

Studijní program: Chemie
Studijní obor: Analytická chemie



Karel Marschner

Optimalizace podmínek generování a atomizace arsanů pro
speciační analýzu metodou atomové fluorescenční
spektrometrie

Optimization of generation and atomization of arsines for
speciation analysis by atomic fluorescence spectrometry

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: doc. RNDr. Jiří Dědina, DSc.

Praha 2013

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

Prohlášení

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

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

V Praze dne

podpis:

Karel Marschner

V úvodu této diplomové práce bych chtěl poděkovat všem, kteří mi při řešení této diplomové práce vycházeli vstříc. V první řadě děkuji svému školiteli doc. RNDr. Jiřímu Dědinovi, DSc. Dále bych chtěl poděkovat konzultantovi RNDr. Stanislavu Musilovi, Ph.D. a také bych rád poděkoval všem ostatním pracovníkům na oddělení stopové prvkové analýzy Ústavu analytické chemie AV ČR, v. v. i.

Abstrakt

Tato práce se zabývá možností speciální analýzy arsenu založené na selektivním generování hydridů a detekcí atomovou fluorescenční spektrometrií. Bylo zjištěno, že při optimálních podmínkách atomizace v tzv. flame in gas shield atomizátoru lze dosáhnout přibližně dvakrát vyšší citlivosti a čtyřikrát nižší meze detekce než v miniaturním difúzním plameni, který je standardním atomizátorem pro atomovou fluorescenční spektrometrie. V dávkovém uspořádání generování hydridů byly dále nalezeny podmínky, kdy je možné generovat arsan z prostředí 1 mol dm^{-3} kyseliny chlorovodíkové a 1% roztoku tetrahydroboratu z obou anorganických forem arsenu, t.j. z arsenitanu a z arseničnanu se stejnou účinností. Ke stanovení pouze trojmocné formy bylo použito generování v prostředí TRIS pufru o pH 6 pomocí 1% roztoku tetrahydroboratu. Mez detekce pro anorganický arsen, t.j. arsenitan a arseničnan, byla 15 ng dm^{-3} a pro arsenitan 9 ng dm^{-3} . Bylo zjištěno, že v dávkovém uspořádání za těchto podmínek je možné generovat odpovídající hydridy z monomethylarseničnanu a dimethylarseničnanu se stejnou účinností jako z jejich anorganické formy. Dále bylo zjištěno že, pokud se separátor fází upraví tak, že směs tetrahydroboratu a kyseliny chlorovodíkové se přivádí na dno separátoru fází, je možné generovat obě anorganické formy arsenu se stejnou účinností i při generování hydridů v režimu průtokové injekční analýzy.

Klíčová slova

arsen, speciální analýza, generování hydridů, atomová fluorescenční spektrometrie

Abstract

Speciation analysis of arsenic based on selective hydride generation and detection by atomic fluorescence spectrometry have been studied in this work. It was found that under optimum conditions of atomization in the flame in gas shield atomizer, sensitivity was approximately twice higher and detection limit was about four times lower compared to miniature diffusion flame, which is a standard atomizer for atomic fluorescence spectrometry. The conditions to generate hydrides from both inorganic forms of the arsenic, i.e. from arsenite and arsenate, with the same efficiency have been found in the batch arrangement, by using 1 mol dm^{-3} hydrochloric acid and 1% solution of tetrahydridoborate. To determine only trivalent form, TRIS buffer at pH 6.00 was used together with 1% sodium tetrahydridoborate. The detection limits found for inorganic arsenic, i.e. for arsenite and arsenate, respectively, were 15 ng dm^{-3} and 9 ng dm^{-3} . It was found that in the batch arrangement under these conditions it is possible to generate corresponding hydrides methylarsonate and dimethylarsonate with the same efficiency as from the inorganic form. Finally, it was found when slightly changing the gas-liquid separator design in order to introduce the mixture of tetrahydridoborate with hydrochloric acid to the bottom of the gas-liquid separator, both inorganic arsenic species, i.e. arsenite and arsenate, were converted to hydride with the same efficiency, even in the flow injection arrangement.

keywords

arsenic, speciation analysis, hydride generation, atomic fluorescence spectrometry

Obsah

Obsah	- 7 -
Seznam zkratk	- 10 -
1. Úvod	- 12 -
1.1 Cíl diplomové práce	- 12 -
2. Teoretická část	- 13 -
2.1 Atomová fluorescenční spektrometrie	- 13 -
2.2 Generování těkavých sloučenin.....	- 13 -
2.3 Generování hydridů	- 13 -
2.4 Vznik hydridu	- 14 -
2.5 Metody generování hydridu	- 15 -
2.5.1 Kontinuální průtoková analýza.....	- 15 -
2.5.2 Průtoková injekční analýza.....	- 15 -
2.5.3 Dávkové uspořádání.....	- 15 -
2.5.4 Kolekční metody.....	- 16 -
2.6 Atomizace hydridu.....	- 16 -
2.6.1 Miniaturní difúzní plamen.....	- 16 -
2.6.2 Flame in gas shield	- 18 -
2.6.3 Dielektrický bariérový výboj.....	- 19 -
2.7 Interference v metodě HG–AFS.....	- 19 -
2.8 Arsen.....	- 20 -
2.8.1 Vlastnosti, výskyt, použití.....	- 20 -
2.8.2 Toxicita	- 21 -
2.9 Speciační analýza	- 21 -
2.9.1 Speciační analýza pomocí generování hydridů	- 22 -
2.9.1.1 Selektivní generování hydridů	- 22 -
2.9.1.2 Generování substituovaných hydridů	- 23 -
2.9.1.3 Postkolonové generování hydridů	- 23 -
2.9.2 Možnosti speciační analýzy arsenu	- 24 -
3. Experimentální část.....	- 25 -
3.1 Chemikálie	- 25 -
3.2 Přístroje	- 26 -
3.3 Separátory fází.....	- 28 -

3.4 Použitá experimentální uspořádání.....	29 -
3.4.1 FIA uspořádání	29 -
3.4.2 Dávkové uspořádání.....	30 -
3.4.3 Dávkové uspořádání s předrozkladem tetrahydroboratu.....	30 -
3.5 Atomizátory	31 -
3.5.1 Miniaturní difúzní plamen.....	31 -
3.5.2 Flame in gas shield	32 -
3.6 Popis experimentů.....	33 -
3.6.1 Optimalizace atomizátorů.....	33 -
3.6.1.1 MDF	33 -
3.6.1.2 FIGS	34 -
3.6.2 Optimalizace podmínek generování	35 -
3.6.2.1 Měření ve FIA uspořádání	36 -
3.6.2.2 Měření v dávkovém uspořádání	37 -
3.6.2.3 Měření v dávkovém uspořádání s předrozkladem tetrahydroboratu.....	40 -
3.6.2.4 Měření ve FIA uspořádání s modifikací separátoru fází.....	42 -
3.7 Zpracování naměřených dat	42 -
3.7.1 Zpracování signálu a software.....	42 -
3.7.2 Statistické vyhodnocení výsledků	43 -
4. Výsledková část a diskuze	46 -
4.1 Optimalizace atomizátorů	46 -
4.1.1 MDF.....	46 -
4.1.1.1 Vliv pozorovací výšky	46 -
4.1.1.2 Vliv průtoku nosného argonu.....	47 -
4.1.1.3 Vliv složení plamenových plynů.....	47 -
4.1.1.4 Celkový průtok plamenových plynů.....	49 -
4.1.1.5 Vliv sušení plynů ze separátoru fází.....	50 -
4.1.2 FIGS	51 -
4.1.2.1 Vliv pozorovací výšky	51 -
4.1.2.2 Vliv vzdálenosti kapiláry	52 -
4.1.2.3 Vliv průtoku stínících plynů.....	52 -
4.1.2.4 Vliv složení plamenových plynů.....	53 -
4.1.2.5 Vliv průtoku kyslíku.....	53 -
4.1.2.6 Vliv celkového průtoku plynů do atomizátoru	55 -
4.1.2.7 Ověření optimálních hodnot průtoku kyslíku a průtoku stínících plynů pro nižší celkový průtok atomizátorem	56 -
4.1.2.8 Vliv celkového průtoku plynů atomizátorem na transportní ztráty.....	56 -

4.1.2.9 Vliv sušení plynů ze separátoru fází.....	57 -
4.1.3 Meze detekce pro FIGS a MDF.....	57 -
4.2 Optimalizace podmínek generování.....	59 -
4.2.1 Optimalizace podmínek generování ve FIA uspořádání.....	59 -
4.2.1.1 Vliv koncentrace THB	59 -
4.2.1.1 Vliv koncentrace kyseliny chlorovodíkové	60 -
4.2.2 Optimalizace podmínek generování v dávkovém uspořádání.....	61 -
4.2.2.1 Vliv koncentrace tetrahydroboratu.....	61 -
4.2.2.2 Vliv koncentrace kyseliny chlorovodíkové	62 -
4.2.2.3 Ověření čistoty standardu iAs(V) a iAs(III)	63 -
4.2.2.4 Generování hydridů z MMA a DMA.....	64 -
4.2.2.5 Optimalizace průtoku nosného argonu.....	64 -
4.2.2.6 Kalibrace.....	65 -
4.2.2.7 Odhad rychlostních konstant	67 -
4.2.3 Optimalizace podmínek generování v dávkovém uspořádání s předrozkladem tetrahydroboratu	69 -
4.2.3.1 Vliv koncentrace kyseliny chlorovodíkové bez přítomnosti předrozkladové cívky	69 -
4.2.3.2 Vliv koncentrace kyseliny chlorovodíkové s předrozkladovou cívkou	70 -
4.2.4 Měření ve FIA uspořádání s modifikací separátoru fází.....	71 -
5. Závěr.....	73 -
Citovaná literatura	74 -

Seznam zkratk

AAS	atomová absorpční spektrometrie
AFS	atomová fluorescenční spektrometrie
Ar _{flame}	argon do plamene
Ar _{chemifold}	nosný argon
Ar _{Shield I}	argon ve vnitřní stínící jednotce
Ar _{Shield II}	argon ve vnější stínící jednotce
c	molární koncentrace
CE–ICP–MS	kapilární elektroforéza ve spojení s hmotnostní spektrometrií s indukčně vázaným plazmatem
CD	vzdálenost kapiláry
CFA	kontinuální průtoková analýza
DBD	dielektrický bariérový výboj
DIW	deionizovaná voda
DMA	kyselina dimethylarseničná
F	průtok plynu
FIA	injekční průtoková analýza
FIGS	flame in gas shield atomizátor
FWHM	šířka píku v polovině výšky píku
GLS	separátor fází
HG–AAS	generování hydridů ve spojení s atomovou absorpční spektrometrií
HG–AFS	generování hydridů ve spojení s atomovou fluorescenční spektrometrií
HPLC–(UV) –HG–ICP–MS	vysokoučinná kapalinová chromatografie (s online mineralizačním krokem) ve spojení s generováním hydridů a hmotnostní spektrometrií s indukčně vázaným plazmatem
iAs(III)	kyselina arsenitá
iAs(V)	kyselina arseničná
LD ₅₀	střední smrtná dávka
LOD	mez detekce

MDF	miniaturní difúzní plamen
MMA	kyselina methylarseničná
OH	pozorovací výška
PMT	napětí na fotonásobiči
PEEK	polyetheretherketon
PTFE	polytetrafluorethylen
r	korelační koeficient
THB	tetrahydroborat sodný
TRIS	tris(hydroxymethyl)aminomethan
T _{VT}	teplota křemenné vertikální trubice atomizátoru
w	hmotnostní koncentrace roztoku (m/v)

1. Úvod

V poslední době je kladen důraz na sledování účinku arsenu a jeho sloučenin na lidský organismus. Bylo zjištěno, že arsen a většina jeho sloučenin jsou toxické látky ať už akutně či chronicky ve velmi malých množstvích a že arsen je i silný karcinogen. Studium toxicity a metabolismu arsenu vyžaduje dostatečně citlivou a rychlou analytickou metodu vhodnou pro stanovení jednotlivých forem arsenu.

1.1 Cíl diplomové práce

Obecným cílem této práce bylo přispět k vývoji metody pro speciální analýzu tří- a pětimocných anorganických forem arsenu a jeho pětimocných methylovaných metabolitů založené na generování hydridů a na atomově fluorescenčním detektoru.

Konkrétními cíly této diplomové práce bylo:

1. Optimalizovat všechny relevantní experimentální parametry obou hydridových atomizátorů používaných pro atomovou fluorescenční spektrometrii: miniaturního difúzního plamene a „flame in gas shield“ atomizátoru. Srovnat meze detekce obou těchto atomizátorů provozovaných s optimalizovanými parametry.
2. Identifikovat faktory ovlivňující fungování jednotlivých přístupů k uspořádání generátoru hydridů a optimalizovat tato uspořádání pro speciální analýzu tří- a pětimocných anorganických forem arsenu a jeho pětimocných methylovaných metabolitů.

2. Teoretická část

2.1 Atomová fluorescenční spektrometrie

Atomová fluorescenční spektrometrie (AFS) je analytická metoda založená na excitaci volných atomů pomocí záření o určité vlnové délce a následné deexcitaci atomů za vzniku sekundárního záření o vlnové délce delší nebo totožné s vlnovou délkou excitujícího záření. Tento jev se nazývá atomová fluorescence. Obě tyto vlnové délky jsou charakteristické pro daný prvek [1].

2.2 Generování těkavých sloučenin

V principu může být vzorek do atomových fluorescenčních spektrometrů zaveden v pevné [2], kapalné, nebo plynné formě [1]. Zavádění vzorku v plynné formě je obvykle založeno na generování těkavých sloučenin. Konverze analytu kapalného vzorku na těkavou sloučeninu se provádí příslušnou chemickou reakcí. Hlavní výhodou generování těkavých sloučenin spočívá v oddělení analytu z matrice vzorku a tím potlačení vlivu matrice. Další výhodou je vysoká účinnost transportu plynné fáze do detektoru a možnost jednoduché prekoncentrace analytu poskytující výjimečné detekční schopnosti [3]. Nejvyužívanějším přístupem ke generování těkavých sloučenin je dnes bezesporu generování hydridů.

2.3 Generování hydridů

Vzniku hydridu lze docílit pomocí různých chemických reakcí. Nejstarší technika je založená na redukci pomocí zinku v prostředí kyseliny sírové [4] a byla použita k důkazu vyšších koncentrací arsenu ve vzorku.

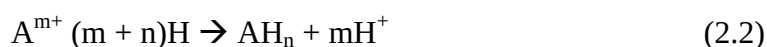
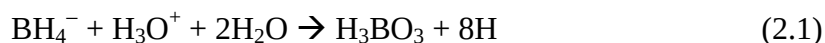
První aplikace generování hydridů pro potřeby atomové absorpční spektrometrie (AAS) byla použita Holakem [5] pro stanovení arsenu. Díky neoddiskutovatelným výhodám generování hydridů byla tato metoda aplikována na další hydridotvorné prvky.

V současné době je nejvíce populární generování binárních hydridů klasických hydridotvorných prvků např. arsenu, antimonu, bismutu, germania, olova, selenu, telluru a cínu. Z výše uvedených pouze bismut, selen a tellur tvoří pouze binární hydridy. Všechny ostatní hydridotvorné prvky mohou poskytovat kromě binárních hydridů také různé alkyl substituované deriváty [6]. Mimo klasických hydridotvorných prvků lze generovat také hydridy thallia a india [7], nebo tuto techniku lze použít

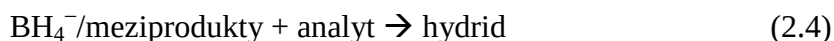
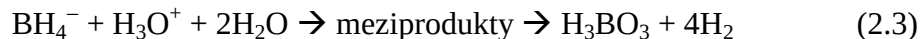
pro generování „studených par“ tj. volných atomů rtuti [8].

2.4 Vznik hydridu

V současnosti se pro generování hydridů používá především reakce analytu s tetrahydroboratem (THB) v kyselém prostředí a to z důvodu lepší výtěžnosti v kratším reakčním čase a nižší kontaminace ve srovnání s redukcí se zinkem v prostředí kyseliny sírové [6]. Mechanismus této reakce není zcela objasněn, ale předpokládalo se, že reakcí THB s kyselinou dojde ke vzniku nasetního vodíku, který reaguje s analytem za vzniku příslušného hydridu [9].



kde m odpovídá valenci analytu ve sloučenině, v níž je přítomen ve vzorku a n odpovídá valenci analytu v hydridu. Přestože tento mechanismus nebyl nikdy potvrzen, byl všeobecně přijímán, dokud D'Ulivo [10] neformuloval alternativní teorii, tzv. teorii přenosu vodíku. Teorie přenosu vodíku předpokládá postupnou hydrolýzu THB a reakci mezi analytem a THB (resp. meziprodukty jeho hydrolýzy) za vzniku hydridu dle následujícího schématu:



V polovině 90. let minulého století se technika generování těkavých sloučenin pomocí THB rozšířila také na těkavé sloučeniny přechodných kovů např. zlata, stříbra, kobaltu, chromu, mědi, železa, iridia, manganu, niklu, osmia, palladia, platiny, rhodia, ruthenia a titanu [6]. Bylo navrženo mnoho hypotéz popisujících povahu těchto těkavých sloučenin, jako je vznik hydridů [11], nanočástic [12] a hydrido-metalových komplexů. Povaha těchto sloučenin nebyla doposud jednoznačně objasněna [13].

Dalším způsobem jak generovat hydrid analytu je elektrochemické generování, kde je analyt redukován elektrickým proudem. Ke generování hydridu dochází v elektrolytické cele. Klasická elektrolytická cela se skládá ze dvou prostorů (anodického a katodického), které jsou od sebe odděleny semipermeabilní membránou, která umožňuje průchod elektrického proudu, ale zamezuje difúzi reakčních produktů mezi anodickým a katodickým prostorem. Hlavní výhoda elektrochemického generování je, že není potřeba chemická látka k redukcí analytu a tím je snížena

možnost kontaminace [14].

Nejnovějším přístupem ke generování hydridů je fotochemické generování. Ke generování hydridů dochází pomocí ultrafialového záření v přítomnosti nízkomolekulárních organických kyselin [15].

2.5 Metody generování hydridu

Existují dva základní přístupy ke generování hydridu, přímý přenos a metoda generování s kolekcí. V přímém přenosu je hydrid uvolněn z roztoku a je přímo transportován do atomizátoru. Metody přímého přenosu lze dále rozdělit: kontinuální průtoková analýza (CFA), průtoková injekční analýza (FIA) a dávkové uspořádání. V metodě generování s kolekcí je vzniklý hydrid zachycen v kolekčním zařízení, dokud není ukončeno generování a poté je transportován do atomizátoru [7].

2.5.1 Kontinuální průtoková analýza

V CFA je konstantní průtok roztoku okyseleného vzorku smícháván s konstantním průtokem roztoku THB a s nosným plynem. V separátoru fází je od sebe oddělena kapalná a plynná fáze. Plynná fáze, která obsahuje vzniklý hydrid, nosný plyn a vodík (vzniklý z rozkladu THB) je transportována do atomizátoru. Kapalná fáze je odsáta do odpadu [7].

2.5.2 Průtoková injekční analýza

Ve FIA je experimentální uspořádání podobné CFA. Rozdíl je v tom, že konstantní průtok THB je smícháván s konstantním průtokem okyseleného nosiče, do kterého je dávkován vzorek [7]. Výhodou průtokové injekční analýzy je možnost automatizace a zrychlení analýzy [16].

2.5.3 Dávkové uspořádání

Dávkový generátor je tvořen plastovou nebo skleněnou nádobou, která slouží jako generátor i jako separátor fází. Dávka okyseleného vzorku je umístěna uvnitř nádoby, do které je přiváděn roztok THB. Dále je přiváděn nosný plyn, který může být přiváděn do mrtvého objemu generátoru, nebo pod hladinu kapaliny (urychluje uvolnění těkavé

sloučeniny z roztoku, ale může zvýšit šum). Vzniklý hydrid je společně s vodíkem transportován nosným plynem do atomizátoru. Po ukončení generování je reakční směs odsáta do odpadu [7].

2.5.4 Kolekční metody

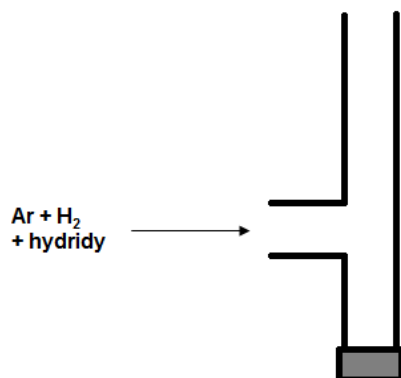
Nejpoužívanější kolekční metodou je kolekce vymrazováním, která používá vymrazovací past, která je obvykle sestavena z U–trubice s vhodnou náplní ponořené do kapalného dusíku. Vzniklý hydrid je zachycen při teplotě kapalného dusíku a následně uvolněn ohřátím pasti do atomizátoru [7].

2.6 Atomizace hydridu

Aby bylo možné stanovit analyt pomocí AFS, je nutné převést analyt na volné atomy (pokud možno s co nejvyšší účinností). K atomizaci hydridů v AFS se v současnosti používají tyto atomizátory: miniaturní difúzní plamen (MDF), „flame in gas shield“ (FIGS) a dielektrický bariérový výboj (DBD) [3].

2.6.1 Miniaturní difúzní plamen

Použití plamene, jako např. vzduch–acetylen, nebo oxid dusný–acetylen, pro atomizaci v metodě AFS bylo spíše výjimkou[1]. V současné době se už nepoužívá vůbec. Nicméně difúzní plamen se v metodě generování hydridů používá od počátku [3]. Jeho zásadním nedostatkem je vysoký šum atomizátoru a velmi krátká doba setrvání volných atomů v optické dráze. Základní optimalizací designu hořáku pro účely atomizace hydridů bylo docíleno výrazného zlepšení jeho vlastností. Např. Ebdon, který použil argono-vodíkový plamen hořící na borosilikátové trubce [17]. Díky tomu, že byl celkový průtok plynů relativně nízký, došlo k prodloužení doby setrvání volných atomů v optické dráze. Velmi podobné uspořádání se nazývá MDF a je to standardní atomizátor pro AFS. Jak je vidět z obrázku 2.1, jedná se o velmi jednoduchý design. Atomizátor se skládá z vertikální trubice o vnitřním průměru obvykle 3 až 8 mm, do které se přivádí směs argonu, vodíku a hydridu [3].



obr. 2.1 Schéma miniaturního difúzního plamene (MDF)

Teplota v plameni je značně nehomogenní, nejvyšší teploty se dosahuje ve vnější zóně plamene (až 1300 °C), kde dochází k reakci mezi vodíkem a kyslíkem z okolní atmosféry. Nejnižší teplota je uvnitř plamene blízko konce vertikální trubice (cca 150 °C) [18].

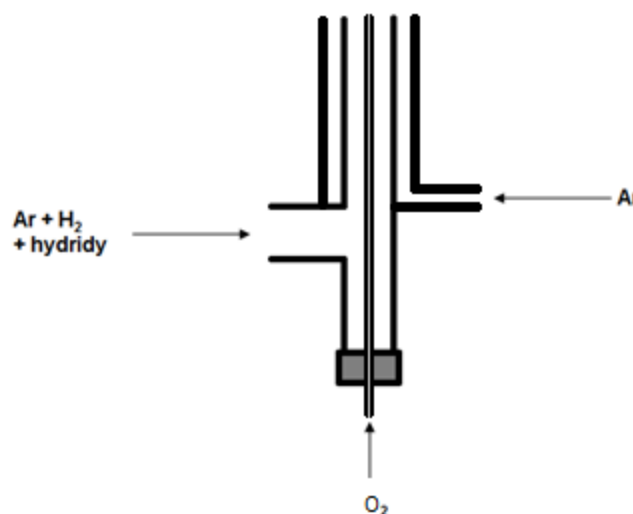
I maximální teplota v MDF je nedostatečná na to, aby byly volné atomy analytu termodynamicky stabilní [19]. K úplné atomizaci hydridu dochází interakcí s vodíkovými radikály, které vznikají na okraji plamene reakcí mezi kyslíkem a vodíkem [20]. Vodíkové radikály difundují do chladnějších částí plamene (přítomnost vodíkových radikálů byla prokázána i uvnitř vertikální trubice v hloubce 3 mm). Díky tomu je analyt plně atomizován v celém objemu plamene [21].

Distribuce volných atomů je ovlivněna atomizací analytu, fyzikálními procesy a chemickými reakcemi volných atomů. Fyzikální procesy jsou: makroskopický pohyb, jako je např. konvekce, teplotní expanze a turbulence, nebo difúze volných atomů. Volné atomy mohou chemicky reagovat se složkami plamene, nebo s plyny z okolní atmosféry, které difundují do plamene [3].

Citlivost u MDF je hlavně ovlivněna pozorovací výškou (vzdálenost od konce atomizátoru do středu optického paprsku z výbojky), celkovým průtokem plynů a množstvím vodíku ve směsi [22]. Celkový průtok plynů má dva protichůdné vlivy. Vyšší průtok poskytuje lepší stínění volných atomů, ale zároveň zkracuje dobu setrvání volných atomů v optické ose [18].

2.6.2 Flame in gas shield

FIGS byl vyvinut pro účely AFS [22]. Jak je patrné z obrázku 2.2, je tento atomizátor modifikací MDF. Uprostřed vertikální trubice je přidána kapilára, kterou se přivádí malé množství kyslíku. Na konci kapiláry hoří v nadbytku vodíku mikroplamínek. Pozorovací objem nad vertikální trubicí je od okolní atmosféry chráněn laminárním průtokem argonu [3]. K úplné atomizaci analytu dochází stejně jako v případě MDF interakcí analytu s vodíkovými radikály, které vznikají v mikroplamínku. V případě dokonalého chránění vodíkových radikálů před okolní atmosférou, pomocí stínícího průtoku argonu, budou vodíkové radikály vyplňovat celý objem nad atomizátorem.



obr. 2.2 Schéma flame in gas shield (FIGS)

Distribuce volných atomů je ovlivněna stejnými procesy jako pro MDF: atomizací analytu, fyzikálními procesy a chemickými reakcemi volných atomů. V případě FIGS je dominantní chemickou reakcí reakce volných atomů s molekulárním kyslíkem, který difunduje z okolní atmosféry i přes stínící průtok argonu (bylo pozorováno, že přidavek 0,1 % kyslíku do stínícího proudu plynu významně snižuje množství volných atomů selenu [23]). Výslednicí těchto dějů vertikální kužel volných atomů, zužující se s výškou nad vrcholem křemenné trubice. To se projevuje ve snižování AFS citlivosti s pozorovací výškou.

Podobně jako u MDF je citlivost ovlivněna množstvím vodíku ve směsi. Dále pak citlivost ovlivňuje i průtok kyslíku kapilárou. Při nízkých průtocích nemusí vzniknout dostatek vodíkových radikálů a tím pádem nemusí dojít k úplné atomizaci. Naopak

při vysokých průtocích může dojít ke snížení citlivosti z důvodů teplotní expanze. A stejně jako u MDF je citlivost ovlivněna i celkovým průtokem směsi argonu a vodíku. Na rozdíl od MDF není chránění volných atomů před okolní atmosférou dosaženo plamenem, ale průtokem stínicího plynu, který neovlivňuje dobu setrvání volných atomů v optické dráze [3].

Analytické vlastnosti MDF i FIGS jsou ovlivněny třemi klíčovými parametry: produkce vodíkových radikálů, izolace volných atomů před okolní atmosférou a dobu setrvání volných atomů v optické dráze. V případě MDF jsou tyto parametry ovlivněny pouze celkovým průtokem směsi argonu a vodíku. V případě FIGS jsou tyto parametry na sobě nezávislé. Produkce vodíkových radikálů je ovlivněna průtokem kyslíku, izolace volných atomů je ovlivněna průtokem stínicího plynu a doba setrvání volných atomů v optické dráze je ovlivněna průtokem směsi argonu a vodíku [22].

2.6.3 Dielektrický bariérový výboj

DBD je netermické mikroplazma operující za atmosférického tlaku, většinou v argonové nebo heliové atmosféře. Dielektrický výboj se získá, pokud se na elektrody, které jsou od sebe vzdáleny několik milimetrů, a alespoň jedna z nich je pokryta dielektrickou vrstvou, vloží vysoké střídavé napětí. Protože energie plazmatu je nízká, používá se výhradně k atomizaci hydridů [3].

2.7 Interference v metodě HG–AFS

Interference u HG–AFS můžeme rozdělit na spektrální a nespektrální. Spektrální interference jsou způsobeny nedokonalou izolací fluorescenčního signálu od zbytku záření dopadajícího na detektor. Nespektrální interference jsou způsobeny složkami vzorku a jejich vlivem na analytický signál.

Izolace fluorescenčního signálu je obvykle docíleno použitím monochromátoru, interferenčního filtru nebo pomocí detektoru, který reaguje pouze na dopadající záření v určitém rozmezí vlnových délek. Interferující záření může pocházet z několika zdrojů. Může se jednat o rozptýlené nebo odražené záření z výbojky. Nebo se může jednat o fluorescenční záření molekul z okolní atmosféry, případně o záření emitované z plamene [1].

Nespektrální interference lze rozdělit na interference v kapalně fázi a interference

v plynné fázi. Interference v kapalně fázi jsou způsobeny změnou rychlosti uvolnění hydridu z kapalně fáze a/nebo snížením účinnosti uvolnění hydridu z kapalně fáze. Interference v plynné fázi jsou obvykle způsobeny těkavými sloučeninami, nejčastěji hydridy, ale také ostatními látkami, nebo kapénkami aerosolu, které vznikají v generátoru. Interference v plynné fázi lze rozdělit na transportní interference a interference při atomizaci.

K transportním interferencím dochází během transportu hydridu do atomizátoru a způsobují zpoždění a/nebo ztráty hydridu. Interference při atomizaci závisí na mechanismu atomizace hydridu [7].

2.8 Arsen

2.8.1 Vlastnosti, výskyt, použití

Arsen je přirozeně vyskytující se prvek, který není široce rozšířen v zemské kůře (1,8 mg/kg [24]). Arsen patří mezi metaloidy. Elementární arsen, někdy označován jako kovový arsen, je ocelově šedá pevná látka. Elementární arsen se v přírodě vyskytuje vzácně. Obvykle se arsen vyskytuje ve sloučeninách s kyslíkem, chlórem a sírou. Přehled sloučenin, které jsou důležité, pro tuto práci nabízí tabulka 1.1.

Tabulka 1.1 Přehled vybraných sloučenin arsenu

zkratka v textu práce	název sloučeniny	strukturní vzorec
iAs(III)	kyselina arsenitá	$\begin{array}{c} \text{HO} \\ \diagdown \\ \text{As}-\text{OH} \\ \diagup \\ \text{HO} \end{array}$
iAs(V)	kyselina arseničná	$\begin{array}{c} \text{OH} \\ \\ \text{HO}-\text{As}-\text{OH} \\ \\ \text{O} \end{array}$
MMA	kyselina monomethylarseničná	$\begin{array}{c} \text{OH} \\ \\ \text{H}_3\text{C}-\text{As}-\text{OH} \\ \\ \text{O} \end{array}$
DMA	kyselina dimethylarseničná	$\begin{array}{c} \text{OH} \\ \\ \text{H}_3\text{C}-\text{As}-\text{CH}_3 \\ \\ \text{O} \end{array}$

Anorganický arsen se v přírodě vyskytuje v půdě a mnoha druzích hornin, zejména v nerostech a rudách, které obsahují měď nebo olovo. Jsou-li tyto rudy taveny v peci, většina arsenu vstupuje do vzduchu jako jemný prach. Z tohoto prachu se může arsen izolovat ve formě oxidu arsenitého [24].

V současnosti se 90 % veškerého arsenu používá na výrobu prostředků na konzervaci dřeva, aby bylo odolné proti hnilobě a rozkladu. V minulosti byly používány anorganické sloučeniny arsenu jako pesticidy. V dnešní době se anorganické sloučeniny arsenu v zemědělství používat nesmí. Nicméně některé organické sloučeniny arsenu se jako pesticidy používat smějí, konkrétně kyselina dimethylarseničná (DMA) a methylarseničan sodný. Některé organické sloučeniny arsenu se přidávají jako přísady do krmiv. Malé množství elementárního arsenu se přidává do jiných kovů a vznikají slitiny s lepšími vlastnostmi. Největší využití arsenu ve slitinách je v olověných akumulátorech [25].

2.8.2 Toxicita

Některé sloučeniny arsenu jsou silně toxické látky. Může se jednat o organické nebo i anorganické sloučeniny v různých oxidačních stavech (III+, V+). Většina otrav arsenem u lidí je vyvolána anorganickým arsenem (oxidy a kyslíkatými kyselinami). Existují určité rozdíly v toxicitě různých anorganických forem, arsenité látky bývají toxičtější než arseničné ($LD_{50}(iAs(III)) = 29,5 \text{ mg/kg}$ u myši při orálním podání, $LD_{50}(iAs(V)) = 143,5 \text{ mg/kg}$ u myši při orálním podání [26]). Nejvíce toxickou sloučeninou arsenu je arsan ($LD_{50}(AsH_3) = 2,5 \text{ mg/kg}$ u myši při injekčním podání [27]). Lidé mohou být vystaveni i organickým sloučeninám arsenu, hlavně methylovaným derivátům kyseliny arseničné, které se používají v zemědělství. Přestože toxicita organických sloučenin arsenu nebyla tak rozsáhle studována jako u anorganických sloučenin, existuje dostatečný počet údajů pro hodnocení toxicity methyl derivátů kyseliny arseničné ($LD_{50}(MMA) = 960 \text{ mg/kg}$ u myši při orálním podání, $LD_{50}(DMA) = 650 \text{ mg/kg}$ u myši při orálním podání [26]). Takzvaný „rybí arsen“ (např. arsenobetain) není považován za toxickou látku [25].

2.9 Speciační analýza

Speciační analýza je definována jako analytická aktivita, která slouží k identifikaci

a/nebo kvantifikaci jedné nebo více chemických specií ve vzorku. Chemická specie je specifická forma prvku definována svým izotopovým složením, elektronovým nebo oxidačním stavem a/nebo molekulovou strukturou [28].

Potřeba speciační analýzy arsenu se objevila přibližně před sto lety [29], kdy skupina francouzských výzkumníků objevila vysokou koncentraci arsenu v mořských plodech. Tento „rybí arsen“ byl považován za netoxickou organickou formu, ačkoliv neexistovala analytická metoda, která by tento předpoklad potvrdila [30]. První pokrok ve speciační analýze arsenu přišel v roce 1973, kdy pomocí generování hydridů bylo možno stanovit iAs(III), iAs(V), MMA a DMA [31]. Je však zřejmé, že tato technika generování hydridů je vhodná pouze pro hydridotvorné formy arsenu. Významný zlom pro speciační analýzu arsenu nastal v 80. letech minulého století. Spojením HPLC a ICP–MS, které začaly být v té době komerčně dostupné, bylo možné analyzovat i formy arsenu, které nelze převést na hydrid. Metoda HPLC–ICP–MS je tak pro výše uvedenou výhodu stále hlavní metoda pro speciační analýzu arsenu [30].

2.9.1 Speciační analýza pomocí generování hydridů

Obecně platí, že speciační analýzu lze pomocí generování hydridů provádět třemi způsoby [32]:

- Selektivní generování hydridů
- Generování substituovaných hydridů
- Postkolonové generování hydridů

2.9.1.1 Selektivní generování hydridů

Selektivní generování hydridů lze charakterizovat následujícím schématem:



Speciační analýza je v tomto případě založena na odlišné účinnosti konverze jednotlivých specií na hydrid [32].

Aby mohlo dojít k reakci mezi THB a analytem, tak analyt nesmí být přítomen ve formě aniontu. Proto je reakce mezi THB a analytem citlivá na pH. V případě speciační analýzy arsenu je nutné, aby přítomné arsenitany a arseničnany byly v nedisociované formě, tzn. pokud je pK_{a1} pro iAs(V) rovno 2,19 [33] a pK_{a1} pro iAs(III) rovno 9,29 [33], tak iAs(V) se bude kvantitativně generovat při pH 0 a

iAs(III) již při pH 7. Na základě tohoto lze zvolit takové pH, aby se arsan generoval pouze z iAs(III) a taky takové pH, aby se arsan generoval z iAs(III) i iAs(V). Množství iAs(V) pak lze vypočítat z rozdílu signálu získaných při těchto podmínkách. [34]

Jinou možností jak stanovit iAs(V) je zredukovat ho na iAs(III) (tento postup se nazývá předredukce) a následně generovat arsan jen z přítomného iAs(III). Často používaným předredukčním činidlem je jodid draselný v kyselině chlorovodíkové o vysoké koncentraci, který se kombinuje s kyselinou askorbovou, která zabraňuje oxidaci jodidu. Při koncentraci kyseliny nižší než $0,3 \text{ mol dm}^{-3}$ předredukce iAs(V) na iAs(III) neprobíhá kvantitativně [35]. Jako jiná předredukční činidla lze použít sloučeniny obsahující –SH vazbu, např. L–cystein. Výhodou je nižší potřebná koncentrace kyseliny [36]. Další výhodou při použití L–cysteinu je, že zvyšuje toleranční limit vůči interferencím [37].

2.9.1.2 Generování substituovaných hydridů

Generování substituovaných hydridů lze charakterizovat následujícím schématem:

generování směsi alkylsubstituovaných hydridů → *separace* → *atomizace/detekce* (2.6)

V podstatě se jedná o variaci derivatizační techniky dobře známé z aplikací plynové chromatografie. Speciační analýza založená na generování substituovaných hydridů se dá použít v případech, kdy jednotlivé specie mohou být převedeny na různé těkavé alkyl substituované hydridy. Produktem generování je pak směs hydridů, která je pak chromatograficky separována, a naměřené zastoupení jednotlivých hydridů odpovídá zastoupení jednotlivých specií [32].

2.9.1.3 Postkolonové generování hydridů

Postkolonové generování hydridů lze charakterizovat následujícím schématem:

separace → *generování hydridů* → *atomizace/detekce* (2.7)

V tomto případě jediným důvodem generování hydridů je zvýšení citlivosti a potlačení interferencí při atomizaci/detekci. To umožňuje nahradit ICP–MS detektory podstatně jednoduššími a méně nákladnými detektory (AAS, AFS). Nevýhodou postkolonového generování hydridů pro speciační analýzu je, že je použitelná jen pokud jednotlivé specie lze převést na hydrid. Tuto nevýhodu lze sice odstranit online mineralizací, ale to vede ke složitým aparaturám a rozmytí zón [32].

2.9.2 Možnosti speciální analýzy arsenu

Jednu z možností speciální analýzy založené na selektivním generování arsenu pomocí HG–AAS popsali Shraim et al [38]. Speciální analýzu prováděl pro iAs(III), iAs(V), MMA, DMA, kde pro každou specii nalezl podmínky, kdy se generuje jako jediná (s výjimkou iAs(V), která byla vypočtena z rozdílu celkového nalezeného arsenu a jednotlivých specií). Celkový arsen by stanovován po deseti minutové předredukci pomocí 5% L–cysteinu a generován z $0,01 \text{ mol dm}^{-3}$ kyseliny chlorovodíkové a 2% THB, iAs(III) byl generován z $4 - 6 \text{ mol dm}^{-3}$ kyseliny chlorovodíkové a 0,05% THB, DMA byl generován z $1,0 \text{ mol dm}^{-3}$ kyseliny chlorovodíkové a 0,3 – 0,6% THB po pětiminutové předredukci pomocí 4% L–cysteinu, a MMA byl generován z $4,0 \text{ mol dm}^{-3}$ kyseliny chlorovodíkové a 0,03% THB po třicetiminutové předredukci 0,4% L–cysteinu. Meze detekce byly pro celkový arsen $1,1 \text{ } \mu\text{g dm}^{-3}$, pro iAs(III) $0,6 \text{ } \mu\text{g dm}^{-3}$, pro DMA $0,5 \text{ } \mu\text{g dm}^{-3}$, pro MMA $1,8 \text{ } \mu\text{g dm}^{-3}$ [38].

Jiná možnost speciální analýzy arsenu založená na postkolonovém generování je pomocí HPLC–(UV)–HG–ICP–MS, kde jsou jednotlivé specie arsenu nejdříve separovány pomocí HPLC (nejčastěji pomocí iontové výměnné chromatografie), po které následuje online mineralizace pomocí fotooxidace v prostředí 2% peroxodisíranu draselného. Hydridy se generují v prostředí $6,0 \text{ mol dm}^{-3}$ kyseliny dusičné a 1% THB a následná detekce pomocí ICP–MS. Meze detekce se pohybují od 0,1 do $0,3 \text{ } \mu\text{g dm}^{-3}$ [39].

Další možností speciální analýzy arsenu je CE–ICP–MS. K separaci jednotlivých specií dochází pomocí kapilární zónové elektroforézy. Jelikož průtok eluentu v kapilární elektroforéze je nízký ve srovnání s optimálním průtokem pro zmlžovač u ICP–MS, musí se k výstupu z elektroforézy přidat pomocný průtok elektrolytu. Meze detekce se pohybují od 0,08 do $0,26 \text{ } \mu\text{g dm}^{-3}$ [40].

3. Experimentální část

3.1 Chemikálie

Veškeré roztoky byly připraveny ředěním pomocí deionizované vody (DIW) získané z Watrex Ultrapure (Watrex, USA)

Pracovní roztoky iAs(V) o požadované koncentraci byly připraveny ředěním ze standardního roztoku iAs(V) o koncentraci 1000 mg dm^{-3} v $0,5 \text{ mol dm}^{-3}$ kyselině dusičné (Merck, Německo).

Pracovní roztoky iAs(III) o požadované koncentraci byly připraveny ředěním pomocí DIW, která byla 30 min probublávána dusíkem (čistota 99,99 %, SIAD, Česká republika), ze zásobního roztoku iAs(III) o koncentraci 1000 mg dm^{-3} , který byl připraven rozpuštěním 0,0660 g oxidu arsenitého (Lach-ner, Česká republika) v $0,5 \text{ cm}^3$ 10% hydroxidu draselného (Lach-ner, Česká republika).

Pracovní roztoky MMA o požadované koncentraci byly připraveny ředěním zásobního roztoku MMA o koncentraci 1000 mg dm^{-3} , který byl připraven rozpuštěním 0,0974 g hexahydrátu methylarseničnanu sodného (Chem Service, USA) a doplněním na celkový objem 25 cm^3 .

Pracovní roztoky DMA o požadované koncentraci byly připraveny ředěním zásobního roztoku DMA o koncentraci 1000 mg dm^{-3} , který byl připraven rozpuštěním 0,0461 g dimethylarseničné kyseliny (Strem. Chemicals, USA) a doplněním na celkový objem 25 cm^3 .

Jako redukční činidlo pro generování hydridů byl použit roztok THB (FLUKA, Německo) o požadované koncentraci v 0,1% roztoku hydroxidu draselného (m/v).

Jako redukční činidlo pro předredukci byl použit L-cystein hydrochlorid monohydrát (Merck, Německo).

Roztoky kyseliny chlorovodíkové o požadované koncentraci byly připraveny ředěním zásobního roztoku o koncentraci 6 mol dm^{-3} , který byl připraven z 37% kyseliny chlorovodíkové p.a. (Merck, Německo).

Roztok TRIS pufru o koncentraci $0,75 \text{ mol dm}^{-3}$ byl připravován rozpuštěním příslušného množství tris(hydroxymethyl)aminomethan hydrochloridu (Sigma-Aldrich, Německo) a výsledné pH bylo upraveno na hodnotu 6,00 pomocí roztoku hydroxidu draselného.

Kalibrační pufry pro pH metr: $4,01 \pm 0,02$ (Mettler-Toledo, Švýcarsko)

$7,00 \pm 0,02$ (Mettler-Toledo, Švýcarsko)

Perly hydroxidu sodného p.a. (Lach-ner, Česká republika) byly použity jako náplň do sušicí trubice.

argon čistoty 99,996 % (SIAD, Česká republika)

vodík čistoty 99,95 % (SIAD, Česká republika)

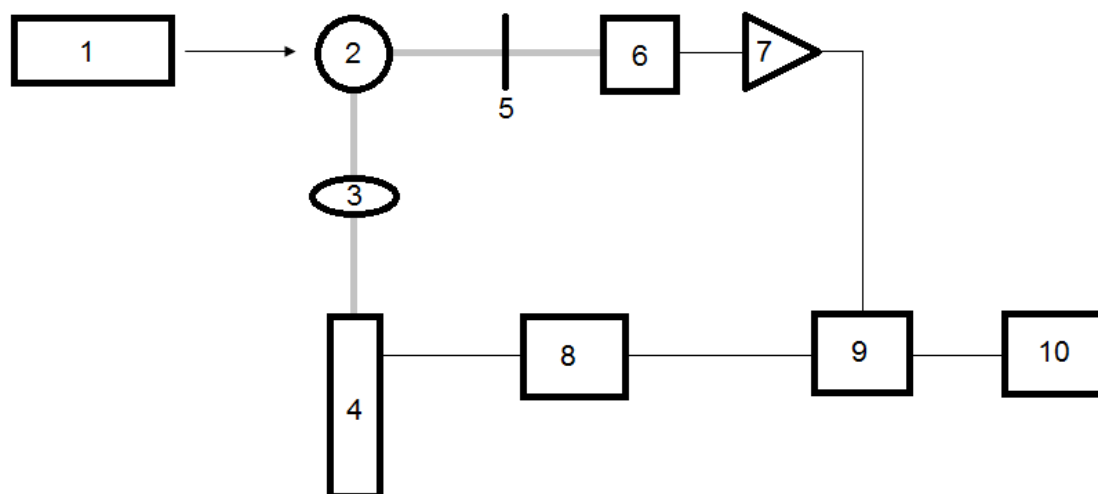
kyslík čistoty 99,998 % (SIAD, Česká republika)

3.2 Přístroje

Atomový fluorescenční spektrometr vyvinutý na oddělení stopové prvkové analýzy Ústavu analytické chemie AV ČR, v. v. i., který je schematicky znázorněn na obrázku 3.1. Jako zdroj záření byla použita arsenová bezelektrodová výbojka EDL system 2 (Perkin-Elmer, USA) s vlnovou délkou analytické čáry arsenu 193,7 nm. Napájecí proud pro výbojku byl pulzně šířkově modulován a byl nastaven na hodnotu 340 mA. Optický paprsek z výbojky byl pomocí křemenné čočky LUD-25.0-46.0-UV (CVI Melles Griot, USA) zaostřen nad vertikální osu atomizátoru. V kolmém směru od optického paprsku byl umístěn fotonásobičový detektor MH 1922 (Perkin Elmer Optoelectronics GmbH, USA). Před detektorem byl umístěn interferenční filtr 193 nm s šířkou píku v polovině výšky píku (FWHM) 18,7 nm (CVI Melles Griot, USA). Pomocí ovládacího software bylo možné měnit napětí vkládané na fotonásobič (PMT). Toto napětí vkládané na PMT slouží pro zesílení signálu. V této práci bylo používáno napětí 1300 až 1600 V. Signál detektoru je měřený ve V. Kvůli srovnatelnosti signálů změřených při různých nastaveních PMT bylo zesílení při jednotlivých PMT kalibrováno. Výsledky této kalibrace jsou uvedeny v tabulce 3.1. Pro srovnání signálů změřených při různých nastaveních PMT byly změřené signály dělené příslušným faktorem zesílení. Tím byly signály změřené při jakémkoliv PMT převedeny do jednotné škály odpovídající signálu detektoru změřenému při minimálním napětí PMT. V dalším textu jsou hodnoty signálů udávány vždy v této jednotné škále.

Tabulka 3.1 Faktory zesílení pro jednotlivá PMT

PMT, V	faktor zesílení
1300	0,03512
1400	0,11532
1500	0,29546
1600	0,81210



Obr. 3.1 Schéma atomového fluorescenčního spektrometru

1 – generátor hydridů, 2 – atomizátor, 3 – čočka, 4 – výbojka, 5 – interferenční filtr, 6 – detektor, 7 – zesilovač, 8 – zdroj napětí, 9 – analyzátor, 10 – řídicí počítač

Digitální regulátor hmotnostního průtoku argonu FMA-2618A (Omega engineering, USA).

Digitální regulátor hmotnostního průtoku argonu FMA-A2407 (Omega engineering, USA).

Digitální regulátor hmotnostního průtoku vodíku FMA-A2405 (Omega engineering, USA).

Digitální regulátor hmotnostního průtoku kyslíku FMA-A2401 (Omega engineering, USA).

Rotametr pro regulování průtoku argonu. (Cole Parmer, USA).

Filtr na bázi acetátu celulózy (průměr filtru 30 mm, velikost pórů 0,2 μm , Whatman–Schleicher & Schuell, Německo).

sušicí trubice z polypropylenu (o délce 10,5 cm a průměru 1,7 cm), naplněná perlami

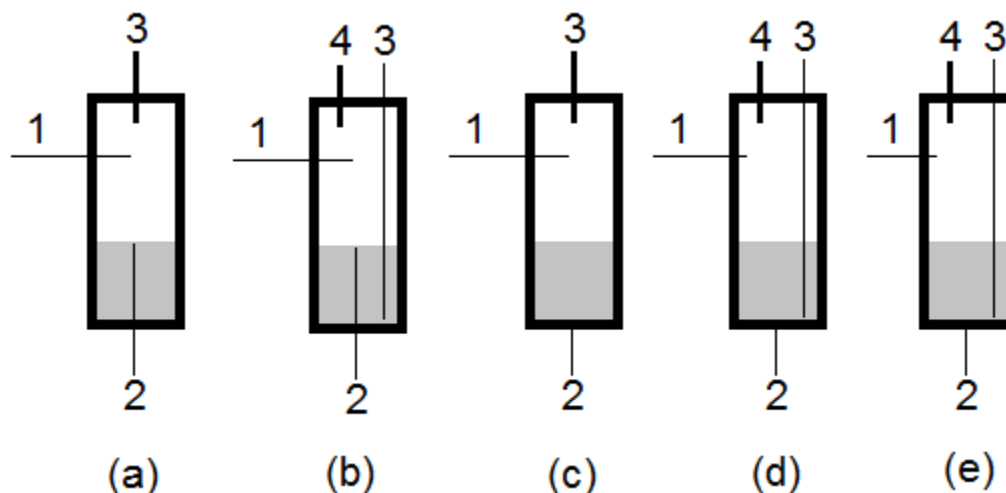
hydroxidu sodného.

Dávkovací ventil s objemem dávkovací smyčky $0,5 \text{ cm}^3$ (Rheodyne, USA).

Peristaltická čerpadla (Ismatec, Švýcarsko).

3.3 Separátory fází

Byly použity tři různé separátory fází v různých zapojeních. Jejich přehled je uveden v tabulce 3.2 a jsou schematicky znázorněny na obrázku 3.2. Plyná fáze se ze separátoru vymývala argonem (nadále označován jako nosný argon ($\text{Ar}_{\text{chemifold}}$)) a postupovala dále polytetrafluorethylenovou (PTFE) hadičkou (o vnitřním průměru 2 mm) do atomizátoru. Kapalná fáze byla pomocí peristaltického čerpadla odtahována do odpadu (tygonovou hadičkou o vnitřním průměru 2,29 mm).



obr 3.2 Schémata použitých separátorů fází

(a) GLS 1: 1 – přívod reakční směsi a nosného plynu, 2 – odtah do odpadu, 3 – výstup do atomizátoru (b) GLS 2: 1 – přívod nosného plynu, 2 – odtah do odpadu, 3 přívod reakční směsi, 4 – výstup do atomizátoru (c) GLS 3: 1 – přívod reakční směsi a nosného plynu, 2 – odtah do odpadu, 3 – výstup do atomizátoru (d) GLS 4: 1 – přívod směsi kyseliny, standardu a nosného plynu, 2 – odtah do odpadu, 3 – přívod THB/směsi THB a HCl, 4 – výstup do atomizátoru (e) GLS 5 : 1 – přívod nosného plynu, 2 – odtah do odpadu, 3 přívod reakční směsi, 4 – výstup do atomizátoru

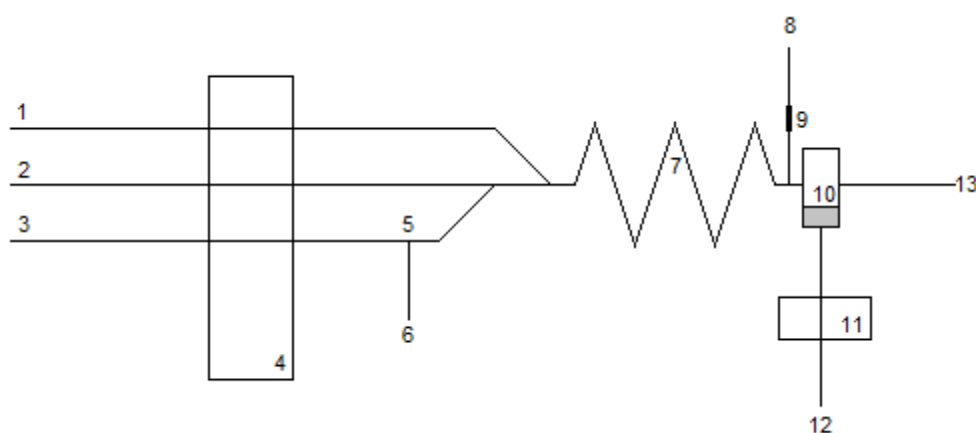
Tabulka 3.2 Použité separátory fází

název	Vnitřní objem, cm ³
GLS 1	20
GLS 2	20
GLS 3	50
GLS 4	50
GLS 5	50

3.4 Použitá experimentální uspořádání

3.4.1 FIA uspořádání

Pro měření s FIA uspořádáním byla použita aparatura dle obrázku 3.3



obr. 3.3 FIA uspořádání

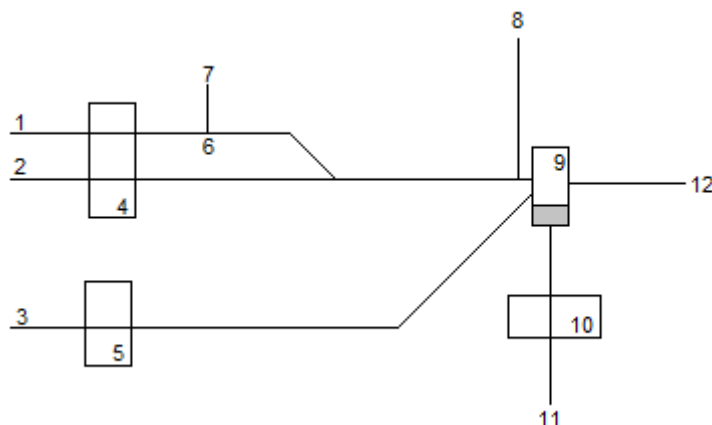
1 – THB, 2 – TRIS, 3 – DIW, 4,11 – peristaltické čerpadlo, 5 – dávkovací ventil, 6 – standard, 7 – reakční cívka, 8 – nosný argon, 9 – kapilára, 10 – separátor fází, 12 – odpad, 13 – výstup do atomizátoru

Peristaltickým čerpadlem byly tygonovými hadičkami o vnitřním průměru 0,89 mm čerpány roztok THB, roztok TRIS pufru a DIW, do které byl dávkovacím ventilem dávkován standard. Ostatní hadičky byly z PTFE před reakční cívkou o vnitřním průměru 0,75 mm a za reakční cívkou o průměru 1 mm. Reakční cívka byla z PTFE 1 m dlouhá s vnitřním průměrem 1 mm (objem reakční cívky 0,79 cm³). Za reakční cívkou byl přiváděn argon jako nosný plyn. Ke snížení fluktuace průtoku argonu byla před T-spojku použita kapilára z polyetheretherketonu (PEEK) o vnitřním průměru 0,25 mm a délce 5 cm. Veškeré T-spojky byly z PTFE. Ze separátoru fází (v tomto uspořádání

byly používány GLS 1,2 a 3) byla plynná fáze vymývána pomocí nosného argonu do T-spojky, kde se tato plynná směs mísila s plamenovými plyny a postupovala dále do atomizátoru.

3.4.2 Dávkové uspořádání

Pro měření v dávkovém uspořádání byla použita aparatura dle obrázku 3.4



obr. 3.4 Dávkové uspořádání

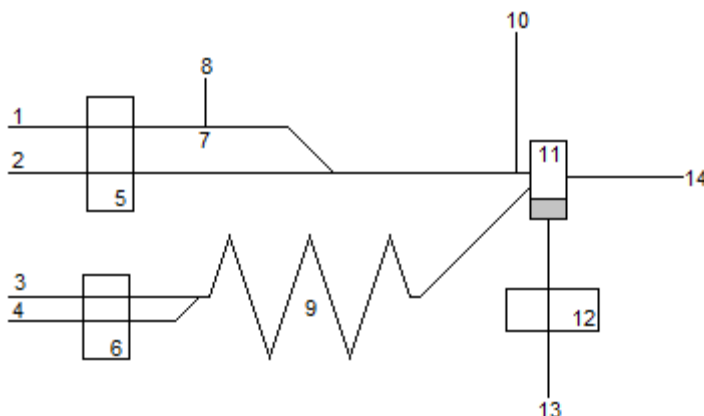
1 – DIW, 2 – TRIS/HCl, 3 – THB, 4,5,10 – peristaltická pumpa, 6 – dávkovací ventil, 7 – standard, 8 – nosný argon, 9 – separátor fází, 11 – odpad, 12 – atomizátor.

Aparatura se skládala z prvního peristaltického čerpadla, které sloužilo k čerpání DIW, do které byl dávkovacím ventilem dákován standard a roztok kyseliny chlorovodíkové, nebo roztok TRIS pufru. Byly použity stejné hadičky a T-spojky jako v předchozím uspořádání. Před vstupem směsi do separátoru fází byl do tohoto kanálu zaveden nosný argon. Druhým peristaltickým čerpadlem byl čerpán roztok THB, který byl zaváděn na dno separátoru fází (v tomto uspořádání byl používán výhradně GLS 4). Ze separátoru fází byla plynná fáze vymývána pomocí nosného argonu do T-spojky, kde se tato plynná směs mísila s plamenovými plyny a postupovala dále do atomizátoru.

3.4.3 Dávkové uspořádání s předrozkladem tetrahydroboratu

Toto uspořádání bylo podobné předchozímu uspořádání (viz 3.4.2) s několika úpravami. Byl zaveden kanál pro kyselinu chlorovodíkovou, který byl zaveden pomocí T-spojky tak, aby došlo ke smíchání s roztokem THB ještě před vstupem do separátoru fází (GLS 4). Za tuto T-spojku mohla být zapojena předrozkladová cívka. Tato kyselina

byla čerpána pomocí druhého peristaltického čerpadla tygonovou hadičkou o vnitřním průměru 0,89 mm. Předrozkladová cívka byla z PTFE 1 m dlouhá s vnitřním průměrem 1 mm (objem 0,79 cm³). Byly použity stejné hadičky a T-spojky jako v předchozích uspořádáních. Schéma uspořádání je znázorněno na následujícím obrázku 3.5.



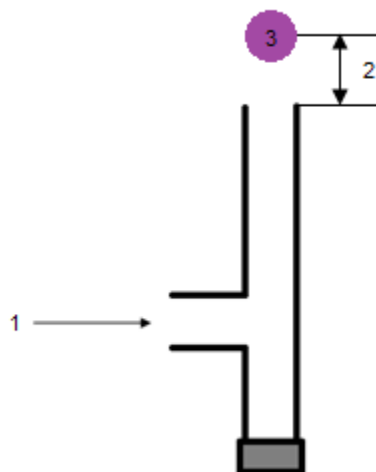
obr. 3.5 Dávkové uspořádání s předrozkladem tetrahydroboritanu

1 – DIW, 2,4 – HCl, 3 – THB, 5,6,12 – peristaltická pumpa, 7 – dávkovací ventil, 8 – standard, 9 – předrozkladová cívka, 10 – nosný argon, 11 – separátor fází, 13 – odpad, 14 – atomizátor.

3.5 Atomizátory

3.5.1 Miniaturní difúzní plamen

K atomizaci byl využíván MDF znázorněný na obrázku 3.6 s vnitřním průměrem vertikální křemenné trubice 6 mm. Pomocí šroubu bylo možné měnit pozorovací výšku (OH), vzdálenost od konce atomizátoru do středu optického paprsku z výbojky. Do atomizátoru byly zavedeny plamenové plyny: argon (nadále označován jako plamenový argon (Ar_{flame})) a vodík.

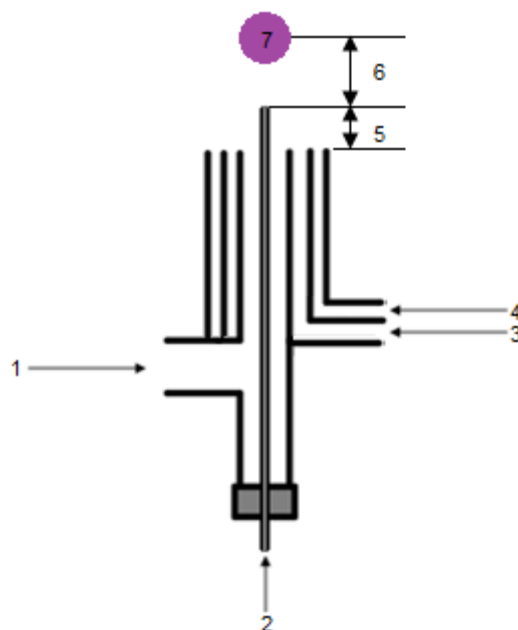


obr. 3.6 Schéma MDF

1 – přívod plynů ze separátoru fází a plamenových plynů, 2 – OH, 3 – optický paprsek

3.5.2 Flame in gas shield

K atomizaci byl využíván FIGS znázorněný na obrázku 3.7, který vycházel z MDF popsaného v kapitole 3.5.1. Na vertikální trubici byla nasazena dvoukanálová stínící jednotka vyrobená z mosazi [41]. Oběma kanály proudil argon. Argon, který proudil ve vnitřním kanálu stínící jednotky byl označen jako $Ar_{\text{Shield I}}$, argon, který proudil ve vnějším kanálu stínící jednotky, byl označen jako $Ar_{\text{Shield II}}$. V ose vertikální trubice byla umístěna kapilára o vnitřním průměru 0,53 mm. Kapilárou bylo možné manipulovat ve vertikálním směru. Vzdálenost mezi koncem kapiláry a koncem křemenné vertikální trubice byla definována jako vzdálenost kapiláry (CD). Pomocí šroubu bylo možné měnit pozorovací výšku. Vzdálenost od konce kapiláry do středu optického paprsku z výbojky byla nazvána jako pozorovací výška (OH).



obr. 3.7 Schéma flame in gas shield

1 – přívod plynů ze separátoru fází a plamenových plynů, 2 – přívod kyslíku, 3 – přívod $\text{Ar}_{\text{Shield I}}$, 4 – přívod $\text{Ar}_{\text{Shield II}}$, 5 – CD, 6 – OH, 7 – optický paprsek

3.6 Popis experimentů

3.6.1 Optimalizace atomizátorů

Pro optimalizaci atomizátorů bylo použito FIA uspořádání viz kapitola 3.4.1 s GLS 1, ze kterého byla kontinuálně odtahována kapalná fáze.

V těchto měřeních byly jako reagentie použity 1% roztok THB (m/v), roztok TRIS pufru o koncentraci $0,75 \text{ mol dm}^{-3}$ a hodnotě pH 6,00. Jako standard byl použit roztok iAs(V) o koncentraci $2 \text{ } \mu\text{g dm}^{-3}$ v 2% L-cysteinu (m/v). Před vlastním měřením bylo kvůli předredukci za pomoci L-cysteinu vyčkáno alespoň 1 hodinu, aby předredukce proběhla kvantitativně [36].

Dávkovacím ventilem byl nadávkován standard iAs(V) v L-cysteinu do proudu nosného média (DIW), který se dále míchal s roztokem TRIS pufru a THB. Průtok všech reagentů byl $1 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$.

3.6.1.1 MDF

Zde byly optimalizovány následující parametry: OH, průtok $\text{Ar}_{\text{chemifold}}$, složení plynů do plamene, celkový průtok plamenových plynů. Dále pak byl proměřen: vliv

celkového průtoku plynů atomizátorem na transportní ztráty a vliv sušení směsi plynů u výstupu ze separátoru fází. Všechny tyto experimenty byly prováděny podle postupu popsaného v záhlaví kapitoly 3.6.1. Dále jsou zmíněny body, které se od ostatních měření lišily.

Složení plynů do plamene

Vždy po změně nastavení poměru argonu a vodíku bylo vyčkáno 15 min, aby došlo k ustálení teploty. Paralelně byla měřena pomocí dotykového termočlánku měřena teplota konce křemenné vertikální trubice a teplota mosazné stínící jednotky.

Vliv celkového průtoku plynů atomizátorem na transportní ztráty

Tyto experimenty byly prováděny ve FIA uspořádání v aparatuře, která byla podobná aparatuře, která je popsána v kapitole 3.4.1. Lišila se tím, že výstup ze separátoru fází nebyl zaveden do T-spojky, aby se mísil s plamenovými plyny, ale místo toho byl do atomizátoru zaveden kapilárou, která u FIGS slouží k přívodu kyslíku. Průtok nosného argonu byl $80 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$. OH byla 5 mm. Vliv transportních ztrát na celkovém průtoku plamenových plynů byl proměřen pro hodnoty 400 a $800 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$, kdy poměr plamenového argonu a vodíku byl v obou případech 3:1.

Vliv sušení směsi plynů u výstupu ze separátoru fází

Tyto experimenty byly prováděny ve FIA uspořádání v aparatuře, která byla podobná aparatuře, která je popsána v kapitole 3.4.1. Lišila se tím, že výstup ze separátoru fází nebyl zaveden přímo do T-spojky, ale před ní bylo umístěno sušící médium.

3.6.1.2 FIGS

Zde byly optimalizovány následující parametry: OH, CD, složení plynů do plamene, celkový průtok plynů do plamene, průtok stínících plynů a průtok kyslíku. Další měření se pak zabývala: ověřením optimálních hodnot průtoku kyslíku pro nižší celkový průtok atomizátorem, ověřením optimálních hodnot stínících plynů pro nižší celkový průtok atomizátorem, vlivem celkového průtoku plynů atomizátorem na transportní ztráty a vlivem sušení směsi plynů u výstupu ze separátoru fází. Všechny tyto experimenty byly prováděny podle postupu popsaným v kapitole 3.6.1. Dále jsou zmíněny body, které se

od ostatních měření lišily.

Průtok stínících plynů

Průtok stínících plynů byl proměřen v intervalu 1 až 3 dm³ min⁻¹ pro Ar_{Shield I} a 0 až 3 dm³ min⁻¹ pro Ar_{Shield II}. Prvky matice byly zvoleny podle následujícího postupu {[1;0],[1;1],[1;2],[1;3],[1,5;0,5],[1,5;1,5] ...} (body množiny jsou uvedeny ve tvaru [F(Ar_{Shield I}); F(Ar_{Shield II})] v dm³ min⁻¹).

Ověření optimálních hodnot průtoku kyslíku pro nižší celkový průtok atomizátorem

Experimenty byly prováděny ve FIA uspořádání viz 3.6.1. Průtok Ar_{chemifold} byl 80 cm³ min⁻¹, průtok Ar_{flame} 350 cm³ min⁻¹, průtok vodíku do plamene byl 50 cm³ min⁻¹, průtoky Ar_{Shield I} a Ar_{Shield II} byly 1,5 (Ar_{Shield I}) a 2,0 dm³ min⁻¹ (Ar_{Shield II}). OH byla 3 mm a CD 0 mm. Vliv kyslíku byl proměřen od 2,5 do 7,5 cm³ min⁻¹.

Ověření optimálních hodnot stínících plynů pro nižší celkový průtok atomizátorem

Experimenty byly prováděny ve FIA uspořádání viz 3.6.1. Průtok Ar_{chemifold} byl 80 cm³ min⁻¹, průtok Ar_{flame} byl 350 cm³ min⁻¹, průtok vodíku do plamene byl 50 cm³ min⁻¹, průtok kyslíku do plamene byl 5 cm³ min⁻¹. OH byla 3 mm a CD 0 mm. Vliv stínících plynů byl proměřen pro Ar_{Shield I} od 0,5 do 1,5 dm³ min⁻¹ a pro Ar_{Shield II} od 1,5 do 2,5 dm³ min⁻¹.

Vliv sušení směsi plynů u výstupu ze separátoru fází u FIGS

Tyto experimenty byly prováděny ve FIA uspořádání v aparatuře, která byla velmi podobná aparatuře, která je popsána v kapitole 3.4.1. Lišila se tím, že výstup ze separátoru fází nebyl zaveden přímo do T-spojky, ale před ní bylo umístěno sušící médium.

3.6.2 Optimalizace podmínek generování

Veškeré tyto optimalizace byly měřeny s MDF. Nastavení atomizátoru při použití GLS 1 a 2 je shrnuto v tabulce 3.3 a nastavení atomizátoru při použití GLS 3, 4 a 5 je shrnuto v tabulce 3.4.

Tabulka 3.3 Nastavení MDF při použití GLS 1 a 2

parametr	hodnota
$F(\text{Ar}_{\text{flame}})$	$600 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$
$F(\text{Ar}_{\text{chemifold}})$	$80 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$
$F(\text{H}_2)$	$200 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$
OH	5 mm

Tabulka 3.4 Nastavení MDF při použití GLS 3,4 a 5

parametr	hodnota
$F(\text{Ar}_{\text{flame}})$	$530 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$
$F(\text{Ar}_{\text{chemifold}})$	$150 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$
$F(\text{H}_2)$	$200 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$
OH	5 mm

3.6.2.1 Měření ve FIA uspořádání

Pro optimalizaci podmínek generování bylo nejprve použito FIA uspořádání podobné tomu které je popsáno v kapitole 3.4.1 s tím rozdílem, že nebyla použita reakční cívka. Byl použit GLS 1 a 3. Kapalná fáze byla ze separátoru odtahována diskontinuálně, tzn. po ukončení generování.

Dávkovacím ventilem byl dávkován standard iAs(III) nebo iAs(V) o koncentraci $2 \mu\text{g dm}^{-3}$ do proudu DIW, který se dále míchal s roztokem kyseliny chlorovodíkové a THB. Průtoky všech reagentů byly $1 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$. V tomto uspořádání byly měřeny závislosti vlivu koncentrace kyseliny chlorovodíkové a THB. Všechny tyto experimenty byly prováděny podle postupu popsaného výše a dále jsou zmíněny body, které se od ostatních měření lišily.

Vliv koncentrace THB

Jelikož s vyšší koncentrací roztoku THB dochází k uvolňování většího množství vodíku, byl tento nárůst kompenzován snižováním průtoku vodíku do plamene (1% roztok THB při průtoku $1 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ odpovídá přibližně $25 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ vodíku). Měřicí cyklus se skládal z kroků popsaných v tabulce 3.5.

Tabulka 3.5 Měřicí cyklus pro FIA uspořádání

krok	čas, s	čerpadlo 1	čerpadlo 2	popis děje
1	0	x	x	ustalování základní linie
2	10	x		
3	15	x		zapnut záznam
4	23	x		nadávkován standard
5	^a		x	konec záznamu, zapnut odtah

^a konec záznamu závisí na jednotlivých speciích arsenu a na koncentracích roztoku THB (jednotlivé časy jsou uvedeny v tabulce 3.6)

Tabulka 3.6 Délka záznamu u FIA uspořádání

w(THB), %	specie	konec záznamu, s
1,00	iAs(III)	195
1,00	iAs(V)	465
2,00	iAs(III)	195
2,00	iAs(V)	315
3,00	iAs(III)	195
3,00	iAs(V)	235
4,00	iAs(III)	195
4,00	iAs(V)	235
5,00	iAs(III)	195
5,00	iAs(V)	195

Vliv koncentrace kyseliny chlorovodíkové

Měřicí cyklus se skládal z kroků popsaných v tabulce 3.5. V tomto případě délka záznamu závisela pouze na formě generovaného arsenu, kdy pro iAs(III) byl konec záznamu v čase 195 s a pro iAs(V) v čase 235 s.

3.6.2.2 Měření v dávkovém uspořádání

K měření bylo použito dávkové uspořádání popsané v kapitole 3.4.2. Dávkovacím ventilem byly dávkovány standardy iAs(III) nebo iAs(V) (případně MMA nebo DMA) o koncentraci $10 \mu\text{g dm}^{-3}$ do proudu DIW, který se poté smíchal s roztokem kyseliny chlorovodíkové/TRIS pufru. Průtok těchto roztoků činil $2 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ po dobu 1 min (tzn. celkově nadávkovaný objem byl 4 cm^3). Po ukončení dávkování standardu se pomocí druhého peristaltického čerpadla začal přivádět roztok THB o průtoku

$1 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$. Po ukončení generování byla kapalná fáze pomocí třetího peristaltického čerpadla odčerpána ze separátoru fází do odpadu.

V tomto uspořádání byly měřeny závislosti vlivu koncentrace kyseliny chlorovodíkové a THB. Další měření se pak zabývala kontrolou čistoty standardů iAs(III) a iAs(V), generováním hydridů z MMA a DMA, optimalizací průtoku nosného argonu, kalibrací a měřením rychlostních konstant. Všechny tyto experimenty byly prováděny podle postupu popsáným výše a dále jsou zmíněny body, které se od ostatních měření lišily.

Vliv koncentrace THB

Měřicí cyklus se skládal z kroků popsáných v tabulce 3.7.

Tabulka 3.7 Měřicí cyklus pro dávkové uspořádání

krok	čas, s	čerpadlo 1	čerpadlo 2	čerpadlo 3	popis děje
1	0	x			nadávkováno do generátoru
2	60				zapnut záznam
3	68		x		začátek generování
4	^a				ukončení generování
5	^a			x	konec záznamu, zapnut odtah

^a konec záznamu a konec generování závisí na jednotlivých speciích arsenu a na koncentracích roztoku THB (jednotlivé časy jsou uvedeny v tabulce 3.8)

Vliv koncentrace kyseliny chlorovodíkové

Měřicí cyklus se skládal z kroků popsáných v tabulce 3.7. V tomto případě jsou doby konce záznamu a konce generování uvedeny v tabulce 3.9.

Kontrola čistoty standardů iAs(III) a iAs(V)

Byly střídavě měřeny standardy iAs(III) a iAs(V) s i bez předredukce 2% L-cysteinem. Měřicí cyklus se skládal z kroků popsáných v tabulce 3.7. V tomto případě je délka záznamu 560 s a doba generování 520 s.

Tabulka 3.8 Délka záznamu a doba generování u dávkového uspořádání při měření vlivu koncentrace THB

w(THB), %	specie	konec generování, s	konec záznamu, s
0,50	iAs(III)	230	310
0,50	iAs(V)	270	350
0,75	iAs(III)	220	290
0,75	iAs(V)	260	330
1,00	iAs(III)	160	290
1,00	iAs(V)	260	310
2,00	iAs(III)	180	240
2,00	iAs(V)	180	240
3,00	iAs(III)	180	240
3,00	iAs(V)	180	240
4,00	iAs(III)	180	240
4,00	iAs(V)	180	240
5,00	iAs(III)	180	240
5,00	iAs(V)	180	240

Tabulka 3.9 Délka záznamu a konce doba generování u dávkového uspořádání při měření vlivu koncentrace kyseliny chlorovodíkové

c(HCl), mol dm ⁻³	specie	konec generování, s	konec záznamu, s
0,25	iAs(III)	220	460
0,25	iAs(V)	220	480
0,50	iAs(III)	200	280
0,50	iAs(V)	220	300
1,00	iAs(III)	200	260
1,00	iAs(V)	220	280
2,00	iAs(III)	190	250
2,00	iAs(V)	200	280

Generování hydridů z MMA a DMA

Byly střídavě měřeny standardy iAs(V), MMA a DMA. V případě generování z prostředí kyseliny chlorovodíkové byly tyto standardy měřeny bez předredukce, v případě generování z prostředí TRIS pufru s předredukcí pomocí 2% L-cysteinu. Měřicí cyklus se skládal z kroků popsaných v tabulce 3.7. V tomto případě byla délka záznamu 390 s pro generování z kyseliny chlorovodíkové a 560 s pro generování z TRIS pufru. Doba generování byla 330 s pro generování z kyseliny chlorovodíkové a 520 s pro generování z TRIS pufru.

Optimalizace průtoku nosného plynu

Byl proměřen standard iAs(V) o koncentraci $10 \mu\text{g dm}^{-3}$ v závislosti na průtoku nosného plynu. Měřicí cyklus se skládal z kroků popsaných v tabulce 3.7. V tomto případě jsou doby konce záznamu a konce generování uvedeny v tabulce 3.10.

Tabulka 3.10 Délka záznamu a doba generování u dávkového uspořádání při měření optimalizace průtoku nosného plynu

průtok nosného plynu, $\text{cm}^3 \text{min}^{-1}$	konec generování, s	konec záznamu, s
25	360	500
50	360	410
75	360	390
100	360	390
150	360	390

Kalibrace

Pro měření kalibračních závislostí byl k atomizaci použit FIGS za optimálních podmínek (viz kap. 4.1.3). Byly střídavě měřeny standardy iAs(III) a iAs(V), o koncentracích 5,0, 2,0, 1,0 a $0,5 \mu\text{g dm}^{-3}$ nejprve z prostředí kyseliny chlorovodíkové a poté z prostředí TRIS pufru s i bez předredukce 2% L-cysteinem. Měřicí cyklus se skládal z kroků popsaných v tabulce 3.7. V tomto případě byla délka záznamu 390 s pro generování z kyseliny chlorovodíkové a 560 s pro generování z TRIS pufru. Doba generování byla 330 s pro generování z kyseliny chlorovodíkové a 520 s pro generování z TRIS pufru.

Odhad rychlostních konstant

Při těchto experimentech byl použit GLS 2, průtok $\text{Ar}_{\text{chemifold}}$ činil $400 \text{ cm}^3 \text{min}^{-1}$, průtok Ar_{flame} byl $280 \text{ cm}^3 \text{min}^{-1}$. Ostatní parametry atomizátoru byly stejné jako jsou uvedeny v tabulce 3.4.

3.6.2.3 Měření v dávkovém uspořádání s předrozkladem tetrahydroboratu

K měření byla použita aparatura popsaná v kapitole 3.4.3.

Dávkovacím ventilem byl dávkován standard iAs(III) nebo iAs(V) o koncentracích

$10 \mu\text{g dm}^{-3}$ do proudu DIW, který se poté smíchal s roztokem kyseliny chlorovodíkové. Průtok těchto roztoků činil $2 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ po dobu 1 min (tzn. celkově nadávkovaný objem byl 4 cm^3). Po ukončení dávkování standardu se pomocí druhého peristaltického čerpadla začala přivádět směs roztoku THB a kyseliny chlorovodíkové, která se smíchala pomocí T-spojky ještě před vstupem do separátoru fází. Výsledná směs byla vedena přes předrozkladovou cívku do separátoru fází pod hladinu kapalně fáze. Po ukončení generování byla kapalná fáze pomocí třetí peristaltické pumpy ze separátoru fází odčerpána do odpadu.

V tomto uspořádání byly měřeny závislosti vlivu koncentrace kyseliny chlorovodíkové mísicí se s roztokem THB před vstupem do generátoru, za přítomnosti i nepřítomnosti předrozkladové cívky. Všechny tyto experimenty byly prováděny podle postupu popsaného výše a dále jsou zmíněny body, které se od ostatních měření lišily.

Vliv koncentrace kyseliny chlorovodíkové bez přítomnosti předrozkladové cívky

Měřicí cyklus se skládal z kroků popsaných v tabulce 3.7. V tomto případě jsou délky záznamu a doby generování uvedeny v tabulce 3.11.

Vliv koncentrace kyseliny chlorovodíkové za přítomnosti předrozkladové cívky

Tyto experimenty byly prováděny v dávkovém uspořádání popsaném výše za použití předrozkladové cívky. Měřicí cyklus se skládal z kroků popsaných v tabulce 3.7. V tomto případě byla délka záznamu a doba generování uvedeny v tabulce 3.12.

Tabulka 3.11 Délky záznamu a doby generování u dávkového uspořádání s předrozkladem THB při měření vlivu kyseliny chlorovodíkové bez předrozkladové cívky

$c(\text{HCl})$, mol dm^{-3}	specie	konec záznamu, s	konec generování, s
0	iAs(III)	390	360
0	iAs(V)	390	360
1,00	iAs(III)	660	610
1,00	iAs(V)	710	660
2,00	iAs(III)	810	760
2,00	iAs(V)	860	810
6,00	iAs(III)	860	810
6,00	iAs(V)	860	810

Tabulka 3.12 Délky záznamu a doby generování u dávkového uspořádání s předrozkladem THB při měření vlivu kyseliny chlorovodíkové s předrozkladovou cívkou

c(HCl)	specie	konec záznamu, s	konec generování, s
0	iAs(III)	390	360
0	iAs(V)	390	360
2	iAs(III)	810	760
2	iAs(V)	860	810
6	iAs(III)	860	810
6	iAs(V)	860	810

3.6.2.4 Měření ve FIA uspořádání s modifikací separátoru fází

Pro tato měření bylo použito FIA uspořádání s kontinuálním a diskontinuálním odtahem kapalně fáze, podobné jako v 3.6.2.1. Jediný rozdíl byl v separátoru fází, kdy byl použit GLS 5.

Dávkovacím ventilem byl dávkován standard iAs(III) nebo iAs(V) o koncentraci $10 \mu\text{g dm}^{-3}$ do proudu DIW, který se dále míchal s roztokem kyseliny chlorovodíkové a THB. Průtoky všech reagentů byly $1 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$. Po ukončení generování byla kapalná fáze pomocí druhého peristaltického čerpadla ze separátoru fází odčerpána do odpadu.

3.7 Zpracování naměřených dat

3.7.1 Zpracování signálu a software

Průběh AFS signálu byl zaznamenán pomocí programu AFS 6.1 (Diram, Česká republika). Jelikož napájecí proud u výbojky byl pulzně modulován, bylo možné zároveň pořizovat hodnoty signálu při zapnuté a vypnuté výbojce, a tímto mohla být provedena korekce na emisi plamene. Dále bylo možné pomocí tohoto programu měnit napětí vkládané na fotonásobič. Záznamy byly exportovány a dále vyhodnocovány v programu Microsoft Excel 2007 (Microsoft Corporation, USA) a OriginPro 8.1 (OriginLab Corporation, USA).

Získané signály byly integrovány podle následujícího vztahu:

$$I_0 = (1/n) \cdot (t_k - t_z) \sum_{i=1}^n S_i \quad (3.1)$$

kde I_0 je plocha píku integrována „od nuly“, t_k je čas konce píku, t_z je čas začátku píku kde S_i je i -tá hodnota signálu, $i = 1$ platí pro čas t_z a $i = n$ platí pro čas t_k , kde n je:

$$n = 40 \cdot (t_k - t_z) + 1 \quad (3.2)$$

(40 je frekvence odečtu dat).

Protože byl zároveň pozorován i signál pozadí (pravděpodobně odražené, nebo rozptýlené záření z výbojky) bylo nutné korigovat plochu píku na základní linii podle vztahu:

$$I_k = I_0 - \frac{(t_k - t_z) \cdot (S_k - S_z)}{2} \quad (3.3)$$

kde I_k je plocha píku korigovaná na základní linii, S_z je průměrný signál základní linie před časem t_z (průměr z 320 odečtů, což odpovídá 8 s záznamu), S_k je průměrný signál základní linie za časem t_k (průměr z minimálně 400 odečtů, což odpovídá 10 s záznamu).

V dalším textu jsou jako „plochy píků“ vždy uváděny hodnoty ploch píků získaných podle vztahu (3.3).

V případě měření s MDF byla ještě provedena korekce na emisi plamene, tzn. odečteny od sebe hodnoty signálu při zapnuté a vypnuté výbojce. V případě měření s FIGS takto korekce prováděna nebyla, neboť v tomto případě byla emise plamene zanedbatelná.

3.7.2 Statistické vyhodnocení výsledků

Odhad střední hodnoty výsledku

Odhadem střední hodnoty výsledků je aritmetický průměr. Aritmetický průměr je definován jako:

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=0}^n x_i \quad (3.4)$$

kde x_i je naměřená hodnota v i -tém pořadí a n je počet výsledků měření. Pro malý počet výsledků je však aritmetický průměr citlivý na okrajové hodnoty.

Charakteristika náhodné chyby

Charakteristikou náhodné chyby (přesnosti výsledků) měření je směrodatná odchylka, která je definovaná jako:

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=0}^n (x_i - \bar{x})^2} \quad (3.5)$$

kde x_i je naměřená hodnota v i -tém pořadí a n je počet výsledků měření. V případě, že byly s výsledky počítány dále pro výpočty typu:

$$y = \frac{a}{b} \quad (3.6)$$

kde y je poměr veličin a a b .

Směrodatné odchylky byly kombinovány podle následujícího vztahu:

$$\frac{\sigma_y}{y} = \sqrt{\left(\frac{\sigma_b}{b}\right)^2 + \left(\frac{\sigma_a}{a}\right)^2} \quad (3.7)$$

kde σ_a je směrodatná odchylka veličiny a , σ_b je směrodatná odchylka veličiny b a σ_y je směrodatná odchylka veličiny y .

Relativní mírou přesnosti série paralelních stanovení je relativní směrodatná odchylka, většinou udávaná v procentech:

$$s_r = \frac{s}{\bar{x}} \quad (3.8)$$

Výsledky v práci jsou uváděny jako aritmetický průměr $\pm$ směrodatná odchylka ze tří hodnot ploch píků, případně citlivosti. Citlivost je definována jako plocha píků vztažená na koncentraci dávkovaného standardu. V případě hodnot pozadí byl aritmetický průměr $\pm$ směrodatná odchylka z pořízených záznamů. U sestrojených grafů je znázorněný bod roven aritmetickému průměru a chybové úsečky vyjadřují směrodatnou odchylku.

Interval spolehlivosti

Rozsah hodnot okolo stanovené hodnoty, ve kterém se s určitou pravděpodobností nachází skutečná hodnota, se nazývá intervalem spolehlivosti. V této práci jsou uváděny intervaly spolehlivosti 95 %, definované podle vztahu [42]:

$$L_{95} = \bar{x} \pm 1,96 S_{EM} \quad (3.9)$$

kde L_{95} je horní (resp. dolní) mez intervalu spolehlivosti a S_{EM} je standardní chyba průměru spočítaná programem OriginPro.

Mez detekce

Mez detekce byla spočítána podle následujícího vztahu [43]:

$$LOD = \frac{3 s_{blank}}{k} \quad (3.10)$$

kde s_{blank} je směrodatná hodnota blanku spočítaná minimálně z deseti paralelních měření a k je citlivost stanovení.

Víceparametrová analýza

Výsledek víceparametrové analýzy dat je v této práci uváděn ve formě odezvové plochy, která je znázorněná vrstevnicovým diagramem. Aby bylo možné sestavit diagram odezvové plochy, je nutné převést výsledky měření do maticového tvaru. V případě, kdy vstupní data byla zvolena tak, že nepokrývají všechny prvky matice, byly tyto prvky matice dopočítány programem OriginPro metodou Renka Cline.

Porovnání dvou analytických metod

Porovnání dvou analytických metod v této práci bylo prováděno pomocí regresních přímk. Na jednu byly vyneseny hodnoty získané pomocí jedné metody a na druhou osu byly vyneseny hodnoty získané pomocí druhé metody. Pokud pro každý vzorek získáme stejný výsledek za použití obou metod, tak regresní přímka bude mít nulový úsek a směrnici rovnou jedné. V případě, že směrnice je rovna jedné, ale úsek není roven nule, tak tyto metody poskytují stejnou citlivost, s tím rozdílem že jedna se liší o konstantní hodnotu. V tomto případě se může jednat o vyšší hodnotu slepého pokusu. [42]

Toto vyhodnocení bylo použito pro srovnání kalibračních závislostí jednotlivých forem analytu.

4. Výsledková část a diskuze

4.1 Optimalizace atomizátorů

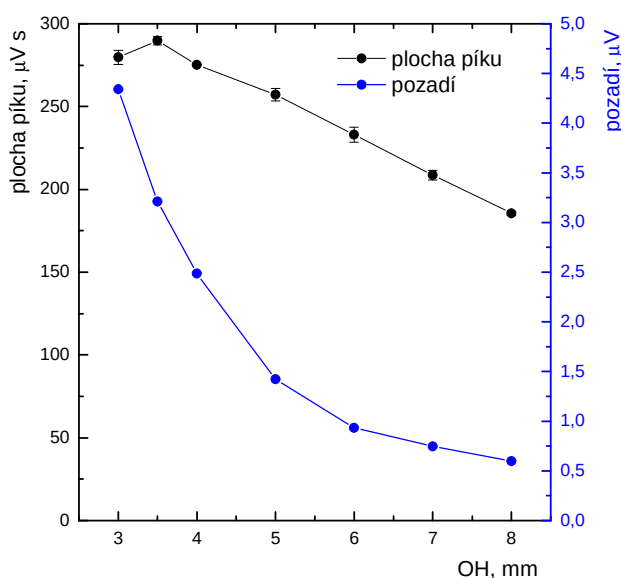
Měření vlivů jednotlivých parametrů na plochu píku u jednotlivých atomizátorů byla provedena postupem popsaným v kapitole 3.6.1.

4.1.1 MDF

Optimalizace pro MDF byly provedeny za experimentálních podmínek popsaných v kapitole 3.6.1.1.

4.1.1.1 Vliv pozorovací výšky

Z obrázku 4.1 znázorňujícího vliv OH na plochu píku je patrné, že se snižující OH roste plocha píku až do maxima pro 3,5 mm. Pro vyšší OH je chránění volných atomů před okolní atmosférou horší než pro nižší hodnoty (viz kapitola 2.6.1). Se snižující se OH roste ovšem signál pozadí, neboť více záření se odráží od atomizátoru do detektoru, a tím i šum, což zhoršuje LOD. Jako optimální OH proto byla zvolena 5 mm.

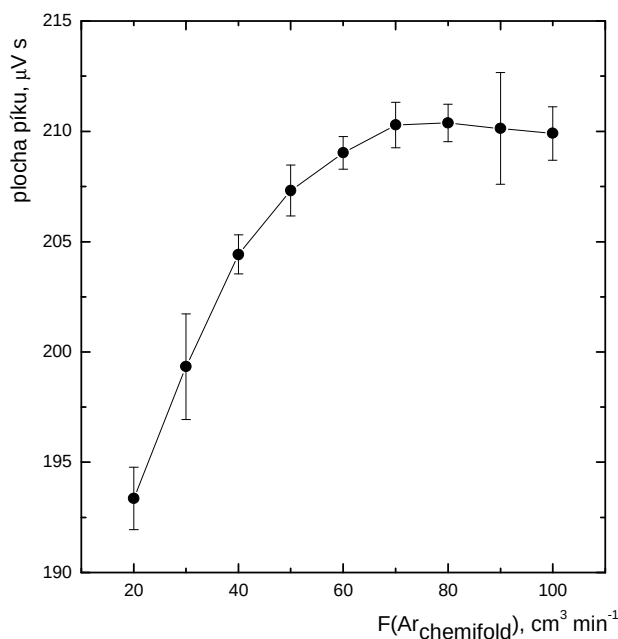


Obr. 4.1 Závislost plochy píku a signálu pozadí na pozorovací výšce

$F(\text{Ar}_{\text{flame}}) = 500 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$, $F(\text{H}_2) = 300 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$, $F(\text{Ar}_{\text{chemifold}}) = 50 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$, PMT = 1400 V, $c(\text{iAs(V)}) = 2 \mu\text{g dm}^{-3}$

4.1.1.2 Vliv průtoku nosného argonu

Vlivu průtoku nosného argonu je znázorněn na obrázku 4.2. Je patrné, že s rostoucím průtokem nosného argonu roste i plocha píku až do maxima pro $80 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$. Při vyšších průtocích je plocha píku konstantní. Při nižších průtocích pravděpodobně docházelo k transportním ztrátám hydridu. Průtok $80 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ byl zvolen jako optimální.

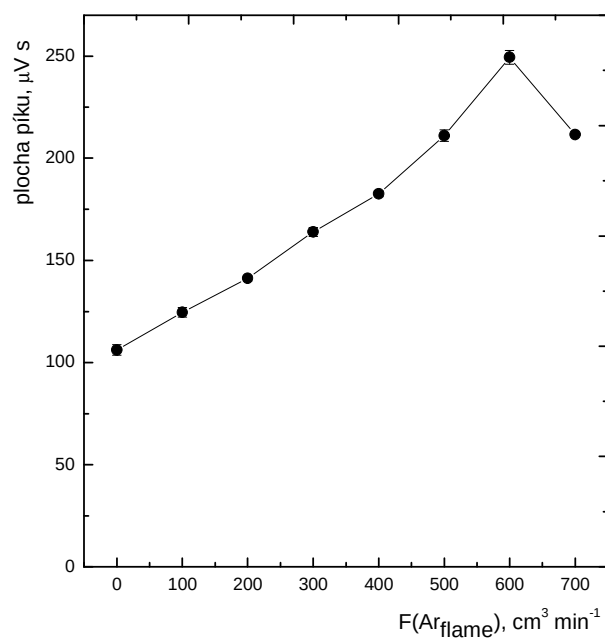


Obr. 4.2 Závislost plochy píku na průtoku nosného plynu

$F(\text{Ar}_{\text{flame}}) = 500 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$, $F(\text{H}_2) = 300 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$, $\text{OH} = 5 \text{ mm}$, $\text{PMT} = 1400 \text{ V}$,
 $c(\text{iAs(V)}) = 2 \mu\text{g dm}^{-3}$

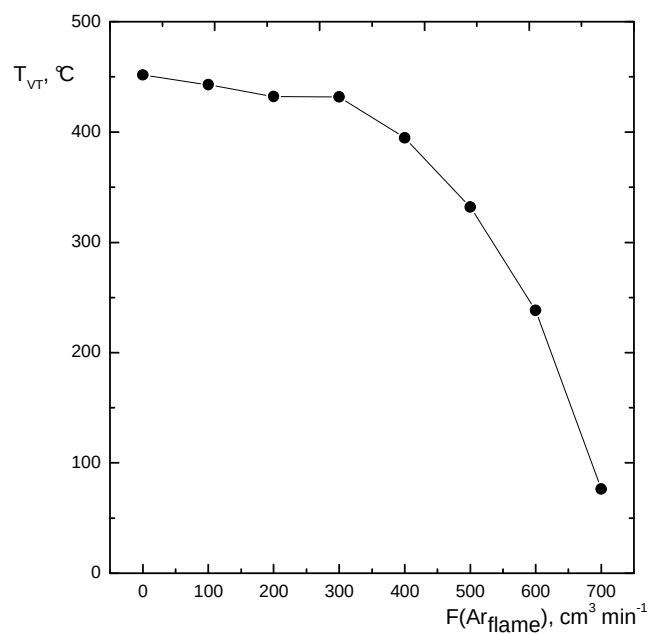
4.1.1.3 Vliv složení plamenových plynů

Závislost je znázorněna na obrázku 4.3. Průtok vodíku byl vždy takový, aby celkový průtok plamenových plynů byl $800 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$. Je patrné, že s rostoucím zastoupením argonu roste i plocha píku až do maxima pro $600 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$. To odpovídá teorii, neboť atomový absorpční koeficient závisí na složení atmosféry v atomizátoru: Lorenzovské rozšíření spektrální čáry je větší v atmosféře vodíku než v argonu [7]. Pokles signálu při průtoku argonu $700 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ je zapříčiněn poklesem teploty plamene. Při nižších teplotách je Lorenzovské rozšíření spektrální čáry výraznější [7].



Obr. 4.3 Závislost plochy píku na složení plamenových plynů

OH = 5 mm, PMT = 1300 V, $c(iAs(V)) = 2 \mu g dm^{-3}$

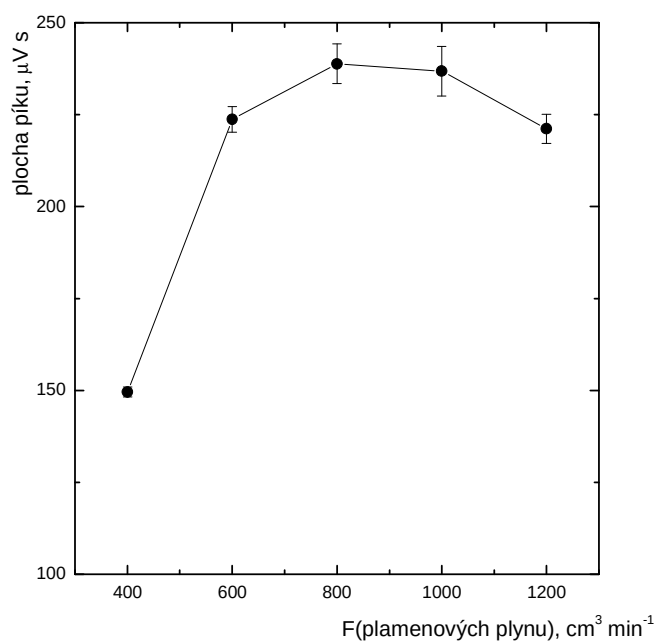


Obr. 4.4 Závislost teploty atomizátoru na složení plamenových plynů

Teplota plamene evidentně závisí na frakci vodíku v plamenových plynech, avšak přímé měření teploty plamene bylo v rámci této práce neproveditelné. Proto byl zvolen nepřímý přístup – měření teploty konce atomizátoru v závislosti na složení plamenových plynů – viz obr. 4.4. Jako optimální složení plamenových plynů bylo zvoleno $600 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1} \text{ Ar}_{\text{flame}}$ a $200 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ vodíku.

4.1.1.4 Celkový průtok plamenových plynů

Závislost je znázorněna na obrázku 4.5. Je patrné, že maximální plocha píku je pro hodnotu $800 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$. Při zvyšování průtoku dochází k mírnému poklesu plochy píku, který je pravděpodobně způsoben naředěním analytu - kratší dobou setrvání volných atomů analytu v optickém prostoru atomizátoru. Při snižování průtoku se sice doba setrvání volných atomů analytu prodlužuje, ale dochází k horšímu stínění volných atomů před molekulárním kyslíkem z okolní atmosféry (viz kap. 2.6.1). Jako optimální průtok plamenových plynů byl zvolen $800 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$.



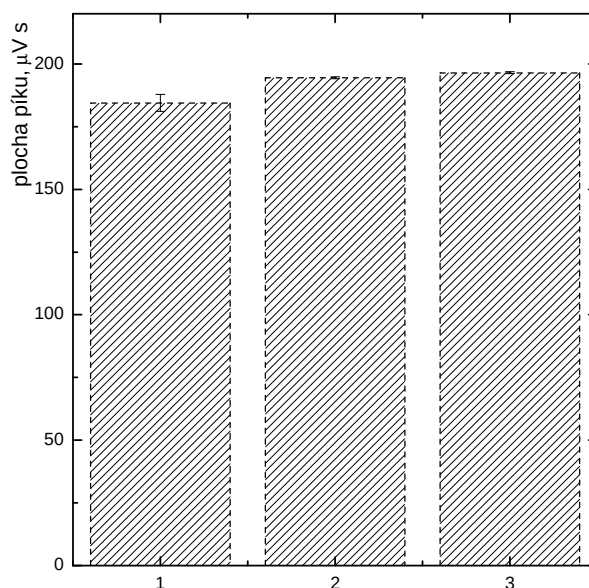
Obr. 4.5 Závislost plochy píku na celkovém průtoku plynů do plamene

$\text{OH} = 5 \text{ mm}$, $\text{PMT} = 1300 \text{ V}$, $c(\text{iAs(V)}) = 2 \mu\text{g dm}^{-3}$, $F(\text{Ar}_{\text{flame}})/F(\text{H}_2) = 3$

Bylo testováno, jestli pokles plochy píku při nižších průtocích plynů do plamene není způsoben transportními ztrátami v atomizátoru. Pokles plochy píku při snížení celkového průtoku plamenových plynů z 800 na $400 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ činil 38 %. Stejný pokles byl pozorován i při zavádění plynů ze separátoru fází do atomizátoru kapilárou, ve které laminární rychlost plynů byla výrazně vyšší (tak by nemělo docházet k adsorpci arsanu na povrchu kapiláry). Lze konstatovat, že k výrazným transportním ztrátám nedochází.

4.1.1.5 Vliv sušení plynů ze separátoru fází

Závislost sušení plynů je znázorněna na obrázku 4.6. Jak je z tohoto obrázku patrné, sušení plynu poněkud zvyšuje plochu píku (o 6 %). To je pravděpodobně způsobeno vodní parou, která jednak absorbuje UV záření o vlnové délce 193,7 nm [44] a tím snižuje fluorescenční signál. Zároveň může vodní pára způsobovat zhášení fluorescence. Odstranění vodní páry z plynů, které vystupují ze separátoru fází, nemá



Obr 4.6 Závislost plochy píku na sušení plynu

1 – bez sušení, 2 – acetátový filtr, 3 – sušicí trubice,

$F(\text{Ar}_{\text{flame}}) = 500 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$, $F(\text{H}_2) = 300 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$, $F(\text{Ar}_{\text{chemifold}}) = 50 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$,

$\text{OH} = 5 \text{ mm}$, $\text{PMT} = 1400 \text{ V}$, $c(\text{iAs(V)}) = 2 \mu\text{g dm}^{-3}$

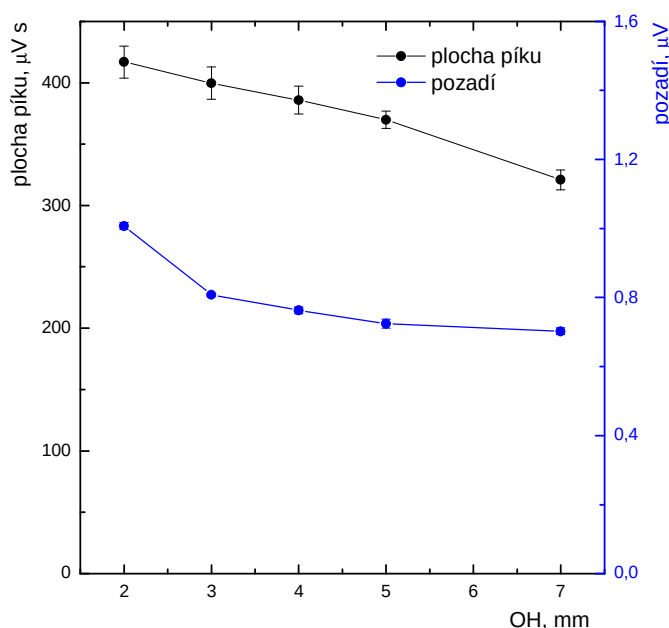
výrazný vliv, neboť jí v samotném MDF mnohem víc, než kolik se jí dostane ze separátoru fází do atomizátoru.

4.1.2 FIGS

Optimalizace pro FIGS byly prováděny za experimentálních podmínek popsanych v kapitole 3.6.1.2.

4.1.2.1 Vliv pozorovací výšky

Z obrázku 4.7 znázorňujícího vliv OH na plochu píku je patrné, že se snižující se OH roste plocha píku. Vysvětlení je stejné jako u MDF (kap. 4.1.1.1). Díky inherentně kvalitnějšímu stínění u FIGS je pokles plochy píku s rostoucí OH nižší než u MDF. Optimální pozorovací výška byla zvolena až po změření závislosti vlivu CD (kap. 4.1.2.2), neboť oba tyto faktory mají vliv na signál pozadí.

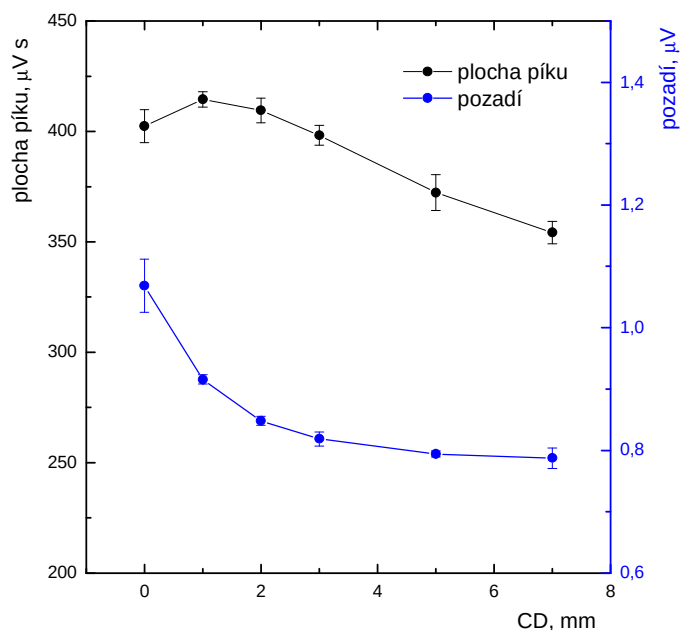


Obr. 4.7 Závislost plochy píku a signálu pozadí na pozorovací výšce

$F(\text{Ar}_{\text{flame}}) = 500 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$, $F(\text{H}_2) = 300 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$, $F(\text{O}_2) = 5 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$,
 $F(\text{Ar}_{\text{chemifold}}) = 80 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$, $F(\text{Ar}_{\text{Shield I}}) = 1,5 \text{ dm}^3 \text{ min}^{-1}$, $F(\text{Ar}_{\text{Shield II}}) = 1,5 \text{ dm}^3 \text{ min}^{-1}$,
 $\text{CD} = 5 \text{ mm}$, $\text{PMT} = 1400 \text{ V}$, $c(\text{iAs(V)}) = 2 \mu\text{g dm}^{-3}$

4.1.2.2 Vliv vzdálenosti kapiláry

Závislost je znázorněna na obrázku 4.8. Je patrné, že se snižující se CD roste plocha píku až do maxima pro 1 mm. Se snižující CD roste ale i signál pozadí a tím i šum, což zhoršuje LOD. Vyšší hodnoty pozadí pro nižší CD jsou způsobeny odrazem záření od atomizátoru. Jako optimální proto byla zvolena hodnota 3 mm pro CD a hodnota 4 mm pro OH.

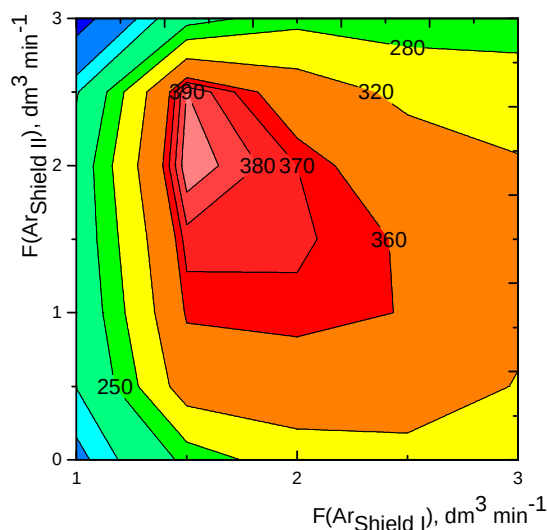


Obr. 4.8 Závislost plochy píku a signálu pozadí na vzdálenosti kapiláry

$F(Ar_{\text{flame}}) = 500 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$, $F(H_2) = 300 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$, $F(O_2) = 5 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$,
 $F(Ar_{\text{chemifold}}) = 80 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$, $F(Ar_{\text{Shield I}}) = 1,5 \text{ dm}^3 \text{ min}^{-1}$, $F(Ar_{\text{Shield II}}) = 1,5 \text{ dm}^3 \text{ min}^{-1}$,
 $OH = 5 \text{ mm}$, $PMT = 1400 \text{ V}$, $c(iAs(V)) = 2 \text{ } \mu\text{g dm}^{-3}$

4.1.2.3 Vliv průtoku stínících plynů

Tato dvou parametrová závislost je znázorněna na obrázku 4.9. Je patrné že největších ploch píku bylo dosaženo při průtocích $Ar_{\text{Shield I}}$ 1,5 až 2,0 $\text{dm}^3 \text{ min}^{-1}$ a při průtocích $Ar_{\text{Shield II}}$ 1,0 až 2,5 $\text{dm}^3 \text{ min}^{-1}$. Hodnoty 1,5 ($Ar_{\text{Shield I}}$) a 2,0 $\text{dm}^3 \text{ min}^{-1}$ ($Ar_{\text{Shield II}}$) byly zvoleny jako optimální hodnoty průtoků stínících plynů.



Obr. 4.9 Závislost plochy píku na průtoku stínících plynů

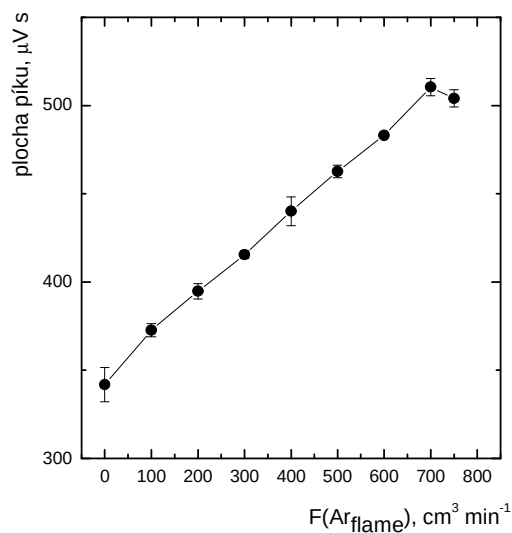
$F(\text{Ar}_{\text{flame}}) = 500 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$, $F(\text{H}_2) = 300 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$, $F(\text{O}_2) = 5 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$,
 $F(\text{Ar}_{\text{chemifold}}) = 80 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$, $\text{CD} = 5 \text{ mm}$, $\text{OH} = 5 \text{ mm}$, $\text{PMT} = 1400 \text{ V}$,
 $c(\text{iAs(V)}) = 2 \mu\text{g dm}^{-3}$

4.1.2.4 Vliv složení plamenových plynů

Z obrázku 4.10 znázorňujícího vliv složení plamenových plynů je patrné, že s rostoucím zastoupením argonu roste i plocha píku až do maxima pro $700 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$. Také v tomto případě byl průtok vodíku vždy takový, aby celkový průtok plamenových plynů byl $800 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$. Vysvětlení je stejné jako u MDF (kap. 4.1.1.3).

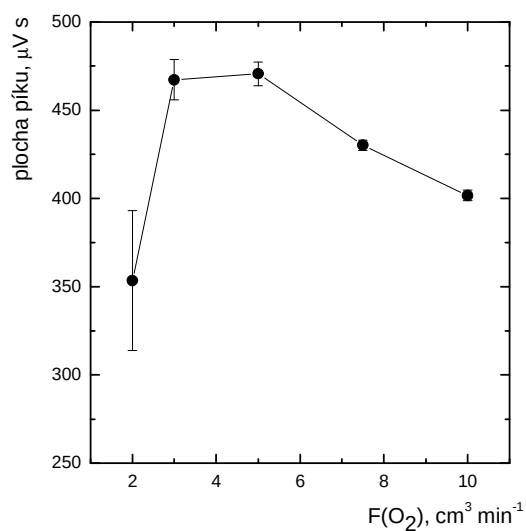
4.1.2.5 Vliv průtoku kyslíku

Z obrázku 4.11 je patrné, že se snižujícím se průtokem kyslíku do kapiláry roste plocha píku až do maxima mezi $3,0$ a $5,0 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$. To je pravděpodobně zapříčiněno tím, že vzniká více vodní páry (její vliv byl diskutován v kap. 4.1.1.5). Musí se brát ale na zřetel, že se zvyšujícím se průtokem kyslíku vzniklá více vodíkových radikálů, které jsou nezbytné pro atomizaci hydridu a ovlivňují i toleranci vůči interferentům. Při průtoku kyslíku pod $3,0 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ není evidentně vodíkových radikálů dost pro kompletní atomizaci hydridu. Průtok $5 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ byl zvolen jako optimální.



Obr 4.10 Závislost plochy píku na složení plamenových plynů

$F(\text{O}_2) = 5 \text{ cm}^3 \text{min}^{-1}$, $F(\text{Ar}_{\text{chemifold}}) = 80 \text{ cm}^3 \text{min}^{-1}$, $F(\text{Ar}_{\text{Shield I}}) = 1,5 \text{ dm}^3 \text{min}^{-1}$,
 $F(\text{Ar}_{\text{Shield II}}) = 1,5 \text{ dm}^3 \text{min}^{-1}$, $\text{OH} = 4 \text{ mm}$, $\text{CD} = 3 \text{ mm}$ $\text{PMT} = 1400 \text{ V}$,
 $c(\text{iAs(V)}) = 2 \mu\text{g dm}^{-3}$

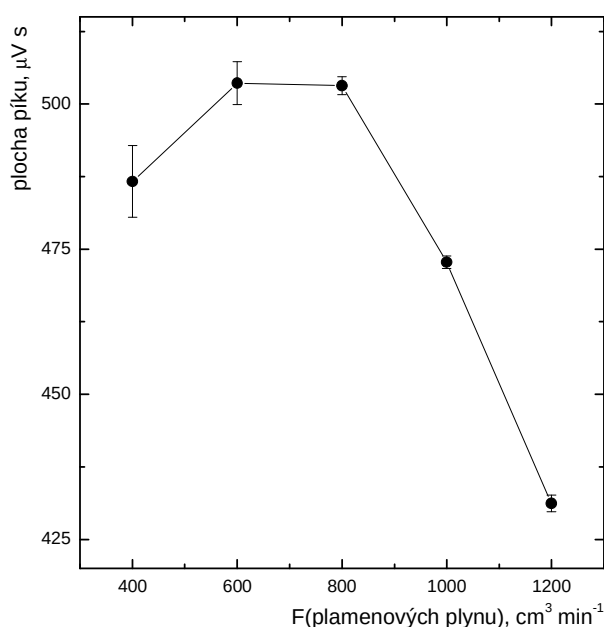


Obr. 4.11 Závislost plochy píku na průtoku kyslíku při nižším průtoku vodíku

$F(\text{Ar}_{\text{flame}}) = 700 \text{ cm}^3 \text{min}^{-1}$, $F(\text{H}_2) = 100 \text{ cm}^3 \text{min}^{-1}$, $F(\text{Ar}_{\text{chemifold}}) = 80 \text{ cm}^3 \text{min}^{-1}$,
 $F(\text{Ar}_{\text{Shield I}}) = 1,5 \text{ dm}^3 \text{min}^{-1}$, $F(\text{Ar}_{\text{Shield II}}) = 1,5 \text{ dm}^3 \text{min}^{-1}$, $\text{OH} = 4 \text{ mm}$, $\text{CD} = 3 \text{ mm}$
 $\text{PMT} = 1400 \text{ V}$, $c(\text{iAs(V)}) = 2 \mu\text{g dm}^{-3}$

4.1.2.6 Vliv celkového průtoku plynů do atomizátoru

Z obrázku 4.12 znázorňujícího závislost celkového průtoku na plochu píku je patrné, že optimální průtok plynů atomizátorem je $800 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$. Tento průtok byl, pokud není explicitně uvedeno jinak, proto nadále používán. Při zvyšování celkového průtoku plynů atomizátorem dochází k poklesu plochy píku, který je evidentně způsoben naředěním volných atomů analytu. Avšak se snižujícím se celkovým průtokem by mělo docházet k opačnému efektu, a tedy ke zvýšení plochy píku. Jak je z tohoto obrázku patrné, tento předpoklad se nenaplnil, se snižujícím průtokem docházelo dokonce k mírnému snížení plochy píku. Kvůli objasnění tohoto nečekaného chování byla provedena další měření - viz následující kapitoly 4.1.2.7 a 4.1.2.6.



Obr. 4.12 Závislost plochy píku na celkovém průtoku plynů atomizátorem

$F(\text{O}_2) = 5 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$, $F(\text{Ar}_{\text{chemifold}}) = 80 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$, $F(\text{Ar}_{\text{Shield I}}) = 1,5 \text{ dm}^3 \text{ min}^{-1}$,
 $F(\text{Ar}_{\text{Shield II}}) = 1,5 \text{ dm}^3 \text{ min}^{-1}$, $\text{OH} = 4 \text{ mm}$, $\text{CD} = 3 \text{ mm}$ $\text{PMT} = 1400 \text{ V}$,
 $c(\text{iAs(V)}) = 2 \mu\text{g dm}^{-3}$

4.1.2.7 Ověření optimálních hodnot průtoku kyslíku a průtoku stínících plynů pro nižší celkový průtok atomizátorem

Pokus o optimalizaci průtoku kyslíku a průtoku stínících plynů při nižším průtoku plynů do plamene ($400 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$) nevedl k signifikantně vyššímu signálu. To dokazuje, že pokles plochy píku při snížení celkového průtoku plynů do plamene není způsoben ani nedostatečnou účinností atomizace analytu ani horší kvalitou stínění.

4.1.2.8 Vliv celkového průtoku plynů atomizátorem na transportní ztráty

Při záporných hodnotách CD byl pozorován signál, který postupně klesal (adsorbovaný arsan na povrchu atomizátoru, který se postupně uvolňoval). Nejprve byl povrch atomizátoru „vyčištěn“ od adsorbovaného arsanu snižováním hodnot CD do hodnoty -9 mm . Poté se nechal atomizátorem projít arsan o celkovém množství 24 ng . Po ukončení generování byla postupně snižována CD po třech milimetrech od výchozí hodnoty a byl pořizován záznam, který byl integrován a následně vydělen citlivostí. V tabulce 4.1 jsou shrnuty výsledky transportních ztrát pro 400 resp. $800 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$. Jak je z tabulky patrné, při celkovém průtoku $400 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ jsou transportní ztráty přibližně 4x větší než při průtoku $800 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$. Také je patrné, že v prvních 3 mm je adsorbováno řádově víc arsenu než ve zbytku atomizátoru, což je pravděpodobně způsobeno tím, že vodíkové radikály difundují i dovnitř atomizátoru proti proudu plamenových plynů a atomizují analyt před výstupem z atomizátoru [21]. V částech atomizátoru, které jsou mimo dosah vodíkových radikálů, dochází pravděpodobně k adsorpci samotného arsanu. Transportní ztráty při celkovém průtoku $400 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ jsou vyšší, ale ne tak výrazné, aby vysvětlily nenaplnění předpokladu z kap. 4.1.2.6.

Experimenty popsané v 4.1.2.7 a 4.1.2.8 tedy dokazují, že mírnému snížení plochy píku pozorovanému při snižujícím se celkovém průtoku plynů do atomizátoru (Obr. 4.12) nelze vysvětlit nedostatečnou účinností atomizace analytu ani horší kvalitou stínění a ani transportními ztrátami. Tento jev zůstává zatím nevysvětlený. Jeho objasnění bude předmětem dalšího zkoumání.

Tabulka 4.1 Transportní ztráty v atomizátoru

CD, mm	transportní ztráty při 400 cm ³ min ⁻¹		transportní ztráty při 800 cm ³ min ⁻¹	
	m, ng	w, %	m, ng	w, %
-3	1,2	4,8	0,30	1,3
-6	0,05	0,2	0,01	0,03
-9	0,06	0,2	0,01	0,03

$F(\text{Ar}_{\text{flame}})/F(\text{H}_2) = 7$, $F(\text{O}_2) = 5 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$, $F(\text{Ar}_{\text{chemifold}}) = 80 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$,
 $F(\text{Ar}_{\text{Shield I}}) = 1,5 \text{ dm}^3 \text{ min}^{-1}$, $F(\text{Ar}_{\text{Shield II}}) = 1,5 \text{ dm}^3 \text{ min}^{-1}$, OH = 4 mm, PMT = 1400 V

4.1.2.9 Vliv sušení plynů ze separátoru fází

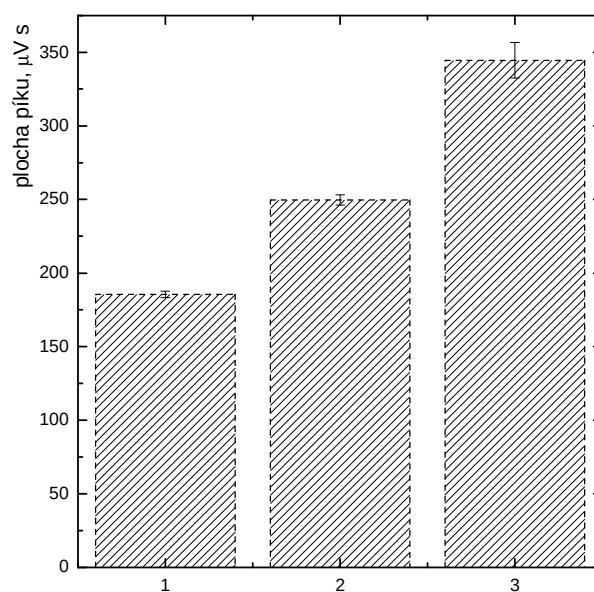
Závislost sušení plynů je znázorněna na obrázku 4.13. Jak je z tohoto grafu patrné, sušení plynu zvyšuje plochu píku. V tomto případě byl už nárůst výrazný (pro acetátový filtr o 35 % a pro sušicí trubici o 85 %). V případě mikroplamínku FIGS vzniká výrazně méně vodní páry než v případě MDF, a proto v tomto případě sušení plynů u výstupu ze separátoru má výrazný vliv. Vliv vodní páry byl diskutován v kap. 4.1.1.5.

4.1.3 Meze detekce pro FIGS a MDF

Optimální nastavení jednotlivých atomizátorů jsou shrnuty v tabulkách 4.2 a 4.3. Stanovené citlivosti a meze detekce jsou shrnuty v tabulce 4.4. V případě FIGS je citlivost přibližně 2x větší a šum 2x menší, tím pádem mez detekce pro FIGS je přibližně 4x menší. Tyto stanovené LOD jsou nejméně o řád menší ve srovnání s jinými pracemi, které se věnují stanovení arsenu metodou HG-AFS (50 ng dm⁻³ [45], 0,2 µg dm⁻³ [46] a 0,15 µg dm⁻³ [47]).

Tabulka 4.2 Optimální nastavení MDF

parametr	hodnota
OH	5 mm
$F(\text{Ar}_{\text{flame}})$	700 cm ³ min ⁻¹
$F(\text{H}_2)$	100 cm ³ min ⁻¹
$F(\text{Ar}_{\text{chemifold}})$	80 cm ³ min ⁻¹
zapojena sušicí trubice	ne



Obr 4.13 Závislost plochy píku na sušení plynu

1 – bez sušení, 2 – acetátový filtr, 3 – sušicí trubice

$F(\text{O}_2) = 5 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$, $F(\text{Ar}_{\text{chemifold}}) = 80 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$, $F(\text{Ar}_{\text{Shield I}}) = 1,5 \text{ dm}^3 \text{ min}^{-1}$,
 $F(\text{Ar}_{\text{Shield II}}) = 1,5 \text{ dm}^3 \text{ min}^{-1}$, $\text{OH} = 5 \text{ mm}$, $\text{CD} = 5 \text{ mm}$, $\text{PMT} = 1400 \text{ V}$,
 $c(\text{iAs(V)}) = 2 \text{ } \mu\text{g dm}^{-3}$

Tabulka 4.3 Optimální nastavení FIGS

parametr	hodnota
OH	4 mm
CD	3 mm
$F(\text{Ar}_{\text{flame}})$	$700 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$
$F(\text{H}_2)$	$100 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$
$F(\text{O}_2)$	$5 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$
$F(\text{Ar}_{\text{Shield I}})$	$1,5 \text{ dm}^3 \text{ min}^{-1}$
$F(\text{Ar}_{\text{Shield II}})$	$2,0 \text{ dm}^3 \text{ min}^{-1}$
$F(\text{Ar}_{\text{chemifold}})$	$80 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$
zapojena sušicí trubice	ano

Tabulka 4.4 Stanovené citlivosti a meze detekce

	FIGS	MDF
LOD	1,0 ng dm ⁻³	3,8 ng dm ⁻³
citlivost	237 μ Vs μ g ⁻¹ dm ³	125 μ Vs μ g ⁻¹ dm ³

4.2 Optimalizace podmínek generování

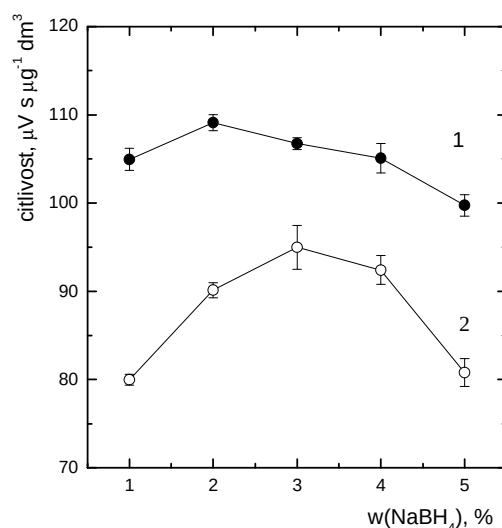
V další části práce byly hledány podmínky generování, které jsou vhodné pro speciální analýzu arsenu, tzn. podmínky, při kterých iAs(III) a iAs(V) poskytují stejnou citlivost stanovení. Dále pak podmínky, při kterých poskytuje citlivost (ideálně stejně vysokou jako v předchozích případech) pouze iAs(III).

4.2.1 Optimalizace podmínek generování ve FIA uspořádání

Nejprve byly hledány podmínky pro speciální analýzu arsenu ve FIA uspořádání experimentálním postupem popsáným v kapitole 3.6.2.1. Nejprve byl použit GLS 1, který se ukázal jako nedostatečný a byl vyměněn za GLS 3.

4.2.1.1 Vliv koncentrace THB

Vliv koncentrace roztoku THB na generování iAs(III) a iAs(V) je znázorněn na obrázku 4.14. Je patrné, že účinnost generování iAs(V) s rostoucí koncentrací stoupá až do 3% roztoku THB a poté mírně klesá. Tento pokles může být způsoben zvyšující se hodnotou pH v reakční směsi. Citlivost stanovení iAs(V) z 3% roztoku THB vztažená k citlivosti stanovení iAs(III) byla $90,4 \pm 2,3$ %.

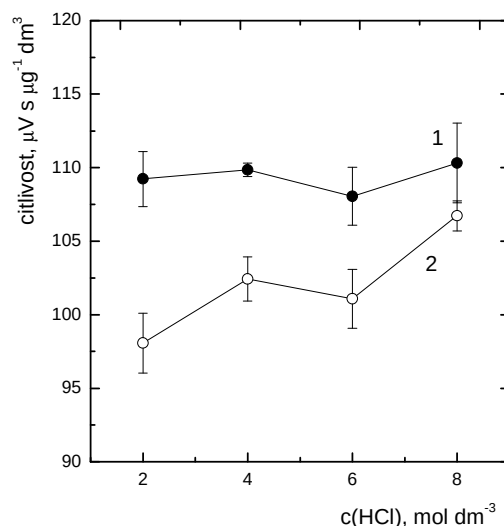


Obr. 4.14 Vliv koncentrace roztoku THB ve FIA uspořádání

1 – iAs(III), 2 – iAs(V), atomizátor: MDF, $F(\text{Ar}_{\text{flame}}) = 600 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$, $F(\text{H}_2) = 200 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$, $F(\text{Ar}_{\text{chemifold}}) = 80 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$, $\text{OH} = 5 \text{ mm}$, $c(\text{As}) = 2 \text{ } \mu\text{g dm}^{-3}$, $c(\text{HCl}) = 2 \text{ mol dm}^{-3}$, $\text{PMT} = 1400 \text{ V}$

4.2.1.1 Vliv koncentrace kyseliny chlorovodíkové

Vliv koncentrace roztoku kyseliny chlorovodíkové na generování iAs(III) a iAs(V) je znázorněna na obrázku 4.15. Jak je z tohoto obrázku patrné, účinnost generování iAs(III) je konstantní zatímco účinnost generování iAs(V) s rostoucí koncentrací stoupá. To se dá vysvětlit tím, že s rostoucí koncentrací kyseliny je větší frakce iAs(V) v nedisociované formě a tím pádem může podstoupit reakci s THB. Nicméně ani v 8 mol dm^{-3} kyselině není citlivost pro obě formy stejná, neboť účinnost generování iAs(V) vztažená k signálu iAs(III) byla $96,7 \pm 2,8 \%$. Kromě toho, práce s vysokou koncentrací kyseliny by byla pro praktické analýzy nevýhodná kvůli vysokému riziku kontaminace a následnému zhoršení LOD.



Obr. 4.15 Vliv koncentrace kyseliny chlorovodíkové ve FIA uspořádání

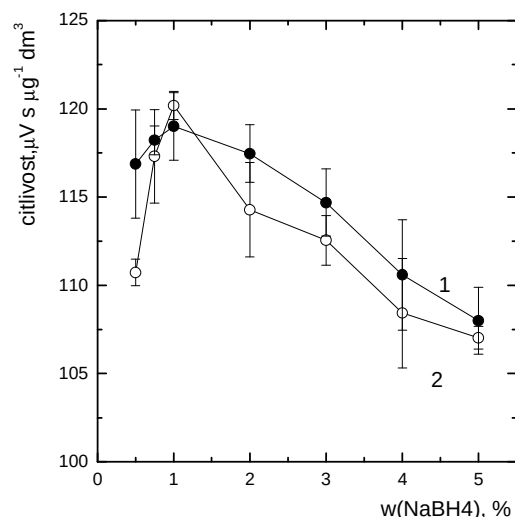
1 – iAs(III), 2 – iAs(V), atomizátor: MDF, $F(\text{Ar}_{\text{flame}}) = 600 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$, $F(\text{H}_2) = 200 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$, $F(\text{Ar}_{\text{chemifold}}) = 80 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$, $\text{OH} = 5 \text{ mm}$, $c(\text{As}) = 2 \text{ } \mu\text{g dm}^{-3}$, $w(\text{THB}) = 3 \%$, $\text{PMT} = 1400 \text{ V}$

4.2.2 Optimalizace podmínek generování v dávkovém uspořádání

Jelikož ve FIA uspořádání nebyly nalezeny podmínky, kdy by iAs(III) a iAs(V) poskytovaly stejnou citlivost stanovení, další experimenty probíhaly v dávkovém uspořádání experimentálním postupem popsáným v kapitole 3.6.2.2.

4.2.2.1 Vliv koncentrace tetrahydroborátu

Vliv koncentrace roztoku THB na generování iAs(III) a iAs(V) je znázorněna na obrázku 4.16. Jak je z tohoto obrázku patrné, tak při přívodu THB je účinnost generování iAs(V) stejná jako iAs(III) a nezávislá na koncentraci THB. Při vyšších koncentracích THB dochází k poklesu citlivosti. To je způsobeno větším množstvím vodíku, který vstupuje do atomizátoru. Vliv vodíku byl diskutován v kap. 4.1.1.3. 1% koncentrace THB byla zvolena jako optimální.

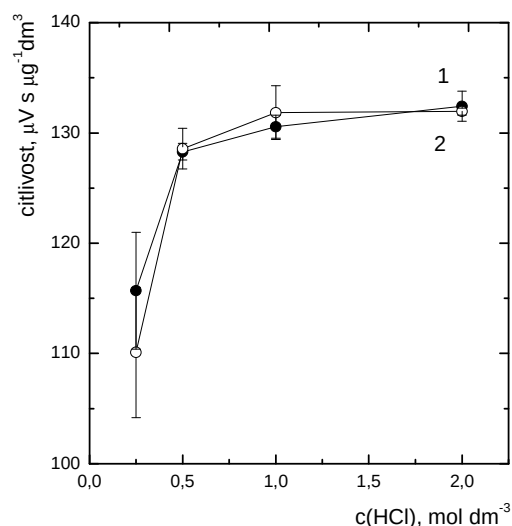


Obr. 4.16 Vliv koncentrace roztoku THB v dávkovém uspořádání

1 – iAs(III), 2 – iAs(V), atomizátor: MDF, $F(\text{Ar}_{\text{flame}}) = 530 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$, $F(\text{H}_2) = 200 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$, $F(\text{Ar}_{\text{chemifold}}) = 150 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$, $\text{OH} = 5 \text{ mm}$, $c(\text{As}) = 10 \text{ } \mu\text{g dm}^{-3}$, $c(\text{HCl}) = 6 \text{ mol dm}^{-3}$, $\text{PMT} = 1300 \text{ V}$

4.2.2.2 Vliv koncentrace kyseliny chlorovodíkové

Vliv koncentrace kyseliny chlorovodíkové na generování iAs(III) a iAs(V) je znázorněn na obrázku 4.17. Z tohoto grafu je patrné, že při dostatečném přívodu THB je účinnost generování iAs(V) stejná jako iAs(III) a nezávislá na koncentraci kyseliny chlorovodíkové. Koncentrace kyseliny chlorovodíkové 1 mol dm^{-3} byla zvolena jako optimální. Je to nejnižší koncentrace, při které bylo dosaženo maximální citlivosti.



Obr 4.17 Vliv koncentrace kyseliny chlorovodíkové v dávkovém uspořádání

1 – iAs(III), 2 – iAs(V), atomizátor: MDF, $F(\text{Ar}_{\text{flame}}) = 530 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$, $F(\text{H}_2) = 200 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$, $F(\text{Ar}_{\text{chemifold}}) = 150 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$, $\text{OH} = 5 \text{ mm}$, $c(\text{As}) = 10 \text{ } \mu\text{g dm}^{-3}$, $w(\text{THB}) = 1 \%$, $\text{PMT} = 1300 \text{ V}$

4.2.2.3 Ověření čistoty standardu iAs(V) a iAs(III)

Bylo ověřeno, jestli se v jednotlivých standardech iAs(V) a iAs(III) nacházejí jen jednotlivé specie arsenu. Výsledky jsou shrnuty v tabulce 4.6. Z této tabulky je patrné, že ve standardu iAs(III) se nacházelo $3,6 \pm 1,4 \%$ iAs(V) a ve standardu iAs(V) se nacházelo $1,1 \pm 0,1 \%$ iAs(III).

Tabulka 4.6 Ověření čistoty standardů iAs(V) a iAs(III)

	předredukce	plocha píku, mV s	vztaženo k předredukci, %
iAs(III)	ne	1139 ± 15	$96,4 \pm 1,4$
iAs(III)	ano	1182 ± 6	
iAs(V)	ne	13 ± 2	$1,1 \pm 0,1$
iAs(V)	ano	1186 ± 5	

atomizátor: MDF, $F(\text{Ar}_{\text{flame}}) = 530 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$, $F(\text{H}_2) = 200 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$, $F(\text{Ar}_{\text{chemifold}}) = 150 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$, $\text{OH} = 5 \text{ mm}$, $c(\text{As}) = 10 \text{ } \mu\text{g dm}^{-3}$, $w(\text{THB}) = 1 \%$, $c(\text{TRIS}) = 0,75 \text{ mol dm}^{-3} (\text{pH} = 6,00)$, $\text{PMT} = 1300 \text{ V}$

4.2.2.4 Generování hydridů z MMA a DMA

Bylo zkoumáno, jestli v tomto dávkovém uspořádání za takovýchto podmínek generování (kyselina chlorovodíková o koncentraci 1 mol dm^{-3} a 1% roztok THB) lze generovat i substituované hydridy arsenu MMA a DMA. Měření po předredukci v prostředí TRIS pufru bylo použito k faktorizaci standardů. Výsledky jsou shrnuty v tabulce 4.7. Z této tabulky je patrné, že citlivosti pro jednotlivé specíe arsenu jsou srovnatelné.

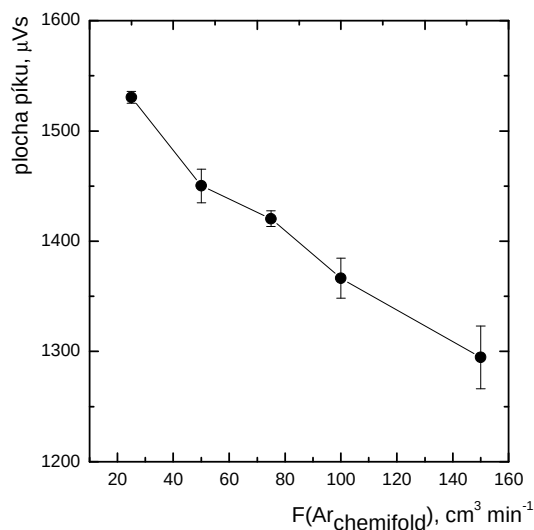
Tabulka 4.7 Generování hydridů z MMA a DMA

	citlivost, $\mu\text{Vs g}^{-1}\text{dm}^3$	vztaženo k iAs(V), %
iAs(V)	153 ± 3	
MMAs(V)	155 ± 1	$101,4 \pm 2,3$
DMAAs(V)	154 ± 1	$100,5 \pm 2,3$

atomizátor: MDF, $F(\text{Ar}_{\text{flame}}) = 530 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$, $F(\text{H}_2) = 200 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$, $F(\text{Ar}_{\text{chemifold}}) = 150 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$, OH = 5 mm, $c(\text{As}) = 10 \mu\text{g dm}^{-3}$, $w(\text{THB}) = 1 \%$, $c(\text{HCl}) = 1 \text{ mol dm}^{-3}$, $c(\text{TRIS}) = 0,75 \text{ mol dm}^{-3}$ (pH = 6,00), PMT = 1300 V

4.2.2.5 Optimalizace průtoku nosného argonu

Vliv průtoku nosného argonu na signál je znázorněn na obrázku 4.18. Je patrné, že s rostoucím průtokem nosného plynu klesá hodnota plochy píku, při nižších hodnotách průtoku nosného plynu se ale zároveň prodlužovala doba analýzy. $75 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ byl zvolen jako optimální průtok nosného argonu. Tato závislost se značně liší s měřením v kap. 4.1.1.2. Je nutné ale vzít v úvahu, že tato měření byla s jiným separátorem fází a byla použita jiná metoda generování hydridů.



Obr 4.18 Vliv průtoku nosného plynu generátorem v dávkovém uspořádání

atomizátor: MDF, $F(\text{H}_2) = 200 \text{ cm}^3 \text{min}^{-1}$, OH = 5 mm, $c(\text{iAs(V)}) = 10 \mu\text{g dm}^{-3}$,
 $w(\text{THB}) = 1 \%$, $c(\text{HCl}) = 1 \text{ mol dm}^{-3}$, PMT = 1300 V

4.2.2.6 Kalibrace

V tabulce 4.8 jsou shrnuty výsledky lineární regrese kalibračních závislostí iAs(III) a iAs(V), které byly generovány z prostředí kyseliny chlorovodíkové a TRIS pufru. V případě generování z prostředí TRIS pufru byla použita i předredukce pomocí L-cysteinu. iAs(V) bez předredukce měřen nebyl, neboť jak bylo ověřeno v kapitole 4.2.2.5 iAs(V) se v tomto prostředí negeneruje. Z této tabulky je patrné, že v případě generování z TRIS pufru je nižší mez detekce. To je pravděpodobně způsobeno tím, že kontaminace arsenem v reagentcích je z větší části ve formě iAs(V), a proto se při generování z TRIS pufru neprojeví. V případě předredukce se projeví kontaminace DIW, ve které je rozpuštěn standard, proto je v tomto případě mez detekce mírně vyšší. Vyšší hodnoty LOD než v kap. 4.1.3 jsou patrně způsobeny delší dobou integrace a také v těchto měření byly větší objemy reagentcií.

Tab. 4.8 Výsledky lineární regrese kalibrační závislosti pro jednotlivé specie

	generováno v prostředí	úsek, μVs		směrnice, $\mu\text{Vs } \mu\text{g}^{-1} \text{ dm}^3$	r	LOD, ng dm^{-3}
iAs(III)	HCl	46,5 $\pm$	5,2	300,9 $\pm$ 2,1	0,99996	15
iAs(V)	HCl	46,4 $\pm$	11,5	300,8 $\pm$ 4,6	0,99998	15
iAs(III)	TRIS	-6,1 $\pm$	4,0	289,2 $\pm$ 1,6	0,99998	5
iAs(III) + L-cys	TRIS	-2,4 $\pm$	9,4	293,1 $\pm$ 3,8	0,99995	9
iAs(V) + L-cys	TRIS	-2,7 $\pm$	8,5	294,7 $\pm$ 3,4	0,99997	9

atomizátor: FIGS, $F(\text{Ar}_{\text{flame}}) = 700 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$, $F(\text{H}_2) = 100 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$, $F(\text{Ar}_{\text{chemifold}}) = 75 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$, $F(\text{Ar}_{\text{Shield I}}) = 1,5 \text{ dm}^3 \text{ min}^{-1}$, $F(\text{Ar}_{\text{Shield II}}) = 1,5 \text{ dm}^3 \text{ min}^{-1}$, OH = 4 mm, CD = 3 mm, $c(\text{As}) = 5, 2, 1, 0,5 \mu\text{g dm}^{-3}$, $w(\text{THB}) = 1 \%$, $c(\text{HCl}) = 1 \text{ mol dm}^{-3}$, $c(\text{TRIS}) = 0,75 \text{ mol dm}^{-3}$ (pH = 6,00), PMT = 1300 V (pro slepá stanovení 1600 V)

Bylo testováno, jestli kalibrační závislosti jednotlivých specií arsenu mohou být nahrazeny jednou kalibrační závislostí. V následující tabulce 4.9 jsou shrnuty výsledky lineární regrese (všechny metody byly vztaženy na iAs(III) generované v prostředí kyseliny chlorovodíkové) a v tabulce 4.10 jsou shrnuty intervaly spolehlivosti úseků a směrnic jednotlivých závislostí. Z tabulky 4.10 je patrné, že všechny úseky obsahují hodnotu 0 ve svém intervalu spolehlivosti a že všechny směrnice (výjimkou je iAs(III) generována z prostředí TRIS pufru) obsahují ve svém intervalu spolehlivosti hodnotu 1. V případě generování iAs(III) z prostředí TRIS pufru je potřeba brát na zřetel, že standard iAs(III) obsahuje i částečně iAs(V) (viz 4.2.2.6), a proto poskytuje nižší citlivost. Tak na základě těchto výsledků můžeme nahradit kalibrační závislost pro obě formy jednou kalibrační závislostí. Za předpokladu že se signál bude korigovat na hodnotu slepého pokusu.

Tab. 4.9 Výsledky lineární regrese pro srovnání metod

	generováno v prostředí	úsek, μVs	směrnice	r
iAs(V)	HCl	-0,0700 $\pm$ 0,9776	0,9967 $\pm$ 0,0078	0,9998
iAs(III) ^a	TRIS	0,0961 $\pm$ 0,6154	0,9583 $\pm$ 0,0122	0,9998
iAs(III) + L-cys ^a	TRIS	0,7602 $\pm$ 1,9779	0,9776 $\pm$ 0,0189	0,9985
iAs(V) + L-cys ^a	TRIS	0,2065 $\pm$ 1,1244	0,9755 $\pm$ 0,0163	0,9989

^a jelikož se úseky výrazně lišily od hodnoty 0, byla od všech signálů odečtena hodnota slepého pokusu

Tab. 4.10 intervaly spolehlivosti směrnice a úseků pro srovnání metod

	generováno v prostředí	intervaly spolehlivosti			
		úsek, μVs		směrnice	
		dolní mez	horní mez	dolní mez	horní mez
iAs(V)	HCl	-1,9862	1,8461	0,9814	1,0121
iAs(III)	TRIS	-1,1101	1,3024	0,9344	0,9823
iAs(III)+ L-cys	TRIS	-3,1165	4,6369	0,9406	1,0146
iAs(V)+ L-cys	TRIS	-1,9973	2,4103	0,9436	1,0074

4.2.2.7 Odhad rychlostních konstant

Závislost vymývání hydridu z mrtvého objemu generátoru popisuje následující rovnice [7]:

$$S(t) = \frac{\beta_t c_0 V_s k_m k_r}{k_m - k_r} \{ \exp(-k_r t) - \exp(-k_m t) \} \quad (4.1)$$

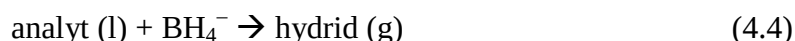
kde $S(t)$ je množství hydridu vystupujícího z generátoru, β_t je účinnost transportu hydridu do atomizátoru, V_s je objem vzorku, k_m je rychlostní konstanta popisující vymývání hydridu z mrtvého objemu generátoru, k_r je rychlostní konstanta pseudoprvního řádu uvolňování hydridu z roztoku a t je čas.

$$k_m = \frac{F(Ar_{chemifold})}{V_{dead}} \quad (4.2)$$

kde V_{dead} je mrtvý objem generátoru.

$$k_r = \frac{f_B k_2}{V_s k_1} \quad (4.3)$$

kde f_B je hmotnostní průtok THB, k_2 je rychlostní konstanta popisující rovnici 4.4 a k_1 je rychlostní konstanta rozkladu THB.



Pokud V_s , a V_{dead} budem považovat za konstanty, dostaneme rovnici:

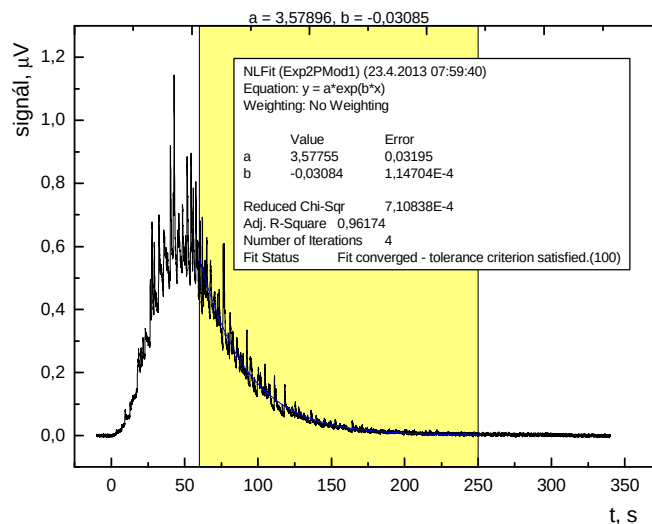
$$S(t) = A \{ \exp(-k_r t) - \exp(-k_m t) \} \quad (4.5)$$

kde A v sobě zahrnuje všechny ostatní konstanty a v případě kdy $k_m \gg k_r$ a zároveň $t \gg 1$ tak lze část rovnice zanedbat a dostaneme:

$$S(t) = A \exp(-k_r t) \quad (4.6)$$

podmínka $k_m \gg k_r$ bude splněna při vyšších průtocích nosného plynu generátorem, pak lze část záznamu signálu proložit funkcí $y = A \exp(Bx)$. Aby toto bylo možné záznam touto funkcí proložit, bylo nutné ode všech hodnot signálu odečíst hodnotu základní

linie a osu x posunut na začátek přidávání THB. Záznamy byly proloženy touto funkcí v programu OriginPro viz obrázek 4.19. Koeficienty nelineární regrese jsou uvedeny v tabulce 4.11.



Obr 4.19 Záznam iAs(V) proložen funkcí $y = A \exp(Bt)$

Tab. 4.11 Koeficienty nelineární regrese

	iAs(III)	iAs(V)
A	3,086 ± 0,088	3,086 ± 0,045
B	-0,03613 ± 0,00021	-0,03085 ± 0,00028

Z rovnice 4.6 je patrné, že $B = -k_m$ a z rovnice 4.3 lze spočítat poměr k_2/k_1 . Poměr k_2/k_1 pro iAs(III) vyšel **0,0119 ± 0,0015** a pro iAs(V) **0,0102 ± 0,0013**. Jelikož objem vzorku nezůstane po celou dobu generování konstantní, tak výsledný poměr k_2/k_1 byl spočten jako průměr ze dvou různých hodnot V_s (5 a 6 cm³ jsou objemy vzorku, které byly v generátoru v čase, kdy začíná proložení záznamu funkcí a kdy má funkce ještě nenulovou hodnotu; jako neurčitost je zde uvedena směrodatná odchylka z těchto dvou hodnot). Z výše uvedených výsledků lze ještě spočítat vzájemný poměr k_2 pro iAs(V) a iAs(III), který vyšel **0,854 ± 0,009**.

Z poměru konstant k_2/k_1 lze vypočítat frakci analytu, který se uvolnění z roztoku ve formě hydridu [7]:

$$\beta_r = 1 - \exp\left(-q \frac{k_2}{k_1}\right) \quad (4.7)$$

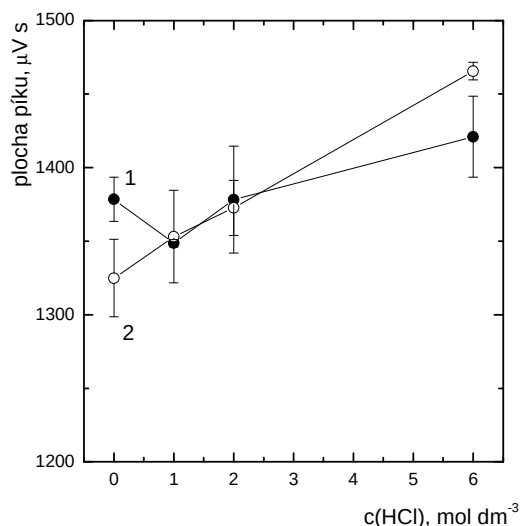
kde β_r je účinnost která vyjadřuje frakci analytu, který se z roztoku uvolní ve formě hydridu a q je hmotnost přidaného THB vztažená na objem vzorku. Jelikož objem vzorku nezůstane po celou dobu generování konstantní, tak výsledná účinnost β_r byla spočtena jako průměr ze dvou různých hodnot V_s (4 a 9 cm³ jsou objemy vzorku, které byly na počátku a na konci generování). Účinnost β_r pro iAs(III) vyšla **99,6 ± 0,6 %** a pro iAs(V) **99,1 ± 1,2 %**.

4.2.3 Optimalizace podmínek generování v dávkovém uspořádání s předrozkladem tetrahydroboratu

Jelikož v dávkovém uspořádání v prostředí kyseliny chlorovodíkové nebyly nalezeny podmínky, kdy by se iAs(V) negenerovala, byla testována hypotéza, že ke generování iAs(V) je zapotřebí přímo ion BH_4^- nebo jeden z prvních rozkladných produktů THB. To by vysvětlovalo, proč v kontinuálním generování s diskontinuálním odtahem nebylo možné dosáhnout stejné účinnosti generování pro iAs(III) a iAs(V). Následující experimenty probíhaly v dávkovém uspořádání experimentálním postupem popsáným v kapitole 3.6.2.3.

4.2.3.1 Vliv koncentrace kyseliny chlorovodíkové bez přítomnosti předrozkladové cívky

Vliv koncentrace kyseliny chlorovodíkové, která reagovala s THB před vstupem do separátoru fází, na generování iAs(III) a iAs(V) je znázorněn na obrázku 4.20. Z této závislosti je patrné, že při dostatečně dlouhém přívodu THB nemá koncentrace kyseliny vliv na účinnost generování jednotlivých specií. Postupný nárůst signálu je pravděpodobně způsoben kontaminací, protože při použití vyšších koncentrací kyseliny bylo doba generování výrazně delší a tím pádem i větší množství reagentů se dostalo do generátoru.

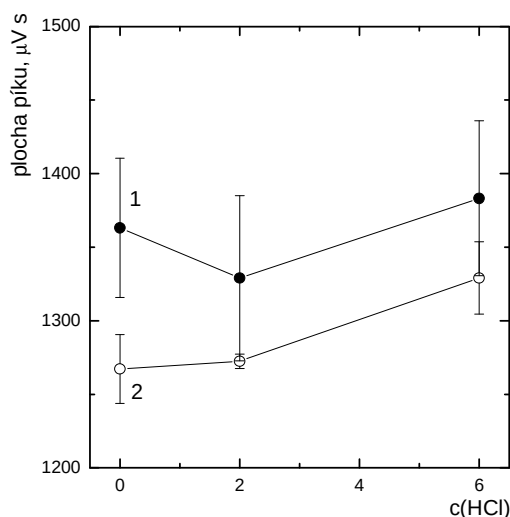


Obr. 4.20 Vliv koncentrace kyseliny reagující s THB před vstupem do generátoru bez předrozkладové cívky

1 – iAs(III), 2 – iAs(V), atomizátor: MDF, $F(\text{Ar}_{\text{flame}}) = 530 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$, $F(\text{H}_2) = 200 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$, $F(\text{Ar}_{\text{chemifold}}) = 150 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$, OH = 5 mm, PMT = 1400 V, $c(\text{iAs(V)}) = 10 \text{ } \mu\text{g dm}^{-3}$, $w(\text{THB}) = 1 \%$, $c(\text{HCl}) = 1 \text{ mol dm}^{-3}$, PMT = 1300 V

4.2.3.2 Vliv koncentrace kyseliny chlorovodíkové s předrozkладovou cívkou

Vliv koncentrace kyseliny chlorovodíkové, která reagovala s THB před vstupem do generátoru, na generování iAs(III) a iAs(V) je znázorněn na obrázku 4.21. Z této závislosti je patrné, že při dostatečně přívodu THB nemá koncentrace kyseliny vliv na účinnost generování jednotlivých specií. Předrozkладová cívka prodloužila dobu reakce mezi kyselinou a THB před vstupem do generátoru, což vedlo k prodloužení doby generování.



Obr 4.21 Vliv koncentrace kyseliny reagující s THB před vstupem do generátoru s předrozkladovou cívkou

1 – iAs(III), 2 – iAs(V), atomizátor: MDF, $F(\text{Ar}_{\text{flame}}) = 530 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$, $F(\text{H}_2) = 200 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$, $F(\text{Ar}_{\text{chemifold}}) = 150 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$, OH = 5 mm, PMT = 1400 V, $c(\text{iAs(V)}) = 10 \text{ } \mu\text{g dm}^{-3}$, $w(\text{THB}) = 1 \%$, $c(\text{HCl}) = 1 \text{ mol dm}^{-3}$, PMT = 1300 V

Experimenty popsané v 4.2.3.1 a 4.2.3.2 tedy ukazují, že ke konverzi iAs(V) na hydrid dochází i v situacích, kdy ion BH_4^- již přešel na některý ze svých hydrolytických produktů (viz kap. 2.4). To má důležité konsekvence pro speciální analýzu iAs(V)/ iAs(III) založenou na selektivním generování hydridů: naznačuje, že v prostředí kyseliny chlorovodíkové nelze najít podmínky, za kterých by docházelo ke konverzi iAs(III) na hydrid a současně by nedocházelo ke konverzi iAs(V) na hydrid.

4.2.4 Měření ve FIA uspořádání s modifikací separátoru fází

V dávkové uspořádání s předrozkladem THB (popsané v kapitole 4.2.3) bylo možné generovat iAs(V) se stejnou účinností jako iAs(III) a ve FIA uspořádání (popsané v kapitole 4.2.1) se toto nepodařilo. Tyto experimenty jsou ve vzájemném rozporu, neboť po tom co se ve FIA uspořádání dostane analyt, který nestihne zreagovat v reakční cívce, do separátoru fází, tak další přívod směsi THB s kyselinou je defacto stejný jako u dávkového uspořádání s předrozkladem THB. Proto byl separátor fází

upraven tak aby směs kyseliny chlorovodíkové a THB byla přidávána na dno separátoru fází, nikoliv do mrtvého objemu separátoru fází jak je to obvyklé [7]. Zároveň musel být $Ar_{\text{chemifold}}$ zaveden jiným kanálem do mrtvého objemu separátoru fází. Měření probíhala podle postupu popsaného v kapitole 3.6.2.4. Cílem těchto experimentů bylo nalézt podmínky, při kterých by se $iAs(V)$ generoval se stejnou citlivostí jako $iAs(III)$ i v kontinuálním generování s kontinuálním odtahem, kde je výrazně kratší doba analýzy než v dávkovém uspořádání.

Nejprve bylo změřeno, jestli v tomto uspořádání je možno vygenerovat $iAs(V)$ se stejnou účinností jako $iAs(III)$ z prostředí 1 mol dm^{-3} kyseliny chlorovodíkové pomocí 1% roztoku THB při kontinuálním generování s diskontinuálním odtahem. To se potvrdilo účinnost citlivost generování $iAs(V)$ vztažená k $iAs(III)$ byla **$98,4 \pm 1,3 \%$** . Doba generování pro $iAs(III)$ byla 400 s a pro $iAs(V)$ byla 600 s.

Jelikož doba generování byla příliš dlouhá, byly na základě předchozích měření zvoleny podmínky generování z prostředí 6 mol dm^{-3} kyseliny chlorovodíkové pomocí 4% roztoku THB, čímž se zkrátila doba generování na 180 s pro obě. Citlivost generování $iAs(V)$ vztažená k $iAs(III)$ byla **$102,1 \pm 2,1 \%$** .

Následně byly prováděny experimenty při kontinuálním generování a kontinuálním odtahem za podmínek generování z prostředí 6 mol dm^{-3} kyseliny chlorovodíkové pomocí 4% roztoku THB. Doba generování pro obě specie byla 180 s a citlivost generování $iAs(V)$ vztažená k $iAs(III)$ byla **$96,2 \pm 0,7 \%$** .

5. Závěr

Předložená diplomová práce byla věnována možnostem speciální analýzy arsenu, založené na selektivním generování hydridů a detekci atomovou fluorescenční spektrometrií.

Úkolem v první části práce bylo optimalizovat a porovnat dva atomizátory pro atomovou fluorescenční spektrometrii. Na základě optimalizace všech relevantních experimentálních parametrů obou atomizátorů bylo zjištěno, že za stejných podmínek generování vykazuje FIGS přibližně dvakrát vyšší citlivost a přibližně čtyřikrát nižší mez detekce.

Další část práce byla věnována fungování jednotlivých přístupů k uspořádání generátoru hydridů a optimalizaci těchto uspořádání pro speciální analýzu tří- a pětimocných anorganických forem arsenu a jeho pětimocných methylovaných metabolitů. Bylo zjištěno, že v dávkovém uspořádání generování hydridů při dostatečně dlouhém přidávání roztoku tetrahydroboratu, se obě anorganické formy arsenu generují se stejnou účinností nezávisle na koncentraci kyseliny a koncentraci tetrahydroboratu, pokud bude množství kyseliny takové, aby mohl zreagovat veškerý přidaný tetrahydroborat. Jelikož v dávkovém uspořádání nebylo možné najít podmínky, kdy by se z kyseliny chlorovodíkové a tetrahydroboratu generovala jen jedna forma arsenu, byly pro stanovení jedné formy arsenu použity podmínky generování z TRIS pufru známé z literatury. Dále bylo zjištěno, že pokud se udělá menší úprava v separátoru fází, je možné generovat obě anorganické formy arsenu se stejnou účinností i v uspořádání průtokové injekční analýzy, což má velký praktický význam, protože to zkrátí a zjednoduší analýzu. Meze detekce nalezené v této práci jsou několikrát nižší než hodnoty publikované u jiných metod.

Citovaná literatura

- [1] Sychra, V.; Svoboda V.; Rubeška I.: *Atomic Fluorescence Spectroscopy*. London, Van Nostrand Reinhold Company 1975.
- [2] Feng, L.; Liu, J.: Solid sampling graphite fibre felt electrothermal atomic fluorescence spectrometry with tungsten coil atomic trap for the determination of cadmium in food samples. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **25**:7, 1072–1078 (2010).
- [3] Dědina, J.: Atomization of volatile compounds for atomic absorption and atomic fluorescence spectrometry: on the way towards the ideal atomizer. *Spectrochimica Acta, Part B: Atomic Spectroscopy* **62B**:9, 846–872 (2007).
- [4] Marsh, J.: Account of a method of separating small quantities of arsenic from substances with which it may be mixed. *Edinburgh New Philosophical Journal* **21**, 229–236 (1836).
- [5] Holak, W: Gas-sampling technique for arsenic determination by atomic absorption spectrophotometry. *Analytical Chemistry* **41**:12, 1712–1713 (1969).
- [6] Dědina, J.: Generation of Volatile Compounds for Analytical Atomic Spectroscopy. In: *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. Meyers, R.A. (ed.). Chichester: John Wiley and Sons Ltd., 2010, p. 1–39.
- [7] Dědina, J.; Tsalev, L. D.: *Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry*. Chichester, Wiley 1995.
- [8] Leopold, K.; Foulkes, M; Worsfold, P.: Methods for the determination and speciation of mercury in natural waters—A review. *Analytica Chimica Acta*. **663**:2, 127–138 (2010).
- [9] Robbins, W. B.; Caruso, J. A.: Development of hydride generation methods for atomic spectroscopic analysis. *Analytical Chemistry*. **51**:8, 889A–899A (1979). *CA* **91**:82407.
- [10] D’Ulivo, A.: Chemical vapor generation by tetrahydroborate(III) and other borane complexes in aqueous media A critical discussion of fundamental processes and mechanisms involved in reagent decomposition and hydride formation. *Spectrochimica Acta, Part B: Atomic Spectroscopy*. **59B**:6, 793–825 (2004).
- [11] Feng, Y. L.; Sturgeon, R. E; Lam, J. W.: Generation of Atomic and Molecular Cadmium Species from Aqueous Media. *Analyst*. **126**:3, 635–640 (2001).

- [12] Musil, S.; Kratzer, J.; Vobecký, M.; Hovorka, J.; Benada, O.; Matoušek, T.: Chemical vapor generation of silver for atomic absorption spectrometry with the multiatomizer: Radiotracer efficiency study and characterization of silver species. *Spectrochimica Acta, Part B: Atomic Spectroscopy*. **64B**:11–12, 1240–1247 (2009).
- [13] Feng, Y. L.; Sturgeon, R. E.; Lam, J. W.; D'Ulivo, A.: Insights into the mechanism of chemical vapor generation of transition and noble metals. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. **20**:4, 255–265 (2005).
- [14] Laborda, F.; Bolea, E.; Castillo, J. R.: Electrochemical hydride generation as a sample-introduction technique in atomic spectrometry: Fundamentals, interferences, and applications. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **388**:4, 743–751 (2007).
- [15] He, Y.; Hou, X.; Zheng, C.; Sturgeon, R. E.: Critical evaluation of the application of photochemical vapor generation in analytical atomic spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **388**:4, 769–774 (2007).
- [16] Petrov P. K.; Serafimovski, I.; Stafilov, T.; Tsalev, L. D.: Flow injection hydride generation electrothermal atomic absorption spectrometric determination of toxicologically relevant arsenic in urine. *Talanta*, **69**:5, 1112–1117 (2006)
- [17] Ebdon, L.; Wilkinson, J. R.; Jackson, K. W.: A simple and sensitive continuous hydride generation system for the determination of arsenic and selenium by atomic absorption and atomic fluorescence spectrometry. *Analytica Chimica Acta*. **136**, 191–199 (1982). *CA* **96**:210044.
- [18] Dědina, J.; D'Ulivo, A.; Lampugnani, L.; Matoušek, T.; Zamboni, R.: Selenium hydride atomization, fate of free atoms, and spectroscopic temperature in miniature diffusion flame atomizer studied by atomic absorption spectrometry. *Spectrochimica Acta, Part B: Atomic Spectroscopy*. **53B**:13, 1777–1790 (1998).
- [19] Matoušek, T.; Dědina, J.; Frech, W.: On-line atomization of selenium hydride in graphite furnaces: mechanism and interferences. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. **17**:10, 1323–1329 (2002).
- [20] Dědina, J.; Welz, B.: Quartz tube atomizers for hydride generation atomic absorption spectrometry: mechanism for atomization of arsine. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. **7**:2, 307–314 (1992).

- [21] Dědina, J.; D'Ulivo, A.; Lampugnani, L.; Matoušek, T.; Zamboni, R.: Selenium hydride atomization, fate of free atoms, and spectroscopic temperature in miniature diffusion flame atomizer studied by atomic absorption spectrometry. *Spectrochimica Acta, Part B: Atomic Spectroscopy*. **53B**:13, 1777–1790 (1998).
- [22] Dědina, J.; D'Ulivo, A.: Argon shielded, highly fuel-rich, hydrogen-oxygen diffusion microflame a new hydride atomizer. *Spectrochimica Acta, Part B: Atomic Spectroscopy*. **52B**:12, 1737–1746 (1997).
- [23] D'Ulivo, A.; Dědina, J.; Lampugnani, L.; Matoušek, T.: Mechanism of selenium hydride atomization, fate of free atoms and temperature distribution in an argon shielded, highly fuel-rich, hydrogen-oxygen diffusion micro-flame studied by atomic absorption spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. **17**:3, 253–257 (2002).
- [24] Greenwood, N. N.; Earnshaw, A.: *Chemistry of the Elements, Second Edition*. Oxford, Butterworth-Heinemann 1997.
- [25] Agency for Toxic Substances and Disease Registry: *Toxicological profile for arsenic*. Dostupné z URL: < <http://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/tp2.pdf> > [cit. 6.5.2013]
- [26] Liu, J.; Lu, Y.; Wu, Q.; Goyer, R. A.; Waalkes, M. P.: Mineral arsenicals in traditional medicines: orpiment, realgar, and arsenolite. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. **236**:2, 363–368 (2008).
- [27] Levvy, G. A.: The toxicity of arsine administered by intraperitoneal injection. *British Journal of Pharmacology and Chemotherapy*. **1**, 287–290 (1946).
- [28] Templeton, D. M.; Ariese, F.; Cornelis, R.; Danielsson, L. G.; Muntau, H.; Van Leeuwen, H. P.; Lobinski, R.: Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. *Pure and Applied Chemistry*. **72**:8, 1453–1470 (2000).
- [29] Chapman, A. C.: The presence of compounds of arsenic in marine crustaceans and shell fish. *Analyst*. **51**, 548–563 (1926). *CA* **21**:4857.
- [30] Francesconi, K. A.; Kuehnelt, D.: Determination of arsenic species: A critical review of methods and applications, 2000-2003. *Analyst*. **129**:5, 373–395 (2004).
- [31] Braman, R. S.; Foreback, C. C.: Methylated forms of arsenic in the environment. *Science*. **182**:4118, 1247-1249 (1973). *CA* **80**:116764.

- [32] Dědina, J.: Atomové absorpční a fluorescenční detektory pro speciální analýzu založenou na generované těkavých sloučenin. In: *Inovace v atomové absorpční a fluorescenční spektroskopii*. Dědina, J. (ed.). Praha, 2007, p. 105–124. Dostupné z URL: < <http://www.vscht.cz/anl/paci/PAC/prezentace/Inovace.pdf> > [cit. 6.5.2013]
- [33] Vohlídal, J.; Julák, A.; Štulík, K.: *Chemické a analytické tabulky*. Praha, Grada Publishing 1999.
- [34] Howard, A. G.: (Boro)hydride techniques in trace element speciation. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. **12**:3, 267–272 (1997).
- [35] Chen, H.; Brindle, I. D.; Le, X. C.: Prereduction of arsenic(V) to arsenic(III), enhancement of the signal, and reduction of interferences by L-cysteine in the determination of arsenic by hydride generation. *Analytical Chemistry*. **64**:6, 667–672 (1992)
- [36] Matoušek, T.; Hernandez-Zavala, A.; Svoboda, M.; Langrová, L.; Adair, B. M.; Drobná, Z.; Thomas, D. J.; Stýblo, M.; Dědina, J.: Oxidation state specific generation of arsines from methylated arsenicals based on L-cysteine treatment in buffered media for speciation analysis by hydride generation-automated cryotrapping-gas chromatography-atomic absorption spectrometry with the multiatomizer. *Spectrochimica Acta, Part B: Atomic Spectroscopy*. **63B**:3, 396–406 (2008).
- [37] Welz, B.; Šucmanová, M.: L-Cysteine as a reducing and releasing agent for the determination of antimony and arsenic using flow injection hydride generation atomic absorption spectrometry. Part 2. Interference studies and the analysis of copper and steel. *Analyst*. **118**:11, 1425–1432 (1993).
- [38] Shraim, A.; Chiswell, B.; Olszowy, H.: Speciation of arsenic by hydride generation-atomic absorption spectrometry (HG-AAS) in hydrochloric acid reaction medium. *Talanta*. **50**:5, 1109–1127 (1999).
- [39] Gomez-Ariza, J. L.; Sanchez-Rodas, D.; Giraldez, I.; Morales, E.: A comparison between ICP-MS and AFS detection for arsenic speciation in environmental samples. *Talanta*. **51**:2, 257–268 (2000).

- [40] Casiot, C.; Donard, O. F. X.; Potin-Gautier, M.: Optimization of the hyphenation between capillary zone electrophoresis and inductively coupled plasma mass spectrometry for the measurement of As-, Sb-, Se- and Te-species, applicable to soil extracts. *Spectrochimica Acta, Part B: Atomic Spectroscopy*. **57B**:1, 173–187 (2002).
- [41] ČR PV 2012-398. Dědina, J., Musil, S. a D'Ulivo, A.: Dvoukanálová stínicí jednotka atomizátoru pro atomovou fluorescenční spektrometrii. 14.6.2012.
- [42] Miller, J. N.; Miller, J. C.: *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry, Fifth edition*. Harlow,; Pearson Education Limited 2005.
- [43] EURACHEM and CITAC: *Guide to Quality in Analytical Chemistry An Aid to Accreditation*. Dostupné z URL: <http://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/CITAC_EURACHEM_GUIDE.pdf> [cit. 6.5.2013]
- [44] Kratzer, J.; Dočekal, B.; Heitmann, U.; Dědina, J.: Spectral interferences of oxygen and water molecules in hydride generation atomic absorption spectrometry with quartz atomizers: Comparison of preconcentration and on-line atomization modes for As and Se determination. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. **26**:11, 2230–2237 (2011).
- [45] Qiu, Y.: HG–AFS determination of trace amounts of As and Se in water. *Guangzhou Huagong*. **40**:14, 133–134 (2012). *CA* **2012**:1681448 .
- [46] Li, Q; Wang, J.: Determination of trace As and Se in water by AFS-930 atomic fluorescence spectrometer. *Tianjin Huagong*. **26**:3, 38–41 (2012). *CA* **157**:446679.
- [47] Lue, Y.; Sun, H.; Yuan, C.; Yan, X.: Simultaneous Determination of Trace Cadmium and Arsenic in Biological Samples by Hydride Generation-Double Channel Atomic Fluorescence Spectrometry. *Analytical Chemistry*. **74**:7, 1525–1529 (2002). *CA* **136**:179995