekce a mezí stanovitelnosti)

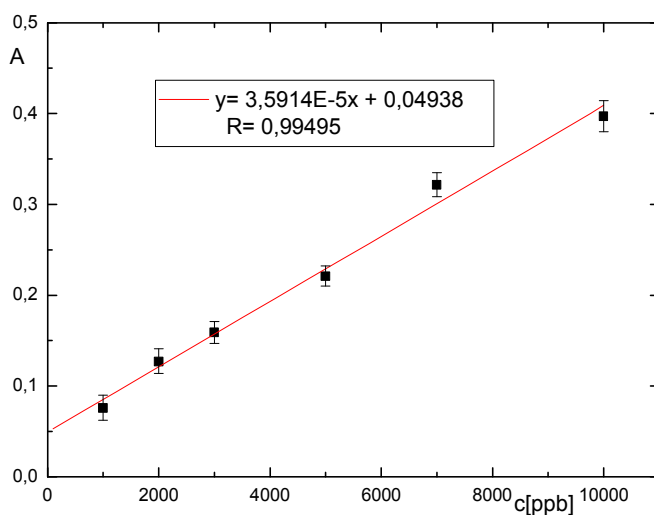
zobrazuje Tab. 4.4. Citlivost měření byla v obou maticích blízka – pro moč byla určena jako $1,3 \cdot 10^{-3} \text{ ml. ng}^{-1}$, ve vodě byla $2,5 \cdot 10^{-3} \text{ ml. ng}^{-1}$. V případě této specie vidíme, že meze detekce jsou prakticky totožné; ve vodě je mez detekce $7,3 \text{ ng.ml}^{-1}$ a v moči 7 ng.ml^{-1} .

Tab. 4.4 Porovnání LOD ve vodě – šedě a moči – zeleně

Sloučenina	Citlivost [ml. ng ⁻¹]	LOD výška [ng.ml ⁻¹]	LOD plocha [ng.ml ⁻¹]	Citlivost [ml. ng ⁻¹]	LOD výška [ng.ml ⁻¹]	LOD plocha [ng.ml ⁻¹]
Se ^{IV}	$2,5 \cdot 10^{-3}$	7,3	5,7	$1,3 \cdot 10^{-3}$	7	8,03
Se ^{VI}	$5 \cdot 10^{-5}$	291	250,2	$4,0 \cdot 10^{-5}$	216,9	185
SeCys	$9 \cdot 10^{-6}$	538	471	$7,0 \cdot 10^{-6}$	648	340
SeMet	$7 \cdot 10^{-7}$	5660	5084	$5,0 \cdot 10^{-7}$	5730	5566

4.5.2 Kalibrace Se^{VI} v moči

Kalibrace Se^{VI} v moči byla proměřena v rozsahu od 1000 ng.ml^{-1} do 10000 ng.ml^{-1} . Následně byla sestrojena kalibrační závislost, uvedená na Obr. 4.27.



Obr. 4.27 Kalibrační závislost pro stanovení Se^{VI} v moči

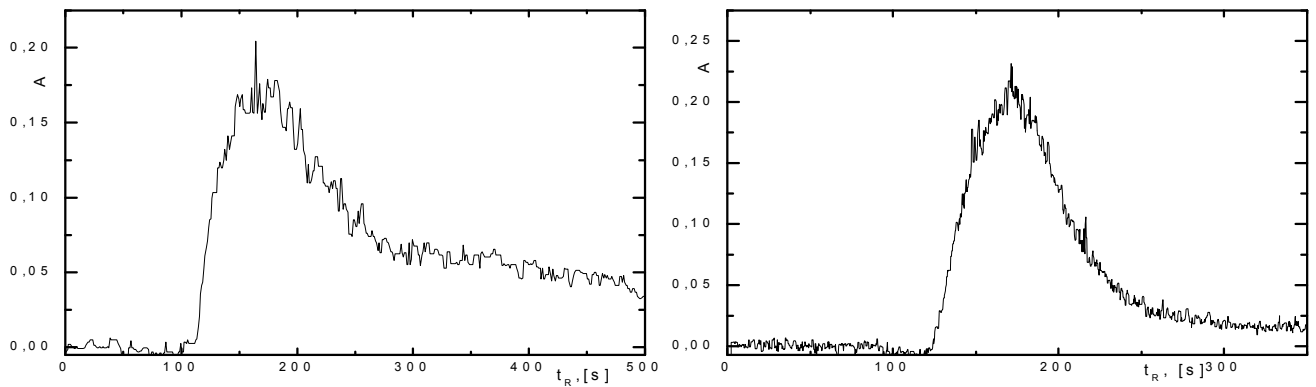
$$I = 1 \text{ A}, pH = 6, c_{kat} = 1 \text{ mol. dm}^{-3}, v_{puf} = 1,5 \text{ ml.min}^{-1}, v_{Ar} = 67 \text{ ml.min}^{-1},$$

$$c_{puf} = 0,005/0,1 \text{ mol. dm}^{-3}$$

Základní charakteristiky stanovení jsou opět uvedeny v Tab. 4.3. Citlivost stanovení byla $4,0 \cdot 10^{-5} \text{ ml.ng}^{-1}$, velice blízká citlivosti získané stanovením této specie ve vodě, která byla $5 \cdot 10^{-5} \text{ ml.ng}^{-1}$. Meze detekce a stanovitelnosti byly opět stanoveny z výšek i ploch píků. Z výšek píků byly určeny jako $216,9 \text{ ng.ml}^{-1}$ a 723 ng.ml^{-1} , z ploch píků pak jako 185 ng.ml^{-1} a $614,5 \text{ ng.ml}^{-1}$. V porovnání s mezemi detekce pro stanovení ve vodě, které jsou vyznačeny v Tab. 4. 4., je vidět, že v moči byly tyto parametry dokonce lepší. To ale není úplně neobvyklé; i v literatuře⁶¹ bylo zaznamenáno stejné zlepšení meze detekce při měření v moči. Opakovatelnost byla stanovena na 4,8%, v porovnání s ostatními sloučeninami byla nejhorší.

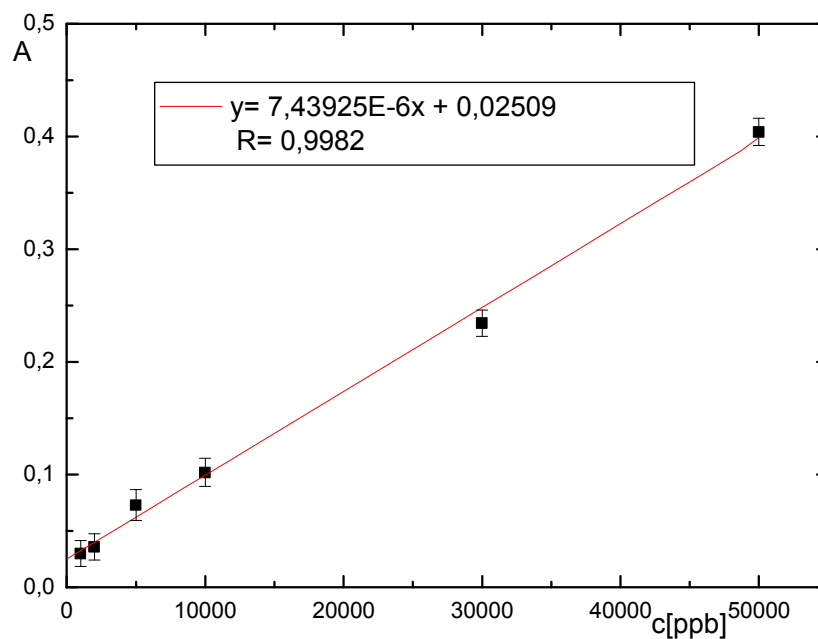
4.5.3 Kalibrace SeCys v moči

Byla provedena kalibrace vzorku v rozsahu od 1000 do 50000 ng.ml^{-1} . Kalibrační přímka je vidět na Obr. 4.29. Pokud se týká charakteristik měření, jako je mez detekce a stanovitelnosti, z výšek píků byla stanovena na 648 ng.ml^{-1} a 2162 ng.ml^{-1} a z ploch píků na 340 ng.ml^{-1} a 1130 ng.ml^{-1} , porovnání s ostatními zkoumanými sloučeninami je v Tab. 4.3. Jak je vidět, mez detekce zjištěná z ploch píků je o polovinu lepší, což je pravděpodobně dáno tvarem píků. Zatímco při stanovení ve vodě měl pík klasický tvar, v moči docházelo k velice pomalému klesání, jak je vidět na Obr. 4.28, a tudíž všechny plochy spočítané z vzorků moči byly větší než u měření ve vodě. Opakovatelnost měření byla stanovena na 3,4 %. V porovnání s mezí detekce pro stanovení ve vodě došlo ke zvýšení přibližně o 100 ng.ml^{-1} ze 538 ng.ml^{-1} . Citlivosti stanovení ve vodě ($9 \cdot 10^{-6} \text{ ml. ng}^{-1}$) a moči ($7 \cdot 10^{-6} \text{ ml.ng}^{-1}$) byly opět velice blízké.



Obr. 4.28 Chromatogram SeCys v moči (vlevo) a ve vodě (vpravo)

$I = 1 \text{ A}$, $pH = 6$, $c_{kat} = 1 \text{ mol. dm}^{-3}$, $v_{puf} = 1,5 \text{ ml. min}^{-1}$, $v_{Ar} = 67 \text{ ml. min}^{-1}$,
 $c_{puf} = 0,005/0,1 \text{ mol. dm}^{-3}$



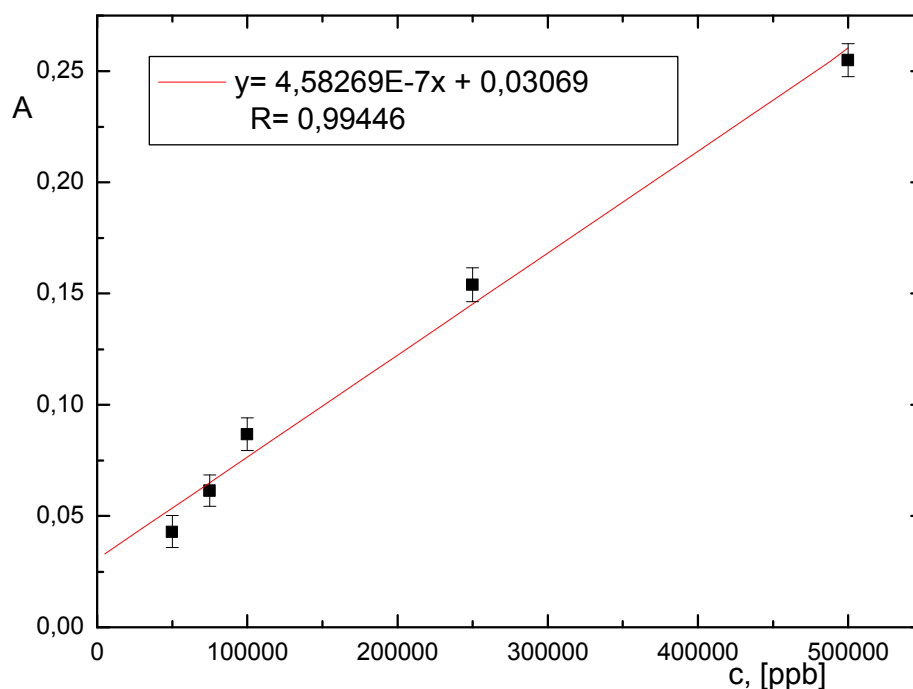
Obr. 4.29 Kalibrační závislost pro stanovení SeCys v moči

$I = 1 \text{ A}$, $pH = 6$, $c_{kat} = 1 \text{ mol. dm}^{-3}$, $v_{puf} = 1,5 \text{ ml. min}^{-1}$, $v_{Ar} = 67 \text{ ml. min}^{-1}$,
 $c_{puf} = 0,005/0,1 \text{ mol. dm}^{-3}$

4.5.4 Kalibrace SeMet v moči

V případě SeMet byla proměřena kalibrace v rozsahu od $50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ do $500 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Získané kalibrační závislosti jsou zobrazeny na Obr. 4.30.

Jak je vidět z Tab. 4.3, citlivost stanovení byla nejmenší ($5,0\cdot 10^{-7} \text{ ml}\cdot\text{ng}^{-1}$) ze všech daných specií, stejně jako při stanovení ve vodě. Ovšem srovnáme-li základní charakteristiky stanovení v moči a ve vodě, které jsou k porovnání v Tab. 4.4, je vidět, že meze detekce jsou prakticky totožné – 5560 resp. $5084 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ pro stanovení ve vodě a 5730 a $5566 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ pro stanovení v moči. Opakovatelnost měření byla velmi dobrá $3,2\%$.



Obr. 4.30 Kalibrační závislost pro stanovení SeMet v moči

$$I = 1 \text{ A}, \text{pH} = 6, c_{\text{kat}} = 1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}, v_{\text{puf}} = 1,5 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}, v_{\text{Ar}} = 67 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1},$$

$$c_{\text{puf}} = 0,005/0,1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$$

5. Závěr

Předkládaná diplomová práce je věnována elektrochemickému generování těkavých sloučenin a vhodnosti spojení této techniky se separačním krokem, konkrétně s vysokotlakou kapalinovou chromatografií a detekční technikou atomovou absorpční spektrometrií ke speciální analýze vybraných anorganických i organických sloučenin selenu.

V první části práce byla provedena optimalizace deprivatizační techniky – metody generování těkavých sloučenin selenu bez zapojení separačního kroku pro dané experimentální zapojení. Byl zjištěn optimální průtok nosného plynu a vzorku, nastavení elektrického generačního proudu a koncentrace katolytu pro jednotlivé zkoumané anorganické i organické specie selenu a následně nastaveny výsledné optimální podmínky pro všechny specie. Po zjištění optimálních podmínek byly proměřeny kalibrační závislosti pro všechny použité specie selenu.

V druhé části diplomové práce bylo přistoupeno k zapojení separačního kroku. Bylo nutno nalézt vhodné separační podmínky pro separaci všech sloučenin selenu. Byla zvolena ideální koncentrace fosforečnanového pufru v mobilní fázi a pH mobilní fáze. Dále byla zjištěna optimální průtoková rychlost mobilní fáze a vhodný objem dávkovaného vzorku. V uspořádání se separačním krokem potom byly proměřeny kalibrační závislosti pro dané specie selenu a byly určeny meze detekce a meze stanovitelnosti pro jednotlivé látky. Podobně byly zjištěny opakovatelnosti stanovení a dosažené citlivosti stanovení.

V závěru diplomové práce pak byla navržená metoda kombinovaného HPLC-EcHG-QFAAS stanovení jednotlivých specií selenu testována na vzorku moči. Podobně jako v případě matrice vodné byla pro přípravu standardních roztoků použita filtrovaná moč. Opět byly proměřeny příslušné kalibrační závislosti a vypočteny analytické charakteristiky, které byly porovnány s výsledky získanými pro vodné roztoky. Na základě těchto srovnání je možné říci, že navržená kombinovaná metoda umožňuje stanovit vybrané specie selenu jak ve vodné matrici, tak i v matrici moči.

6. Použitá literatura

- ¹ Němcová, I.; Čermáková, L.; Rychlovský, P.: Spektrometrické analytické metody I, Univerzita Karlova, Nakladatelství Karolinum, Praha 2004
- ² Pyrzyńska, K.: *Analyst* **121**, 77R (1996)
- ³ Olivas, R. M.; Donard, O. F. X.; Cámara, C.; Quevauviller, P.: *Analytica Chbnica Acta* **286**, 357 (1994)
- ⁴ Owen T. Butler, T.; Cairns W. R. L.; Cook, M.; Davidson, M.: *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **25**, 103 (2010)
- ⁵ Walsh, A.: *Spectrochim. Acta* **7**, 108 (1955)
- ⁶ Dědina J.; Fara M.; Koliňová D.; Korečková J.; Musil J.; Plško E.; Sychra V.: *Vybrané metody analytické atomové spektrometrie, Česká spektroskopická společnost, Sekce optické atomové spektrometrie, Praha 1987*
- ⁷ Welz, B.; Sperling, M.: *Atomic Absorption Spektrometry, Third Edition, WILEY Verlag GmbH, Weinheim 1999*
- ⁸ Ferreira, H. S.; Ferreira, S. L. C.; Cervera, M. L.; Guardia, M.: *Spectrochimica Acta Part B* **64**, 597 (2009)
- ⁹ Tsogas, G.; Giokas, D.; Vlessidis, A.: *Journal of Hazardous Materials* **163**, 988 (2009)
- ¹⁰ Dědina J.; Salev D. I.: *Hydride Generation Atomic Absorption Spektrometry, John Wiley and Sons Ltd, Chichester, England 1995*
- ¹¹ Feng Y.L., Lam J.W., Sturgeon R.E., *Analyst*, **126**, 1833 (2001)
- ¹² Jiang, X.; Gan, W.; Wan, L.; Zhang, H.; He, Y.: *Spectrochimica Acta Part B* **65**, 171 (2010)
- ¹³ Červený, V.; Rychlovský, P.; Hraníček, J.; Šíma, J.: *Chemické Listy* **103**, 652 (2009)
- ¹⁴ Chen H.W.; Brendle I.D.: *Anal. Chem.* **64**, 667 (1992)
- ¹⁵ Ding, W. W.; Sturgeon, R. E.: *Spectrochim. Acta B* **51**, 1325 (1996)
- ¹⁶ Rigin V. I.; Verkhoturov G. N.: *Zh. Anal. Khim.* **32**, 1557 (1977)
- ¹⁷ Denkhaus, E.; Beck, F.; Bueschler, P.; Gerhard, R.; Golloch, A.: *Fresenius J. Anal. Chem.* **370**, 735 (2001)

-
- ¹⁸ Brockmann, A.; Nonn, C.; Golloch, A.: *J. Anal. Atom. Spectrom.* **8**, 397 (1993)
- ¹⁹ Lin, Y. H.; Wang, X. R.; Yuan, D. X.; Yang, P. Y.; Huang, B. L.; Zhuang, Z. X.: *J. Anal. Atom. Spectrom.* **7**, 287 (1992)
- ²⁰ Ding W. W.; Sturgeon R. E.: *Spectrochim. Acta Part B* **51**, 1325 (1996)
- ²¹ Denkhaus E.; Golloch A.; Kampen T. U.; Nierfelf M.; Telgeher U.: *Fresenius J. Anal. Chem.* **361**, 733 (1998)
- ²² Schickling C.; Yang J. F.; Broekaert J. A. C.: *J. Anal. Atom. Spectrom.* **11**, 739 (1996)
- ²³ Machado L.F.; Jacinto A. O.; Menegario A. A.; Zagatto E. A.; Giné M. F.: *J. Anal. Atom. Spectrom.* **13**, 1343 (1998)
- ²⁴ Pyrol U.; Dworschak A.; Nitschke F.; Neidhart B.: *Fresenius J. Anal. Chem.* **363**, 495 (1999)
- ²⁵ Šíma J.; Rychlovský P.: *Chem. Listy* **92**, 676 (1998)
- ²⁶ Šíma J.; Rychlovský P.; Dědina J.: *Spectrochim. Acta Part B* **59**, 125 (2004)
- ²⁷ Šíma J.; Rychlovský P.: *Spectrochim. Acta Part B* **58**, 919 (2003)
- ²⁸ Junková G.; Šíma J.; Rychlovský P.: *Chem. Papers* **57**, 192 (2003)
- ²⁹ Ding W. W.; Sturgeon R. E.: *J. Anal. Atom. Spectrom.* **11**, 521 (1996)
- ³⁰ Hueber D. M.; Winefordner J. D.: *Anal. Chim. Acta* **316**, 129 (1995)
- ³¹ Červený V.: Diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze, Praha 2004
- ³² Šíma J.: Diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze, Praha 1998
- ³³ Schamlöffel D.; Neidhart B.: *Fresenius J. Anal. Chem.* **354**, 866 (1996)
- ³⁴ Červený, V.; Rychlovský, P.; Netolická, J.; Šíma, J.: *Spectrochimica Acta Part B* **62**, 317 (2007)
- ³⁵ Šíma, J.; Rychlovský, P.: *Chem. Listy* **92**, 676 (1998)
- ³⁶ Šíma, J.; Rychlovský, P.; Dědina, J.: *Spectrochim. Acta Part B* **59**, 125 (2004)
- ³⁷ Šíma, J.; Rychlovský, P.: *Spectrochim. Acta Part B* **58**, 919 (2003)
- ³⁸ Yamamoto, M.; Takada, K.; Kumamaru, T.: *Anal. Chem.* **59**, 2446 (1987)
- ³⁹ Wang, X. R.; Barnes, R. M.: *J. Anal. Atom. Spectrom.* **3**, 1083 (1988)
- ⁴⁰ Wang, X. R.; Barnes, R. M.: *J. Anal. Atom. Spectrom.* **3**, 1091 (1988)

-
- ⁴¹ Laborda, F.; Gomez, M. T.; Jimenez, M. S.: *J. Anal. Atom. Spectrom.* **11**, 1121 (1996)
- ⁴² Denkhaus, E. ; Golloch, A.; Guo, X.; Huang, B. : *JAAS* **16**, 870 (2001)
- ⁴³ Dědina J.; Matoušek T.: *J. Anal. At. Spectrom.* **15**, 301 (2000)
- ⁴⁴ Dědina J.; D'Ulivo A.: *Spectrochim. Acta Part B* **52**, 1737 (1997)
- ⁴⁵ Dauchy, X.; Potin- Gautir, M.; Astruc, A.; Astruc, M.: *Fresenius J Anal Chem* **348**, 792 (1994)
- ⁴⁶ <http://www.onkologickecentrum.cz/laboratore/vysetreni-mesice/2003/duben-selen.aspx> , [on- line]
- ⁴⁷ Pedrero, Z; Madrid, Y.: *Analytica Chimica Acta* **634**, 135 (2009)
- ⁴⁸ http://tomcat.prf.jcu.cz/sima/vybrane_kapitoly/prutok_anal.htm , [on- line]
- ⁴⁹ Pacáková, V.; Štulík, K.: *Vysokoúčinná kapalinová chromatografie*, Státní pedagogické nakladatelství, Praha 1986
- ⁵⁰ Eckschlager, K.: *Chemometrie*, Univerzita Karlova, Praha, 1994
- ⁵¹ Lobinski, R. ; Edmonds, S. J. ; Suzuki, K. T. ; Eden, P. C.: *Pure Appl. Chem.* **72**, 447 (2000)
- ⁵² Gómez-Ariza; J. L. ;Sanchez-Rodas, D. ; Caro de la Torre, M. A. ; Giráldez, I. ; Morales. E: *Journal of Chromatography A* **889**, 33 (2000)
- ⁵³ Harwood. J. J.; Su, W.: *Journal of Chromatography A* **788**, 105(1997)
- ⁵⁴ Johansson, M.; Bordin, G. ; Rodriguey, A. R.: *Analyst* **125**, 273(2000)
- ⁵⁵ Ochsenkühn- Petropoulou, M. ; Michalke B.; Kavouras, D.; Schmarel, P.: *Analytica Chimica Acta* **478**, 219 (2003)
- ⁵⁶ Cobo- Fernandes, M.C. ; Palacios, M. A. ; Chakraborti, M. C. ; Quevauviller, P: *J. Anal. Chem.* **351**, 438(1995)
- ⁵⁷ Gómez, M. M. ; Gasparic, T. ; Palacios, M. A. ; Camara, C. : *Analytica Chimica Acta* **374**, 241(1998)
- ⁵⁸ Gilon, N. ; Potin- Gautier, M. ;Astruc, M. : *Journal of Chromatography A* **750**, 327 (1996)
- ⁵⁹ Johanson,M.; Bordin,G.; Rodriguez, A.:*Analyst* **125** , 273 (2000)
- ⁶⁰ Moreno, M. A. : *JAAS* **15**, 681 (2000)
- ⁶¹ Lafuente, J. M. G. ; Sánchez, M. L. F. ; Sanz- Medel, A. : *JAAS* **11**, 1163 (1996)