UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza

Bc. Marta Kolrosová

Generování hydridu bismutu pro atomovou absorpční a fluorescenční spektrometrii

Hydride generation of bismuth for atomic absorption and fluorescence spectrometry

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Stanislav Musil, Ph.D.

Konzultanti: RNDr. Jakub Hraníček, Ph.D.

Mgr. Barbora Štádlerová

Praha 2019

Prohlášení

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

Jsem si vědoma 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

Abstrakt

Tato diplomová práce se zabývá optimalizací podmínek chemického generování hydridů (HG) bismutu, jejich atomizací a detekcí atomovou absorpční spektrometrií (AAS) a atomovou fluorescenční spektrometrií (AFS). K atomizaci hydridu bismutu pro AAS byl použit miniaturní difúzní plamen (MDF), zatímco pro AFS byl použit jak MDF, tak tzv. „flame-in-gas-shield“ (FIGS) atomizátor. Nejprve byly hledány optimální podmínky HG v režimu injekční průtokové analýzy. Jednalo se o koncentraci kyseliny chlorovodíkové, koncentraci tetrahydridoboritanu sodného a objem reakční cívky. Následně byly optimalizovány parametry ovlivňující atomizaci a detekci volných atomů v obou plamenových atomizátorech, kterými byly frakce vodíku, celkový průtok plynů a pozorovací výška. Z důvodu složitější konstrukce byl ve FIGS atomizátoru navíc studován vliv dalších parametrů, např. průtok kyslíku zaváděného kapilárou a průtoky stínicích plynů potřebných pro stínění volných atomů. Zvláštní část práce byla také věnována optimalizaci optické cesty atomového fluorescenčního spektrometru, výběru interferenčního filtru a optimalizaci napájecího proudu bezelektrodové výbojky. Při zvolených optimálních podmínkách generování, atomizace i detekce bylo zjištěno, že s oběma atomizátory lze s AFS dosáhnout vynikajících mezí detekce (2,3 pg cm^{-3} pro MDF a 1,6 pg cm^{-3} pro FIGS atomizátor) a vynikající opakovatelnosti (pod 1 %). Správnost metody HG-AFS s MDF i FIGS atomizátorem byla ověřena stanovením koncentrace bismutu v certifikovaném referenčním materiálu vody NIST 1643f s relativně dobrou shodou výsledků.

Klíčová slova: bismut, chemické generování hydridů, miniaturní difúzní plamen, flame-in-gas-shield atomizátor, atomová absorpční spektrometrie, atomová fluorescenční spektrometrie.

Abstract

This master's thesis deals with the optimization of conditions of chemical hydride generation (HG) of bismuth, its atomization and detection by atomic absorption spectrometry (AAS) and atomic fluorescence spectrometry (AFS). Two types of atomizers were used for atomization of volatile species, a miniature diffusion flame for AAS as well as for AFS and a flame-in-gas-shield atomizer for AFS. At first, the parameters of HG in a flow injection mode were optimized – the concentration of hydrochloric acid, the concentration of sodium borohydride and the volume of the reaction coil. Subsequently, the atomization conditions were optimized using both atomizers. The parameters optimized were hydrogen fraction, total gas flow rate and observation height. Due to the more complicated construction of the FIGS atomizer, more parameters were studied, such as the oxygen flow rate through the capillary and the flow rate of shielding argon required for shielding the free atoms. A special part of the thesis dealt with the optimization of the optical path of the atomic fluorescence spectrometer, the selection of an interference filter and the optimization of a power supply of an electrodeless discharge lamp. It was found that under optimum conditions of generation, atomization and detection excellent detection limits (2,3 pg cm^{-3} for MDF and 1,6 pg cm^{-3} for FIGS atomizer) and excellent repeatability (below 1%) were obtained for both atomizers. The accuracy of HG-AFS method with both MDF and FIGS atomizers was verified by determination of bismuth in the certified reference material of water NIST 1643f with a relatively good agreement of the results.

Keywords: bismuth, chemical hydride generation, miniature diffusion flame, flame-in-gas-shield atomizer, atomic absorption spectrometry, atomic fluorescence spectrometry.

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému vedoucímu RNDr. Stanislavu Musilovi, Ph.D. za odborné rady, trpělivost a nápomoc při měření i při písemném zpracování této práce. Dále bych chtěla poděkovat svým konzultantům RNDr. Jakubovi Hraníčkovi, Ph.D. a Mgr. Barboře Štádlerové za rady a nápomoc při měření. Také bych chtěla poděkovat ostatním členům oddělení stopové prvkové analýzy Ústavu analytické chemie AV ČR.

Děkuji výzkumnému záměru Ústavu analytické chemie AV ČR (RVO: 68081715) a grantu GA ČR (17-04329S) za finanční podporu.

Seznam zkratek

A	absorbance
AAS	atomová absorpční spektrometrie
AFS	atomová fluorescenční spektrometrie
c	molární koncentrace
CD	vzdálenost kapiláry od ústí vertikální trubice
CFA	kontinuální průtoková analýza
CH-VSG	chemické generování těkavých specií
DIW	deionizovaná voda
EC-VSG	elektrochemické generování těkavých specií
EDL	bezelektrodová výbojka
EHQTA	externě vyhřívaný křemenný atomizátor
ETA-AAS	atomová absorpční spektrometrie s elektrotermickou atomizací
F	průtoková rychlost
F-AAS	atomová absorpční spektrometrie s plamenovou atomizací
FIA	průtoková injekční analýza
FIGS	"flame-in-gas-shield" atomizátor
FIT	plamínek v křemenné trubici
FWHM	šířka píku změřená v polovině jeho výšky
H	výška signálu
HCL	výbojka s dutou katodou
HG	generování hydridů
HG-AAS	generování hydridů ve spojení s atomovou absorpční spektrometrií
HG-AFS	generování hydridů ve spojení s atomovou fluorescenční spektrometrií
ICP	indukčně vázáné plazma
ICP-MS	hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem

ICP-OES	optická emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem
LOD	mez detekce
LOQ	mez stanovitelnosti
MDF	miniaturní difúzní plamen
MMQTA	multiatomizátor
OH	pozorovací výška
PA	plocha píku
PMT	fotonásobič
P-VSG	fotochemické generování těkavých specií
sd	směrodatná odchylka
s_r	relativní směrodatná odchylka
s/n	signál/šum
t	čas
UV	ultrafialové
VSG	generování těkavých specií
VSG-AAS	generování těkavých specií ve spojení s atomovou absorpční spektrometrií
$\bar{x}$	aritmetický průměr

Obsah

1. TEORETICKÁ ČÁST 10
1.1 Bismut 10
1.2 Atomová absorpční spektrometrie 11
1.2.1 Zdroje záření 11
1.2.1.1 Výbojky s dutou katodou (HCL) 11
1.2.1.2 Bezelektrodové výbojky (EDL) 12
1.2.1.3 Výbojky s vysokou září 12
1.2.1.4 Kontinuální zdroje záření 13
1.2.2 Atomizace 14
1.2.2.1 Miniaturní difúzní plamen (MDF) 14
1.2.2.2 Křemenný atomizátor (QTA) 15
1.2.2.3 Plazmový atomizátor s dielektrickou bariérou (DBD) 15
1.2.3 Optický systém 16
1.3 Atomová fluorescenční spektrometrie 16
1.3.1 Atomizace 17
1.3.1.1 „Flame-in-gas-shield“ atomizátor (FIGS) 17
1.3.2 Optický systém a detektor 18
1.4 Techniky generování těkavých specií 19
1.4.1 Chemické generování 19
1.4.2 Elektrochemické generování 20
1.4.3 Fotochemické generování 20
1.5 Uspořádání generátoru 21
1.5.1 Průtoková injekční analýza 21
1.5.2 Kontinuální průtoková analýza 22
1.5.3 Dávkové uspořádání 22
1.5.4 Separátor fází 22
2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST 24
2.1 Použité chemikálie 24
2.2 Příprava reagencií 24
2.3 Použité přístroje 25
2.3.1 AAS 25
2.3.2 AFS 25

2.4 Generátor hydridů 26
2.5 Atomizátory 27
2.6 Zpracování naměřených dat 30
2.6.1 Zpracování signálu a software 30
2.6.2 Statistické vyhodnocení výsledků 31
3 VÝSLEDKY A DISKUZE 34
3.1 HG-AAS s MDF 34
3.1.1 Podmínky generování bismutanu 34
3.1.2 Podmínky atomizace v MDF 37
3.1.2.1 Vliv vodíku 37
3.1.2.2 Vliv celkového průtoku plynů a pozorovací výšky 38
3.1.3 Analytické charakteristiky HG-AAS s MDF 40
3.2 HG-AFS s MDF 41
3.2.1 Optimalizace optické cesty AFS a EDL zdroje 41
3.2.2 Podmínky atomizace v MDF 43
3.2.2.1 Vliv vodíku 43
3.2.2.2 Vliv celkového průtoku plynů a pozorovací výšky 43
3.2.3 Analytické charakteristiky pro HG-AFS s MDF 46
3.3 HG-AFS s FIGS 47
3.3.1 Podmínky atomizace ve FIGS atomizátoru 47
3.3.1.1 Vliv vodíku 47
3.3.1.2 Vliv celkového průtoku plynů a pozorovací výšky 48
3.3.1.3 Vliv vzdálenosti kapiláry 50
3.3.1.4 Vliv průtoku kyslíku 50
3.3.1.5 Vliv průtoku stínicích plynů 51
3.3.1.6 Shrnutí podmínek atomizace ve FIGS atomizátoru s detekcí AFS. 52
3.3.2 Analytické charakteristiky HG-AFS s FIGS atomizátorem 53
3.4 Certifikovaný referenční materiál 54
3.5 Porovnání analytických charakteristik 54
4. ZÁVĚR 56
5. ZDROJE 58

1. TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Bismut

Bismut je prvek s protonovým číslem 83. První záznamy o bismutu jsou známy již z počátku 15. století, ovšem jako prvek byl izolován až v 18. století v roce 1739 chemiky J. H. Pottem a T. O. Bergmanem. Svůj název dostal až v roce 1753, pojmenován byl francouzským vědcem C. Geoffroym. Původ názvu pochází z německého weisse masse - bílá hmota - "wissmut". Bismut je kov bílé až načervenalé barvy. V zemské kůře není hojně zastoupen, nejčastěji se v přírodě vyskytuje ve formě oxidu (Bi_2O_3), uhličitanu ($(BiO)_2CO_3$) nebo sulfidu (Bi_2S_3) [1–3].

Sloučeniny bismutu se používají k léčbě gastrointestinálních poruch a mohou také být užitečné pro léčbu jiných nemocí. Bismut je málo toxický prvek - ve vyšších dávkách u organismu způsobuje nefrotoxicitu, hepatotoxicitu a encefalopatii. Akutní otravy bismutem jsou obdobné jako otravy olovem, šedý lem na dásních [1,4–6].

Biochemická transformace bismutu vede ke vzniku těkavých alkylovaných sloučenin. Zatímco anorganické formy bismutu vykazují relativně nízkou toxicitu, proces biomethylace zvyšuje jeho mobilitu, biologickou dostupnost a toxicitu [7,8].

Bismut je využívaný v různorodých oblastech, jako jsou polovodičové součástky, baterie, kosmetické produkty, léčiva [9].

Ke stanovení bismutu se využívají metody atomové absorpční spektrometrie (AAS) a atomové fluorescenční spektrometrie (AFS) ve spojení s generováním hydridů (HG), optická emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-OES) nebo hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS) [10,11].

Detekce bismutu pomocí plamenové emisní spektrometrie je velmi obtížná, neboť nejcitlivější rezonanční čára při 306,8 nm je silně ovlivněna emisními pásy hydroxylových skupin. Optimální absorpční čára volných atomů Bi používaná v AAS je při 223,1 nm, kterou lze využít i pro měření fluorescenčního přechodu v AFS [10–12].

1.2 Atomová absorpční spektrometrie

Atomová absorpční spektrometrie (AAS) je analytická metoda založená na absorpci záření volnými atomy v plynném stavu. Tyto atomy vznikající v atomizátorech absorbují fotony o určité energii a vlnové délce [13,14].

Instrumentace v AAS se skládá ze zdroje záření, absorpčního prostředí (atomizátoru), monochromátoru, detektoru a vyhodnocovacího zařízení. Záření ze zdroje prochází atomizátorem, optickou soustavou, kde dochází k fokusaci paprsku do disperzního prvku. V monochromátoru dochází k výběru rozmezí vlnových délek záření, které dále dopadá na detektor. Měří se úbytek intenzity záření a měřená veličina se nazývá absorbance. AAS je selektivní metoda s vysokou citlivostí. Mezi hlavní přednosti patří její nízké pořizovací náklady oproti ostatním metodám stopové a ultrastopové prvkové analýzy [13,15].

1.2.1 Zdroje záření

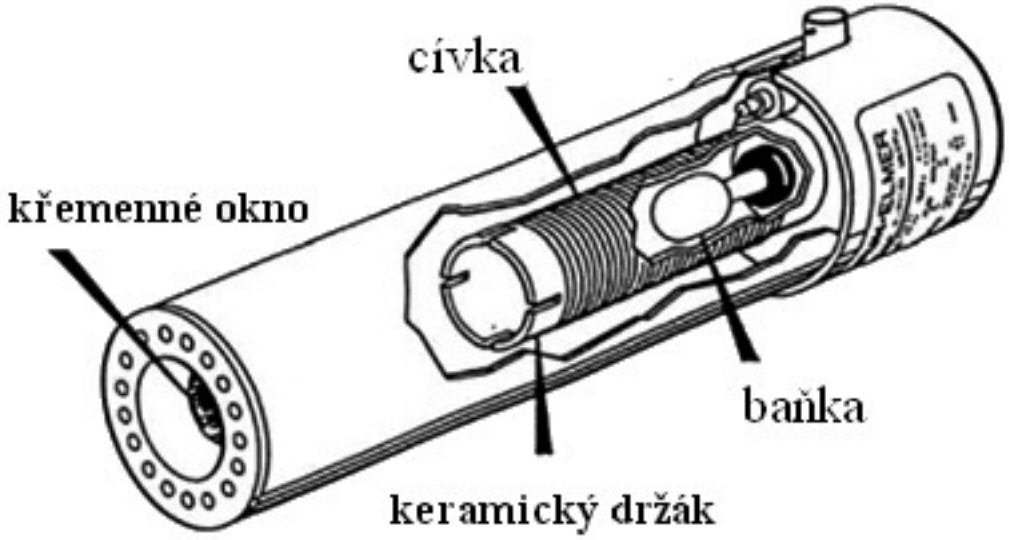
Zdroje primárního záření se musí vyznačovat stabilitou a vysokou intenzitou bez spojitého pozadí. Pro atomovou absorpci je nutné, aby zdroj vyzařoval co nejužší čáru stanovovaného prvku s minimálním pozadím a bez dalších čar ve spektrálním intervalu [14].

1.2.1.1 Výbojky s dutou katodou (HCL)

Pro stanovení většiny prvků jsou nejčastěji používány výbojky s dutou katodou (HCL). Výbojka je tvořena evakuovanou baňkou s elektrodami a je naplněná vzácným plynem. Katoda je tvořena přímo ze stanovovaného prvku, v případě víceprvkových výbojek je tvořena ze slitiny analyzovaných prvků. Anody jsou vyrobeny z těžko tavitelného kovu, např. wolframu. Vložením napětí na elektrody dochází ke vzniku doutnavého výboje a následné ionizaci inertního plynu. Na katodě se soustřeďují kladné ionty, které svým působením rozprašují atomy kovu z jejího povrchu, které dále pronikají do dutiny výbojky, excitují se a vyzařují čárové spektrum charakteristické pro stanovovaný prvek [14,15].

1.2.1.2 Bezelektrodové výbojky (EDL)

Bezelektrodové výbojky (EDL) poskytují velmi úzké čáry s intenzitou až o 2 řády vyšší než HCL. Jsou konstruovány z křemenné baňky naplněné inertním plynem s přídavkem těkavé formy sloučeniny stanovovaného prvku. Nejčastěji se jedná o halogenid kovu. Okolo baňky je ovinuta cívka napojená na vysokofrekvenční zdroj nebo je baňka umístěna v dutině rezonančního mikrovlnného generátoru [14,15]. Konstrukční uspořádání EDL je zobrazeno na obr. 1.

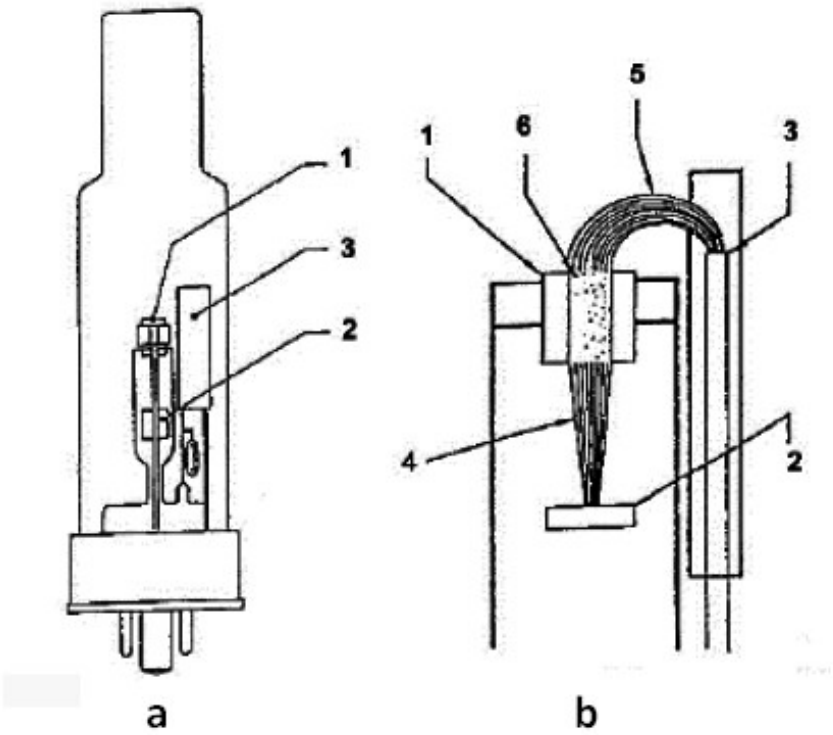


Obr. 1: Schéma bezelektrodové výbojky, převzato a upraveno z [16].

1.2.1.3 Výbojky s vysokou září

Speciálním typem výbojek jsou výbojky s vysokou září, tzv. superlampy. Principem jsou podobné HCL, ale navíc je zde emitor elektronů a cylindrická katoda beze dna (obr. 2). K buzení atomů dochází obdobně jako u HCL s tím rozdílem, že vnitřní prostor cylindrické katody je bombardován elektrony z emitoru, čímž dochází k homogennímu buzení v celém objemu cylindrické katody. Díky tomu je potlačena samoabsorpce [14].

Výhodou superlamp je vyšší intenzita emitovaného záření než u HCL, a tím i vyšší lineární dynamický rozsah [14].



Obr. 2: Schéma superlampy (a) a schematické znázornění jejího principu (b), převzato a upraveno z [14].

1 – cylindrická katoda, 2 – anoda, 3 – emitor elektronů, 4 – primární výboj, 5 – pomocný výboj, 6 – excitační prostor (dochází k excitaci většiny atomů)

1.2.1.4 Kontinuální zdroje záření

Mezi kontinuální zdroje záření patří vysokotlaké xenonové výbojky a deuteriové výbojky. Nedávno německá společnost Analytik Jena vyvinula speciální xenonovou výbojku s krátkým obloukem s velmi intenzivně zářící částí výboje pracující za vysokého tlaku. Touto konstrukcí je dosahováno mnohonásobně vyšší intenzity než u klasických xenonových výbojek a cca 100krát vyšší intenzity než u HCL. Tato výbojka se dnes používá jako jediný zdroj v atomových absorpčních spektrometrech s vysokým rozlišením (přístroje ContrAA, Analytik Jena) s použitelným spektrálním rozsahem 190 – 900 nm [17,18].

1.2.2 Atomizace

Atomizace je děj, při kterém dochází k převedení analytu na volné atomy. Samotný proces probíhá v atomizátoru - nejčastěji v plamenu, elektrotermických atomizátorech nebo vyhřívaných křemenných trubicích. V posledních letech se stále více uplatňuje i atomizátor založený na dielektrickém bariérovém výboji (DBD). Podle použitého atomizátoru se metody AAS obvykle dělí na plamenovou AAS (F-AAS) a AAS s elektrotermickou atomizací (ETA-AAS). Všechny tyto typy atomizátorů jsou v principu využitelné i pro generování těkavých sloučenin (HG-AAS) [13].

Atomizátory jsou důležitou součástí systému AAS i AFS. Ideální atomizátor by měl vykazovat vysokou atomizační schopnost, robustnost, nízké spektrální pozadí a minimální příspěvek k šumu přístroje. Dále by měl být tolerantní ke složitějším matricím, měl by mít nízkou spotřebu energie a dlouhou životnost [19].

1.2.2.1 Miniaturní difúzní plamen (MDF)

Miniaturní difúzní plamen pro atomizaci hydridů se skládá z vertikální křemenné nebo borosilikátové trubice o vnitřním průměru 3 - 8 mm s horizontálním přívodním ramenem, jímž je do atomizátoru přiváděna směs argonu, vodíku a těkavých specií analytu. Na konci křemenné trubice hoří kyslíko-vodíkový plamínek. Samotná atomizace hydridu je způsobena přítomností vodíkových radikálů, které vznikají reakcí vodíku s atmosférickým kyslíkem. Teplota v plamenu je proměnlivá a pohybuje se v rozmezí 150 až 1300 °C. Minimální teploty je dosahováno uvnitř plamene u ústí trubice, maximální teplota je na vnějších okrajích plamene [20,21].

Vznikající volné vodíkové radikály difundují do vnitřních částí plamene, a tím dochází k atomizaci analytu v celém objemu plamene. Důležitý vliv na citlivost MDF má pozorovací výška, která je dána vzdáleností osy optického paprsku od konce vertikální trubice atomizátoru. Mezi další parametry ovlivňující citlivost patří průtoky plynů a frakce jednotlivých plynů. MDF vykazuje vysokou účinnost atomizace a odolnost vůči interferencím. Svoje výsostné uplatnění má zejména v metodě AFS. I přes svoji vysokou robustnost se v AAS tolik nepoužívá. Důvodem je zejména velmi krátká

doba setrvání volných atomů v ose paprsku z AAS, což má za následek nízkou citlivost [20,21].

1.2.2.2 Křemenný atomizátor (QTA)

Křemenný atomizátor (QTA) se skládá z křemenné trubice ve tvaru písmene T, která má přívodní rameno a horizontální optickou trubici, kterou prochází optický paprsek z AAS. Přívodním ramenem jsou přiváděny nosný plyn a těkavá specie. Rozlišujeme tři druhy křemenných atomizátorů - plamínek v křemenné trubici (FIT), externě vyhřívaný křemenný atomizátor (EHQTA) a tzv. multiatomizátor (MMQTA) [22].

V konstrukci FIT atomizátoru je v přívodním ramenu umístěna kapilára, na jejímž konci hoří malý kyslíko-vodíkový plamínek. U EHQTA je optická trubice vyhřívána elektricky odporovým vyhříváním nebo plamenem acetylén-vzduch. Konce optické trubice mohou být otevřené nebo uzavřené křemennými okénky [23].

Kombinací FIT a EHQTA je multiatomizátor, který má dvouplášťovou stěnu vyhřívaného horizontálního ramene. Vnitřní optická trubice je opatřena 14ti rovnoměrně rozmístěnými otvory. Do meziprostoru mezi vnitřní optickou trubicí a vnější trubicí je vháněn kyslík, který následně proniká otvory do vnitřního pozorovaného objemu atomizátoru. Díky tomu dochází ke vzniku vodíkových radikálů po celé délce optického trubice. Výhodou MMQTA je vyšší odolnost vůči interferencím a lepší lineární dynamický rozsah kalibračních závislostí [22].

1.2.2.3 Plazmový atomizátor s dielektrickou bariérou (DBD)

Plazmový atomizátor s dielektrickou bariérou (DBD) je atomizátor, který se skládá ze dvou elektrod oddělených od sebe dielektrickou vrstvou (nejčastěji sklem). Na elektrody je vloženo vysoké střídavé napětí, čímž dojde k vytvoření netermálního plazmatu o nízké energii, která je dostačující pro účinnou atomizaci těkavé specie [24].

1.2.3 Optický systém

Pro izolaci šířky spektrálního intervalu slouží v AAS zejména monochromátor. Monochromátor je vybaven disperzním prvkem, hranolem nebo mřížkou. Obvykle je kombinováno uspořádání s Echelle mřížkou. Nejčastěji používaným detektorem v AAS je fotonásobič. Více o jeho principu bude pojednáno v kapitole 1.3.2 [17].

1.3 Atomová fluorescenční spektrometrie

Příbuznou metodou AAS je atomová fluorescenční spektrometrie (AFS). Princip této metody je založen na převedení vzorku do plynné fáze a následné excitaci volných atomů do vyššího energetického stavu buzením pomocí primárního zdroje záření. Následuje deexcitace a vyzáření fluorescenčního záření, které je charakteristické pro daný prvek [10,25,26].

Instrumentace v AFS je obdobná jako u AAS, ale detekce fluorescenčního záření je zpravidla prováděna kolmo ke zdroji záření. Zdroje excitačního záření jsou nejčastěji výbojka s dutou katodou, výbojky s vysokou září, bezelektrodová, xenonová výbojka nebo případně lasery [13].

Rozlišujeme dva základní typy fluorescenčních přechodů, a to rezonanční a nerezonanční. O rezonanční fluorescenci se jedná v případě, že fluorescenční záření má stejnou vlnovou délku jako excitační záření. Nerezonanční fluorescenci lze rozdělit na přímou čárovou fluorescenci, kde se excitovaný elektron vrací zpět na vyšší hladinu, a dále na postupnou fluorescenci, při níž dochází nejprve k excitaci do některého z vyšších energetických stavů a poté ke dvoustupňové deaktivaci. Prvním stupněm je nezářivý přechod v důsledku srážek a druhým je pak fluorescenční přechod. Posledním typem je tzv. anti-Stokesova fluorescence, kdy fluorescenční záření má kratší vlnovou délku než excitované záření vlivem dodané tepelné energie [10,25].

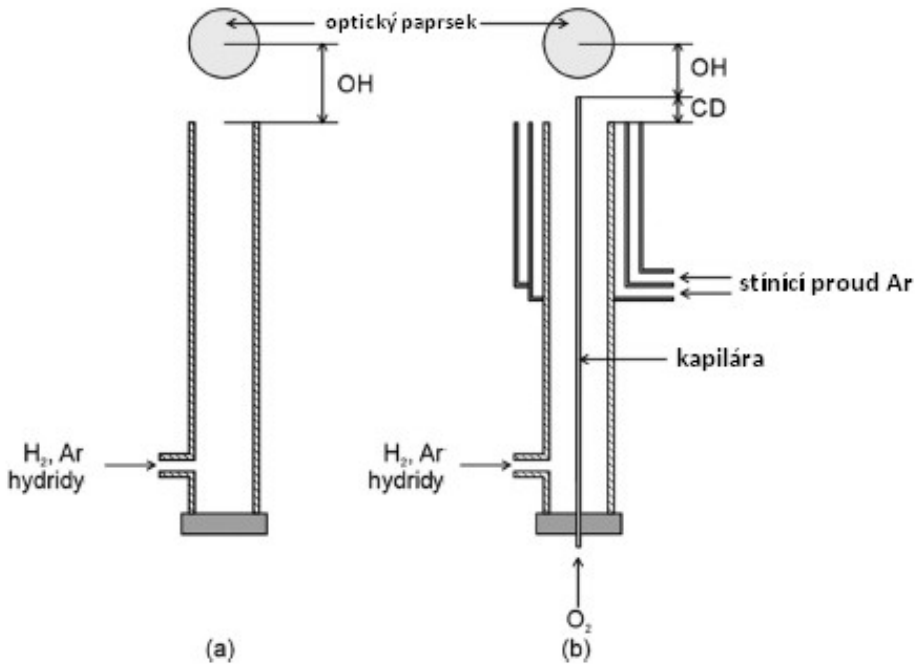
1.3.1 Atomizace

Nejčastějšími atomizátory používanými v AFS jsou zejména MDF, DBD a FIGS atomizátor. MDF a DBD již byly podrobněji popsány v kapitole 1.2.2.1a 1.2.2.3.

1.3.1.1 „Flame-in-gas-shield“ atomizátor (FIGS)

FIGS atomizátor byl speciálně navržen pro využití v AFS. Jedná se o upravený model konstrukce MDF, v níž je do osy vertikální trubice navíc umístěna křemenná kapilára přivádějící kyslík (obr. 3) Na konci kapiláry hoří kyslíko-vodíkový mikroplamínek. Tento mikroplamínek je od atmosférického kyslíku (ze vzduchu) chráněn proudem stínicího argonu. Stínicí jednotka je obvykle tvořena z jednoho či dvou okruží a vytváří laminární tok argonu kolem mikroplamínku [21,27].

Velký vliv na citlivost FIGS atomizátoru má pozorovací výška, vzdálenost kapiláry od ústí vertikální křemenné trubice a průtoky a složení plynů.



Obr. 3: a - miniaturní difúzní plamen, b – „flame-in-gas-shield“ atomizátor, OH - pozorovací výška, CD - vzdálenost kapiláry od ústí vertikální křemenné trubice, převzato a upraveno z [21].

1.3.2 Optický systém a detektor

Obecně mohou být AFS přístroje rozděleny na disperzní a nedisperzní. Disperzní systém obvykle obsahuje monochromátor, který slouží k izolaci spektrální čáry o dané vlnové délce. Disperzní systém umožňuje detekci v širokém rozsahu vlnových délek za použití citlivých fotonásobičů v UV/VIS oblasti. Obvykle se kombinuje se spojitým zdrojem záření. Nevýhodou jsou velké ztráty intenzity fluorescenčního záření při průchodu monochromátorem [28].

V nedisperzním systému není využit monochromátor. Proto se téměř výhradně používají čárové zdroje záření a pro eliminaci balastního záření se před detektor zařazuje vhodný interferenční filtr. Ten propouští pouze určitý rozsah vlnových délek s propustností záření v řádu desítek procent. Jedná se o jednoduchý a levný systém. Nedisperzní systémy mohou být na druhou stranu více ovlivněny rozptylem záření, balastním zářením (zejména ve VIS a blízké UV oblasti), emisí z atomizátoru či přítomností spektrálních interferencí [28].

Interferenční filtry jsou založené na principu interference záření, propouští pouze část monochromatického světla ze spojitého záření. Charakteristickými rysy jsou propustnost filtru a spektrální pološířka (FWHM). Filtry jsou zhotoveny ze dvou vrstev, z dielektrické a kovové polopropustné vrstvy, přičemž tloušťka propustného dielektrika je polovina vlnové délky, pro kterou je filtr určen. Často mohou být potaženy ještě antireflexní vrstvou, která zabraňuje vytváření odlesků a nežádoucích optických jevů ve skle filtru [29,30].

Fluorescenční záření je většinou detekováno pomocí fotonásobiče. Ten je tvořen evakuovanou baňkou, vhodně umístěnou fotokatodou, anodou a soustavou dynod. Největší záporné napětí je vloženo na fotokatodu a napětí postupně vzrůstá od dynod směrem k anodě. Fotonásobiče mohou být citlivé pro různé rozsahy vlnových délek (UV či UV-VIS oblast) podle zvoleného materiálu fotokatody a vstupního okénka (křemen, UV sklo, sklo). Princip fotonásobiče je následující: dopadem fotonů na fotokatodu dochází k uvolnění elektronů, které jsou urychleny elektrickým polem a dopadají na soustavu dynod (bývá jich nejčastěji 9-13), z kterých jsou vyraženy tzv. sekundární elektrony. Ty jsou opět urychleny a dopadají na další dynody.

Z poslední dynody jsou elektrony usměrněny na anodu, z níž je odebírán výsledný zesílený proud [14,15].

1.4 Techniky generování těkavých specií

Generování těkavých specií (VSG) je hojně využívanou metodou pro analýzu stopových a ultrastopových prvků, při které dochází k převedení analytu z kapalné fáze do fáze plynné. Technika VSG se ve svých počátcích používala pro stanovení rtuti a tzv. hydridotvorných prvků (As, Bi, Ge, Sb, Se, Sn, Te). Dnes je však možné generovat různými přístupy i těkavé specie z více než dvaceti dalších přechodných prvků a některých nekovových prvků (I, Br, Cl, S). Generování těkavých specií zahrnuje separaci analytu z matrice vzorku s vysokou účinností transportu do detektoru, což vede k nízkým mezím detekce. Podle způsobu redukce analytu lze techniky generování rozdělit na chemické (CH-VSG), elektrochemické (EC-VSG) a fotochemické (P-VSG) [11,31–34].

1.4.1 Chemické generování

Nejčastěji využívaná technika generování je chemické generování (CH-VSG) a nejčastěji generované těkavé specie jsou hydridy. K převedení analytu na hydrid dochází za pomoci redukčního činidla tetrahydridoboritanu, který je v přítomnosti minerální kyseliny (nejčastěji kyseliny chlorovodíkové) hydrolyzován [35,36].

Hydrolýza redukčního činidla je popsána následujícími rovnicemi (1.1.-1.4), upraveno z [37]:

$$BH_4^- + H^+ + H_2O \rightarrow H_2O\text{-}BH_3 + H_2 \quad (1.1.)$$

$$H_2O\text{-}BH_3 + H_2O \rightarrow H_2O\text{-}BH_2OH + H_2 \quad (1.2.)$$

$$H_2O\text{-}BH_2OH + H_2O \rightarrow H_2O\text{-}BH(OH)_2 + H_2 \quad (1.3)$$

$$H_2O\text{-}BH(OH)_2 + H_2O \rightarrow B(OH)_3 + H_2O + H_2 \quad (1.4.)$$

Během procesu hydrolýzy redukčního činidla dochází ke vzniku několika hydridoboritanových komplexů, které mohou všechny reagovat s analytem, a tím ho redukovat. Mechanismus generování je závislý na složení reakčního média, které může modifikovat reakci analytu s tetrahydridoboritanem [38,39].

Výhodou CH-VSG je rychlá kinetika reakce, vysoká účinnost generování a možnost použití pro speciační analýzu. Nevýhodou je možná kontaminace, protože tetrahydridoboritan není k dostání ve vynikající čistotě, a nestabilita roztoku tetrahydridoboritanu. Proto je potřeba jej připravovat čerstvý nebo uchovávat v zamraženém stavu. Pro stabilizaci pracovních roztoků se používá hydroxid sodný či draselný [40].

1.4.2 Elektrochemické generování

Elektrochemické generování těkavých specií (EC-VSG) využívá elektrického proudu k redukci analytu v prostředí velmi čisté minerální kyseliny. Provádí se v elektrochemické cele, která se skládá z anodového a katodového prostoru, které jsou často od sebe odděleny polopropustnou membránou. Prvním krokem generování je difúze analytu z roztoku kyseliny na povrch katody. Druhým krokem je redukce hydridotvorného prvku přenosem náboje z katody na adsorbovaný analyt. Třetím krokem je desorpce hydridu analytu z katody a její uvolnění z kapalné fáze do plynné. Elektrody jsou voleny tak, aby byl jejich povrch inertní, nepřispívaly k chemickým a elektrochemickým reakcím a poskytovaly co možná nejvyšší účinnost generování těkavé specie. Vhodným materiálem anody je inertní platina, katodovým materiálem může být platina či olovo. Nevýhodou EC-VSG je nutnost údržby povrchu katody. Výhodou je, že generování probíhá pouze z čistých minerálních kyselin bez nutnosti použití redukčního činidla a hydroxidu, které jsou obvykle významným zdrojem kontaminace [36,41,42].

1.4.3 Fotochemické generování

Při fotochemickém generování (P-VSG) dochází k redukci analytu působením UV záření v prostředí nízkomolekulární organické kyseliny. Nejčastěji se jedná o kyselinu mravenčí, octovou či propionovou. Mechanismus generování nebyl doposud

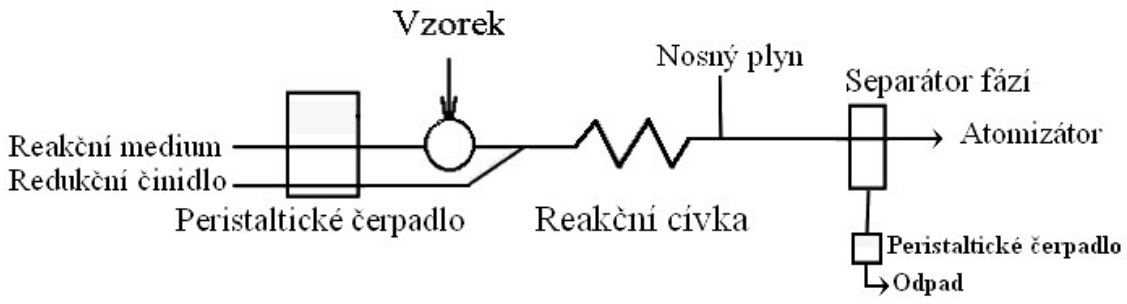
uspokojivě vysvětlen, ale předpokládá se, že vlivem UV záření dochází k fotolýze organické kyseliny. Vznikají volné radikály a volné elektrony, které redukují analyt za tvorby těkavé specie. Mezi hlavní výhody P-VSG patří, stejně jako pro techniku EC-VSG, že generování probíhá z pouze čistých kyselin, a tudíž je možno výrazně snížit riziko kontaminace. Současně lze touto technikou generovat těkavé specie daleko většího rozsahu prvků (hydridotvorné prvky, přechodné prvky, nekovové prvky), které technikou CH-VSG jednoduše generovat nejdou. Nevýhodou tohoto přístupu ke generování je velice špatná odolnost vůči interferencím od běžných minerálních kyselin či pouze jejich aniontů (dusičnany, chloridy aj.) [43–46].

1.5 Uspořádání generátoru

VSG může být provedeno v dávkovém či průtokovém uspořádání. Průtokové metody lze rozdělit dle způsobu dávkování analytu na metody průtokové injekční analýzy (FIA) a na metody kontinuální průtokové analýzy (CFA). Důležitou součástí průtokových systému je separátor fází [14].

1.5.1 Průtoková injekční analýza

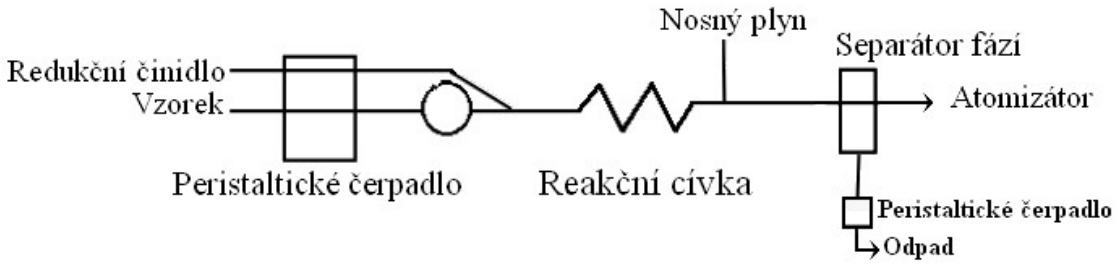
Průtoková injekční analýza (FIA) je založena na dávkování vzorku pomocí šesticestného dávkovacího ventilu do proudu reakčního média (obr. 4). Po smíchání s redukčním činidlem vznikají v reakční cívce těkavé specie, které jsou nosným plynem přivedeny do separátoru fází. Výsledný záznam je ve tvaru píku. Vyhodnocovacím parametrem je plocha nebo výška signálu [14,47–49].



Obr. 4: Schéma generátoru hydridů – FIA.

1.5.2 Kontinuální průtoková analýza

Kontinuální průtoková analýza (CFA) je analytická metoda, při které není vzorek dávkován skrze ventil, ale je konstantně zaváděn peristaltickým čerpadlem do generátoru (obr. 5). Po smíchání s redukčním činidlem vznikají v reakční cívce těkavé specie, které jsou nosným plynem přivedeny do separátoru fází. Vyhodnocuje se výška ustáleného signálu [50].



Obr. 5: Schéma generátoru hydridů - CFA.

1.5.3 Dávkové uspořádání

V tomto uspořádání je analyt v celém svém objemu dávkován přímo do generátoru, který zároveň plní i funkci separátoru fází. Dávkový generátor je obvykle skleněná nebo plastová nádoba s kónickým dnem, do které je peristaltickým čerpadlem nebo injekční stříkačkou přiveden roztok redukčního činidla. Dále také může být přiváděn proud nosného plynu pro urychlení uvolnění těkavé specie. K redukci analytu dochází uvnitř nádoby generátoru, vzniklá specie je nosným plynem unášena do atomizátoru. Výsledný záznam je ve formě píku [11,17].

1.5.4 Separátor fází

Samostatný separátor fází je důležitou součástí všech průtokových uspořádání generátorů. Separátor fází je zařízení sloužící k oddělení těkavých specií a vodíku od kapalné fáze. Separátory dělíme do tří skupin na hydrostatické, s nuceným odtahem a separátory membránové. Nejvíce využívaný je hydrostatický separátor, který funguje na principu sifonu. Skládá se z U trubice, do které je přiváděna reakční směs a ve které je

vždy udržován určitý objem kapaliny. Plyn odchází do atomizátoru a kapalina je tlačena druhým ramenem do odpadu [14,41,51].

Separátory s nuceným odtahem eliminují obtíže s přetlakem u předchozího typu, avšak vyžadují zapojení dalšího čerpadla. Odtahová rychlost odpadu by měla být správně sladěna s rychlostí přítoku roztoku, aby bylo zamezeno vniknutí kapaliny do atomizátoru. Membránové separátory jsou vybaveny porézní membránou (teflonovou), skrze kterou difundují plyny, ale která brání pronikání aerosolu reakční směsi do atomizátoru [51].

2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Použité chemikálie

Deionizovaná voda (≤ 0,3 μS cm^{-1}) z přístroje Watrex Ultrapur, Watrex, USA.

Kyselina chlorovodíková 37%, p.a., Merck, Německo.

Tetrahydridoboritan sodný, pevný, 98%, Sigma-Aldrich, Německo.

Hydroxid draselný, p.a., pevný, Lach-Ner, ČR.

Standardní roztok bismutu, Bi, 1000 ± 4 mg dm^{-3}, standard pro AAS, Sigma Aldrich. TraceCERT, Švýcarsko.

Certifikovaný referenční materiál – Trace elements in water (1643f), National Institute of Standards and Technology, USA.

Argon čistoty 99,996 %, SIAD, Praha, ČR; vodík čistoty 99,95 %, SIAD, Praha, ČR; kyslík čistoty 99,998 %, SIAD, Praha, ČR .

2.2 Příprava reagencií

Reakčním médiem byla kyselina chlorovodíková o koncentraci 1 mol dm^{-3}, pokud není uvedeno jinak. Redukčním činidlem byl téměř výhradně 0,5% (m/v) roztok tetrahydridoboritanu sodného v 0,4% roztoku hydroxidu draselného, který byl připraven z 1 g tetrahydridoboritanu sodného a 8 cm^3 10% hydroxidu draselného doplněním na objem 200 cm^3 deionizovanou vodou. Následně byl roztok přefiltrován přes nylonový membránový filtr (Whatman, Velká Británie) o porositě 0,45 μm. Roztok činidla byl uchováván ve zmrazené formě a před každým měřením byl rozmražen.

Ze standardního roztoku Bi o koncentraci 1000 mg dm^{-3} byly připraveny zásobní roztoky o koncentraci 1 mg dm^{-3} či 10 mg dm^{-3} Bi v kyselině chlorovodíkové o koncentraci 1 mol dm^{-3}, které byly každý den použity pro přípravu standardních roztoků pro experimenty s HG-AAS či HG-AFS.

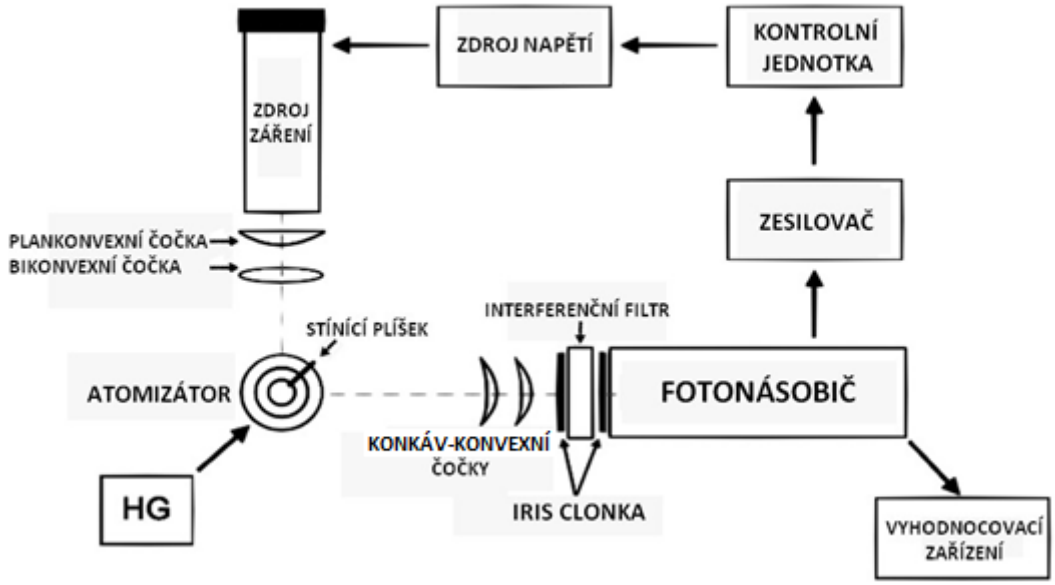
2.3 Použité přístroje

2.3.1 AAS

Byl využit atomový absorpční spektrometr Perkin-Elmer 503 (Perkin-Elmer, Německo). Korekce pozadí nebyla použita. Jako zdroj záření byla použita bezelektrodová výbojka Bi EDL System 2 (Perkin-Elmer, USA) napájena externím zdrojem proudem 400 mA. Pro měření byla zvolena vlnová délka 223,1 nm a šířka spektrálního intervalu 0,2 nm.

2.3.2 AFS

Byl používán atomový fluorescenční spektrometr vyvinutý na Oddělení stopové prvkové analýzy Ústavu analytické chemie AV ČR [52]. Jako zdroj záření byla použita tatáž bezelektrodová výbojka Bi EDL System 2 (Perkin-Elmer, USA) napájena externím zdrojem. Pokud není uvedeno jinak, byl použit napájecí proud výbojky 400 mA. Napájecí proud pro výbojku byl pulzně modulován s frekvencí 40 Hz. Optický paprsek z výbojky byl zaostřen nad atomizátor kombinací dvou křemenných čoček (plankonvexní o průměru 25 mm s ohniskovou vzdáleností 40 mm a následně bikonvexní čočkou o průměru 22 mm s ohniskovou vzdáleností 45 mm). Byl použit „solar-blind“ fotonásobičový detektor MH 1922 (spektrální rozsah 165 - 320 nm, Perkin-Elmer Optoelectronics, USA). Před fotonásobič byl umístěn interferenční filtr 222,63 nm s šířkou píku v polovině výšky píku 10 nm (CVI Melles Griot, USA). Další v této práci testované filtry byly 193,2 ± 20 nm, 202,1 ± 10 nm, 222,63 ± 10 nm a 307,1 ± 10 nm. Pro zaostření fluorescenčního záření do fotonásobiče byly použity dvě křemenné čočky (s pozitivním meniskem a ohniskovou vzdáleností 21 mm). Dvě iris clonky a stínicí kovový plíšek, umístěný na stínicí jednotku FIGS atomizátoru, byly použity pro odstínění nežádoucího parazitního záření z EDL výbojky. Schéma atomového fluorescenčního spektrometru je na obr. 6.



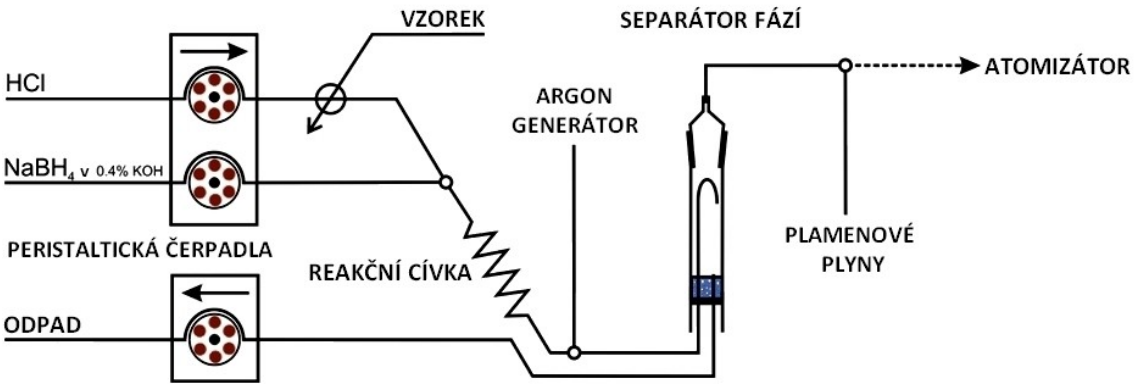
Obr. 6: Schéma atomového fluorescenčního spektrometru.

2.4 Generátor hydridů

Pro udržování konstantních průtoku jednotlivých plynů byly použity hmotnostní průtokoměry od firmy Omega (Omega Engineering, USA) a od firmy Cole-Parmer (Cole-Parmer, USA). Dále byla využita peristaltická čerpadla Reglo Digital (ISMATEC, Švýcarsko) a šesticestný dávkovací ventil V-451 (IDEX Health and Science, USA) s dávkovací smyčkou o objemu 1 cm^3. Tygonová hadička (ISMATEC, Švýcarsko) pro čerpání roztoku redukčního činidla tetrahydridoboritanu sodného měla vnitřní průměr 0,51 mm, hadička pro čerpání kyseliny chlorovodíkové měla vnitřní průměr 1,02 mm. Výsledná průtoková rychlost byla na základě předchozích prací [53] zvolena 4 cm^3 min^{-1} pro kyselinu chlorovodíkovou a 1,2 cm^3 min^{-1} pro redukční činidlo. Veškeré ostatní hadičky v generátoru hydridů byly vyrobeny z teflonu s vnitřním průměrem 1 mm. Pro transport plynné fáze byly použity hadičky také z teflonu s vnitřním průměrem 1,6 mm. Pro oddělení kapalné a plynné fáze byl použit skleněný separátor fází s nuceným odtahem o objemu 5 cm^3 [54].

Schéma použitého generátoru je znázorněno na obr. 7. Peristaltickými čerpadly byl čerpán roztok redukčního činidla tetrahydridoboritanu sodného a reakčního média

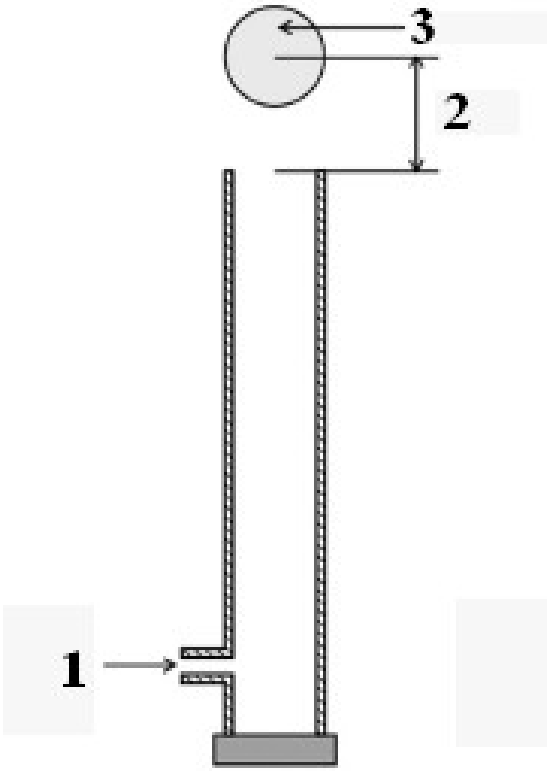
kyseliny chlorovodíkové přes reakční cívku do separátoru fází. Pomocí stříkačky byl nasát standardní roztok analytu v prostředí kyseliny chlorovodíkové do dávkovací smyčky a dávkován do proudu reakčního média šesticestným dávkovacím ventilem. Pokud není výslovně uvedeno jinak, ke smíchání roztoku tetrahydridoboritanu sodného a nadávkovaného vzorku došlo v reakční cívce o délce 10 cm a objemu 0,08 cm^3. Před separátor fází byl přiváděn nosný plyn argon ($Ar_{generátor}$). Oddělená kapalná fáze byla peristaltickým čerpadlem odváděna do odpadu. Hydridy v plynné fázi byly dále unášeny proudem nosného plynu ze separátoru fází a dále míchány s plyny potřebnými pro udržení plamene v atomizátorech (viz dále). Při experimentech s AAS to byl pouze argon (Ar_{plamen}), zatímco v AFS to byl Ar_{plamen} předmíchaný s vodíkem ($H_{2\ plamen}$).



Obr. 7: Schéma generátoru hydridů pro AAS.

2.5 Atomizátory

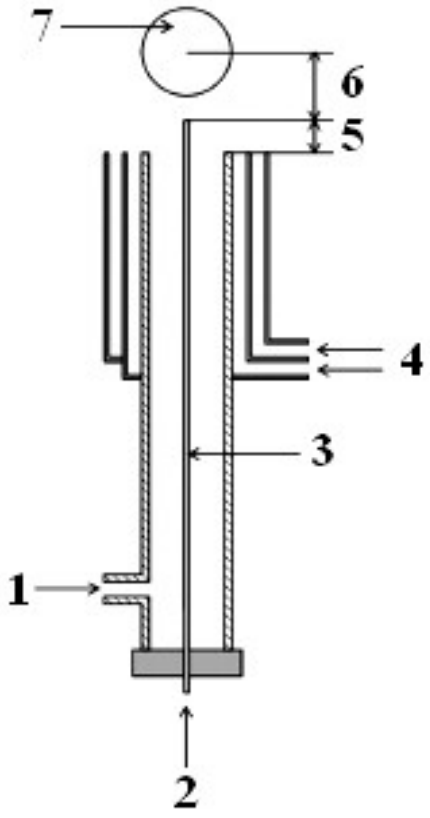
Pro atomizaci hydridů byly použity MDF a FIGS atomizátor. Oba atomizátory sestávají z vertikální křemenné trubice s vnitřním průměrem 6 mm a délkou 100 mm. Přívodním ramenem (délka 35 mm a vnitřní průměr 2 mm) jsou do atomizátoru zaváděny společně s hydridem analytu plyny argon a vodík. Schéma MDF je zobrazeno na obr. 8. V AAS je vzdálenost mezi horním okrajem vertikální trubice a spodním okrajem paprsku definována jako pozorovací výška (OH). V AFS je OH definována jako vzdálenost od horního okraje vertikální trubice do středu optického paprsku (obr. 8). MDF použitý v AAS obsahoval navíc vstup pro vodík ($H_{2\ plamen}$), který se nacházel zespodu vertikální trubice atomizátoru.



Obr. 8: Schéma MDF, převzato a upraveno [21];
1 - přívodní rameno pro přívod plynů s hydridem analytu, 2 - pozorovací výška (OH),
3 - optický paprsek

Ve spojení s AFS byl kromě MDF použit atomizátor FIGS o stejném základu jako MDF. Ten oproti MDF obsahuje ještě dvoukanálovou stínicí jednotku a kapiláru pro kyslík umístěnou v ose vertikální trubice (obr. 9). Křemenná kapilára měla vnitřní průměr 0,53 mm a délku 155 mm. Vzdálenost mezi koncem kapiláry a ústím vertikální trubice je definována jako vzdálenost kapiláry (CD) a byla nastavena na 3 mm, pokud není uvedeno jinak. U FIGS atomizátoru je OH definována jako vzdálenost od konce kapiláry do středu optického paprsku (obr. 9). Na vertikální trubici byla nasazena dvoukanálová stínicí jednotka z mosazi [55]. Oběma kanály byl dovnitř stínicí jednotky přiváděn vysoký průtok argonu. Argon zaváděný do vnitřního kanálu stínicí jednotky byl označen jako $Ar_{shield\ I}$, do vnějšího kanálu jako $Ar_{shield\ II}$. Před začátkem měření bylo vždy potřeba aparaturu FIGS nahřát difúzním plamenem minimálně po dobu 30 minut [21].

Pozice obou atomizátorů v AAS i AFS byla vždy nastavena tak, aby střed optického paprsku z EDL výbojky procházel osou vertikální trubice.



Obr. 9: Schéma FIGS, převzato a upraveno [21];
1 - přívodní rameno pro přívod plynů s hydridem analytu, 2 - přívod kyslíku, 3 - křemenná kapilára, 4 - přívod vnitřního a vnějšího proudu stínicího argonu, 5 - vzdálenost konce kapiláry od ústí vertikální trubice (CD), 6 - pozorovací výška (OH), 7 - optický paprsek

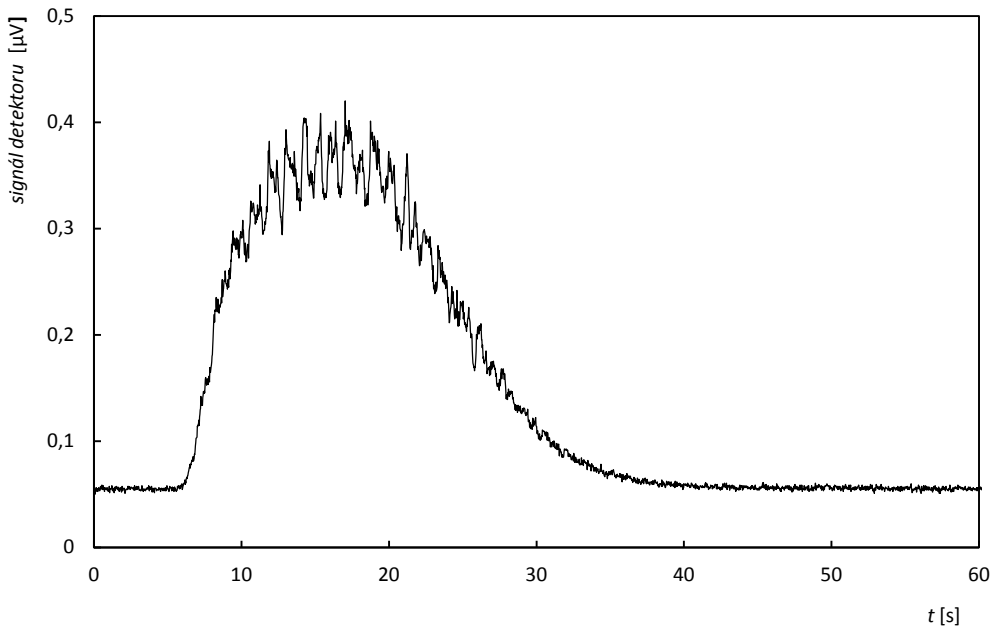
2.6 Zpracování naměřených dat

2.6.1 Zpracování signálu a software

Analogový signál z AAS spektrometru Perkin-Elmer 503, určený pro zapisovač, byl pomocí A/D převodníku zdigitalizován, zpracován v softwaru Sigvis a ukládán do txt souborů. V programu Microsoft® Excel 2010 (Microsoft Corporation, USA) byla provedena integrace jednotlivých měření. Pro vyhodnocení analytických výsledků byla výhradně použita plocha píku.

Signály z AFS byly zaznamenány pomocí softwaru AFS 7.0 (vyvinutého firmou Diram, Česká republika). Výsledný signál detektoru je v µV. Software umožňuje měnit napětí vkládané na fotonásobič (PMT) pro zesílení signálu. Používané napětí v této práci bylo 1300 nebo 1400 V. Pro srovnání signálů získaných při různých napětích na PMT byly změřené signály vyděleny příslušným faktorem zesílení, a tím byly převedeny na signál odpovídající minimálnímu napětí PMT. Faktor zesílení pro 1300 V byl 0,03512 a pro 1400 V byl 0,10723. Jelikož napájecí proud výbojky byl pulzně modulován (40 Hz), bylo možné zároveň kontinuálně pořizovat hodnoty signálu při zapnuté a vypnuté výbojce. Odečtením těchto hodnot signálu získaných v téměř identickém čase byla provedena korekce na případný příspěvek emise atomizátoru k intenzitě fluorescenčního záření. Všechny uložené záznamy signálů (txt soubory) byly exportovány do programu Microsoft® Excel 2010 (Microsoft Corporation, USA), kde byly i vyhodnoceny. Pro vyhodnocení analytických výsledků byla použita plocha píku. Na obr. 10 je zobrazen ukázkový záznam měření s HG-AFS a MDF atomizátorem.

Doplňkovým parametrem byl i poměr signálu k šumu. Šum byl měřen po dobu 10 s při zapnutém generátoru a jedná se tedy o signál slepého pokusu. Z každého měření bylo získáno 400 hodnot (při vzorkovací frekvenci 40 Hz a době 10 s) a z nich byla vypočítána směrodatná odchylka. Signál byl v tomto případě určen z výšky píku nadávkovaného standardu, která byla vyhodnocena jako průměr z 200 hodnot (5 s) kolem maxima píku. Signál k šumu byl určen jako poměr průměrné výšky píku z 5 opakování a průměrem směrodatných odchylek šumu ze 3 opakování.



Obr. 10: Ukázkový záznam měření s HG-AFS s MDF jako atomizátorem.

c(Bi) = 1 ng cm^{-3}.

Výsledek víceparametrové analýzy dat je v této práci uváděn ve formě odezvové plochy, která je znázorněná vrstevnicovým grafem. Aby bylo možné sestrojit diagram odezvové plochy, bylo 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 2017 metodou Renka Cline.

2.6.2 Statistické vyhodnocení výsledků

Všechny naměřené výsledky v rámci této práce jsou uvedeny ve tvaru medián ± směrodatná odchylka, pokud není uvedeno jinak. Medián je dle definice ze seřazených hodnot podle velikosti prostředním členem mezi hodnotami x_i. S vyloučením odlehlých hodnot podle Deanova-Dixonova testu jsou do grafů vyneseny mediány ploch píků a chybové úsečky znázorňují směrodatné odchylky.

Přesnost výsledků je dána hodnotou směrodatné odchylky *sd*, která je dána vztahem (2.1.), kde x_i je naměřená hodnota v i-tém pořadí, *n* je počet měření.

$$sd = \sqrt{\frac{1}{n-1}\sum_{l=0}^{n}(x_i - \bar{x})^2} \tag{2.1.}$$

Ve vztahu (2.1.) $\bar{x}$ představuje aritmetický průměr, který je dán vztahem (2.2.).

$$\bar{x} = \frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n} x_i \tag{2.2.}$$

Deanův-Dixonův test (2.3.-2.5.) je jednoduchý test pro zjištění odlehlých hodnot, kde *R* je variační rozpětí, x_n je nejvyšší hodnota a x_1 nejnižší naměřená hodnota.

$$R = x_n - x_1 \tag{2.3.}$$

$$Q_{max} = \frac{x_n - x_{n-1}}{R} \tag{2.4.}$$

$$Q_{min} = \frac{x_2 - x_1}{R} \tag{2.5.}$$

Opakovatelnost, vyjádřená relativní směrodatnou odchylkou (s_r), určuje přesnost měření metody za stálých podmínek a je dána vztahem (2.6).

$$s_r = \frac{s}{\tilde{x}} \tag{2.6.}$$

Mez detekce (LOD) je definována jako hodnota koncentrace, při které je signál statisticky významně odlišný od šumu, a je dána vztahem (2.7.), kde sd_{blank} je směrodatná odchylka signálu slepého pokusu nejméně z deseti statisticky neodlehlých hodnot paralelního měření, a kde *k* je citlivost metody, vyjádřená směrnicí rovnice regrese z přímky kalibrační závislosti.

$$LOD = \frac{3\, sd_{blank}}{k} \tag{2.7.}$$

Mez stanovitelnosti (LOQ) je definována jako minimální hodnota koncentrace, která může být s dostatečnou přesností a správností stanovena, a je dána vztahem (2.8.).

$$LOD = \frac{10\ sd_{blank}}{k} \tag{2.8.}$$

3 VÝSLEDKY A DISKUZE

V této práci byly nejprve optimalizovány podmínky generování BiH_3 a zkoumány parametry ovlivňující atomizaci v MDF s AAS detekcí. Pro experimenty s AFS byly použity nalezené optimální podmínky generování a byla provedena optimalizace optické cesty AFS spektrometru. Následně byly testovány parametry ovlivňující atomizaci v MDF a FIGS s cílem o dosažení co nejnižších mezí detekce a stanovitelnosti.

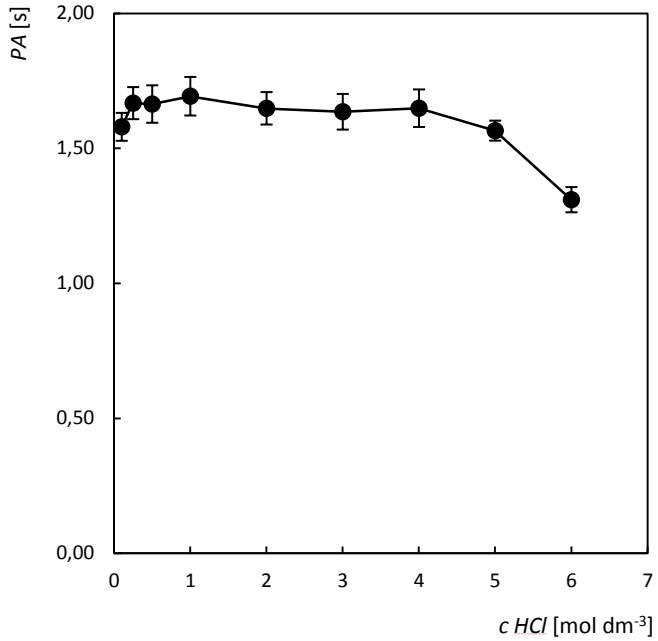
3.1 HG-AAS s MDF

MDF byl použit jako atomizátor hydridu bismutu s AAS detekcí kvůli své robustnosti a nízkému šumu. Kvůli tomu byl použit pro optimalizaci podmínek generování. Dále byl zkoumán vliv jednotlivých parametrů na atomizaci v AAS. Obecně má u MDF velký vliv na citlivost OH, celkový průtok plynů a množství vodíku ve směsi. Argon byl do generátoru přiváděn před ($Ar_{generátor}$) i za separátor fází (Ar_{plamen}). Průtok $Ar_{generátor}$ pro optimalizaci podmínek generování byl zvolen 100 cm^3 min^{-1}. Pro experimenty zabývající se optimalizací podmínek atomizace v MDF byl tento průtok snížen na 50 cm^3 min^{-1}. Pro všechny experimenty zabývající se optimalizací podmínek generování a atomizace byl použit standardní roztok bismutu o koncentraci 200 ng cm^{-3}.

3.1.1 Podmínky generování bismutanu

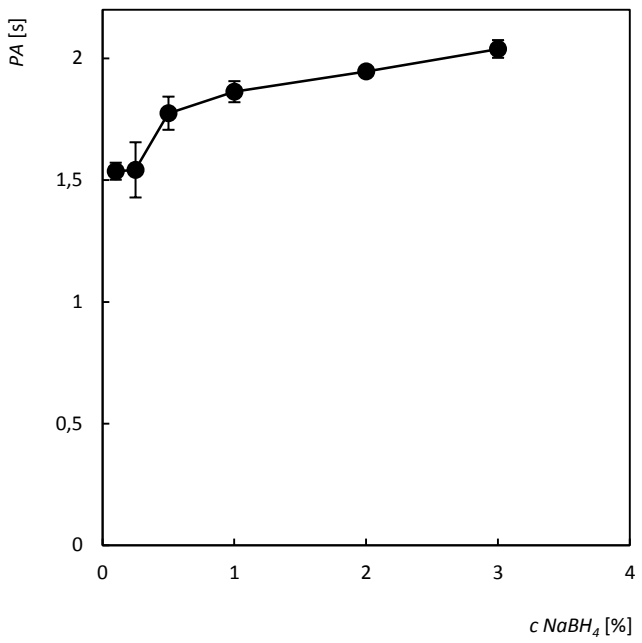
Nejprve byly ověřovány převzaté optimální koncentrace reagencií pro generování BiH_3 [53]. Optimalizace koncentrace kyseliny chlorovodíkové je znázorněna na obr. 11. Jako optimální byla zvolena koncentrace 1 mol dm^{-3}. Ze závislosti je však zřejmé, že při zvolené koncentraci tetrahydridoboritanu sodného (0,5 %, m/v) je BiH_3 účinně generován v širokém rozsahu koncentrací kyseliny chlorovodíkové (0,25 – 4 mol dm^{-3}). Na obr. 12 je zobrazena závislost plochy píku na koncentraci tetrahydridoboritanu sodného, který byl rozpuštěn v 0,4% (m/v) hydroxidu draselném. Od hodnoty 0,5 % závislost s rostoucí koncentrací stále nepatrně roste. Při použití

různých koncentrací tetrahydridoboritanu sodného vzniká různé množství vodíku, které je transportováno do MDF a může ovlivňovat atomizaci v MDF. Volumetricky bylo změřeno, že například při koncentraci 0,5 % vzniká rozkladem tetrahydridoboritanu sodného mezi 12 a 15 cm^3 min^{-1} plynného vodíku a při koncentraci 3 % vzniká přibližně 90 cm^3 min^{-1} plynného vodíku. V následujícím experimentu byl „simulován“ vliv různého množství vodíku vznikajícího rozkladem tetrahydridoboritanu sodného na pozorovaný signál tak, že byl zvyšován průtok $H_{2\ plamen}$ (od 100 cm^3 min^{-1} do 200 cm^3 min^{-1}) a pro generování byl použit 0,1% roztok tetrahydridoboritanu sodného. Až do hodnoty 200 cm^3 min^{-1} byla obdržena konstantní závislost plochy píku na přidávaném vodíku, což znamená, že různé množství vodíku vznikající z rozkladu tetrahydridoboritanu nemá ve skutečnosti vliv na závislost na obr. 12 a že tento mírný nárůst citlivosti je skutečně dán zvýšením účinnosti generování. Jelikož zvýšení citlivosti bylo mezi koncentracemi 0,5 % a 3 % pouze o přibližně 15 %, byla z ekonomického hlediska i z důvodu nižšího rizika kontaminace nadále používána koncentrace 0,5 % tetrahydridoboritanu sodného.



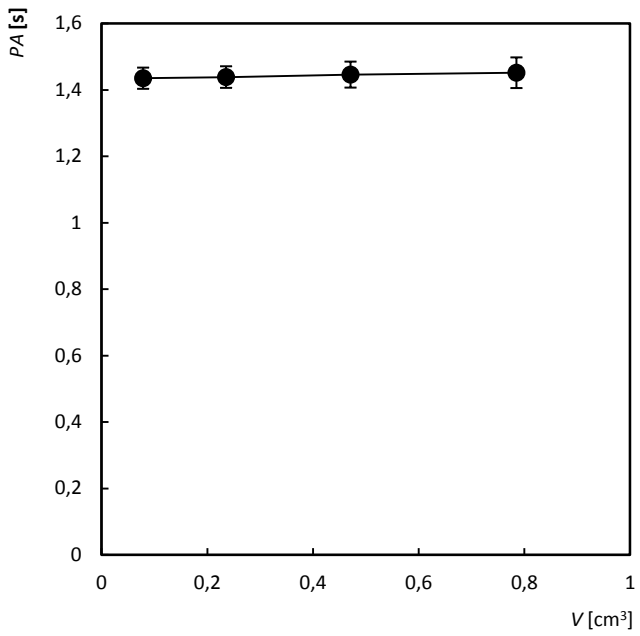
Obr. 11: Závislost plochy píku na koncentraci kyseliny chlorovodíkové.

c(Bi) = 200 ng cm^{-3}, c($NaBH_4$) = 0,5 %, c(KOH) = 0,4 %, V (cívky) = 0,08 cm^3,
F($Ar_{generátor}$)= 100 cm^3 min^{-1}, F($H_{2\ plamen}$) = 100 cm^3 min^{-1}, OH= 0 mm.



Obr. 12: Závislost plochy píku na koncentraci tetrahydridoboritanu sodného. c(Bi) = 200 ng cm^{-3}, c(HCl) = 1 mol dm^{-3}, c(KOH) = 0,4 %, V (cívky) = 0,08 cm^3, $F(Ar_{generátor})$ = 100 cm^3 min^{-1}, $F(H_{2\ plamen})$ = 100 cm^3 min^{-1}, OH= 0 mm.

Dále byla optimalizována délka a tedy i objem reakční cívky. Testovány byly cívky o délkách 10, 30, 60 a 100 cm (o objemech 0,08; 0,24; 0,47 a 0,79 cm^3). Ze závislosti na obr. 13 je patrné, že objem reakční cívky nemá vliv na generování, jelikož bylo získáno plató v celém rozsahu. Pro další experimenty byla zvolena jako optimální nejkratší cívka o délce 10 cm a objemu 0,08 cm^3.



Obr. 13 : Vliv objemu reakční cívky.
c(Bi) = 200 ng cm^{-3}, c($NaBH_4$) = 0,5 %, c(HCl) = 1 mol dm^{-3}, c(KOH) = 0,4 %,
F($Ar_{generátor}$) = 100 cm^3 min^{-1}, F($H_{2\ plamen}$) = 100 cm^3 min^{-1}, OH= 0 mm.

Zvolené optimální podmínky generování hydridu bismutu, které byly využity v následujících částech práce, jsou shrnuty v tab. 1.

Tab.1: Optimální podmínky generování hydridů bismutu.

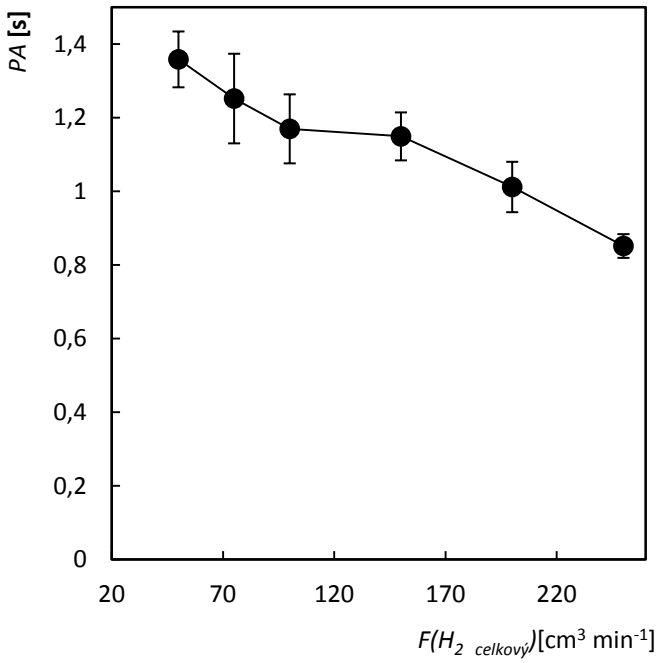
Koncentrace HCl	1 mol dm^{-3}
Koncentrace $NaBH_4$	0,5 %
Koncentrace KOH	0,4 %
Objem reakční cívky	0,08 cm^3

3.1.2 Podmínky atomizace v MDF

3.1.2.1 Vliv vodíku

Vodík je v MDF potřeba k zapálení a hoření plamene. Optimální frakce vodíku v plamenu byla hledána tak, že byl současně měněn průtok $H_{2\ plamen}$ a Ar_{plamen} přiváděný za separátor fází. Po celou dobu experimentu byl udržován konstantní celkový průtok

přiváděných plynů do MDF a to 300 cm^3 min^{-1}. Výsledný celkový průtok H_2 na obr. 14 obsahuje také nezanedbatelné množství vodíku vznikajícího z rozkladu tetrahydridoboritanu $F(H_{2\ generátor} = 15\ cm^3\ min^{-1})$. Průtok $Ar_{generátor}$ byl zvolen 50 $cm^3 min^{-1}$. Ze získané závislosti na obr. 14 můžeme konstatovat, že se snižující se frakcí vodíku roste signál. Nejvyšší signál byl naměřen při celkovém průtoku vodíku 50 cm^3 min^{-1} a celkovém průtoku argonu 250 cm^3 min^{-1}, což odpovídá poměru 1:5. Při nižších průtocích vodíku nebyl však plamen dostatečně stabilní a často zhasínal. Proto byl s ohledem na další experimenty vybrán jako optimální poměr vodíku a argonu 1:3.

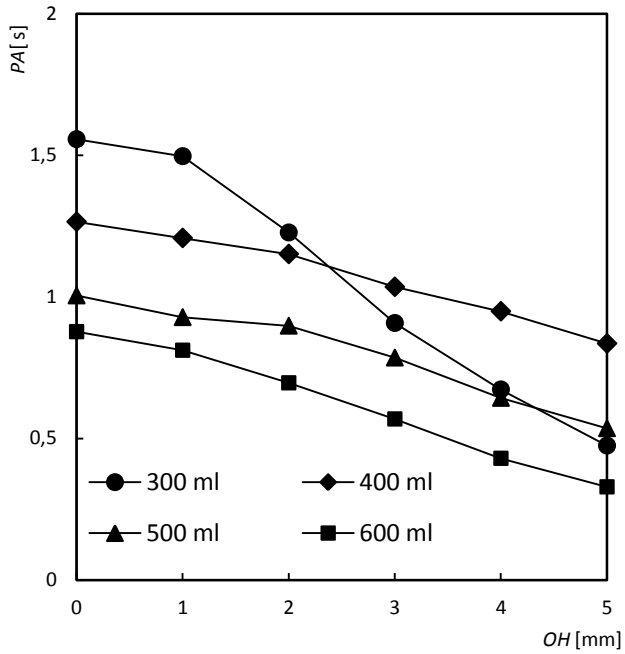


Obr. 14: Závislost plochy píku na celkovém průtoku vodíku za konstantního celkového průtoku plynů (300 cm^3 min^{-1}).
c(Bi) = 200 ng cm^{-3}, OH = 0 mm, $F(Ar_{generátor}) = 50\ cm^3\ min^{-1}$,
$F(Ar_{plamen}) = 300 - F(Ar_{generátor}) - F(H_{2\ plamen}) - F(H_{2\ generátor})$.

3.1.2.2 Vliv celkového průtoku plynů a pozorovací výšky

Dále byl vyšetřován vliv pozorovací výšky (OH) a celkového průtoku plynů za konstantního poměru vodíku a argonu 1:3. Měření bylo provedeno v rozsahu celkového průtoku plynů od 300 cm^3 min^{-1} do 600 cm^3 min^{-1}. Nižší hodnota průtoku nebyla zahrnuta kvůli nestabilitě MDF při takto zvoleném poměru plynů. Ze závislostí na

obr. 15 je patrné, že nejvyššího signálu bylo dosaženo při celkovém průtoku 300 cm^3 min^{-1} a OH rovno 0 mm. Dále je zřejmé, že se zvyšujícím se celkovým průtokem signál klesá. Vyšší průtoky u MDF sice způsobují lepší stínění volných atomů před molekulárním kyslíkem, ale zkracují jejich dobu setrvání v pozorovaném objemu plamene, čímž dochází k poklesu signálu. Optimální hodnota celkového průtoku plynů a OH byla zvolena 300 cm^3 min^{-1} a 0 mm. Optimální podmínky atomizace bismutanu v MDF s detekcí AAS jsou uvedeny v tab. 2.



Obr. 15: Závislost plochy píku na pozorovací výšce pro různé celkové průtoky plynů. c(Bi) = 200 ng cm^{-3}, F($Ar_{generátor}$) = 50 cm^3 min^{-1}.

Tab. 2: Vybrané optimální podmínky atomizace bismutanu v MDF s detekcí AAS.

F($Ar_{celkový}$)[a]	225 cm^3 min^{-1}
F($H_{2\ celkový}$)[b]	75 cm^3 min^{-1}
OH	0 mm

[a] složen ze dvou průtoků: F($Ar_{generátor}$) = 50 cm^3 min^{-1} a F(Ar_{plamen}) = 175 cm^3 min^{-1}

[b] složen ze dvou průtoků: F($H_{2\ generátor}$) = 15 cm^3 min^{-1} a F($H_{2\ plamen}$) = 60 cm^3 min^{-1}

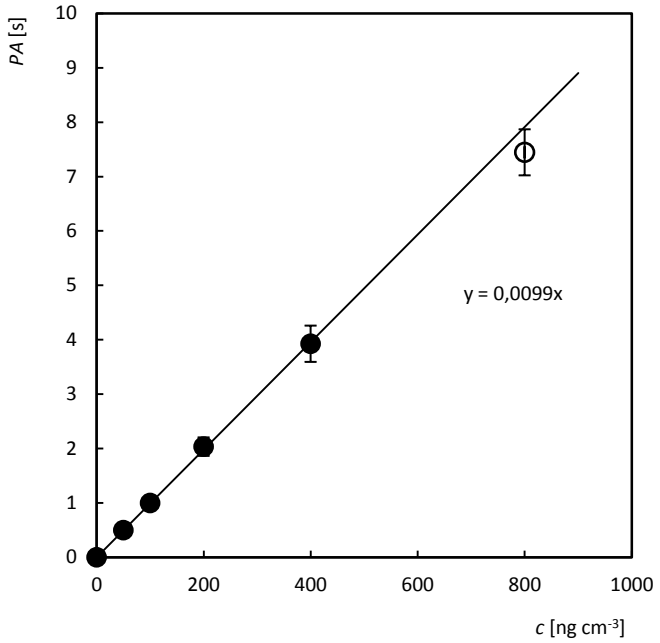
3.1.3 Analytické charakteristiky HG-AAS s MDF

Při optimálních podmínkách generování a atomizace byla změřena kalibrační závislost, stanoveny LOD a LOQ a opakovatelnost, které jsou uvedeny v tabulce č. 3.

Opakovatelnost byla stanovena opakovaným měřením standardního roztoku (15x) o koncentraci 200 ng cm^{-3}. Kalibrační závislost (obr. 16) byla lineární v rozsahu koncentrací 0 - 400 ng cm^{-3}. U vyšších koncentrací dochází k zakřivení kalibrační závislosti, proto nebyla hodnota 800 ng cm^{-3} použita pro vyhodnocení směrnice kalibrační závislosti.

Tab. 3: Získané meze detekce a stanovitelnosti a opakovatelnost pro HG-AAS s MDF.

	MDF
LOD [ng cm^{-3}]	20
LOQ [ng cm^{-3}]	67
s_r [%]	3,6



Obr. 16: Kalibrační závislost pro HG-AAS s MDF.
c(Bi) = 50; 100; 200; 400; 800 ng cm^{-3}.

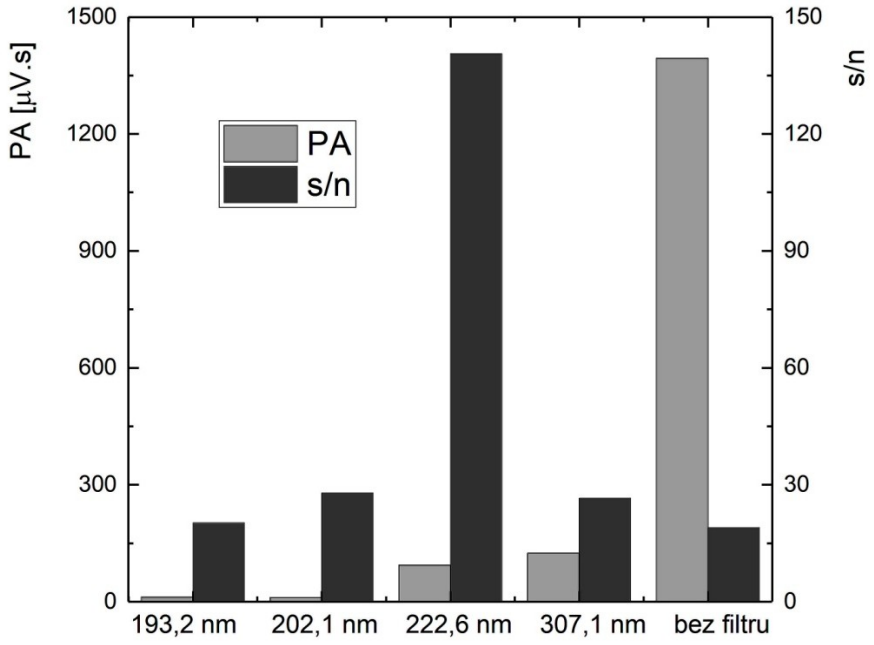
3.2 HG-AFS s MDF

Pro optimalizaci podmínek atomizace v MDF a FIGS ve spojení s AFS byly převzaty podmínky generování ověřené experimenty s AAS (kapitola 3.1.1). Pro experimenty byl používán standardní pracovní roztok Bi o koncentraci 1 ng cm^{-3}. Oproti experimentům s AAS je třeba, aby pozorovací výška byla podstatně větší než 0 mm, aby nedocházelo k nechtěným odrazům záření z výbojky na stěnách atomizátoru do detektoru. Proto je obecně nutné používat podstatně vyšší průtoky plynů do MDF. Počáteční podmínky pro atomizaci v MDF pro AFS byly převzaty z předešlých prací na HG-AFS arsenu [21]. Průtok Ar_{plamen} byl 600 cm^3 min^{-1}, $Ar_{generátor}$ 80 cm^3 min^{-1} a průtok $H_{2\ plamen}$ 185 cm^3 min^{-1}. Pozorovací výška byla nastavena na 7 mm.

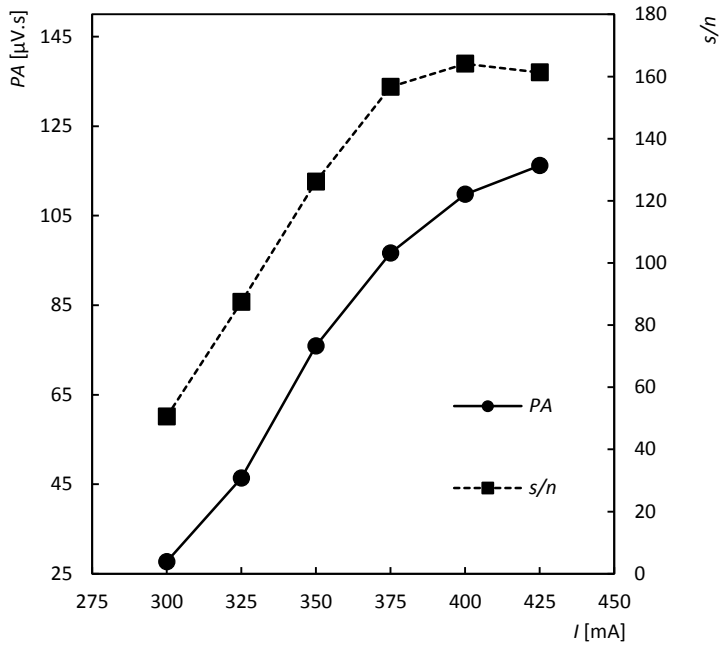
3.2.1 Optimalizace optické cesty AFS a EDL zdroje

Po vložení Bi EDL do laboratorně vyvinutého přístroje (schéma na obr. 6) bylo nejprve potřeba nastavit optimální vzájemné pozice jednotlivých komponent mezi sebou (horizontální pozice atomizátoru vůči EDL výbojce a vůči detektoru, pozice EDL výbojky vůči detektoru) s cílem o dosažení co možná nejvyšší intenzity fluorescenčního záření a nejnižšího příspěvku rozptýleného záření z EDL zdroje na částech aparatury. Dále bylo třeba vybrat vhodný interferenční filtr. Byly testovány různé filtry s maximem propustnosti pro různé vlnové délky a pološířkou (193,2 ± 20 nm, 202,1 ± 10 nm, 222,63 ± 10 nm a 307,1 ± 10 nm) tak, aby pokryly všechny intensivní fluorescenční čáry bismutu, konkrétně 206,1; 222,8; 223,1 a 306,7 nm [10]. Také byl zkoušen případ bez použití filtru. Na obr. 17 jsou porovnány dosažené citlivosti a poměry signálu k šumu pro jednotlivé případy. Jako optimální byl zvolen filtr pro vlnovou délku 222,63 nm, s kterým bylo jednoznačně dosaženo nejvyššího poměru signálu k šumu.

Důležitým parametrem byl napájecí proud EDL výbojky. Ze závislosti signálu plochy píku na napájecím proudu výbojky (obr. 18) je patrné, že nejvyšší signál byl zaznamenán při 425 mA, nicméně poměr signálu k šumu dosahoval nejvyšší hodnoty při 400 mA. Za optimální hodnotu napájecího proudu bylo tedy zvoleno 400 mA, což je i doporučená hodnota pro tento typ výbojky s modulovaným napájecím proudem.



Obr. 17: Srovnání dosažených citlivostí (plochy píků) a poměrů signál/šum pro jednotlivé interferenční filtry. c(Bi) = 1 ng cm^{-3}, U(PMT) = 1000-1400 V.

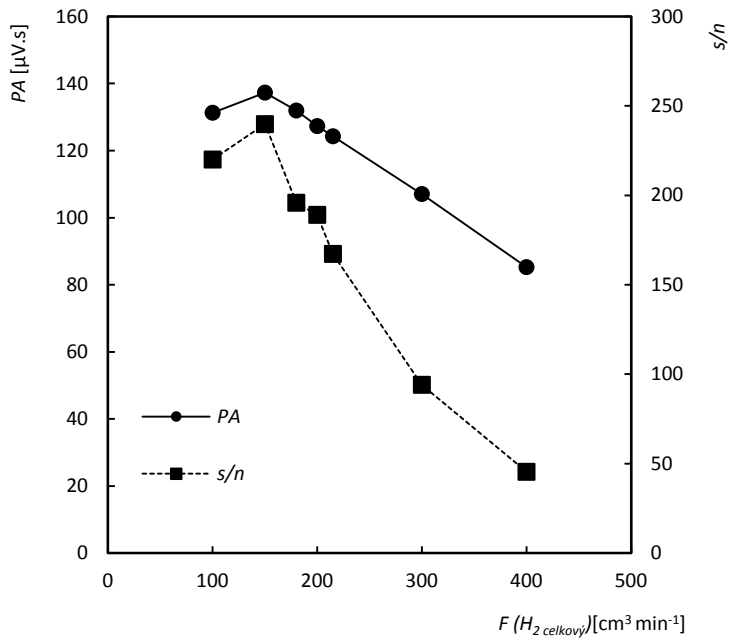


Obr. 18: Závislost plochy píku a poměru signál/ šum na napájecím proudu EDL výbojky. c(Bi) = 1 ng cm^{-3}, OH = 7 mm, U(PMT) = 1400 V, F(Ar_{plamen}) = 600 cm^3 min^{-1}, F($Ar_{generátor}$) = 80 cm^3 min^{-1}, F($H_{2\ plamen}$) = 185 cm^3 min^{-1}; F($H_{2\ generátor}$) = 15 cm^3 min^{-1}.

3.2.2 Podmínky atomizace v MDF

3.2.2.1 Vliv vodíku

Vliv průtoku vodíku za konstantního celkového průtoku přiváděných plynů 900 cm^3 min^{-1} byl měřen v rozmezí od 100 do 400 cm^3 min^{-1}. Stejně jako v případě měření s AAS, výsledný celkový průtok H_2 na obr. 19 obsahuje také nezanedbatelné množství vodíku vznikajícího z rozkladu tetrahydridoboritanu (15 cm^3 min^{-1}). Ze získané závislosti je zřejmé, že se snižující se frakcí vodíku roste signál až do celkového průtoku vodíku 150 cm^3 min^{-1}, což při celkovém průtok argonu 750 cm^3 min^{-1} odpovídá poměru 1:5. Tato hodnota poměru průtoku vodíku ku argonu byla zvolena jako optimální.

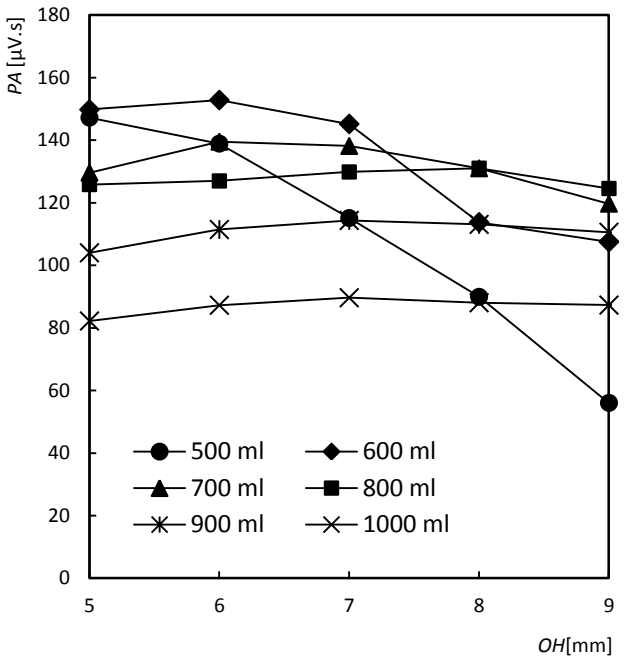


Obr. 19: Závislost plochy píku a poměru signál/ šum na celkovém průtoku vodíku. c(Bi) = 1 ng cm^{-3}, OH = 7 mm, U(PMT) = 1300 V, $F(Ar_{generátor})$ = 80 cm^3 min^{-1}, $F(Ar_{plamen}) = 900 - F(Ar_{generátor}) - F(H_{2\ plamen}) - F(H_{2\ generátor})$.

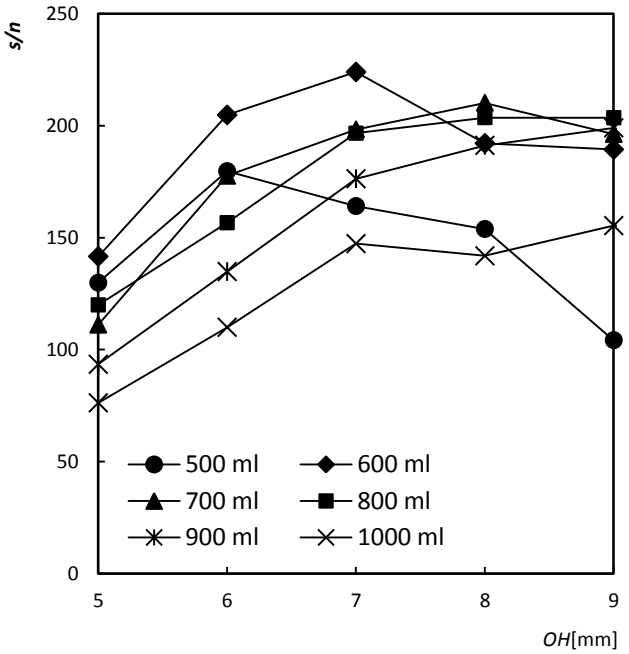
3.2.2.2 Vliv celkového průtoku plynů a pozorovací výšky

Celkový průtok plynů byl optimalizován za konstantního poměru vodíku a argonu 1:5. Optimalizace byla provedena v rozsahu celkových průtoků plynů od 500 do

1000 cm^3 min^{-1}. Pro každý celkový průtok plynů byla proměřena závislost na OH. Ze získaných závislostí (obr. 20) je patrné, že nejvyššího signálu bylo dosaženo při průtoku 600 cm^3 min^{-1} a OH = 6 mm. Se zvyšujícími se průtoky argonu a vodíku výrazně klesá signál, což je způsobeno ředěním volných atomů v pozorovaném objemu plamene. Při vyšších celkových průtocích plynů do plamene dochází k nárůstu fyzického objemu plamene a závislost na OH neklesá tak rychle jako pro nižší průtoky, či je závislost dokonce konstantní (pro 800 – 100 cm^3 min^{-1}). Pokles hodnot poměru signálu k šumu při OH = 5 mm u všech celkových průtoků plynů (obr. 21) není dán poklesem citlivosti, což dokazuje obr. 20, ale zvýšením šumu. Při této pozorovací výšce již dochází k odrazům záření z EDL výbojky do detektoru, což vede ke zvýšení intenzity pozadí, a tedy i šumu. Optimální hodnoty celkového průtoku plynů a OH byly zvoleny 600 cm^3 min^{-1} a 7 mm, při kterých byl získán nejvyšší poměr signál/šum (obr. 21).



Obr. 20: Závislost plochy píku na celkovém průtoku plynů a pozorovací výšce.
c(Bi)= 1 ng cm^{-3},U (PMT)= 1300 V, F($Ar_{generátor}$) = 80 cm^3 min^{-1}, F($H_{2\ generátor}$) = 15 cm^3 min^{-1}.



Obr. 21: Závislost signál/šum na celkovém průtoku plynů a pozorovací výšce.
c(Bi) = 1 ng cm^{-3}, U (PMT) = 1300 V, $F(Ar_{generátor})$ = 80 cm^3 min^{-1}, $F(H_{2\ generátor})$ = 15 cm^3 min^{-1}.

V tab. 4 jsou shrnuty vybrané optimální podmínky atomizace bismutanu v MDF pro AFS.

Tab. 4: Optimální podmínky atomizace bismutanu v MDF s detekcí AFS.

$F(Ar_{celkový})^a$	500 cm^3 min^{-1}
$F(H_{2\ celkový})^b$	100 cm^3 min^{-1}
OH	7 mm

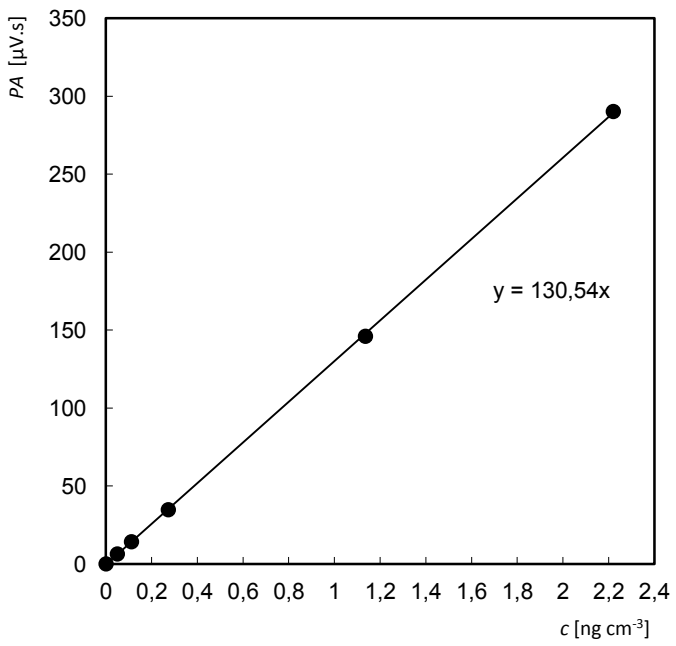
[a] složen ze dvou průtoků: $F(Ar_{generátor})$ = 80 cm^3 min^{-1} a $F(Ar_{plamen})$ = 420 cm^3 min^{-1}
[b] složen ze dvou průtoků: $F(H_{2\ generátor})$ = 15 cm^3 min^{-1} a $F(H_{2\ plamen})$ = 85 cm^3 min^{-1}

3.2.3 Analytické charakteristiky pro HG-AFS s MDF

Při optimálních podmínkách atomizace (tab. 4) a generování (tab. 1) byla změřena kalibrační závislost, stanoveny LOD, LOQ a opakovatelnost, které jsou uvedeny v tab. 5. Kalibrační závislost (obr. 22) byla lineární v rozsahu měřených koncentrací 0,05 až 2,22 ng cm^{-3}. Opakovatelnost byla stanovena opakovaným měřením standardního roztoku (15x) o koncentraci 1 ng cm^{-3}.

Tab. 5: Stanovené meze detekce a stanovitelnosti a opakovatelnost pro HG-AFS s MDF.

	MDF
LOD [pg cm^{-3}]	**2,3**
LOQ [pg cm^{-3}]	**7,7**
s_r [%]	**0,5**



Obr. 22: Kalibrační závislost pro HG-AFS s MDF.
c(Bi) = 0,049; 0,11; 0,27; 1,14; 2,22 ng cm^{-3}, U(PMT) = 1300 V.

3.3 HG-AFS s FIGS

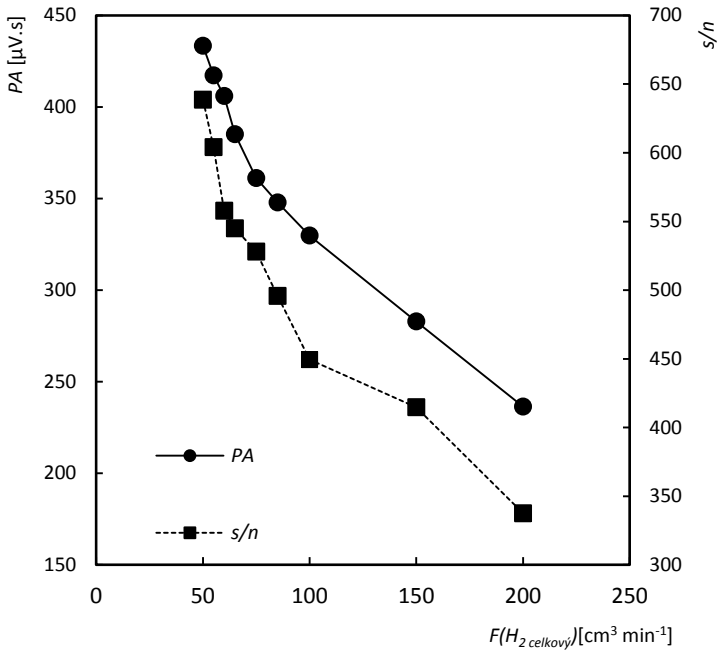
3.3.1 Podmínky atomizace ve FIGS atomizátoru

Druhým atomizátorem, který byl pro AFS použit byl tzv. „flame-in-gas-shield“ atomizátor. Pro tento typ atomizátoru bylo potřeba optimalizovat více parametrů než u MDF z důvodu jeho konstrukce. Do stínicí jednotky, jež obklopuje vertikální křemennou trubici, je přiváděn vnitřní a vnější průtok argonu. Křemennou kapilárou umístěnou ve vertikální ose křemenné trubice atomizátoru byl přiváděn kyslík. Všechny tyto zmíněné parametry byly optimalizovány v této práci společně se vzdáleností kapiláry od ústí křemenné trubice (CD) a také OH.

Počáteční podmínky pro atomizaci ve FIGS byly podobně jako pro MDF převzaty z předešlých prací na HG-AFS arsenu [21]. Tyto podmínky byly: CD 3 mm, OH 7 mm, průtok vnitřního stínicího argonu ($Ar_{shield\ I}$) 1500 $cm^3\ min^{-1}$, vnějšího stínicího argonu ($Ar_{shield\ II}$) 2000 $cm^3\ min^{-1}$ a průtok kyslíku kapilárou 5 $cm^3\ min^{-1}$. Průtoky ostatních plynů byly převzaty z optimalizace podmínek atomizace v MDF pro AFS optimalizovaných v této práci (kap. 3.2.2.): průtok Ar_{plamen} 420 $cm^3\ min^{-1}$, průtok $Ar_{generátor}$ 80 $cm^3\ min^{-1}$, průtok $H_{2\ plamen}$ 85 $cm^3\ min^{-1}$.

3.3.1.1 Vliv vodíku

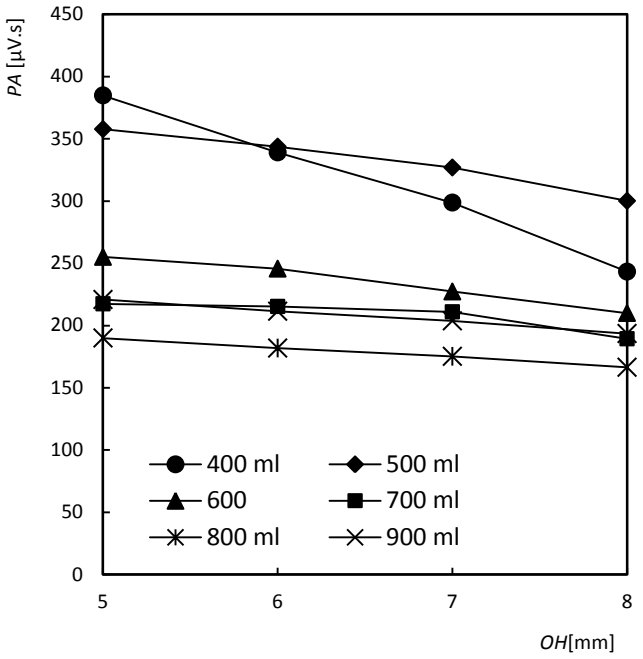
Vliv celkového průtoku vodíku za konstantního celkového průtoku přiváděných plynů, 600 $cm^3\ min^{-1}$, byl měřen v rozpětí hodnot od 45 do 200 $cm^3\ min^{-1}$. Stejně jako v předchozích případech, výsledný celkový průtok H_2 obsahuje také 15 $cm^3\ min^{-1}$ vodíku vznikajícího z rozkladu tetrahydridoboritanu. Ze závislosti plochy píku na celkovém průtoku vodíku (obr. 23) je vidět, že s klesajícím průtokem celkového vodíku signál stále roste. Nicméně je třeba upozornit, že při průtocích vodíku rovno nebo méně než 65 $cm^3\ min^{-1}$, což odpovídá v tomto případě poměru průtoků vodíku ku argonu 1:8, nebyl plamínek dostatečně stabilní a někdy zhasínal. Především to bylo ovlivněné tím, zda bylo nebo nebylo zapnuté HG, které kontinuálně přispívá 15 $cm^3\ min^{-1}$ vodíku.



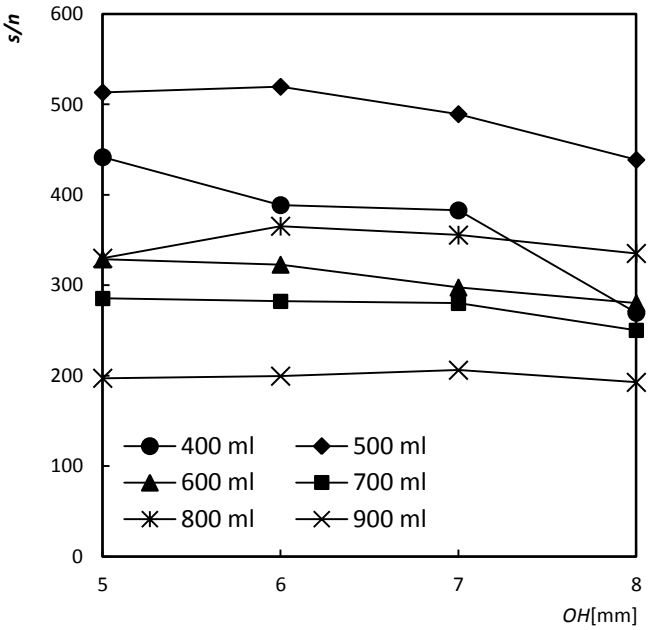
Obr. 23: Závislost plochy píku a signálu/šum na celkovém průtoku vodíku.
c(Bi) = 1 ng cm^{-3}, CD= 3 mm, OH = 6 mm, U(PMT) = 1300 V, $F(Ar_{generátor})$ = 80 cm^3 min^{-1}, $F(H_{2\ generátor})$ = 15 cm^3 min^{-1}, $F(Ar_{shield\ I})$ = 1500 cm^3 min^{-1}, $F(Ar_{shield\ II})$ = 2000 cm^3 min^{-1}, $F(O_2)$ = 5 cm^3 min^{-1}.

3.3.1.2 Vliv celkového průtoku plynů a pozorovací výšky

Dalším parametrem optimalizace byl celkový průtok plynů za konstantního poměru vodíku a argonu. Pro tento experiment byl zvolen poměr 1:8. Optimalizace byla provedena v rozsahu celkového průtoků plynů od 400 do 900 cm^3 min^{-1}. Ze závislosti na obr. 24 je vidět, že nejvyššího signálu bylo dosaženo při průtoku 400 cm^3 min^{-1}. Nicméně kvůli špatné stabilitě plamínku a nejvyššímu poměru signál/šum (obr. 25) byl jako optimální zvolen průtok 500 cm^3 min^{-1}. Podobně jako v předešlém případě vedly nízké hodnoty celkového průtoku vodíku k častému zhasínání plamene, zejména v případě, když bylo vypnuto HG. Optimální hodnota OH byla pro průtok 500 cm^3 min^{-1} vybrána 6 mm, opět kvůli nejvyššímu poměru signál/šum (obr. 25).



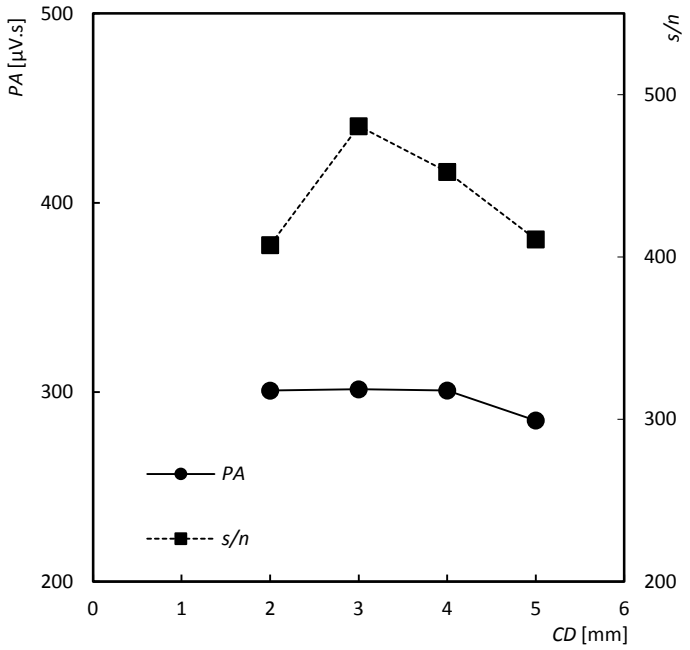
Obr. 24: Závislost plochy píku na celkovém průtoku plynů a pozorovací výšce. c(Bi) = 1 ng cm^{-3}, CD = 3 mm, U(PMT) = 1300 V, F($Ar_{generátor}$) = 80 cm^3 min^{-1}, F($H_{2\ generátor}$) = 15 cm^3 min^{-1}, F($Ar_{shield\ I}$) = 1500 cm^3 min^{-1}, F($Ar_{shield\ II}$) = 2000 cm^3 min^{-1}, F(O_2) = 5 cm^3 min^{-1}.



Obr. 25: Závislost signálu/ šum na celkovém průtoku plynů a pozorovací výšce. c(Bi) = 1 ng cm^{-3}, CD = 3 mm, U(PMT) = 1300 V, F($Ar_{generátor}$) = 80 cm^3 min^{-1}, F($H_{2\ generátor}$) = 15 cm^3 min^{-1}, F($Ar_{shield\ I}$) = 1500 cm^3 min^{-1}, F($Ar_{shield\ II}$) = 2000 cm^3 min^{-1}, F(O_2) = 5 cm^3 min^{-1}.

3.3.1.3 Vliv vzdálenosti kapiláry

Vliv vzdálenosti konce kapiláry od ústí křemenné trubice (CD) byl zkoumán v rozmezí hodnot 2 - 5 mm. Vzdálenost kapiláry neměla velký vliv na plochu píku, ale měla velký vliv na poměr signál/šum (obr. 26). Při hodnotě 2 mm již docházelo k odrazům záření z EDL výbojky od konce kapiláry do detektoru. Jako optimální byla zvolena hodnota 3 mm.

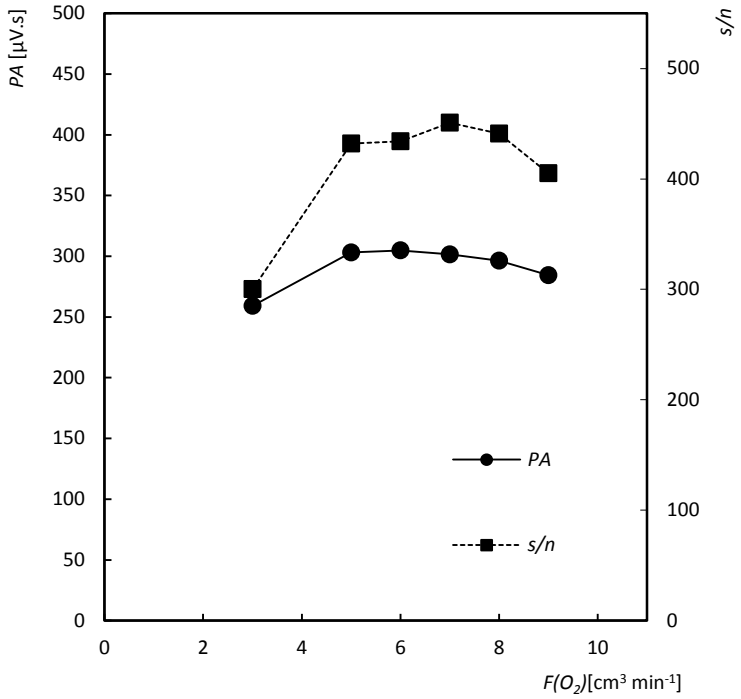


Obr. 26: Závislost plochy píku a signál/šum na vzdálenosti konce kapiláry od ústí křemenné trubice.

c(Bi) = 1 ng cm^{-3}, U(PMT) = 1300 V, F(Ar_{plamen}) = 360 cm^3 min^{-1}, OH = 6 mm, F($Ar_{generátor}$) = 80 cm^3 min^{-1}, F($H_{2\ plamen}$) = 45 cm^3 min^{-1}, F($H_{2\ generátor}$) = 15 cm^3 min^{-1}, F($Ar_{shield\ I}$) = 1500 cm^3 min^{-1}, F($Ar_{shield\ II}$) = 2000 cm^3 min^{-1}, F(O_2) = 7 cm^3 min^{-1}.

3.3.1.4 Vliv průtoku kyslíku

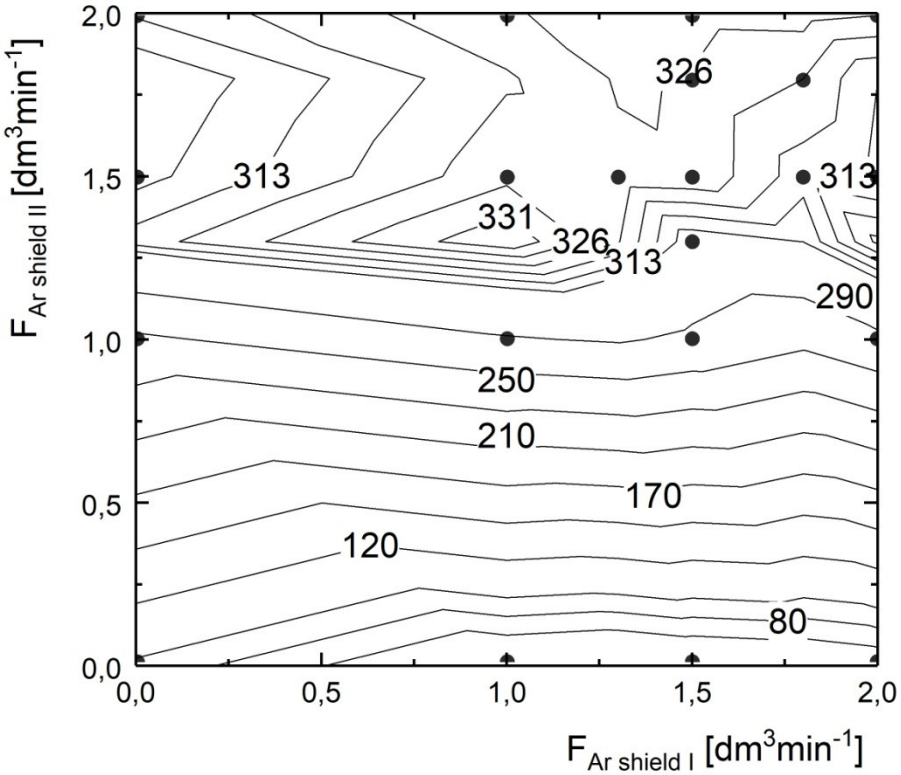
Optimalizován byl také průtok kyslíku, který byl přiváděn kapilárou, v rozmezí hodnot od 3 do 9 cm^3 min^{-1} (obr. 27). Výsledná plocha píku se příliš nemění v rozmezí 5 a 8 cm^3 min^{-1}. Za optimální hodnotu byl zvolen průtok 7 cm^3 min^{-1}, kdy bylo dosaženo nejvyššího poměru signál/šum.



Obr. 27: Závislost plochy píku a signálu/ šum na průtoku kyslíku.
c(Bi) = 1 ng cm^{-3}, U(PMT) = 1300 V, OH = 6 mm, F(Ar_{plamen}) = 360 cm^3 min^{-1},
F($Ar_{generátor}$) = 80 cm^3 min^{-1}, F($H_{2\ plamen}$) = 45 cm^3 min^{-1}, F($H_{2\ generátor}$) = 15 cm^3 min^{-1},
F($Ar_{shield\ I}$) = 1500 cm^3 min^{-1}, F($Ar_{shield\ II}$) = 2000 cm^3 min^{-1}.

3.3.1.5 Vliv průtoku stínicích plynů

Také byl proměřen vliv stínicích plynů, vnitřního ($Ar_{shield\ I}$) a vnějšího argonu ($Ar_{shield\ II}$), na stínění volných atomů v pozorovaném objemu plamínku. Dvouparametrová závislost byla vynesena do povrchového grafu a je znázorněna níže (obr. 28). Kombinace testovaných průtoků jsou v grafu označeny černou tečkou. Ze závislosti jsou patrná širší rozmezí průtoků stínicích plynů, v kterých je dosaženo nejvyšší citlivosti (1000-1500 cm^3 min^{-1} pro vnitřní stínicí plyn a 1300-1750 cm^3 min^{-1} pro vnější stínicí plyn). Jelikož bylo nejvyššího poměru signál/šum dosaženo při 1500 cm^3 min^{-1} pro oba stínicí plyny, byly tyto hodnoty zvoleny jako optimální.



Obr. 28: Dvouparametrová závislost plochy píku na průtocích stínicích plynů.
c(Bi) = 1 ng cm^{-3}, U(PMT) = 1300 V, CD = 3 mm, OH = 6mm,
$F(Ar_{plamen})$ = 360 cm^3 min^{-1}, $F(Ar_{generátor})$ = 80 cm^3 min^{-1},
$F(H_{2\ plamen})$ = 45 cm^3 min^{-1},$F(H_{2\ generátor})$ = 15 cm^3 min^{-1}, $F(O_2)$ = 7 cm^3 min^{-1}.

3.3.1.6 Shrnutí podmínek atomizace ve FIGS atomizátoru s detekcí AFS.

Z přechozích experimentů byly po úvaze vybrány optimální podmínky atomizace ve FIGS atomizátoru s detekcí AFS, které jsou shrnuty v tab. 6. I když je z obr. 23 zřejmé, že nejvyšší citlivosti i poměry signál/šum jsou dosahovány s velmi nízkými frakcemi vodíku v plamenu, byl nakonec vybrán přibližný poměr průtoků vodíku ku argonu 1:7. Tento poměr odpovídá celkovému průtoku vodíku 60 cm^3 min^{-1} při celkovém průtoku plynů 500 cm^3 min^{-1}. Toto kompromisní řešení bylo zvoleno, aby nedocházelo vůbec k nechtěnému zhasínání plamene při vypnutí HG, jelikož zapalování plamene ve FIGS a následná stabilizace citlivosti trvá podstatně déle než u MDF.

Tab. 6: Optimální podmínky atomizace ve FIGS atomizátoru s AFS detekcí.

$F(Ar_{celkový})^a$	440 cm^3 min^{-1}
$F(H_{2\ celkový})^b$	60 cm^3 min^{-1}
$F(Ar_{shield\ I})$	1500 cm^3 min^{-1}
$F(Ar_{shield\ II})$	1500 cm^3 min^{-1}
$F(O_2)$	7 cm^3 min^{-1}
OH	6 mm
CD	3 mm

[a] složen ze dvou průtoků: $F(Ar_{generátor})$ = 80 cm^3 min^{-1} a $F(Ar_{plamen})$ = 360 cm^3 min^{-1}

[b] složen ze dvou průtoků: $F(H_{2\ generátor})$ = 15 cm^3 min^{-1} a $F(H_{2\ plamen})$ = 45 cm^3 min^{-1}

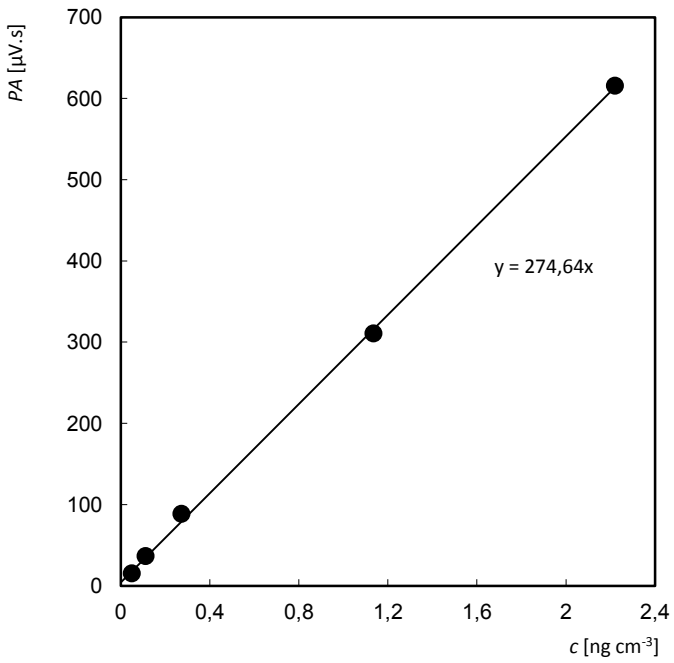
3.3.2 Analytické charakteristiky HG-AFS s FIGS atomizátorem

Při optimálních podmínkách atomizace (tab. 6) a generování (tab. 1) byla změřena kalibrační závislost, stanoveny LOD, LOQ a opakovatelnost, které jsou uvedeny v tab. 7.

Kalibrační závislost (obr. 29) byla lineární v rozsahu měřených koncentrací 0,05 - 2,2 ng cm^{-3}. Citlivost získaná s FIGS atomizátorem dosahovala přibližně více jak dvojnásobné hodnoty oproti MDF. Opakovatelnost byla změřena z 13ti měření standardního roztoku bismutu o koncentraci 1 ng cm^{-3} a byla stanovena 0,3 %.

Tab.7: Získané meze detekce a stanovitelnosti a opakovatelnost pro HG-AFS s FIGS.

	FIGS
LOD [pg cm^{-3}]	**1,6**
LOQ [pg cm^{-3}]	**5,3**
s_r [%]	**0,3**



Obr. 29: Kalibrační závislost pro HG-AFS s FIGS.
c(Bi) = 0,049; 0,11; 0,27; 1,14; 2,22 ng cm^{-3},U(PMT) = 1400 V.

3.4 Certifikovaný referenční materiál

Pro ověření správnosti byl metodou HG-AFS s MDF a FIGS atomizátorem stanoven obsah bismutu v certifikovaném referenčním materiálu vody NIST 1643f a porovnán s certifikovanou koncentrací bismutu 12,62 ± 0,11 ng cm^{-3}. Stanovení bylo provedeno pomocí metody kalibrační přímky (obr. 24 a 29) po 20ti násobném naředění certifikovaného referenčního materiálu kyselinou chlorovodíkovou o koncentraci 1 mol dm^{-3}. Koncentrace bismutu v CRM byla stanovena na 13,3 ± 0,1 ng cm^{-3} s použitím MDF atomizátoru a 13,8 ± 0,2 ng cm^{-3} s použitím FIGS atomizátoru.

3.5 Porovnání analytických charakteristik

V tab. 8 jsou srovnány získané analytické charakteristiky pro metody HG-AAS s MDF, HG-AFS s MDF a HG-AFS s FIGS atomizátorem. Je vidět, že metody AFS jsou přibližně o 4 řády citlivější než metoda HG-AAS s MDF atomizátorem. Citlivost

metody HG-AFS s FIGS atomizátorem je asi dvakrát vyšší než s MDF atomizátorem. Rozdíl ve výsledných LOD pro oba tyto atomizátory je významný, ale nedosahuje přesně faktoru 2, což může být přisouzeno nepatrně vyššímu šumu FIGS atomizátoru. Porovnáním relativních směrodatných odchylek pro jednotlivé metody bylo zjištěno, že metodou HG-AFS je dosahováno podstatně vyšší přesnosti než metodou HG-AAS.

Tab. 8: Porovnání analytických charakteristik.

	HG-AAS s MDF	HG-AFS s MDF	HG-AFS s FIGS
LOD [pg cm^{-3}]	20 000	2,3	1,6
LOQ [pg cm^{-3}]	67 000	7,7	5,3
opakovatelnost, s_r [%]	3,6	0,5	0,3

4. ZÁVĚR

Cílem této práce bylo optimalizovat podmínky chemického generování hydridů (HG) bismutu za použití miniaturního difúzního plamene (MDF) s atomovou absorpční spektrometrií (AAS) a dále optimalizovat podmínky atomizace a detekce volných atomů v MDF a tzv. „flame-in-gas-shield“ (FIGS) atomizátoru pro atomovou fluorescenční spektrometrii (AFS).

V první části byly zkoumány podmínky mající vliv na HG. Jako optimální podmínky pro použité průtokové rychlosti reagencií (4 cm^3 min^{-1} pro kyselinu chlorovodíkovou a 1,2 cm^3 min^{-1} pro roztok tetrahydridoboritanu) byly zvoleny: koncentrace kyseliny chlorovodíkové 1 mol dm^{-3}, koncentrace tetrahydridoboritanu 0,5 % (m/v) a minimální objem reakční cívky. Následně byly optimalizovány parametry ovlivňující atomizaci a detekci volných atomů v obou plamenových atomizátorech, kterými byly frakce vodíku, celkový průtok plynů a pozorovací výška. Z důvodu složitější konstrukce byl ve FIGS atomizátoru navíc studován vliv dalších parametrů, např. průtok kyslíku zaváděného kapilárou a průtoky stínicích plynů potřebných pro stínění volných atomů. Jednoznačně se ukázalo, že pro MDF v AAS je výhodné používat co nejnižší celkový průtok plynů s minimální pozorovací výškou. Tyto parametry nejsou však vhodné pro AFS kvůli nežádoucím odrazům záření z výbojky od konce vertikální trubice atomizátoru do detektoru. Použitím významně vyššího celkového průtoku plynů je nutné vytvořit větší objem plamene, aby mohlo být záření ze zdroje fokusováno do vhodné zóny plamene ve větší vzdálenosti od ústí vertikální trubice.

Ze získaných analytických charakteristik lze konstatovat, že metoda HG-AAS s MDF atomizátorem je přibližně o 4 řády méně citlivá než metoda HG-AFS. Dosažená mez detekce pro HG-AFS s MDF atomizátorem je totiž vynikající (2,3 pg cm^{-3}) a může být ještě nepatrně snížena použitím FIGS atomizátoru (1,6 pg cm^{-3}). Stejně vynikající je i opakovatelnost metody HG-AFS s oběma atomizátory, která dosahuje běžně hodnoty pod 1 %. Vezmeme-li však v úvahu složitost konstrukce FIGS atomizátoru, nároky na jeho obsluhu a nemalou spotřebu argonu pro stínicí plyny, není použití FIGS atomizátoru velkým přínosem pro měření autentických vzorků.

Na závěr byla také ověřena správnost metody HG-AFS s MDF i FIGS atomizátorem stanovením koncentrace bismutu v certifikovaném referenčním materiálu vody NIST 1643f. Stanovená koncentrace dosahuje hodnoty výtěžnosti 105 ± 1 % pro MDF a 109 ± 2 % pro FIGS atomizátor. Čím je tato nepatrně vyšší výtěžnost dána, bude předmětem dalšího studia.

5. ZDROJE

[1] Sadler P.J. , Li H., Sun H. Coordination chemistry of metals in medicine: target sites for bismuth. *Coord. Chem. Rev.* **1993**, 689–709.

[2] Pagel, W. A. History of Chemistry. J. R. Partington. *Medical History* **2012**, *6*, 189–191.

[3] Greenwood, N. N., Earnshaw, A.: *Chemistry of the Elements, Second Edition* Oxford, Butterworth-Heinemann 1997.

[4] Třebichavský, J., Havrdová, D., Blohberger, M. *Toxické kovy*; NSO – Ing. František Nekvasil: Kutná Hora, 1998.

[5] Li, H.; Sun, H. Recent advances in bioinorganic chemistry of bismuth. *Curr. Opin. Chem Biol.* **2012**, *16*, 74–83.

[6] DiPalma, J. Bismuth Toxicity, Often Mild, Can Result in Severe Poisonings. *Emergency Medicine News* **2001**, *16* (23).

[7] Bialek B., Diaz-Bone R.A., Pieper D, Hollmann M., Hensel R. Toxicity of Methylated Bismuth Compounds Produced by Intestinal Microorganisms to Bacteroides thetaiotaomicron, a Member of the Physiological Intestinal Microbiota. *J. Toxicol* **2011**, *9*, 1–6.

[8] Dopp, E.; Recklinghausen, U.; Hippler, J.; Diaz-Bone, R.; Richard, J.; Zimmermann, U.; Rettenmeier, A.; Himer, A. Toxicity of Volatile Methylated Species of Bismuth, Arsenic, Tin, and Mercury in Mammalian Cells In Vitro. *J. Toxicol* **2011**, *10*, 1–7.

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

[10] Sychra, V.; Svoboda, V.; Rubeška, I. *Atomic Fluorescence Spectroscopy*; Van Nostrand Reinhold Company: London, 1975.

[11] Dědina, J.; Tsalev, L. *Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry*; Wiley: Chichester, 1995.

[12] Dagnall, R.; Thompson, K.; West, T. Studies in atomic-fluorescence spectroscopy: The fluorescence characteristics and analytical determination of bismuth with an iodine electrodeless discharge tube as source. *Talanta* **1967**, *14*, 1467–1475.

[13] Komárek, J. *Atomová absorpční spektrometrie*, 1st ed.; Masarykova univerzita, 2000.

[14] Černohorský, T. *Atomová absorpční spektrometrie: kurz AAS 1*, 1st ed.; Spektroskopická společnost Jana Marka Marci a Vysoká škola chemicko-technologická: Praha, 2015.

[15] Rubeška I., Moldan B. *Atomová absorpční spektrofotometrie*; SNTL-Nakladatelství technické literatury: Praha, 1967.

[16] Welz B., Sperling M. *Atomic Absorption Spectrometry*; John Wiley & Sons, 2008.

[17] Pavelka J., Spěváčková V., Fara M., Kolihová D., Sysalová J., Kubáň V., Hoenig M., Kučera J., Plško E., Dědina J., Černohorský T. *Kurz atomové absorpční spektrometrie (pro pokročilé)*; Spektroskopická společnost Jana Marka Marci a Vysoká škola chemicko-technologická: Praha, 1996.

[18] Global Analytik Jena AG, (n.d.). https://www.analytik-jena.com/ (accessed April 15, 2019).

[19] Zou Z., Deng Y., Hu J., Jiang X., Hou X. Recent trends in atomic fluorescence spectrometry towards miniaturized instrumentation-A review. *Anal. Chim. Acta* **2018**, *1019*, 25–37.

[20] 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. *Spectrochim. Acta, Part B* **1998**, *53*, 1777–1790.

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

[22] 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* **2007,** *62*, 846–872.

[23] Dědina J., Fara M., Korečková J.,. Musil J, Plško E., Sychra V. *Vybrané metody analytické atomové spektrometrie*; ČSSS: Praha, 1987.

[24] Zhu Z., Zhang S., Lv Y., Zhang X. Atomization of hydride with a low-temperature, atmospheric pressure dielectric barrier discharge and its application to arsenic speciation with atomic absorption spectrometry. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 865–872.

[25] Butcher D.J. *Atomic fluorescence spectrometry, Encyclopedia of Analytical Science*, 2nd ed.; Elsevier: Oxford, 2005.

[26] Kirkbright G.F., Sargent M., Atomic Absorption and Fluorescence Spectroscopy, Academic Press, 1974.

[27] D'Ulivo A., Paolicchi I., Onor M., Zamboni R., Lampugnani L. Flame-in-gas-shield miniature flame hydride atomizers for ultra trace element determination by chemical vapor generation atomic fluorescence spectrometry. *Spectrochim. Acta, Part B* **1974**, *64*, 48–55.

[28] Browner R.F. Atomic-fluorescence spectrometry as an analytical technique. A critical review. *Analyst* **1974**, *99*, 617.

[29] Interferenční filtry. http://kamery.atesystem.cz/produkty/podle-vyrobce/schneider-kreuznach/filtry/ (accessed April 15, 2019).

[30] Němcová, I.; Čermáková, L.; Rychlovský, P., *Spektrometrické analytické metody I*. Univerzita Karlova: 2004.

[31] Dědina, J., Generation of Volatile Compounds for Analytical Atomic Spectroscopy. In *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, John Wiley & Sons, Ltd: 2006.

[32] Zhou L., Chen Ch., Xiandeng H., Chengbin Z.; Recent Advance of Hydride Generation–Analytical Atomic Spectrometry: Part II—Analysis of Real Samples. **2019**, *47*, 495–517.

[33] Gao Y., Xu M., Sturgeon R.E., Mester Z., Shi Z., Galea R., Saull P., Yang L. Metal Ion-Assisted Photochemical Vapor Generation for the Determination of Lead in Environmental Samples by Multicollector-ICPMS. *Anal. Chem.* **2015**, *85*, 4495–4502.

[34] Gao Y., Liu R., Yang L. Application of chemical vapor generation in ICP-MS: A review. *Chin. Sci. Bull.* **2013**, *58*, 1980–1991.

[35] Bobbins W.B., Caruso J.A. Development of Hydride Generation Methods for Atomic Spectroscopic Analysis. *Anal. Chem.* **1979**, *51*, 889–899.

[36] Laborda F., Bolea E., Baranguan M.T., Castillo J.R. Hydride generation in analytical chemistry and nascent hydrogen: when is it going to be over?. *Spectrochim. Acta, Part B* **2002**, *57*, 797–802.

[37] D'Ulivo A., Dědina J., Mester Z., Sturgeon R.E., Wang Q., Welz B. Mechanisms of chemical generation of volatile hydrides for trace element determination (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.* **2011**, *83*, 1283–1340.

[38] D'Ulivo A., Battistini S.S.T., Pitzalis E., Zamboni R., Mester Z., Sturgeon R.E. Effect of additives on the chemical vapour generation of bismuthane bytetrahydroborate(III) derivatization. *Anal Bioanal Chem* **2007**, *388*, 783–791.

[39] D'Ulivo A., Onor M., Spiniello R., Pitzalis E. Mechanisms involved in chemical vapor generation by aqueous tetrahydroborate(III) derivatization: Role of

hexacyanoferrate(III) in plumbane generation. *Spectrochim. Acta, Part B* **2008**, *63*, 835–842.

[40] He Y., Hou X., Zheng C., Sturgeon R.E. Critical evaluation of the application of photochemical vapor generation in analytical atomic spectrometry. *Anal Bioanal Chem* **2007**, *388*, 769–774.

[41] Denkhaus E., Beck F., Bueschler P., Gerhard R., Golloch A. Electrolytic hydride generation atomic absorption spectrometry for the determination of antimony, arsenic, selenium, and tin - mechanistic aspects and figures of merit. *Fresenius' J. Anal. Chem.* **2001**, *370*, 735–743.

[42] Červený V., Rychlovský P., Hraníček J., Šíma J. Elektrochemické generování těkavých sloučenin pro potřeby spektrálních analytických metod. *Chem. Listy* **2009**, *103*, 652–660.

[43] Zheng C., Ma Q., Wu L., Hou X., Sturgeon R.E. UV photochemical vapor generation–atomic fluorescence spectrometric determination of conventional hydride generation elements. *Microchem. J.* **2010**, *95*, 32–37.

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

[45] Zhou J., Deng D., Su Y., Lv Y. Determination of total inorganic arsenic in water samples by cadmium ion assisted photochemical vapor generation-atomic fluorescence spectrometry. *Microchem. J.* **2019**, *146*, 359–365.

[46] Romanovskiy K.A., Bolshov M.A., Münz A.V., Temerdashev Z.A., Burylin M.Yu., Sirota K.A. A novel photochemical vapor generator for ICP-MS determination of As, Bi, Hg, Sb, Se and Te. *Talanta* **2018**, *187*, 370–378.

[47] Růžička J., Hansen E.H. *Flow Injection Analysis*, 2nd ed.; Wiley: New York, 1988.

[48] Kolev S., McKelvie I. *Comprehensive Analytical Chemistry, Advances in Flow Injection Analysis and Related Techniques*; Elsevier: Amsterdam, 2009.

[49] Castro L.M.D. *Flow Analysis, Flow Injection Analysis: Instrumentation. Encyclopedia of Analytical Science*, 3rd ed.; Academic Press: Oxford, 2019.

[50] Pohl P., Jamroz P., Welna M., Szymczycha-Madeja A., Greda K., Chemical-vapor generation of transition metals through the reaction with tetrahydroborate in recent achievements in analytical atomic spectrometry. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2014**, *59*, 144–155.

[51] Krenželok M., Rychlovský P. Comparison of Hydride Generator/Gas-Liquid Phase Separator Systems for Continuous Hydride Generation in Atomic Absorption Spectrometry. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1998**, *63*, 164–181.

[52] Musil S., Matoušek T., Currier J.M., Stýblo M., Dědina J. Speciation Analysis of Arsenic by Selective Hydride Generation-Cryotrapping-Atomic Fluorescence Spectrometry with Flame-in-Gas-Shield Atomizer: Achieving Extremely Low Detection Limits with Inexpensive Instrumentation. *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 10422–10428.

[53] Musil S., Dědina J. A sapphire tube atomizer for on-line atomization and in situ collection of bismuthine for atomic absorption spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.* **2013**, *28*, 593–600.

[54] Matoušek T., Johansson M., Dědina J., Frech W. Spatially resolved absorption measurements of antimony atom formation and dissipation in quartz tube atomizers following hydride generation1This paper was published in the Special Issue of the Third European Furnace Symposium, Prague, Czech Republic, June 1998.1. *Spectrochim. Acta, Part B* **1999**, *54*, 631–643.

[55] ČR PV 2012-398. Dědina, J., Musil, S. a D´Ulivo, A.: Dvoukanálová stínicí jednotka atomizátoru pro atomovou fluorescenční spektrometrii. 14.6.2012.