

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Bc. Michaela Migašová

Chemické generování těkavých specií rtuti pro speciální analýzu
- optimalizace podmínek a analytické aplikace

Chemical generation of volatile mercury species for speciation analysis
- method optimization and analytical applications

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Dr. Inga Petry-Podgórska

Konzultanti: RNDr. Jan Kratzer, Ph.D.
RNDr. Václav Červený, Ph.D.

Praha, 2020

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.

V Praze dne 8. ledna 2020.

.....
Bc. Michaela Migašová

Tato diplomová práce vznikla na Ústavu analytické chemie AV ČR, v. v. i. na jeho detašovaném pracovišti Oddělení stopové prvkové analýzy v Praze. Práce byla finančně podporována výzkumným záměrem Ústavu analytické chemie AV ČR, v. v. i. (projekt RVO:68081715) a Grantovou agenturou ČR (projekt č. 18-01116S). Konzultanty této práce byli RNDr. Jan Kratzer, Ph.D. a RNDr. Václav Červený, Ph.D.

Poděkování

Chtěla bych tímto velmi poděkovat své školitelce Dr. Inze Petry-Podgórske za neskutečnou trpělivost a čas, který mi během měření diplomové práce věnovala. Také bych chtěla velmi poděkovat panu RNDr. Janu Kratzerovi, Ph.D. za trpělivost a rady během měření mé práce, a při zpracování výsledků. Poděkování patří také celému týmu Oddělení stopové prvkové analýzy Ústavu analytické chemie AV ČR, v. v. i., zejména RNDr. Tomáši Matouškovi, Ph.D. a Bc. Věře Schrenkové za provedení mechanistické studie týkající se změn speciální informace při generování těkavých specií rtuti a jejich kvantifikaci.

Také děkuji své rodině za trpělivost a podporu během celého mého vysokoškolského studia.

Abstrakt

Byly optimalizovány podmínky chemického generování čtyř těkavých specií rtuti a jejich následné atomizace za účelem speciální analýzy rtuťnatých iontů a iontů methylrtuti, ethylrtuti a fenylrtuti s detekcí atomovou absorpční spektrometrií (AAS). Ke generování těkavých specií (VSG) rtuti byla použita konstrukce generátoru s dávkováním do proudu a k atomizaci vyhřívaný křemenný atomizátor. Optimalizovanými parametry byly koncentrace kyseliny chlorovodíkové a tetrahydridoboritanu sodného, délka reakční cívky, průtok nosného plynu, atomizační teplota a množství kyslíku v atomizátoru. Dále byl studován i vliv sušící trubice na signál specií Hg a použitelnost chloridu cínatého jako alternativního redukčního činidla místo tetrahydridoboritanu sodného. Za optimálních podmínek byly naměřeny kalibrační závislosti a určeny základní analytické charakteristiky stanovení všech čtyř specií rtuti. Meze detekce specií rtuti se pohybovaly v rozmezí od 0,12 do 0,25 ng cm⁻³ a citlivost stanovení při atomizační teplotě 500 °C byla kolem 0,10 s ng⁻¹. Experimenty zaměřené na optimalizaci atomizační teploty prokázaly, že během generování specií organicky vázané rtuti dochází k jejich výraznému rozkladu. Ve druhé části práce byla provedena speciální analýza rtuti, stanovení obsahu methylrtuti a celkové rtuti v pěti vzorcích vlasů a certifikovaném referenčním materiálu IAEA-086. Methylrtuť byla selektivně extrahována 2 mol dm⁻³ HCl, což bylo prokázáno pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) s hmotnostní spektrometrií s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS) jako detektorem. Byly srovnány čtyři analytické techniky stanovení methylrtuti v extraktu: AMA-254, VSG-AAS, ICP-MS a HPLC-ICP-MS. Ve všech případech bylo dosaženo dobré shody s certifikovanými hodnotami materiálu IAEA-086. Reálné vzorky vlasů obsahovaly kolem 70 % methylrtuti.

Klíčová slova: atomová absorpční spektrometrie, specie rtuti, chemické generování těkavých sloučenin, extrakce

Abstract

Experimental conditions have been optimized for volatile species generation (VSG) of four mercury species and their subsequent atomization with detection by atomic absorption spectrometry (AAS). The species investigated were mercury (+II), methylmercury (+I), ethylmercury (+I) and phenylmercury (+I). Flow injection construction of volatile species generator and externally heated quartz tube atomizer were employed. The optimized parameters were the concentration of hydrochloric acid and sodium borohydride, the length of the reaction coil, carrier gas flow rate, atomization temperature and the amount of oxygen present in the atomizer. Furthermore, the effect of the drying tube on the signal of Hg species as well as the applicability of tin chloride as an alternative reductant instead of sodium borohydride were studied. Calibration curves were measured and the basic analytical figures of merit were determined, under optimum experimental conditions, for all four mercury species investigated. Limits of detection for Hg species ranged from 0.12 to 0.25 ng cm⁻³, while sensitivity reached ca 0.10 s ng⁻¹ at atomization temperature of 500 °C. Experiments focused on atomization temperature optimization have revealed that volatile compounds generated from organic Hg species decompose significantly. Speciation analysis of mercury in hair samples, quantification of methylmercury and total mercury contents, was performed in the second part of the thesis. Five hair samples and a certified IAEA-086 reference material were studied. Methylmercury was selectively extracted by 2 mol dm⁻³ HCl, which was proven by high-performance liquid chromatography (HPLC) with inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) as a detector. Four analytical techniques were compared for methylmercury determination in the extract: AMA-254, VSG-AAS, ICP-MS and HPLC-ICP-MS. In all cases a good match was achieved between the found values and the certified value for IAEA-086 reference material. Real hair samples contained around 70% of methylmercury.

Keywords: atomic absorption spectrometry, mercury species, chemical generation of volatile species, extraction

Obsah

Seznam zkratk	8
1 Úvod	9
1.1 Cíle práce.....	9
2 Teoretická část	10
2.1 Rtuť	10
2.1.1 Elementární rtuť	11
2.1.2 Anorganické sloučeniny rtuti	11
2.1.3 Organické sloučeniny rtuti	11
2.1.4 Rtuť v životním prostředí.....	13
2.1.5 Rtuť v biologických vzorcích	14
2.2 Stanovení celkového obsahu rtuti a speciální analýza	15
2.2.1 Atomová absorpční spektrometrie	15
2.2.2 AMA-254.....	16
2.2.3 Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem.....	16
2.2.4 Vysokoučinná kapalinová chromatografie HPLC	17
2.2.5 Extrakce	17
2.3 Technika generování těkavých specií.....	18
2.3.1 Chemické generování těkavých specií	19
2.3.2 Elektrochemické generování těkavých specií	20
2.3.3 Fotochemické generování těkavých specií	20
2.3.4 Metody generování těkavých specií.....	21
2.3.5 Atomizace	22
3 Experimentální část	24
3.1 Chemikálie.....	24
3.2 Přístroje	24
3.3 Aparatura	25
3.3.1 VSG-AAS	25
3.3.2 Spektrometr AMA- 254	27
3.3.3 HPLC-ICP-MS.....	28
3.3.4 Porovnání detekčních technik	30

4	Výsledková část a diskuze.....	31
4.1	Optimalizace koncentrace NaBH ₄	32
4.2	Optimalizace koncentrace HCl.....	33
4.3	Optimalizace průtoku argonu	33
4.4	Optimalizace atomizační teploty	34
4.5	Vliv vzduchu na výsledný signál.....	36
4.6	Vliv sušicí trubice.....	37
4.7	Vliv reakční cívky	38
4.8	Chlorid cínatý jako redukční činidlo	38
4.9	Kalibrační závislosti a analytické charakteristiky	39
4.10	Aplikovatelnost dosažených výsledků.....	42
4.11	Speciační analýza rtuti ve vlasech.....	44
5	Závěr.....	48
6	Použitá literatura.....	50

Seznam zkratek

AAS	atomová absorpční spektrometrie
AMA-254	jednoúčelový analyzátor stopových množství rtuti
CT	kryogenní past
CV	studené páry rtuti
EC-VSG	elektrochemické generování těkavých specií
EtHg ⁺	kation ethylrtuti
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HG	generování hydridů
Hg ²⁺	anorganicky vázaná rtuť
ICP-MS	hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem
LOD	mez detekce
LOQ	mez stanovitelnosti
MeHg ⁺	kation methylrtuti
MF A	mobilní fáze A
MF B	mobilní fáze B
PhHg ⁺	kation fenylrtuti
P-VSG	fotochemické generování těkavých specií
QTA	křemenný atomizátor
VSG	generování těkavých specií

1 Úvod

Rtuť je považována za jeden z nejvíce toxických prvků a její přítomnost v životním prostředí má tak značně negativní vliv na lidské zdraví i ekosystém. Vyskytuje se v několika chemických formách (speciích), které se odlišují svými fyzikálně-chemickými vlastnostmi, což také výrazně ovlivňuje jejich toxicitu, či schopnost bioakumulace. Všechny sloučeniny rtuti však vzhledem ke svým toxickým vlastnostem představují zdravotní riziko již ve velmi nízkých koncentracích.

Jedním ze současných trendů ve stopové prvkové analýze je právě vývoj analytických technik umožňujících nejen stanovení co nejnižší koncentrace prvku, ale i kvantifikaci jeho jednotlivých specií, tzv. speciační analýzu.

1.1 Cíle práce

- Optimalizace podmínek chemického generování těkavých specií rtuti s detekcí atomovou absorpční spektrometrií (VSG-AAS) pro čtyři toxikologicky nejvýznamnější specie (Hg^{2+} , MeHg^+ , EtHg^+ a PhHg^+).
- Optimalizace podmínek atomizace vygenerovaných těkavých specií Hg ve vyhřívaném křemenném atomizátoru s AAS detekcí.
- Určení analytických charakteristik stanovení Hg^{2+} , MeHg^+ , EtHg^+ a PhHg^+ technikou VSG-AAS.
- Speciační analýza Hg ve vlasech, stanovení celkového obsahu rtuti a methylrtuti.

2 Teoretická část

2.1 Rtuť

Rtuť byla známa již v Egyptě v roce 1500 před n.l. Název prvku pochází z alchymie ze 6.století. I přesto, že její toxicita byla rozpoznána už v rané době, rtuť se používala především pro lékařské účely. [1] V oblasti Středozemního moře byla rtuť používána pro extrakci kovů amalgamací, a to již 500 let před Kristem. Rtuť byla pojmenována podle Merkura, který byl poslem bohů v římské mytologii. Chemický symbol Hg je odvozen z latinského názvu *hydrargyrum*, neboli „tekuté stříbro“. Nejvýznamnější rudou rtuti je cinabarit, tedy HgS, který lze nalézt podél pásem dávné vulkanické aktivity. Nejvýznamnější naleziště jsou ve Španělsku, která obsahují 6 až 7 % rtuti a pracovalo se na nich už od římských dob. Ostatní naleziště obsahují méně než 1% rtuti a nachází se v Alžírsku, Mexiku, Itálii, zemích bývalé Jugoslávie a bývalé SSSR. HgS byl ve středověku hojně využíván jako pigment (rumělka) [2].

Rtuť patří k nejdéle známým toxickým kovům. Z toxikologického hlediska je velmi důležité, v jaké formě se rtuť vyskytuje. Toxickým působením se od sebe odlišují organické a anorganické sloučeniny rtuti, páry rtuti a kovová rtuť. Délka expozice přímo ovlivňuje toxicitu rtuti. Rtuť má vysokou afinitu k síře, pevně se váže na thiolové skupiny bílkovin včetně enzymů, a negativně tím ovlivňuje jejich funkčnost. Také se váže na sérový albumin, hemoglobin a tím dojde k poškození krevní buňky. [3]

Rtuť byla lékařsky i komerčně používána již po staletí. V minulosti byla běžnou součástí mnoha léků. Stále je používána v teploměrech, bateriích, vypínačích a zářivkách. Velké množství rtuti se také používá jako elektrody např. při amalgámovém způsobu výroby NaOH a KOH. Tato použití vedou stále k pracovním expozicím. V dnešní době nalézáme tři hlavní zdroje expozice běžné populace rtutí, jsou to: konzumace ryb, zubní amalgámy a vakcíny. [4] Je to také jediný kov, který existuje v kapalném skupenství mezi prvky periodické tabulky za běžných podmínek. Rozdílem mezi toxicitou rtuti a jinými kovy je v tom, že rtuť se v organismu snadno hromadí. Toxicita rtuti je závislá na chemické formě. Organická rtuť je toxicitější než rtuť anorganická. [5]

2.1.1 Elementární rtuť

Elementární rtuť je těkavá při pokojové teplotě a její páry mohou být nebezpečné pro člověka. K expozici může docházet v laboratořích, na pracovištích, ale také v domácnostech, např. při rozbití teploměru obsahujícího rtuť. [6]

Elementární rtuť je nejméně toxickou formou, která je po požití vyloučena bez dopadu na organismus. Páry rtuti jsou po inhalaci rychle absorbovány do krevního řečiště, díky čemuž jsou poté dopraveny do cílového orgánu, mozku.

Mírná expozice způsobí poškození centrálního nervového systému, a může vyvolat únavu, nespavost, podrážděnost, poruchu motoriky, třes končetin, a poruchy paměti. Silné expozice vedou až ke smrtícím účinkům.

2.1.2 Anorganické sloučeniny rtuti

Mírně toxické jsou sloučeniny rtuti anorganické, kdy sloučeniny jednomocné jsou méně škodlivé než sloučeniny rtuti dvojmocné, a to díky menší rozpustnosti ve vodě a kyselém prostředí. Sloučeniny rtuti se většinou vyskytují ve formě bílého prášku nebo krystalů. Mezi nejvýznamnější sloučeniny patří chlorid rtuťnatý (sublimát), chlorid rtuťný (kalomel) a sulfid rtuťnatý. Nejvíce toxický je rozpustný chlorid rtuťnatý, naopak sulfid rtuťnatý a chlorid rtuťný jsou díky své nerozpustnosti toxické řádově méně. [7] Mezi projevy akutní toxicity patří poškození funkce ledvin, bolesti břicha, změny barvy nehtů.

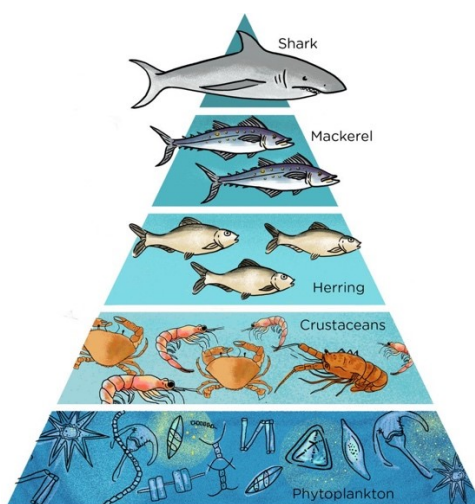
2.1.3 Organické sloučeniny rtuti

Populace může být vystavena organickým formám rtuti díky inhalaci, orálně anebo dermálně. Cesta vstupu do organismu závisí na formě organické sloučeniny a povaze expozice. Primárním zdrojem expozice organické rtuti je pro většinu populace konzumace ryb a měkkýšů, které jsou kontaminované methylrtutí. Vyšší koncentrace methylrtuti jsou obvykle u ryb starších a ryb, které jsou postaveny výše v potravinovém řetězci. Dravé ryby v horní části potravního řetězce (Obr. 1) mohou mít koncentrace rtuti ve tkáni až 10 000/100 000 krát vyšší než je koncentrace v okolních vodách. Mezi suchozemskými savci mají ti, kteří konzumují ryby, vyšší tělní zátěž rtutí než vegetariánské druhy. Nejvyšší koncentrace rtuti se nachází v játrech a ledvinách. Vysoce toxickou organickou sloučeninou rtuti je dimethylrtuť, která je na rozdíl od jiných forem

okamžitě a zcela absorbována kůží. Dimethylrtuť způsobí trvalé poškození mozku, nebo smrt. [8]

Mezi nejnebezpečnější sloučeniny rtuti patří methylrtuť (MeHg^+), která vzniká z anorganických sloučenin působením methanogenních bakterií v anaerobním prostředí (př. sedimenty sladkých a slaných vod). Je rozpustná ve vodě i v tucích, a díky tomuto zůstává ve vodním prostředí, odkud snadno přechází do rybího masa. Methylrtuť vyskytující se v rybím masu je vydatným zdrojem rtuti v potravním řetězci. Ten vede až k člověku, kdy v jednotlivých člancích řetězce dochází k zakoncentrování rtuti v tkáních organismů.

Methylrtuť je schopna přestupovat přes placentu plodu a hematoencefalickou bariéru. Díky tomu patří mezi embryotoxické a mutagenní látky, kdy u těhotných žen může vyvolat poškození plodu nebo spontánní potrat. U malých dětí způsobuje smyslové poruchy, až úplné selhání funkcí-hluchota, slepota, ztráta chuti. U dospělých může vyvolat třes těla. Methylrtuť je hojně přítomna především ve vodních ekosystémech. Sladkovodní i mořské ryby mají schopnost kumulace rtuti ve svých tkáních. Sladkovodní ryby jsou vůči methylrtuti méně odolné než ryby mořské. Rtuť poškozuje také řasy a bezobratlé organismy. Vyšší obsah rtuti byl také zaznamenán u rostlin, díky přítomnosti rtuti v půdě vázané do stabilních komplexů s organickými složkami. [3]



Obr. 1 Potravní pyramida ve vodním ekosystému [9].

2.1.4 Rtuť v životním prostředí

Rtuť je jeden z nejtoxičtějších prvků, jehož sloučeniny vzbuzují obavy v oblasti veřejného zdraví. Po celé generace se šíří a zůstává v ekosystémech a působí na zdraví populace. Běžná populace je vystavena organické rtuti, která je většinou ve formě MeHg^+ , a to především díky konzumaci mořských plodů. MeHg^+ a její toxické účinky se projevují primárně na centrální nervové soustavě.[10] Použití dentálních amalgámových výplní je významným zdrojem anorganicky vázané rtuti.

Rtuť je přirozeně se vyskytující prvek v zemské kůře. Do životního prostředí je distribuována přírodními procesy jako jsou sopečná činnost, požáry, pohyby řek, jezer a potoků a biologickými procesy. Výrazně podílející se na výskytu rtuti a jejích sloučenin v životním prostředí je antropogenní činnost. [11] Antropogenními zdroji rtuti jsou skládky a také spalovací procesy jako je výroba energie z uhlí, spalovny zdravotnického odpadu a spalování komunálního odpadu. K uvolnění rtuti do životního prostředí také dochází při výrobě kovů, hydroxidů a cementu. [3]

V litosféře, atmosféře, hydrosféře a biosféře se nachází nízké koncentrace rtuti. V zemské kůře je obsah rtuti $0,5 \text{ mg kg}^{-1}$, mořská voda obsahuje okolo $0,03 \text{ mg dm}^{-3}$ rtuti a vzduch $0,002\text{-}0,02 \text{ pg dm}^{-3}$. [10] V prostředí se může elementární rtuť slučovat s chlorem, sírou, fosforem a dalšími prvky za vzniku anorganických sloučenin. Působením mikroorganismů lze anorganickou rtuť vázat s uhlíkem za vzniku organických sloučenin, z nichž nejhojněji je zastoupena methylrtuť. [11] Cykly rtuti v životním prostředí podléhají změnám jejích chemických forem. V atmosféře se rtuť vyskytuje v těkavé formě, jako jsou elementární páry, ale také ve formě vázané na částice. V mořském prostředí je anorganická rtuť methylována na methylrtuť, jež se hromadí v mořských organismech. Část environmentálně se vyskytující rtuti se váže na síru, kdy vytváří nerozpustný sulfid rtuťnatý, který se hromadí v sedimentech. Rtuť je všudypřítomná látka kontaminující životní prostředí, avšak k přeměně anorganické rtuti na organickou rtuť dochází zejména ve vodním prostředí, kde se methylrtuť bioakumuluje a biomagnifikuje v potravinovém řetězci. [12] Toxicita rtuti je závislá na chemické formě. Organická rtuť je toxičtější než rtuť anorganická. Nejméně toxickou je elementární rtuť a nerozpustný HgS . [8]

2.1.4.1 Otravy způsobené sloučeninami rtuti

V roce 1960 byla popsána otrava methylrtutí a to v Japonském přístavním městě Minamata, od kterého také vzešel název otravy „Minamata disease“. Rybáři a jejich rodiny byli v 60. letech 20. století otráveni MeHg^+ díky konzumaci ryb, ve kterých byla zvýšená koncentrace MeHg^+ v důsledku úniku rtuti do zálivu z místní chemické továrny. Otravy methylrtutí se projevily na centrálním nervovém systému, kdy nejvíce byly postiženy narozené děti matek, které byly během těhotenství intoxikovány. Děti s onemocněním „minamata“ se rodily s mozkovou obrnou, slepotou anebo mentální retardací. [13-14]

Další otrava byla v Iráku, kdy v letech 1971-1972 byla popsána otrava rtutí po konzumaci chleba, který byl vyroben z mouky, jež byla umleta z chemicky ošetřené pšenice. Její zrna byla ošetřena sloučeninami fenylrtuti a ethylrtuti. Ethylrtuť byla detekována ve vzorcích krve a vlasech obětí. Ve vlasech obětí byla také hledána přítomnost methylrtuti. [13, 15, 16]

2.1.5 Rtuť v biologických vzorcích

Rtuť lze stanovit v biologických vzorcích jako např. ve vlasech, nehtech, krvi a moči. Vlasy jsou vzorky, které lze snadno získat, a to s minimálními náklady. Výhodou je snadná přeprava do laboratoře k analýze a jejich skladování. Díky růstu vlasů (cca 1 cm za měsíc) lze určit i historii expozice rtuti. Koncentrace rtuti ve vlasech se může zvýšit v důsledku vnější kontaminace. Rtuť se hromadí ve vlasech především ve formě methylrtuti. Pro stanovení množství rtuti u plodu se jako biomarker expozice používají vlasy matky, kdy hladina rtuti v mateřské krvi koreluje s hladinou v pupeční krvi plodu. [17,18,19]

V krvi lze stanovit kromě methylrtuti také rtuť anorganicky vázanou. Ta je přítomna v plazmě, a koncentrace se zvyšuje v závislosti na množství anorganické rtuti akumulované v ledvinách. Methylrtuť je obsažena v červených krvinkách. Na základě studií Bjorkman et al. (2007) bylo zjištěno, že krev je užitečným biomarkerem pro stanovení methylrtuti v mozku. [17,18,19]

Anorganickou rtuť lze také stanovit v moči, kdy koncentrace rtuti se zvyšuje ve vztahu k hladině anorganické rtuti akumulované v ledvinách. U osob s onemocněním ledvin může docházet k vylučování methylrtuti močí. [19]

2.2 Stanovení celkového obsahu rtuti a speciální analýza

Metody stanovení rtuti lze rozdělit na metody stanovující celkový obsah rtuti a metody umožňující speciální analýzu, tj. stanovení konkrétních specií, ve kterých je rtuť vázána. Metody speciální analýzy jsou založeny většinou na chromatografických technikách, které umožňují separaci a následné stanovení všech specií rtuti. [31]

Ke stanovení celkového obsahu rtuti se využívá metod jako je atomová absorpční spektrometrie (AAS), atomová fluorescenční spektrometrie (AFS), atomová emisní spektrometrie (AES), emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-AES) či hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS). [30]. V případě stanovení rtuti lze spektrometrické detekční techniky kombinovat s předřazeným krokem generování studených par rtuti, který se označuje jako CV (cold vapor), blíže viz kapitola 2.3. Všechny výše zmíněné analytické spektrometrické techniky jsou destruktivní, tj. dochází k atomizaci molekuly, ve které byla rtuť vázána, v některých případech následně i k ionizaci (ICP-MS). Tyto techniky mohou být využity i pro speciální analýzu rtuti, avšak musí být předřazena vhodná separační technika, aby různé specie byly do spektrometru transportovány v odlišných (retenčních) časech. Právě retenční čas pak v sobě nese informaci o struktuře detekované specie. Při rentgenové fluorescenci je umožněna nedestruktivní analýza rtuti v pevných tkáních. [21]

2.2.1 Atomová absorpční spektrometrie

Atomová absorpční spektrometrie (AAS) je jedna z nepoužívanějších analytických metod. Metodou AAS lze stanovit více než 60 prvků. Principem metody je absorpce záření volnými atomy v plynném stavu, které vznikají v atomizátorech. [22], [23]. Při absorpci záření o vhodné energii atomy prvku, které musí být v plynné fázi, dochází k pohlcení energetických kvant fotonů ze zdroje záření; tím jsou vnější elektrony v atomech převedeny ze základních atomových orbitalů s energií E_0 na excitované orbitály s energií E_j . Tyto přechody se řídí přesně danými výběrovými pravidly. Obecně platí, že volné atomy v plynném stavu jsou schopny absorbovat záření takové energie, které samy vyzařují při emisi, což je pochopitelně opačný absorpci záření. V AAS jsou významné tzv. rezonanční přechody (přechody hlavních sérií), tj. přechody vycházející ze základního elektronového stavu atomu. Za podmínek užívaných pro atomizaci v AAS

jsou absorbující atomy prvku v základním elektronovém stavu. Jsou-li atomy prvku ozařovány svazkem monochromatických paprsků určité vlnové délky (fotony o určité energii), které jsou schopny absorbovat, platí pro atomovou absorpci Lambertův – Beerův zákon. [23] [22] AAS je nejpoužívanější metoda pro stanovení rtuti ve vzorku. [30]

2.2.2 AMA-254

Jednoúčelový analyzátor AMA-254 se využívá ke stanovení celkového obsahu rtuti a pracuje na principu atomové absorpční spektrometrie. Jde o jednopaprskový přístroj se sériovým uspořádáním kyvet, jímž můžeme stanovit obsah rtuti v pevných, ale i kapalných vzorcích a to bez předešlé úpravy vzorku. Metoda pracuje na principu rozložení vzorku za zvýšené teploty v proudu kyslíku a následného zachycení rtuti ve formě amalgámu na zlatě. Po prekoncentraci je zachycená rtuť vypuzena z amalgamátoru do měřicí kyvety a dochází k měření volných atomů rtuti metodou atomové absorpční spektrometrie. Díky použití systému dvou měřících kyvet o různé délce umožňuje přístroj AMA-254 měřit kalibrační křivky dvou rozsahů a stanovovat tak vzorky, které obsahují absolutně cca 0,1 až 500 ng rtuti v navážce vzorku. Je dosaženo vysoké citlivosti stanovení bez závislosti na matici vzorku. [24,25,26]

2.2.3 Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem

Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS) je považována za jednu z nejcitlivějších metod stopové prvkové analýzy a dnes patří také k těm nejpoužívanějším. Mezi její hlavní přednosti patří multielementární měření, nízké detekční limity, zjištění izotopového zastoupení a technika on-line izotopového zřed'ování. Za negativa je považována menší tolerance k vyšším obsahům organických rozpouštědel a solí v matici vzorku.

Kapalný vzorek je za pomoci peristaltické pumpy a zmlžovače převeden na jemný aerosol, který je nosným plynem zaváděn do argonového plazmatu, kde dojde k atomizaci a ionizaci. Vzniklé ionty analytu přestupují z prostředí atmosférického tlaku v plazmové hlavici do prostředí vysokého vakua hmotnostního spektrometru skrz dva kovové kužely (kóny). Ionty následně procházejí skrz iontovou optiku, která slouží k fokusaci a urychlení svazku iontů, nejčastěji do kvadrupólového analyzátoru. Ten je složen ze čtyř rovnoběžných tyčových elektrod, na které se vkládá proměnné elektromagnetické pole.

Tím je dosaženo různého zakřivení trajektorie letu separovaných iontů v závislosti na jejich hodnotě poměru m/z , kde m je hmotnost iontu a z jeho náboj. Za daného nastavení elektromagnetického pole pak do detektoru projdou pouze ionty s určitým poměrem m/z . Během měření vzorku dochází k rychlé změně nastavení elektromagnetického pole, čímž lze během několika sekund proskenovat široký interval hodnot m/z pokrývající rozsah téměř všech prvků periodické tabulky. [20] [27] [28] [29] [30]

2.2.4 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie HPLC

Mezi v současnosti nejvíce preferované separační metody použitelné pro speciální analýzu rtuti patří HPLC s reverzními fázemi (RP-HPLC) ve spojení se spektrometrickými prvkově selektivními detektory, nejčastěji s ICP-MS. RP-HPLC je díky možnosti separace anorganicky i organicky vázaných specií Hg a jejich detekci ve stopovém množství (až $\text{ng} \cdot \text{dm}^{-3}$) vhodná také pro rutinní použití. Při separaci specií rtuti se využívá tvorby komplexů s činidlem, kterým je obvykle sloučenina s thiolovou skupinou, například 2-merkaptoethanol, methionin nebo L-cystein. Izokratickou elucí lze však tímto způsobem separovat pouze Hg^{2+} , MeHg^+ a EtHg^+ . Pro eluci PhHg^+ je nutné během analýzy zvýšit obsah organické fáze v mobilní fázi, kterou obvykle tvoří methanol, jedná se tedy o gradientovou eluci. [30]

2.2.5 Extrakce

Při provádění speciální analýzy v pevných vzorcích je zapotřebí jednotlivé specie převést do kapalně fáze tak, aby převod byl ideálně kvantitativní a dále aby nedocházelo ke změnám speciální informace. Nejběžnějším případem je extrakce specií. Při extrakci rtuti z matrice vzorku se často využívá tvorby komplexních sloučenin. Jako komplexotvorné činidlo se používá L-cystein, 2-merkaptoethanol a pyrolidindithiokarbamát sodný. [31,32]

Přehled extrakčních činidel použitých pro speciální analýzu rtuti byl shrnut v nedávném článku [33]. Je zřejmé, že jako extrakční jsou často používána činidla, která jsou složkami mobilní fáze pro HPLC separaci specií rtuti, což činí krok extrakce a následné HPLC separace plně kompatibilní. Extrakce bývá podpořena působením ultrazvuku, mikrovlňného záření či zvýšené teploty. Některé práce využívají i šetrného rozkladu vzorku enzymaticky či hydroxidem tetramethylamonným (TMAH), alkalickou (KOH) nebo kyselou hydrolýzou (HCl , HNO_3). Je nutné zdůraznit, že použitelnost

extrakčního činidla výrazně závisí na matici vzorku a postup extrakce vyvinutý pro jeden typ vzorků nemusí být přenositelný na vzorky s odlišnou maticí. Rozhodně musí být eliminováno riziko přeměny specií mezi sebou.

2.3 Technika generování těkavých specií

Generování těkavých specií analytů (VSG), z anglického „volatile species generation“, je rozšířeným způsobem předúpravy vzorku a derivatizace analytu před jeho zavedením do spektrometrického detektoru. Vzorek je tedy zaváděn do spektrometru v plynné fázi, přičemž k tvorbě těkavé specie dochází nejčastěji chemickou reakcí (redukcí), viz kapitola 2.3.1. Alternativně lze těkavé specie generovat i elektrochemicky (kapitola 2.3.2) či fotochemicky (kapitola 2.3.3). Selektivní konverze analytu z kapalného vzorku do plynné fáze se provádí reakcí, která vede k těkavé sloučenině analytu. VSG se využívá především kvůli výhodám, kterými jsou oddělení analytu od matrice vzorku, vysoká účinnost přenosu plynného analytu do detektoru a mírné podmínky atomizace.

Postup VSG zahrnuje dva nezávislé kroky, které jsou prováděny v samostatných zařízeních. Je to generování těkavých sloučenin, které je prováděno v generátoru, a následná atomizace/detekce prováděna v atomizátoru integrovaném do použitého spektrometru (AAS, AFS). VSG se skládá z kroku, kdy dojde k přeměně analytu ve vzorku na těkavou sloučeninu pomocí chemické reakce, dále dojde k přenosu generované sloučeniny do plynné fáze a transportu uvolněné sloučeniny unášené nosným plynem do detektoru. Oba dva kroky, tj. generování a atomizace se liší v prostoru, a lze je rozlišit i v čase. Generování těkavých sloučenin je kompatibilní se všemi běžnými metodami atomové spektrometrie (AAS, AFS, ICP-OES i ICP-MS). [23]

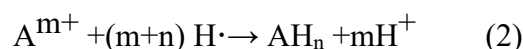
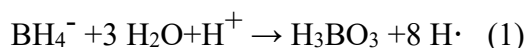
V současné době jsou nejoblíbenějšími generovanými těkavými sloučeninami binární hydridy prvků jako jsou arsen, antimon, bizmut, germanium, olovo, selen, telur a cín. Bizmut, selen a telur tvoří jen binární hydridy. Ostatní prvky poskytují kromě binárních hydridů také řadu analyticky užitečných, alkylem substituovaných hydridů. [23] Vytvoření „studených par“ neboli volných atomů rtuti je druhým nejčastějším přístupem k VSG.

Výhodou VSG je selektivní oddělení analytu od kapalné matrice, a tím také redukce případných interferencí. Díky tomu lze dosáhnout výrazně nižších detekčních limitů než při zmlžování kapalných vzorků. Účinnost převedení analytu na těkavou

sloučeninu se často blíží ke 100 %, účinnost běžných zmlžovačů je pouze okolo 2-5 %. Mezi další výhody VSG řadíme možnost prekoncentrace analytu v plynné fázi za účelem snížení detekčního limitu metody. [24]

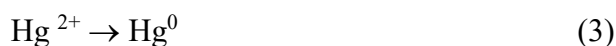
2.3.1 Chemické generování těkavých specií

Chemické generování těkavých specií je nejdéle a nejvíce používanou metodou generování těkavých specií. Tato technika se používá od 70.let 20.století, nejčastěji pro generování těkavých binárních hydridů, pak ji označujeme jako generování hydridů (HG). HG se využívá ke stanovení prvků As, Sb, Bi, Ge, Sn, Pb, Se a Te, a je založena na redukci analytu s redukčním činidlem v kapalně fázi. [24] Nejpoužívanějším redukčním činidlem je tetrahydroboritan sodný (NaBH_4). Roztok NaBH_4 je stabilizován KOH. Při HG dochází k postupné hydrolyze NaBH_4 za vzniku H_3BO_3 a vodíku, které jsou konečnými produkty reakce. Při reakci dochází k tvorbě vodíku podle rovnice 1, který poté reaguje s analytem v iontové formě za vzniku hydridu, reakce 2. [23]



Pozdější výzkumy mechanismu generování těkavých sloučenin ukázaly, že reakční mechanismus je daleko složitější a probíhá několikasupňovým mechanismem přes vícero reakčních intermediátů, kterými jsou boranové komplexy analytu. [24]

VSG lze při použití NaBH_4 nebo SnCl_2 jako redukčního činidla využít i pro speciální analýzu rtuti. Anorganická rtuť je redukována na rtuť elementární dle rovnice 3. Jako redukční činidlo se používá NaBH_4 . Dochází ke generování tzv. studených par rtuti (CV – cold vapor). [24] Ostatní specie rtuti, jako je MeHg^+ , EtHg^+ a PhHg^+ jsou převedeny na hydrid dle rovnic (4)-(6). [24, 34]



2.3.2 Elektrochemické generování těkavých specií

Elektrochemické generování těkavých specií (EC-VSG) je alternativní metodou k chemickému generování, kdy redukce je provedena prostřednictvím elektrického proudu v roztoku minerální kyseliny. [31] Při EC-VSG se využívá elektrochemické cely, která je složena z katodového a anodového prostoru oddělených od sebe semipermeabilní membránou. Ta umožňuje vodivý kontakt, ale omezuje difúzi reakčních produktů mezi kompartmenty. Na katodě dochází k vylučování plynného vodíku a také redukci analytu na těkavou sloučeninu. Na anodě vzniká kyslík. [31] Nevýhodou EC-VSG jsou změny vlastností povrchu katody v čase dané částečnou depozicí redukováného analytu na povrchu elektrody a adsorpcí plynných produktů. Tyto změny mohou ovlivňovat účinnost elektrochemického generování a tím i velikost signálu. Další nevýhodou je také nižší účinnost generování v porovnání s chemickým generováním a z toho vyplývající menší robustnost metody. Výhodou je možnost dosažení nižších hodnot slepých pokusů, jelikož z reagentů jsou použity pouze čisté kyseliny a není nutné použití dalších aditiv či redukčního činidla jako v případě chemického generování, které mohou být zdrojem kontaminace. Další výhodou uváděnou v literatuře může být nezávislost účinnosti generování těkavé sloučeniny na výchozí valenci prvku v roztoku. [5]

2.3.3 Fotochemické generování těkavých specií

Fotochemické generování těkavých specií (P-VSG) probíhá v prostředí nízkomolekulárních karboxylových kyselin. Ke kapalnému vzorku je přidána organická kyselina, nejčastěji mravenčí, octová, propionová nebo malonová. Působením UV záření, nejčastěji použitím Hg výbojky, dochází v roztoku k fotolýze organických kyselin a řadě radikálových reakcí, při nichž dochází k fotoredukci analytu na těkavou sloučeninu, nejčastěji hydridy a jejich alkylované deriváty či karbonyly. Struktura vznikající těkavé sloučeniny je dána nejen analytem, ale může být ovlivněna i použitou nízkomolekulární kyselinou. V některých případech se používá TiO_2 jako fotokatalyzátor. Výhodami fotochemického generování těkavých sloučenin jsou: jednoduché experimentální uspořádání a provozní náklady a v některých případech i nižší riziko interferencí a možnost nalezení podmínek pro provádění speciální analýzy. Nevýhodou jsou nižší účinnosti generování v porovnání s chemickým generováním, které mohou činit metodu

méně robustní i složitý a dosud ne plně popsán mechanismus generování, který znesnadňuje další optimalizaci techniky.[5] [35]

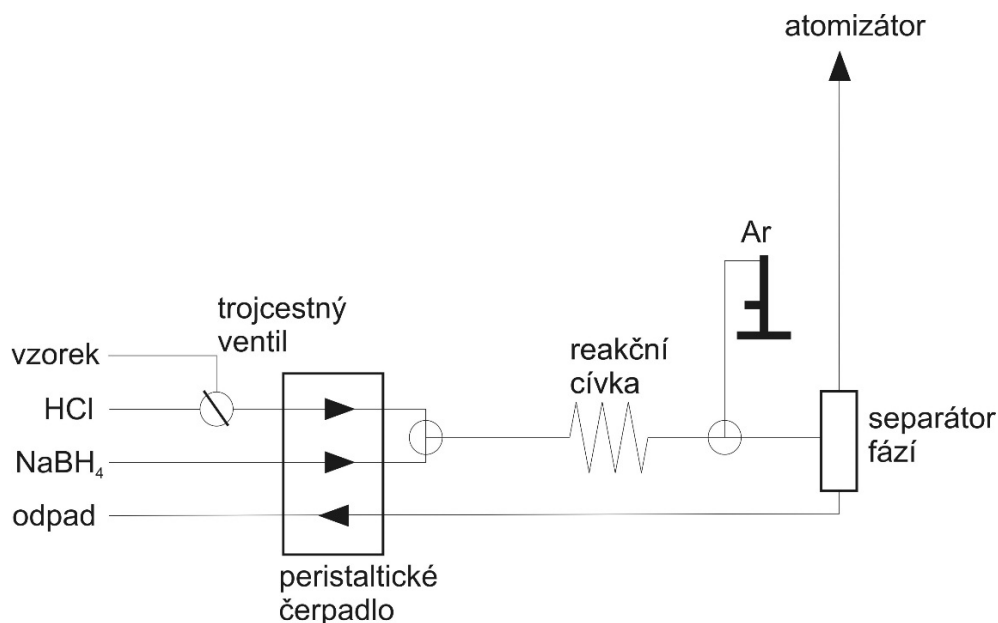
2.3.4 Metody generování těkavých specií

Pro generování těkavých specií lze použít metodu přímého přenosu, označovanou také jako on-line atomizace. Při této metodě je generovaná těkavá specie vedena přímo do atomizátoru. Druhou používanou metodou je metoda prekoncentrace, kdy jsou těkavé specie před detekcí ještě prekoncentrovány. [24]

2.3.4.1 Metody přímého přenosu

Mezi metody přímého přenosu patří kontinuální generování, dávkové uspořádání a dávkování do proudu.

Při **kontinuálním generování** dochází k plynulému míchání okyseleného kapalného vzorku s redukčním činidlem. Reakce probíhá v reakční cívce, a poté dochází v separátoru fází k oddělení plynné a kapalně fáze. Plynná fáze odchází do atomizátoru, kdežto kapalná fáze je odtahována do odpadu. Před vstupem do separátoru fází je přidán nosný plyn, který unáší plynnou směs obsahující těkavé specie do separátoru fází. [24] [33] Na obr.2 je schématicky kontinuální generování znázorněno.



Obr. 2 Schéma průtokového generátoru pro kontinuální generování těkavých specií. [24]

Dávkování do proudu se od kontinuálního generování liší v tom, že vzorek o přesném objemu je dávkován do toku reakčního média. [36] Reakční médium představuje zředěná kyselina, poté je reakční směs smíchána s proudem NaBH_4 . [24] Důležitým parametrem ovlivňujícím účinnost generování těkavých specií je poměr rychlostí průtoků NaBH_4 a vzorku. [23]

Dávkové uspořádání je konstrukčně nejjednodušší, ale nelze jej automatizovat. Je realizováno nádobkou, která plní funkci jak separátoru fází, tak i generátoru těkavých specií. Dávkování vzorku je umožněno pomocí peristaltické pumpy nebo pipetou do nádobky. Nádobka se uzavře víčkem, poté se otvorem ve víčku přidá NaBH_4 a vzniklé těkavé specie jsou proudem nosného plynu unášeny do atomizátoru. [23,24]

2.3.4.2 Prekoncentrační metody

Základem prekoncentračních metod je záchyt těkavých specií ve zvláštním zařízení, které je umístěno mezi generátorem a atomizátorem. Prekoncentrace může být prováděna také přímo v atomizátoru.

Jako příklad použití je tlaková prekoncentrace, a to buď v adsorpčním mediu nebo kryogenní záchyt. Při tlakové prekoncentraci se jímá vygenerovaný hydrid do hermeticky uzavřené nádoby. Vyšší citlivosti lze dosáhnout metodou kryogenního záchytu. Hydrid je zachycen v U-trubicí, která je ponořena do kapalného dusíku. Dalším příkladem prekoncentrační metody je tzv. in-situ trapping v grafitovém atomizátoru, kdy k prekoncentraci dochází přímo v atomizátoru. V současné době je tento přístup nejvíce používán. [23-24] Prekoncentrační postupy nebyly v rámci této práce využívány.

2.3.5 Atomizace

V atomové absorpční spektrometrii může být vzorek zaváděn do atomizátoru v kapalně, plynně či pevně fázi. Atomizace těkavých sloučenin je jednodušší, než atomizace vzorků vnášených v kapalně nebo pevně formě. Při atomizaci plynného analytu je zapotřebí méně energie, tudíž postačí nižší teplota atomizátoru. Není nutné dodávat energii potřebnou pro převedení analytu z pevné či kapalné fáze do plynné fáze. Při atomizaci těkavých sloučenin není do atomizátoru zaváděna veškerá matrice vzorku,

ale pouze plynný analyt. Těkavé sloučeniny lze v atomizátoru prekoncentrovat, což vede ke snížení detekčních limitů. [24]

V praxi jsou využívány atomizátory křemenné, grafitové, plamenové a miniaturní plazmata. Mezi nejrozšířenější řadíme atomizátory křemenné.

2.3.5.1.1 Křemenné atomizátory

Křemenné atomizátory označované také jako QTA (Quartz tube atomizer) jsou v současné době nejpoužívanějšími atomizátory hydridů. Mají tvar písmene T. Vodorovné (optické) rameno je umístěno v ose atomového absorpčního spektrometru, a je vyhříváno na požadovanou atomizační teplotu buď plamenem acetylén-vzduch, nebo píčkou. Atomizační teplota je nižší než v plamenových a grafitových atomizátorech. Pohybuje se většinou v rozsahu od 700-1100 °C. Do optického ramene je přiváděna plynná fáze z generátoru těkavých specií přívodním ramenem. Tato obsahuje inertní nosný plyn (Ar), těkavou specií analytu, vodík, stopy kyslíku, množství drobných kapiček z generátoru, případně další těkavé sloučeniny, které vznikly v generátoru, a mohou být považovány jako potencionální interferent. Přítomný vodík je produktem rozkladu NaBH_4 a zdrojem kyslíku jsou jeho stopy rozpuštěné v roztoku vzorku, reagentů a nosném plynu.

V blízkosti spojení přívodního ramene s ramenem optickým vzniká oblak vodíkových radikálů, který je důsledkem reakcí vodíku s kyslíkem. Vodíkové radikály reagují s těkavou specií analytu za vzniku volných atomů. Tento jev je označován jako radikálový mechanismus atomizace. [24]

Dalším typem křemenného atomizátoru je multiatomizátor MMQTA (multiple microflame quartz tube atomizer). Rozdíl od QTA je v tom, že optické rameno je dvouplášťové. Díky děrované vnitřní trubici je umožněno, aby bylo do optické osy dávkováno kontrolované množství kyslíku. Ke vzniku vodíkových radikálů dochází po celé délce optického ramene. Díky tomuto volné atomy mohou existovat po delší dobu. [24] [37]

3 Experimentální část

3.1 Chemikálie

- Standardní roztok rtuti o koncentraci 1000 g/l , Hg²⁺ (Merck, Německo)
- Chlorid methylrtuti (Riedel de Haen, Německo)
- Chlorid ethylrtuti (Supelco, USA)
- Chlorid fenylrtuti (Supelco, USA)
- Tetrahydroboritan sodný (Sigma-Aldrich, USA)
- Hydroxid draselný, p.a. (Lach-Ner, ČR)
- Kyselina chlorovodíková 37%, p.a. (Merck, Německo)
- Chlorid cínatý (p.a. Lachema)
- Methanol 99,9 % (Fisher chemical, UK)
- L-cystein (Merck, Německo)
- L-cystein hydrochlorid monohydrát (Merck, Německo)
- Argon 99,996% (SIAD, ČR)
- Vzduch (Kompresor v laboratoři)
- Kyslík medicínální (SIAD, ČR)
- Deionizovaná voda ze zařízení ULTRAPUR, <0,1 μS cm⁻¹ (Watrex, USA)
- Reálné vzorky vlasů (Dobrovolníci-Veletrh vědy)
- Certifikovaný referenční materiál (IAEA-086 s certifikovaným obsahem celkového množství Hg 0,573 mg kg⁻¹; z toho MeHg⁺ 0,258 mg kg⁻¹ , Mezinárodní agentura pro atomovou energii (IAEA), Rakousko)

3.2 Přístroje

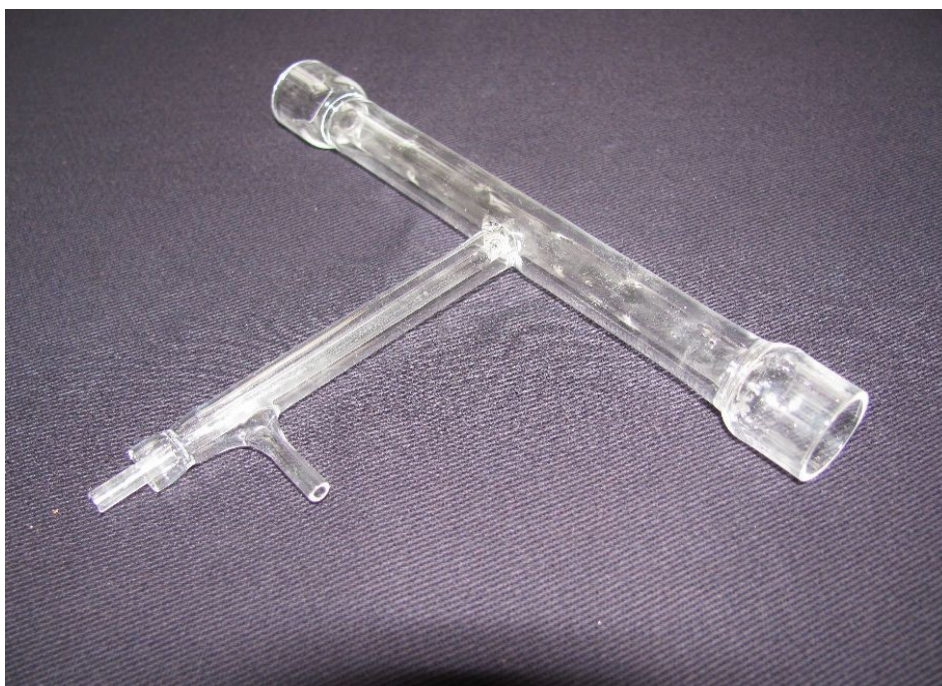
- Atomový absorpční spektrometr AA-7000 (Shimadzu, Japonsko)
- Odporová píčka s regulátorem teploty se zpětnou vazbou REX-C 100 (Syscon, USA)
- Jednoúčelový analyzátor stopových množství rtuti AMA-254 s automatickým podavačem pevných vzorků ASS-254 (Altec, ČR)

- Digitální teploměr s termočlánkem (Omron E5CB)
- Systém peristaltických pump pro dávkování do proudu FIAS 400 (Perkin Elmer, USA)
- Vysokoučinný kapalinový chromatograf HPLC (Agilent Technologies; kolona-Agilent Zorbax Eclipse XDB-C18 (4,6 mm x 150 mm, 5 μ m, Agilent Technologies); HPLC pumpa 1200 Series (Agilent); Automatický dávkovač 1260 Infinity (Agilent) s dávkovací smyčkou)
- Hmotnostní spektrometr s indukčně vázaným plazmatem ICP-MS Agilent 8900x (Agilent, USA)
- Regulátory hmotnostního průtoku (tzv. mass flow controllery) Cole-Parmer, USA
- Laboratorní třepačka (Velp Scientifica, Classic advanced vortex mixer)
- pH metr (Mettler Toledo-seven easy)

3.3 Aparatura

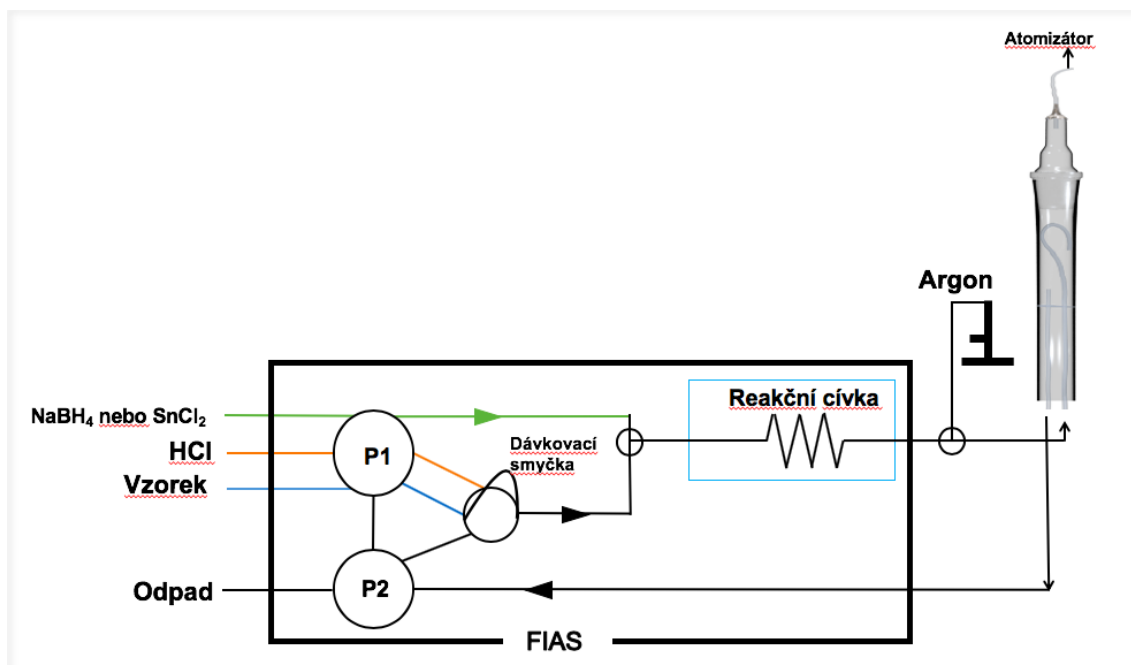
3.3.1 VSG-AAS

Pro optimalizaci podmínek chemického generování těkavých specií rtuti byl využíván atomový absorpční spektrometr AA-7000 (Shimadzu). Zdrojem záření byla Hg výbojka s dutou katodou. Měření byla prováděna při vlnové délce 253,7 nm s použitím šířky štěrbin 0,7 nm. Napájecí proud lampy byl 4 mA a měření byla prováděna bez použití korekce pozadí. Naměřené signály byly vyhodnocovány v programu LabSolutions (Shimadzu), kde byla integrována plocha píku a odečítána jeho výška. K atomizaci těkavých specií byl zvolen externě vyhříváný křemenný multiatomizátor (MMQTA), viz obrázek 3.1. K ohřevu MMQTA byla použita odporová pítka se zpětnou vazbou zkonstruovaná v laboratoři. Teplota byla nastavena pomocí regulátoru teploty REX-C100 (Syscon) se zpětnou vazbou a termočlánkovým senzorem teploty typu K (Omega Engineering). V grafech jsou uváděny průměry z minimálně 3 měření a chybové úsečky reprezentují směrodatnou odchylku měření.



Obr. 3.1 Křemenný multiatomizátor.

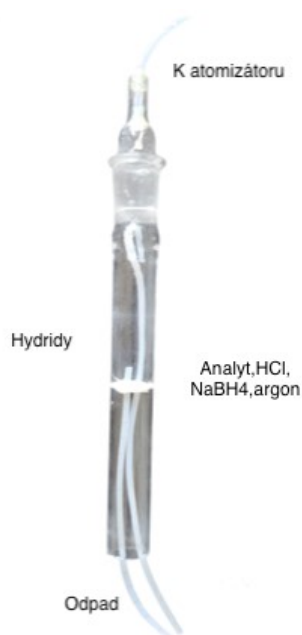
Pro chemické generování čtyř specií rtuti (Hg^{2+} , MeHg^+ , EtHg^+ , PhHg^+) byl použit průtokový generátor hydridů v kontinuálním uspořádání. Schéma uspořádání je na Obr. 3.2.



Obr. 3.2 Schéma průtokového generátoru s dávkováním do proudu.

Do systému bylo vždy dávkováno $0,5 \text{ cm}^3$ standardu příslušné specíe rtuti v prostředí kyseliny chlorovodíkové. Standard byl pomocí automatického dávkovacího ventilu FIAS 400 dávkován do proudu HCl přiváděné konstantní rychlostí $4,0 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$. NaBH_4 jakožto redukční činidlo bylo přiváděno rychlostí $1,2 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$, a nosným plynem byl argon. Reakční směs byla vháněna do separátoru fází s nuceným odtahem.

Ve skleněném separátoru fází byla oddělena těkavá specíe rtuti z kapalně fáze do plynně fáze. Uvolněná plynná specíe rtuti byla následně vedena do křemenného multiatomizátoru, a to teflonovou hadičkou. Kapalná fáze byla ze separátoru fází odčerpávána rychlostí $9,0 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$. Separátor fází je znázorněn na Obr. 3.3.



Obr. 3.3 Separátor fází s nuceným odtahem. Převzato a upraveno z [38].

3.3.2 Spektrometr AMA- 254

Spektrometr AMA-254 byl používán k ověření koncentrace specií rtuti v pracovních standardech před jejich použitím k optimalizačním měřením. Bylo pipetováno $100 \mu\text{L}$ roztoku standardu na vyžíhanou kovovou (niklovou) lodičku. Měření byla prováděna v manuálním režimu s dobou sušení 60 s a dobou rozkladu 120 s . Ke stanovení celkového obsahu rtuti v certifikovaném referenčním materiálu a reálných vzorcích (lidské vlasy) byl jednoúčelový analyzátor rtuti AMA-254 také využit.

Měření byla prováděna v automatickém režimu s použitím dávkovače pevných vzorků ASS-254. Doba sušení byla 10 s a doba rozkladu 200 s. Navážka vlasů a CRM pro jednotlivou analýzu činila přesně asi 10 mg.

3.3.3 HPLC-ICP-MS

Pomocí HPLC-ICP-MS byl stanovován obsah methylrtuti ve vzorcích vlasů, tj. v certifikovaném referenčním materiálu CRM-IAEA-086 i reálných vzorcích vlasů od dárců. Měření pomocí HPLC-ICP-MS sloužila také k ověření selektivity extrakce MeHg z vlasů. Bylo naváženo 50-300 mg reálného vzorku vlasů či CRM, a poté byly po dobu 4 hodiny extrahovány v 2 mol dm^{-3} HCl za neustálého třepání na laboratorní třepáče. Poté byly jednotlivé extrakty filtrovány (LUT Syringe Filters PTFE, 25 mm; $0,45 \mu\text{m}$). Extrakt byl poté dále ředěn 10x L-cysteinovým pufrem ($0,5 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ hydrochloridu L-cysteinu a $0,5 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ L-cysteinu rozpuštěné v deionizované vodě, pH 2,3).

HPLC separace probíhala za podmínek izokratické eluce. Tok mobilní fáze zajišťovala HPLC pumpa 1200 Series (Agilent). Přístroj byl vybaven automatickým dávkovačem 1260 Infinity (Agilent) s dávkovací smyčkou o objemu $100 \mu\text{l}$. Separace specií se uskutečnila na koloně Agilent Zorbax Eclipse XDB-C18 ($4,6 \times 150 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$, Agilent, Japonsko) s předkolonou se stejnou stacionární fází ($4,6 \times 12,5 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$, Agilent). Mobilní fáze byla připravena rozpuštěním $0,5 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ hydrochloridu L-cysteinu a $0,5 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ L-cysteinu v deionizované vodě a její pH bylo poté upraveno na hodnotu 2,3 přidávkem HCl. Eluent z kolony byl následně zmlžován v MicroMist zmlžovači do ICP-MS detektoru. Detekce proběhla pomocí spektrometru ICP-MS Agilent 8900x (Agilent), parametry detektoru jsou uvedeny v tabulce 3.1. Monitorovanými izotopy byly ^{125}Te , ^{202}Hg a dále ^{201}Hg pro kontrolu správnosti výsledků. Zpracování chromatogramů proběhlo v programu Agilent Mass Hunter Workstation, verze B.01.01 (Agilent, USA).

Tab. 3.1 Parametry měření na HPLC-ICP-MS a ICP-MS

ICP-MS		
Vnitřní standard	200 $\mu\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$ Te v 2 % HNO_3	
Příkon plazmatu [W]	1550	
Průměr injektoru plazmového hořáku [mm]	1,5	
	<i>ICP-MS</i>	<i>HPLC-ICP-MS</i>
Průtok peristaltické pumpy [$\text{dm}^3\cdot\text{min}^{-1}$]	0,3	0,6
Průtok nosného plynu (Ar) [$\text{dm}^3\cdot\text{min}^{-1}$]	0,6	0,85
Průtok ředícího plynu (Ar) [$\text{dm}^3\cdot\text{min}^{-1}$]	0,28	0,0
Sledovaná m/z	$^{201,202}\text{Hg}$, ^{125}Te	
HPLC		
Předkolona	Zorbax Eclipse XDB-C18 (4,6 x 150 mm, 5 μm)	
Kolona	Zorbax Eclipse XDB-C18 (4,6 x 12,5 mm, 5 μm)	
Průtok [$\text{cm}^3\text{ min}^{-1}$]	1	
Dávkovací objem [μl]	25	
Mobilní fáze:		
MF A:	0,5 g dm^{-3} L-cysteinu a 0,5 g dm^{-3} L-cystein hydrochloridu v deionizované vodě pH= 2,3 (upraveno HCl)	
MF B:	Methanol	
Gradient:		
0-4 min	2 % MF B	
4-8 min	50 % MF B	
8-20 min	2 % MF B	

3.3.4 Porovnání detekčních technik

Jak již bylo uvedeno výše, měření pomocí HPLC-ICP-MS popsaná v kapitole 3.3.3 sloužila k ověření selektivity extrakce MeHg^+ z matrice lidských vlasů. Poté, co byl tento fakt ověřen (kapitola 4.11), byly pro stanovení MeHg^+ v extraktech porovnány tři analytické metody založené na: 1) VSG-AAS (viz kapitola 2.3.1), 2) AMA-254 (viz kapitola 2.2.2 a 3) ICP-MS, viz tab. 3.1. Jelikož provedená extrakce je selektivní, tj. extrakt obsahuje rtuť pouze ve formě MeHg^+ , lze k jejímu stanovení použít jakýkoli spektrometrický detektor již bez nutnosti použití separační metody. Měření pomocí ICP-MS byla prováděna obdobně jak je popsáno v kapitole 3.3.3, pouze bez předřazené HPLC separace. K dávkování vzorku(extraktu) byl použit automatický podavač vzorků (1260 ALS, Agilent). Měření s detekcí VSG-AAS a AMA-254 byla prováděna bez dalšího ředění extraktu, pro měření pomocí ICP-MS byly extrakty 10x ředěny 2 mol dm^{-3} HCl.

4 Výsledková část a diskuze

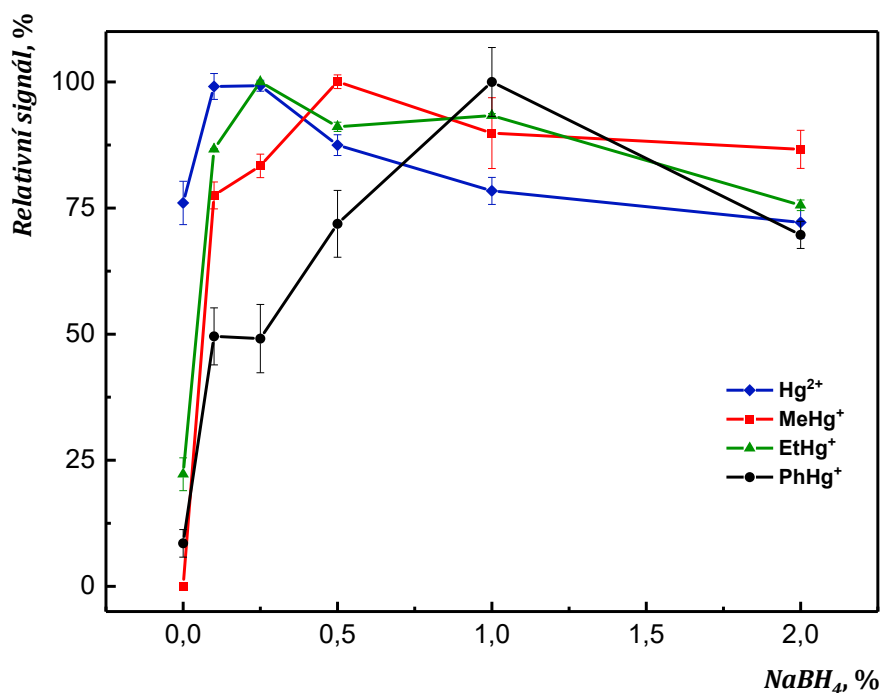
Uvedené kapitoly (4.1 až 4.8) se zabývají optimalizací jednotlivých experimentálních parametrů chemického generování těkavých specií rtuti, tj. Hg^0 , MeHgH , EtHgH a PhHgH , z odpovídajících sloučenin v kapalně fázi - Hg^{2+} , MeHg^+ , EtHg^+ a PhHg^+ . Byly optimalizovány koncentrace reagentů (NaBH_4 a HCl), průtok argonu jako nosného plynu a atomizační teplota. Dále byl studován vliv vzduchu zavedeného do multiatomizátoru na signál a použití SnCl_2 jako alternativního redukčního činidla namísto NaBH_4 . Studován byl i vliv délky reakční cívky a sušidla na signál jednotlivých specií. Pro každou specii byly nalezené optimální podmínky rozdílné. Pokud není v textu uvedeno jinak, veškeré optimalizace byly prováděny s koncentrací standardů jednotlivých specií 10 ng cm^{-3} . Pokud nebyl daný parametr předmětem optimalizace, byla jeho hodnota nastavena tak, jak je uvedeno v tabulce 4.1. Následně byly určeny analytické parametry stanovení jednotlivých specií Hg pomocí VSG-AAS (kapitola 4.9). Ačkoli za optimálních podmínek je dosaženo nejvyššího signálu pro danou specii Hg, dalšími experimenty provedenými na školicím pracovišti bylo prokázáno, že během kroku VSG dochází k signifikantním změnám speciální informace (de-alkylací MeHg^+ a EtHg^+ a de-arylací PhHg^+). Tyto experimenty, jejichž výsledky jsou stručně diskutovány v kapitole 4.10, nejsou součástí této diplomové práce, avšak jsou důležité pro pochopení motivace provádění dalších experimentů diskutovaných v kapitole 4.11.

Tab.4.1 Optimální podmínky pro generování těkavých specií rtuti

Specie	NaBH_4 [%]	HCl [mol dm^{-3}]	Ar [$\text{cm}^3 \text{ min}^{-1}$]	T [$^{\circ}\text{C}$]
Hg^{2+}	0,1	0,5	25	150
MeHg^+	0,5	0,3	25	500
EtHg^+	0,25	0,5	25	500
PhHg^+	1,0	1,0	25	500

4.1 Optimalizace koncentrace NaBH₄

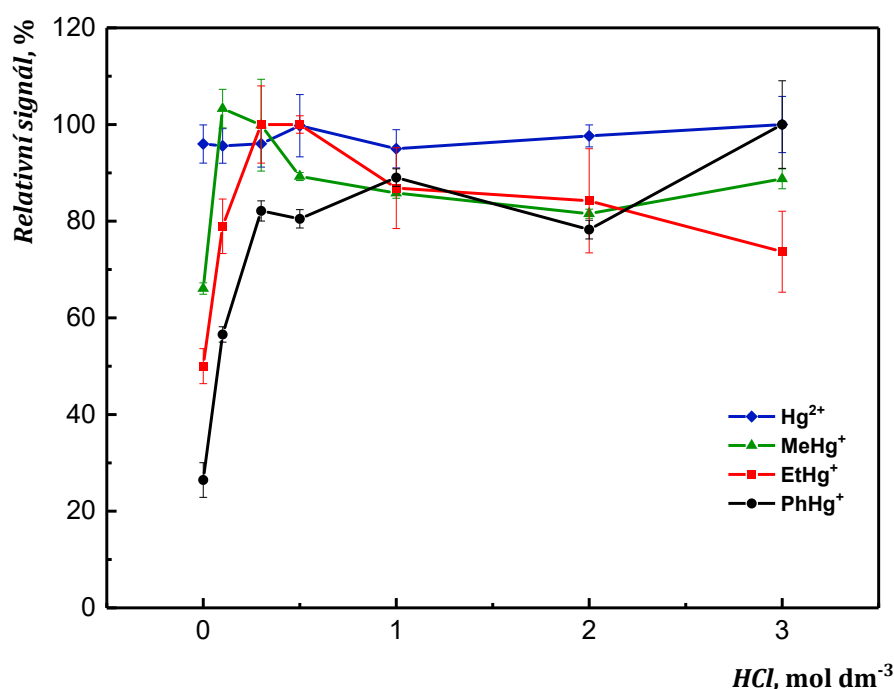
Byla provedena optimalizace koncentrace roztoku NaBH₄ používaného jako redukční činidlo. Studovány byly koncentrace NaBH₄ v rozmezí od 0,1% do 1%. Roztok redukčního činidla byl vždy stabilizován 0,4% KOH. Během optimalizace byly pro každou specii použity jiné podmínky, které jsou uvedené v tabulce 4.1. Naměřené závislosti pro všechny čtyři specie (Hg²⁺, MeHg⁺, EtHg⁺, PhHg⁺) jsou uvedeny v grafu na obrázku 4.1. Pro všechny specie dochází nejprve k prudkému nárůstu signálu s rostoucí koncentrací NaBH₄, což je nejvíce patrné pro Hg²⁺ a EtHg⁺. Poté dochází k dosažení plata či mírnému poklesu signálu. Optimální koncentrace redukčního činidla byly na základě provedených optimalizací určeny následovně: 0,1% NaBH₄ pro Hg²⁺, 0,5% NaBH₄ pro MeHg⁺, 0,25% NaBH₄ pro EtHg⁺ a 1% NaBH₄ pro PhHg⁺.



Obr. 4.1 Závislost plochy píku specií rtuti na koncentraci tetrahydridboritanu sodného.

4.2 Optimalizace koncentrace HCl

Byla optimalizována koncentrace kyseliny chlorovodíkové. Studované koncentrace byly v rozmezí od 0,1 do 3,0 mol dm⁻³ HCl. Naměřené závislosti jsou uvedeny v grafu na obrázku 4.2 a mají podobný trend jako ty uvedené na obrázku 4.1 pro NaBH₄. Kromě anorganické rtuti, pro kterou je signál konstantní v celém rozsahu studovaných koncentrací HCl, signál ostatních specií nejprve prudce roste a poté dosahuje plata či mírně klesá. Pro anorganickou rtuť a ethylrtuť byla jako optimální zvolena koncentrace 0,5 mol dm⁻³ HCl. Pro methylrtuť bylo dosaženo nejvyššího signálu při koncentraci 0,3 mol dm⁻³ HCl, pro fenylrtuť byla zvolena koncentrace 1 mol dm⁻³ HCl.

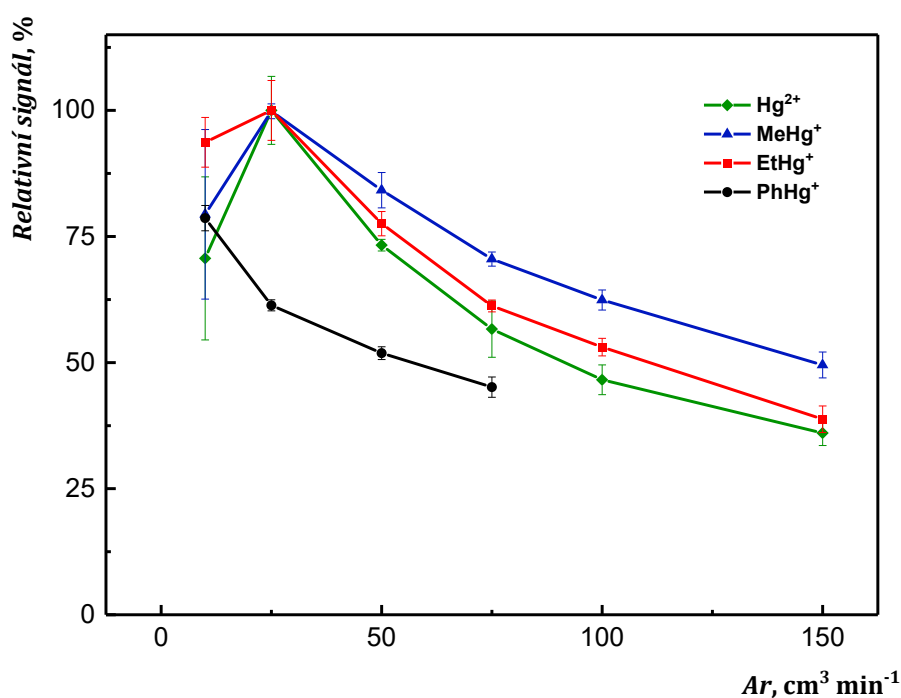


Obr. 4.2 Závislost plochy píku specií rtuti na koncentraci kyseliny chlorovodíkové.

4.3 Optimalizace průtoku argonu

Závislost signálu specií rtuti na průtoku nosného plynu byla studována od 10 do 150 cm³ min⁻¹ Ar. Pro methylrtuť, ethylrtuť a anorganickou rtuť bylo nejvyššího signálu dosaženo při průtoku 25 cm³ min⁻¹ Ar, při vyšších hodnotách průtoku docházelo k poklesu

signálu proporcionálně s naředěním volných atomů analytu nosným plynem. V případě fenylrtuti se velikost signálu snižovala již od $10 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1} \text{ Ar}$. Toto rozdílné chování lze vysvětlit faktem, že VSG této specie se provádí při vyšší koncentraci redukčního činidla (1% NaBH_4), frakce vodíku ko-generovaného společně s PhHgH je tak nejvyšší ze všech specií a dosahuje cca $30 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1} \text{ H}_2$. Generovaný vodík se podílí na uvolnění PhHgH z kapalně fáze a transportu do atomizátoru, přídavek nosného plynu je už tedy nadbytečný. Optimální průtok argonu byl zvolen při průtoku $25 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ pro všechny specie rtuti.

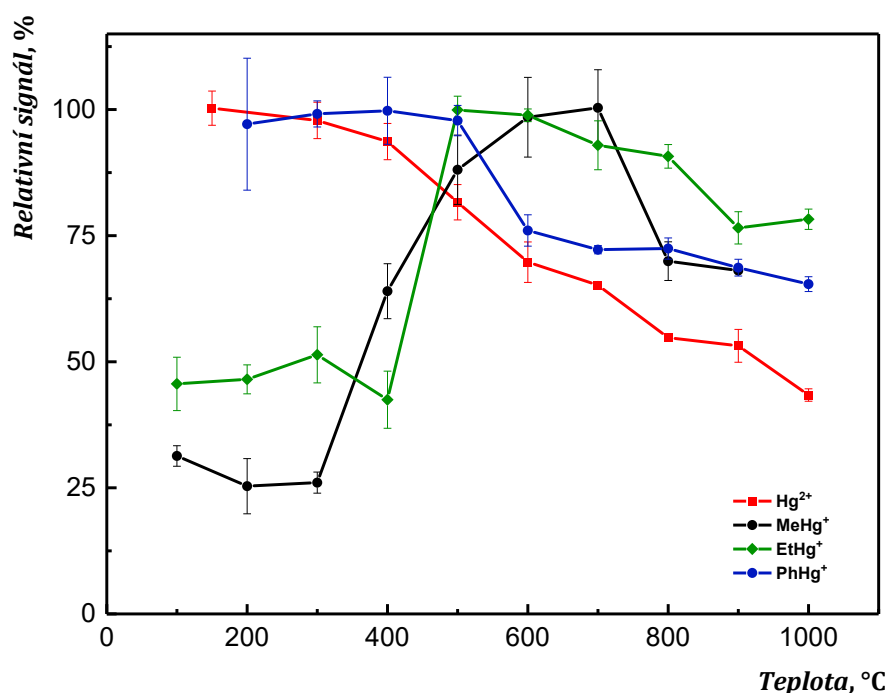


Obr. 4.3 Závislost plochy píku specií rtuti na průtoku argonu.

4.4 Optimalizace atomizační teploty

Optimalizace atomizační teploty přinesla nejzajímavější výsledky. Vliv atomizační teploty na signál jednotlivých specií rtuti byl studován v rozsahu 150 až $1000 \text{ }^\circ\text{C}$. Výsledky jsou vyneseny v grafu na obrázku 4.4. Dle očekávání byl při použití standardu Hg^{2+} nejvyšší signál naměřen při nejnižší atomizační teplotě zatímco s rostoucí teplotou atomizátoru signál monotónně klesal. Jelikož produktem redukce Hg^{2+} tetrahydridoboritanem sodným jsou studené páry rtuti (Hg^0), tedy volné atomy, je logické

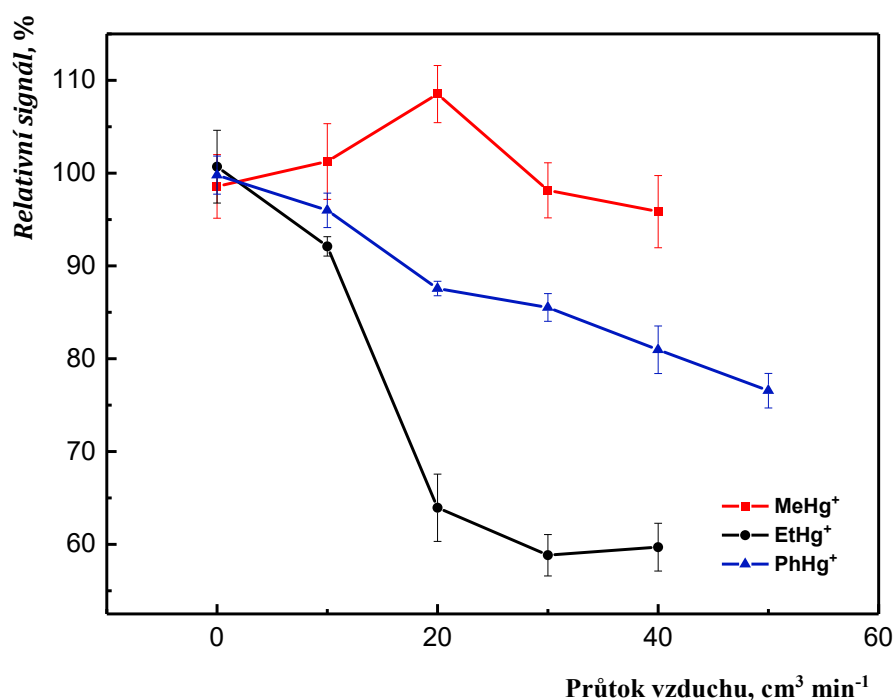
že signál je v AAS detekovatelný již v nevyhříváném atomizátoru nebo v atomizátoru vyhříváném na nízkou teplotu (např. 150 °C). Další vyhřívání atomizátoru vede k poklesu signálu, jelikož s rostoucí teplotou dochází k expanzi nosného plynu a rychlejšímu transportu volných atomů mimo optickou osu atomového absorpčního spektrometru. Závislost signálu fenylrtuti na atomizační teplotě kopíruje tu pozorovanou pro anorganicky vázanou rtuť (viz obrázek 4.4). V případě MeHg^+ a EtHg^+ dochází nejprve s rostoucí atomizační teplotou k prudkému nárůstu signálu, poté je dosaženo plata cca mezi 400 a 600 °C, s následným mírným poklesem signálu těchto specií při vyšších atomizačních teplotách. Nárůst signálu v úzkém teplotním intervalu mezi 400 a 600 °C lze vysvětlit atomizací molekulárních struktur, do kterých je analyt vázán (MeHgH a EtHgH). Při teplotě kolem 500 °C vznikají v atomizátoru reakcí mezi kogenerovaným vodíkem a stopami kyslíku vodíkové radikály, které radikálovým mechanismem atomizují hydrid analytu (viz kapitola 2.3.5.1.1). Pokles signálu při teplotách vyšších než 700 °C může být i v případě methyl- a ethylrtuti vysvětlen expanzí nosného plynu a rychlejším transportem volných atomů rtuti mimo optickou osu. Zajímavým zjištěním je, že nezanedbatelný signál je pro všechny organické specie rtuti pozorován i při atomizační teplotě 150 °C (viz obrázek 4.4). Jelikož atomizaci molekulárních struktur, tedy substituovaných hydridů MeHgH , EtHgH a PhHgH nelze při této teplotě očekávat, lze předpokládat, že pozorovaný signál pochází od volných atomů rtuti, tedy že při VSG těchto specií dochází částečně k demethylaci, deethylaci a defenylaci. V případě fenylrtuti lze z průběhu křivky v grafu na obrázku 4.4 usuzovat, že rozpad PhHg^+ na Hg^0 probíhá kvantitativně. Procesy dealkylace a dearylace specií rtuti nebyly v rámci této diplomové práce studovány, ale byly kvantifikovány na školicím pracovišti paralelně s optimalizacemi prezentovanými v této práci. Problematika změn speciální informace během VSG specií rtuti úzce souvisí s tématem této práce a použitelnosti zde prezentovaných výsledků v praxi, proto je stručně diskutována a uvedena do souvislostí s výsledky této diplomové práce v kapitole 4.10.



Obr. 4.4 Závislost plochy píku specií rtuti na atomizační teplotě.

4.5 Vliv vzduchu na výsledný signál

Byl studován vliv přívodu vzduchu do MMQTA na signál specií rtuti. Rozsah průtoku vzduchu byl měněn od 0 do 40 cm³ min⁻¹. Závislost plochy píku na průtoku vzduchu znázorňuje graf na obrázku 4.5. V případě EtHg⁺ a PhHg⁺ byl nejvyšší signál pozorován bez přídavku vzduchu. S přídavkem vzduchu docházelo k poklesu signálu kvůli naředění volných atomů. Při vyšších průtocích již také mohlo docházet k záchytu rtuti v optickém rameni MMQTA díky přítomnosti kyslíku. Nejvyšší signál byl pro MeHg⁺ pozorován při průtoku vzduchu do MMQTA 20 cm³ min⁻¹, signál byl asi o 10 % vyšší než bez přídavku vzduchu. Při dalších experimentech nebyl vzduch do atomizátoru přidáván, jelikož jeho pozitivní vliv na signál je zanedbatelný.



Obr. 4.5 Závislost plochy píku specií rtuti na průtoku vzduchu do QTA.

4.6 Vliv sušící trubice

Během optimalizace podmínek generování jednotlivých specií Hg byl studován vliv kogenerovaného aerosolu na transport a atomizaci jednotlivých těkavých specií Hg. Zapojením sušící trubice lze výrazně snížit množství aerosolu v plynné fázi. Byla použita polypropylenová sušící trubice (100 mm délka, 15 mm vnitřní průměr), která byla naplněna peckami hydroxidu sodného (čistoty p.a., Penta, ČR). Tato trubice byla zapojena mezi separátor fází a atomizátor. Byly porovnány signály všech specií Hg v přítomnosti a nepřítomnosti sušící trubice. Relativní signály naměřené v přítomnosti sušící trubice činily 106 %, 116 %, 87 % a 103 % signálů naměřených pro Hg²⁺; MeHg⁺; EtHg⁺ a PhHg⁺ v nepřítomnosti sušící trubice. Z naměřených dat vyplývá, že v sušící trubici nedochází k významnějším ztrátám specií Hg. [39] Sušící trubice nebyla při dalších měřeních dále používána, neboť kogenerovaný aerosol nijak neinterferuje při AAS měřeních s atomizací ve vyhřívaném křemenné atomizátoru a uspořádání aparatury bylo bez sušící trubice jednodušší. Přesto jsou naměřené výsledky důležité. V některých aplikacích, např. při použití prekoncentračního kroku se záchytem vygenerovaných

těkavých specií Hg v kryogenní pasti, je nezbytné kogenerovaný aerosol z plynné fáze odstraňovat (kapitola 4.10).



Obr. 4.6 Použitá sušící patrona naplněná hydroxidem sodným.

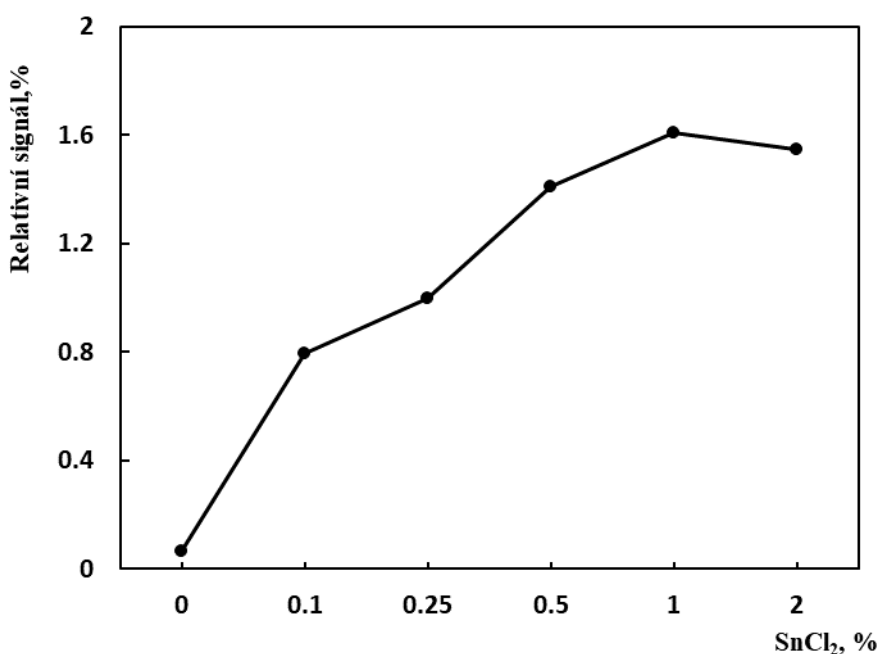
4.7 Vliv reakční cívky

Jedním z dalších studovaných parametrů byl vliv zapojení reakční cívky na výsledný signál. Reakční cívka z PTFE o délce 100 cm a vnitřním průměru 1 mm byla zapojena do aparatury za T-spoj, ve kterém dochází k míchání redukčního činidla NaBH_4 se standardem příslušné specie rtuti a před druhý T-spoj sloužící pro přívod nosného plynu (obrázek 3.2). Zapojení reakční cívky mělo umožnit delší reakční dobu pro redukci specií rtuti NaBH_4 na příslušnou těkavou sloučeninu. Pokud nebyla reakční cívka zapojena, byly dvě T-spojky v aparatuře, tj. místo mísení okyseleného vzorku a NaBH_4 a místo přívodu nosného plynu, navzájem propojeny krátkou PTFE hadičkou o délce 9 cm a vnitřním průměru 1 mm. Byl studován vliv zapojení reakční cívky na signál všech studovaných specií. Porovnáním signálů v přítomnosti reakční cívky a její nepřítomnosti bylo zjištěno, že relativní signály Hg^{2+} ; MeHg^+ ; EtHg^+ a PhHg^+ naměřené v přítomnosti reakční cívky činily 97 %, 99%, 98% a 103% signálů naměřených bez reakční cívky. Jelikož při zapojení reakční cívky nedošlo k výrazným změnám signálu u žádné ze studovaných specií, nebyla reakční cívka v dalších experimentech použita.

4.8 Chlorid cínatý jako redukční činidlo

Studené páry rtuti se generují také za použití chloridu cínatého SnCl_2 jako redukčního činidla místo NaBH_4 . Byly připraveny čerstvé roztoky SnCl_2 v rozsahu koncentrací od 0,1; 0,25; 0,5; 1 a 2 %.

V případě VSG s použitím standardu Hg^{2+} signál rtuti s použitím AAS detektoru prudce roste s rostoucí koncentrací SnCl_2 mezi 0 a 0,5%, aby dosáhl téměř konstantní odezvy mezi koncentračními úrovněmi 0,5 a 2% SnCl_2 (viz graf na obrázku 4.7). Jako optimální koncentrace SnCl_2 byla zvolena hodnota 1 %. Při VSG ze standardu Hg^{2+} bylo za optimálních podmínek dosaženo srovnatelných ploch signálů při použití SnCl_2 a NaBH_4 jako redukčních činidel, z čehož lze usuzovat srovnatelnou účinnost generování studených par rtuti nezávisle na použitém redukčním činidle. Toto pozorování je v souladu s publikovanými výsledky[24]. Pro ostatní specie rtuti, tj. MeHg^+ ; EtHg^+ a PhHg^+ nebyl signál v AAS detekován při žádné ze studovaných koncentrací SnCl_2 , z čehož vyplývá, že toto redukční činidlo není na rozdíl od NaBH_4 schopné redukce těchto specií na odpovídající substituovaný hydrid. Tohoto poznatku by patrně mohlo být využito při speciální analýze Hg, pokud by bylo dostačující rozlišit mezi anorganicky vázanou rtutí (Hg^{2+}) a organicky vázanými speciem rtuti. Tato problematika však nebyla v rámci této práce dále studována.

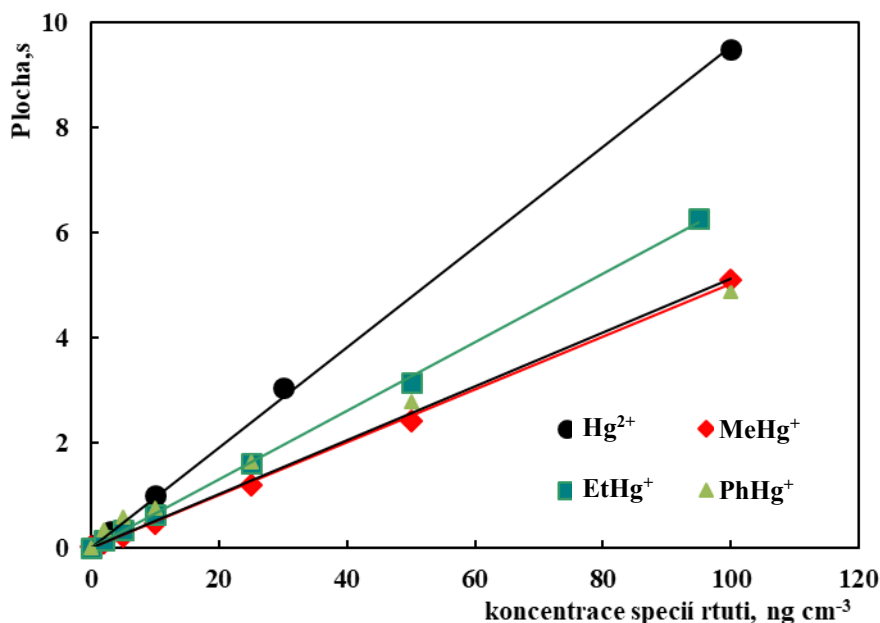


Obr. 4.7 Závislost plochy píku Hg^{2+} na koncentraci SnCl_2 .

4.9 Kalibrační závislosti a analytické charakteristiky

Kalibrační závislosti byly měřeny v rozsahu koncentrací od 0,5 do 100 ng cm^{-3} pro každou specii rtuti za optimálních podmínek uvedených v tabulce 1, a jsou uvedeny

v grafu na obrázku 4.8. Z naměřených závislostí je patrné, že kalibrační křivky jsou lineární v celém studovaném rozsahu. Nejvyšší směrnice kalibrační křivky a tudíž i nejvyšší citlivosti bylo dosaženo pro anorganicky vázanou rtuť. Směrnice kalibračních závislostí ostatních specií jsou srovnatelné a téměř dvakrát nižší ve srovnání s Hg^{2+} .



Obrázek 4.8 Kalibrační závislosti jednotlivých specií rtuti.

Nutno zdůraznit, že stanovení Hg^{2+} však bylo prováděno při atomizační teplotě 150 °C, zatímco atomizační teplota pro ostatní specie činila shodně 500 °C. Pokud vezmeme do úvahy expanzi plynné fáze v atomizátoru v závislosti na atomizační teplotě, pak by signál při teplotě 500 °C měl činit cca 50 % signálu naměřeného při 150 °C právě kvůli expanzi nosného plynu a rychlejšímu transportu volných atomů mimo optickou osu spektrometru. Směrnice kalibrační závislosti pro Hg^{2+} při atomizační teplotě 500 °C by tedy byla cca poloviční. Pak lze konstatovat, že směrnice kalibračních závislostí pro všechny specie při jedné atomizační teplotě jsou srovnatelné. Parametry stanovené z kalibračních závislostí jednotlivých specií jsou shrnuty v tabulce 4.2. Meze detekce jsou pro všechny čtyři specie srovnatelné a pohybují se v rozmezí od 0,12 do 0,25 ng cm⁻³. Citlivost je pro specie, které jsou atomizovány při stejné teplotě také srovnatelná, dosahuje hodnoty 0,10 s ng⁻¹ Hg pro MeHg^+ a PhHg^+ a mírně vyšší hodnoty 0,13 s ng⁻¹ Hg pro EtHg^+ . Hodnota citlivosti pro Hg^{2+} je téměř dvojnásobná, což je ale opět způsobeno nižší atomizační teplotou a delšímu

setrvání volných atomů Hg v optické ose spektrometru kvůli nižší expanzi nosného plynu, jak je diskutováno výše. Při stejné atomizační teplotě jako pro organické specie rtuti, tj. 500 °C, by citlivost pro stanovení Hg²⁺ měla být zhruba poloviční a pohybovat se kolem 0,10 s ng⁻¹. Podobné hodnoty citlivosti stanovení všech specií Hg naznačují, že i účinnosti generování jednotlivých specií budou srovnatelné.

Účinnosti generování specií rtuti byly ve stejném uspořádání aparatury kvantifikovány v rámci jiné diplomové práce [38] a jsou uvedeny v tabulce 4.3. Z výsledků uvedených v tabulce 4.3 je zřejmé, že předpoklad srovnatelných účinností generování se potvrdil a všechny specie jsou v daném uspořádání aparatury za optimalizovaných podmínek VSG generovány s účinností kolem 60 %.

Tab. 4.2 Parametry získané z kalibračních závislostí pro jednotlivé specie rtuti

Specie	Rovnice kalibrační závislosti	Koeficient determinace	LOD ng cm ⁻³	Citlivost s ng ⁻¹
Hg ²⁺	y = 0,0954x	0,9994	0,25	0,19
MeHg ⁺	y = 0,0502x	0,9988	0,24	0,10
EtHg ⁺	y = 0,0652x	0,9994	0,12	0,13
PhHg ⁺	y = 0,0512x	0,9758	0,17	0,10

Tab. 4.3 Shrnutí výsledků účinností generování specií rtuti. Převzato z [38]

Specie	Účinnost generování, %
Hg ²⁺	59 ± 0,6
MeHg ⁺	56 ± 0,7
EtHg ⁺	52 ± 0,2
PhHg ⁺	65 ± 3,5

4.10 Aplikovatelnost dosažených výsledků

V rámci této diplomové práce byly nalezeny optimální podmínky VSG čtyř specií Hg. Během prováděných optimalizací bylo zjištěno (viz kapitola 4.4), že při VSG může částečně docházet k nežádoucím změnám ve speciální informaci, tj. dealkylací MeHg^+ a EtHg^+ a defenylaci PhHg^+ . Pádným důkazem byl zejména průběh závislosti signálu jednotlivých specií na atomizační teplotě (viz kapitola 4.4), kdy signál organických specií byl do jisté míry pozorován i při atomizační teplotě 150 °C, při které by molekulární struktury typu MeHgH , EtHgH a PhHgH neměly být atomizovány. Kvantifikace změn ve speciální informaci přesahuje rámec této diplomové práce. Avšak na školícím pracovišti byly na základě těchto pozorování provedeny mechanistické studie, které prokázaly, že během VSG skutečně dochází k demethylaci MeHg^+ , deethylaci EtHg^+ a defenylaci PhHg^+ .

Změny ve speciální informaci byly studovány pomocí kryogenní pasti (CT), která byla zařazena mezi generátor těkavých specií a použitý ICP-MS detektor. Technika se proto označuje jako VSG-CT-ICP-MS. Těkavé specie Hg byly generovány analogicky jako v této diplomové práci s použitím optimálních podmínek nalezených zde a shrnutých v tabulce 4.1. Vygenerované specie Hg byly zachyceny v CT při teplotě kapalného dusíku. Jednalo se o U-trubici z borosilikátového skla (vnitřní/vnější průměr 2,5/4,3 mm, délka 45 cm) naplněnou Chromosorbem (WAW-DMSC, zrnitost 45/60, SUPELCO, USA) a z vnějšku ovinutou Ni-Cr odporovým drátem. U-trubice byla nejprve ponořena do Dewarovy nádoby s kapalným dusíkem a následně se spustil krok VSG, přičemž těkavé specie byly zachyceny v kryogenní pasti. Poté byla U-trubice vyjmuta z Dewarovy nádoby a ohřívána lineárním gradientem na teplotu přibližně 130 °C. Specie rtuti byly poté v plynné fázi unášeny heliem do ICP-MS detektoru. Při ohřevu CT a uvolnění zachycených specií rtuti dochází zároveň také k separaci specií, bylo-li jich v pasti zachyceno více, podle jejich bodu varu. Teoreticky by při VSG měla z jedné specie v kapalně fázi vznikat vždy jen jedna těkavá specie podle rovnic (3) až (6) uvedených v kapitole 2.3.1. Experimentálně však bylo zjištěno, že toto platí pouze pro Hg^{2+} , kdy je metodou VSG-CT-ICP-MS zaznamenán skutečně jen jeden pík odpovídající Hg^0 . V případě VSG organických specií MeHg^+ a EtHg^+ byly registrovány vždy dva píky, z nichž první svým retenčním časem odpovídal Hg^0 (tedy dealkylaci) a druhý odpovídal příslušnému hydridu (MeHg^+ , resp. EtHg^+).

V případě PhHg^+ byl metodou VSG-CT-ICP-MS zaznamenán pouze jeden pík odpovídající tvorbě Hg^0 , tedy kvantitativní defenylaci fenylrtuti. Popsanou metodou VSG-CT-ICP-MS byl stupeň de-alkylace MeHg^+ a EtHg^+ , resp. de-arylace PhHg^+ kvantifikován na 45%, 77% a 94% [34]

Je tedy zřejmé, že za optimálních podmínek VSG nalezených v této práci dochází k výrazné změně speciální informace. Krok VSG tak nelze použít pro speciální analýzu Hg v reálných vzorcích s použitím přístupu tzv. generování substituovaných hydridů [9], kdy jsou těkavé specie současně vygenerovány, následně jsou separovány např. plynovou chromatografií nebo prekoncentrovány a separovány kryogenní pastí a následně detekovány. Tento přístup lze schématicky vyjádřit podle pořadí probíhajících kroků takto:

VSG → separace → detekce

Poznatky dosažené v této práci lze však ve speciální analýze rtuti přesto využít a to dvěma způsoby. Buď lze krok VSG zařadit za separační metodu, která nemění speciální informaci, např. HPLC. Tento přístup se označuje jako post-kolonové generování a lze ho schématicky vyjádřit:

separace → VSG → detekce

Výhodou zařazení kroku VSG je zde vyšší účinnost transportu těkavých specií do detektoru v porovnání s jejich zmlžováním a tedy i potenciál dosažení nižších detekčních limitů.

Druhý využitelný způsob se označuje jako selektivní generování (např. generování Hg^0 pomocí SnCl_2). Ze vzorku obsahujícího směs specií analytu se na těkavou sloučeninu převede pouze jedna vybraná specie a to buď vhodnou volbou experimentálních podmínek, nebo např. selektivní extrakcí. Schématicky lze tento postup vyjádřit:

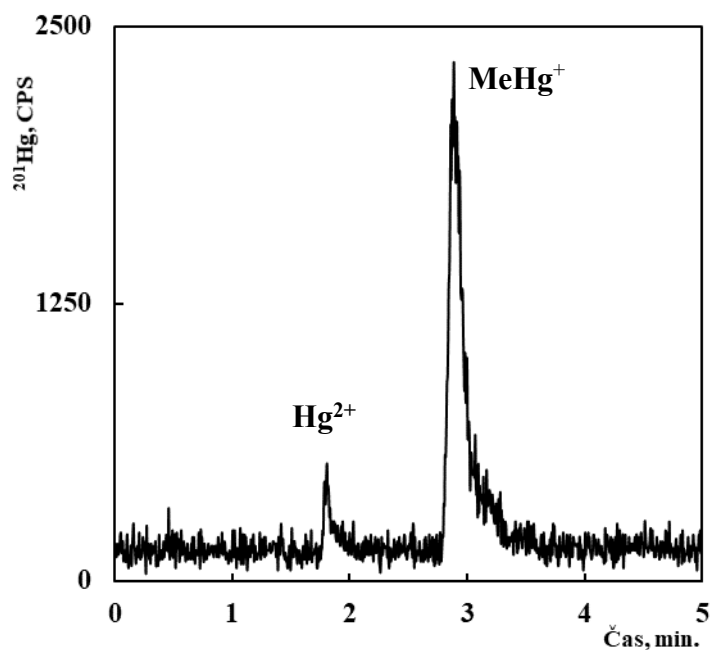
VSG → detekce

Selektivní generování bylo v této práci dále studováno. Jednalo se o analytický úkol stanovení MeHg^+ ve vzorcích vlasů. Tato problematika je diskutována v kapitole 4.11.

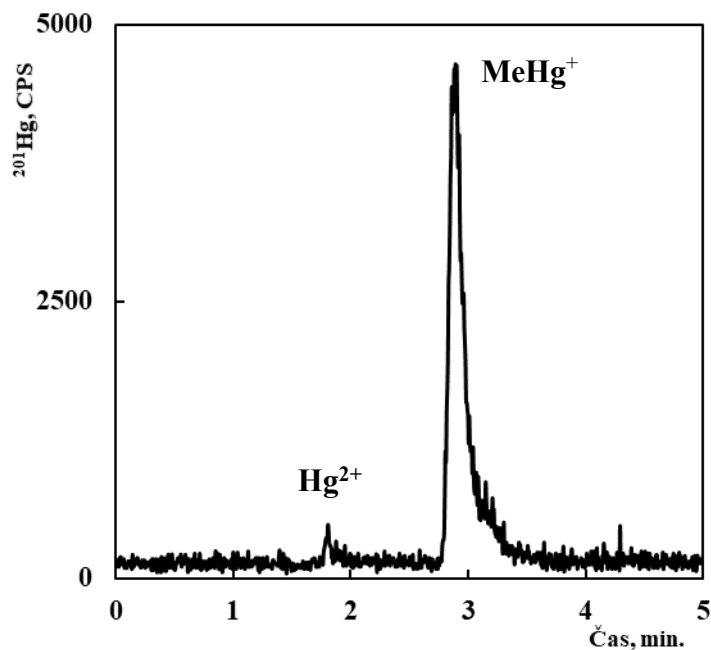
4.11 Speciální analýza rtuti ve vlasech

4.11.1 Ověření selektivity extrakce methylrtuti

Z literatury je známo, že methylrtuť lze z matrice lidských vlasů selektivně extrahovat pomocí $2 \text{ mol dm}^{-3} \text{ HCl}$ [40]. Způsob extrakce byl tedy převzat a reálné vzorky vlasů nebyly před extrakcí nijak upraveny/čištěny. Selektivita extrakce byla nejprve ověřena a to jak měřením certifikovaného referenčního materiálu, tak i reálných vzorků. Postup extrakce i následného měření extraktů pomocí HPLC-ICP-MS pro ověření selektivity extrakce MeHg^+ je popsán v kapitole 3.3.3. Pro ilustraci jsou na obrázcích 4.9 a 4.10 uvedeny chromatogramy extraktů certifikovaného referenčního materiálu i vybraného reálného vzorku. Z obou obrázků je zřejmé, že extrakce je dostatečně selektivní pro methylrtuť.



Obr. 4.9 Stanovení MeHg^+ v certifikovaném referenčním materiálu metodou HPLC-ICP-MS.



Obr. 4.10 Stanovení MeHg⁺ v reálném vzorku H-33 pomocí HPLC-ICP-MS.

4.11.2 Porovnání detektorů a interpretace dat

Obsah methylrtuti v extraktech CRM i reálných vzorků byl měřen 4 různými analytickými metodami a to ICP-MS, VSG-AAS, AMA-254 a HPLC-ICP-MS. Metoda VSG-AAS byla zvolena, neboť v rámci optimalizační studie bylo zjištěno, že methylrtuť lze účinně generovat v prostředí 2 mol dm⁻³ HCl (viz. Obr. 4.2), v níž jsou připraveny extrakty.

Měření pomocí HPLC-ICP-MS byla prováděna kvůli ověření selektivity extrakce methylrtuti, jak je diskutováno v kapitole 4.11.1. Ve všech případech byly naměřeny chromatogramy kvalitativně podobné těm uvedeným na obrázcích 4.9. a 4.10. Měření pomocí HPLC-ICP-MS nade vší pochybnost prokázala, že extrakce je selektivní a proto lze ke kvantifikaci obsahu methylrtuti použít jakýkoli spektrometrický detektor. Výsledky jsou přehledně uvedeny v tabulce 4.4, která kromě obsahu methylrtuti v extraktech naměřeného 4 různými analytickými metodami uvádí i celkový obsah rtuti ve vzorcích a CRM stanovený technikou AMA-254 v pevných vzorcích bez extrakce. Z výsledků uvedených v tabulce 4.4 je patrné, že obsah methylrtuti v reálných vzorcích se pohybuje kolem 70 % celkového obsahu Hg (69 – 73 %), zatímco v případě CRM tvoří methylrtuť 43 % celkového obsahu rtuti.

Dále je z tabulky patrné, že výsledky obsahu methylrtuti dosažené pro daný vzorek různými detekčními technikami se od sebe významně neliší. V případě certifikovaného referenčního materiálu je zřejmé, že bylo vždy dosaženo dobré shody naměřených hodnot s těmi certifikovanými.

Tab. 4.4 Obsah celkového množství rtuti ($Hg_{\text{celk.}}$) stanovený metodou AMA-254 a methylrtuti v reálných vzorcích i certifikovaném referenčním materiálu IAEA-086. Porovnání technik AMA-254, VSG-AAS, ICP-MS a HPLC-ICP-MS pro stanovení obsahu methylrtuti.

Vzorek	$Hg_{\text{celk.}}, \mu\text{g kg}^{-1}$ (AMA-254)	$\text{MeHg}, \mu\text{g kg}^{-1}$			
		AMA-254	VSG-AAS	ICP-MS	HPLC-MS
H-IPP	267	182	203	177	173
H-70	653	446	480	401	480
H-55	1212	824	843	882	967
H-33	574	395	446	366	407
H-18-7	579	377	479	447	362
IAEA-086	547 ± 27	231 ± 6	283 ± 28	231 ± 3	246 ± 5
	573 ± 39		258 ± 22		

V nedávné studii Státního zdravotního ústavu v Praze byl ve vzorcích vlasů 179 žen z ČR [41], kojících prvorodiček, stanoven medián celkového obsahu Hg $0,13 \text{ mg kg}^{-1}$ vlasu (minimum $0,017$ a maximum $1,62 \text{ mg kg}^{-1}$). Medián pro methylrtuť činil $0,11 \text{ mg kg}^{-1}$ vlasu. Průměrný obsah methylrtuti tedy činil 85 %, což je srovnatelné s výsledky dosaženými v této práci.

V tabulce 4.5 jsou shrnuty meze detekce a stanovitelnosti pro stanovení methylrtuti ve vzorcích vlasů těmito metodami. Detekční limity dosažené pomocí HPLC-ICP-MS a ICP-MS jsou mírně lepší než ty dosažené technikami VSG-AAS a AMA-254. Všechny testované detektory jsou dostatečně citlivé pro stanovení methylrtuti ve vzorcích vlasů.

V případě VSG-AAS a AMA-254 není třeba extrakty před měřením nijak upravovat, v porovnání s ICP-MS a HPLC-ICP-MS, kdy extrakty je třeba před analýzou ředit 10x pro snížení obsahu vyextrahovaných složek matrice (produkty degradace keratinu a jiné).

Tab. 4.5 Mez detekce a kvantifikace pro MeHg^+ ve vzorcích vlasů

	AMA-254	VSG-AAS	ICP-MS	HPLC-MS
LOD [ng g^{-1}]	35	41	10	5
LOQ [ng g^{-1}]	138	136	33	16

5 Závěr

Byly nalezeny optimální podmínky pro chemické generování (VSG) čtyř specií rtuti pro speciální analýzu Hg^{2+} , MeHg^+ , EtHg^+ a PhHg^+ v kapalných vzorcích s detekcí atomovou absorpční spektrometrií (AAS). Atomizace vygenerovaných studených par rtuti, resp. substituovaných hydridů rtuti z organicky vázaných specií Hg, byla prováděna ve vyhřívaném křemenném atomizátoru. Podmínky atomizace byly rovněž v rámci této diplomové práce optimalizovány. Bylo zjištěno, že podmínky generování těkavých specií rtuti, zejména koncentraci HCl a NaBH_4 jako redukčního činidla i průtok nosného plynu, stejně jako podmínky následné atomizace (atomizační teplota) by bylo možné zvolit jako kompromis tak, aby všechny specie rtuti byly z roztoku generovány současně se srovnatelnou a vysokou účinností (cca 60 %) a následně po vhodně zvolené separaci, např. pomocí plynové chromatografie či kryogenní pasti, detegovány s vysokou citlivostí pomocí AAS. Toto by bylo možné za předpokladu, že by během kroku generování nedocházelo ke změně speciální informace.

Během experimentů však bylo zjištěno, že i za optimalizovaných podmínek generování dochází k výrazným změnám speciální informace rozkladem těkavých organických specií rtuti, konkrétně k dealkylaci methylrtuti a ethylrtuti a defenylaci fenylrtuti. Z tohoto důvodu nelze krok VSG použít ke speciální analýze rtuti s využitím přístupu tzv. generování substituovaných hydridů (VSG → separace → detekce).

Získaných poznatků a optimálních podmínek VSG lze přesto použít pro speciální analýzu Hg v režimu postkolonového generování (separace → VSG → detekce), kdy je krok VSG vřazen za separační metodu, nejčastěji HPLC. Tento přístup nebyl v této diplomové práci dále rozvíjen, dosažené výsledky ale slouží jako pilotní experimenty pro další výzkum postkolonového generování na školicím pracovišti.

Poslední možností využití VSG pro speciální analýzu Hg je selektivní generování, kdy je jedna ze specií rtuti ze vzorku selektivně vyextrahována a následně je v extraktu stanovena pomocí VSG-AAS. Tento přístup byl v práci dále rozvíjen na vzorcích lidských vlasů. Methylrtuť byla selektivně extrahována 2 mol dm^{-3} HCl, což bylo prokázáno pomocí HPLC-ICP-MS. Celkový obsah Hg byl stanoven pomocí AMA-254. Byly srovnány čtyři metody stanovení methylrtuti v extraktu: AMA-254, VSG-AAS, ICP-MS a HPLC-ICP-MS.

Ve všech případech bylo dosaženo dobré shody s certifikovanými hodnotami materiálu IAEA-086. Reálné vzorky vlasů obsahovaly kolem 70 % methylrtuti.

6 Použitá literatura

[1] Mercury, chemical element : The Editors of Encyclopaedia Britannica.

Dostupné z URL <<https://www.britannica.com/science/mercury-chemical-element> >
(14.11.2019)

[2] Greenwood, N. N., Earnshaw, A. Chemistry of the Elements, England, Pergamo Press Plc, 1993

[3] Kafka,Z.; Punčochářová, J. Těžké kovy v přírodě a jejich toxicita. Chemické listy, 96 (7), 611–617; 2002.

[4] Mercury- Hg.

Dostupné z URL< <https://www.lenntech.com/periodic/elements/hg.htm>> (20.11.2019)

[5] Rybínová, M.; Červený, V.; Hraníček, J.; Rychlovský, P. UV-Fotochemické Generování Těkavých Sloučenin pro Potřeby Atomových Spektrometrických Metod. Chemické listy, 109 (12), 930–937; 2015.

[6] Syversen, T.; Kaur, P. The Toxicology of Mercury and Its Compounds. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, 26 (4), 215–226; 2012.

[7] World Health Organization: Elemental mercury and inorganic mercury compounds: human health aspects, Geneva (2003)

[8] Risher, J.F.; Murray, H.E; Prince, G.R. Organic mercury compounds: human exposure and its relevance to public health. Toxicology and Industrial Health, 18, 109-160; 2002

[9] Potravní pyramida ryb.

Dostupné z URL: <<https://www.flickr.com/photos/121935927@N06/13578787885>] >
(10.12.2019)

- [10] Tseng, C. M.; Diego, A. de; Pinaly, H.; Amouroux, D.; Donard, O. F. X. Cryofocusing Coupled to Atomic Absorption Spectrometry for Rapid and Simple Mercury Speciation in Environmental Matrices. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 13 (8), 755–764; 1998.
- [11] Morita, M.; Yoshinaga, J.; Edmonds, J.S. The determination of mercury species in environmental and biological samples. *Pure and Applied Chemistry*, 70, 1585-1615, 1998
- [12] Kvestad, I.; Vabø, S.; Kjellevold, M.; Nøstbakken, O. J.; Kolden-Midtbø, L.; Hysing, M.; Markhus, M.W.; Madsen, L.; Handeland, K.; Graff, I.E.; Lie, O.; Frøyland, L.; Stormark, K.J.; Dahl, L.; Øyen, J. Fatty fish, hair mercury and cognitive function in Norwegian preschool children: Results from the randomized controlled trial FINS-KIDS, *Environmental International*, 121, 1098-1105; (2018)
- [13] Gochfeld, M.: Cases of mercury exposure, bioavailability, and absorption, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **56**, 174 - 179 (2003)
- [14] Minamata Disease Municipal Museum. Minamata Disease- Its history and lessons. Minamata City. Minamata City Planning division, 2007
- [15] Bakir, F.; Rustam, H.; Al-Damluji, S.F.; Shihristani, H.; Tikriti, S.: Clinical and epidemiological aspects of methylmercury poisoning. *Postgraduate Medical Journal*, 56, 1-10 (1980)
- [16] Takizawa Y.: Mercury-contaminated grain in Iraq. *Environmental toxicology and human health- Vol.1*. Oxford, United Kingdom. Eolss Publishers Co. Ltd., 2009
- [17] World Health Organization: Children's exposure to mercury compounds, Geneva; 2010
- [18] Fernández, D.R.; Vásquez, A.C.; Ocando, A.M.; Bello, S.C.; Rodríguez, M.C.; Granadillo, V.A. Human hair as indicator for mercury exposure evaluated by cold vapor atomic absorption spectrometry, *Atomic spectrometry*, 29, 224-229 (2008)

- [19] Suzuki, T.; Akagi, H.; Arimuka, K.; Ando, T.; Sakamoto, M.; Satoh, H.; Naganuma, A.; Futatsuka, M.; Matsuyama, A. Mercury analysis manual, Ministry of the Environment, Japan, 2004 Dostupné z URL <[http://nimd.env.go.jp/kenkyu/docs/march_mercury_analysis_manual\(e\).pdf](http://nimd.env.go.jp/kenkyu/docs/march_mercury_analysis_manual(e).pdf)> (30.12.2019)
- [20] Morita, M.; Yoshinaga, J.; Edmonds, J.S. The determination of mercury species in environmental and biological samples. *Pure and Applied Chemistry*, 70, 1585-1615, 1998
- [21] Gochfeld, M.; Cases of mercury exposure, bioavailability, and absorption. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 56, 174-179; 2003.
- [22] Rebelo, A.; Pinto, E.; Silva, V. M.; Almeida A.A.: Chemical safety of children's play paints: Focus on selected heavy metals. *Microchemical Journal* 118, 203- 210 (2015)
- [23] Dědina, J. Generation of Volatile Compounds for Analytical Atomic Spectroscopy. In *Encyclopedia of Analytical Chemistry*; American Cancer Society; 2010.
- [24] Černohorský, T.; Červený, V.; Dočekal, B.; Komárek, J.; Kratzer, J.; Spěváčková, V.; Sysalová, J. *Atomová Absorpční Spektrometrie: Kurz AAS 1; Spektroskopická společnost Jana Marka Marci a Vysoká škola chemicko-technologická*; 2015.
- [25] Qvarnstrom, J. On the reliability of methods for the speciation of mercury based on chromatographic separation coupled to atomic spectrometric detection. Dissertation, Sweden, 2003, Umea University, Department of Chemistry
- [26] AMA 254, Advanced mercury analyser. Návod na obsluhu; Altec s.r.o., Praha; 2010
- [27] Mihaljevič, M.; Strnad, L.; Šebek, O. Využití hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem v geochemii. *Chemické listy*, 98, 123-130; 2004.

- [28] Němcová, I.; Čermáková, L.; Rychlovský, P.: Spektrometrické analytické metody I. Praha, Karolinum 2004.
- [29] Becker, S.J. Inorganic mass spektrometry. Principles and applications.; England, John Wiley. & Sons Ltd 2007
- [30] Šebek, O.; Mihaljevič, M.; Strnad, L.; Rychlovský, P.; Ettler, V.; Rohovec, J; Řanda, Z.; Grygar, T.; Příkryl, R. Moderní analytické metody v geologii. Praha, Vysoká škola chemicko-technologická, 2008
- [31] 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.
- [32] Rydberg, J.,Cox, M., Musikas, C.; Choppin,G. Solvent extraction principles and practice. New York: Marcel Dekker, 2004, 750 p. ISBN 08-247-5063-2.
- [33] Linhart, O.; Kolorosová-Mrázová, A.; Kratzer, J.; Hraníček, J.; Červený, V. Mercury speciation in fish by high-performance liquid chromatography (HPLC) and post-column ultraviolet (UV)-photochemical vapor generation (PVG): Comparison of conventional line-source and high-resolution continuum source (HR-CS) atomic absorption spektrometry (AAS), Analytical Letters, 52, 613-632 (2019)
- [34] Migašová, M.; Schrenková, V.; Matoušek, T.; Žídek, R.; Petry-Podgorská, I.; Kratzer, J. Speciation analysis of mercury by volatile species generation from HCl and TRIS buffer media: quantification of generation efficiency and characterization of severe changes in speciation information due to de-alkylation. Zasláno do „Analytical Chemistry“
- [35] Han, C.; Zheng, C.; Wang, J.; Cheng, G.; Lv, Y.; Hou, X. Photo-Induced Cold Vapor Generation with Low Molecular Weight Alcohol, Aldehyde, or Carboxylic Acid for Atomic Fluorescence Spectrometric Determination of Mercury. Analytical and bioanalytical chemistry, 388, 825–830; 2007.

- [36] Svoboda, M. Studium generování hydridů pro účely speciální analýzy arsenu spojené s AAS a AFS detekcí, Disertační práce, Praha, 2012, Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta
- [37] Matoušek, T.; Dědina, J.; Selecká, A. Multiple microflame quartz tube atomizer-further development towards the ideal hydride atomizer for atomic absorption spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B*, 57, 451-462 (2002)
- [38] Žídek, R. Speciální analýza rtuti v kapalných a plynných vzorcích, Diplomová práce, Praha, 2019, Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta
- [39] Schrenková, V. Speciální analýza rtuti: postkolonové generování hydridů a studium jejich dealkylací pomocí kryogenní pasti, Studentská vědecká konference, Praha, 2019, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Fakulta chemicko-inženýrská
- [40] Čejchanová, M.; Spěváčková, V.; Kratzer, K.; Wranová, K.; Spěváček, V.; Beneš, B. Determination of mercury and methylmercury in hair of the czech children's population. *Biol Trace Elem Res*, 121, 92-105 (2008)
- [41] Černá M. a kol., Systém monitorování zdravotního stavu obyvatelstva ve vztahu k životnímu prostředí. Zdravotní důsledky expozice lidského organismu toxickým látkám ze zevního prostředí (biologický monitoring). Odborná zpráva za rok 2014. Státní zdravotní ústav Praha, 2015. Dostupnéz http://www.szu.cz/uploads/documents/chzp/biomonitoring/Odborna_biolmon_2014_def.pdf