UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Přírodovědecká fakulta
Katedra analytické chemie

SPECIAČNÍ ANALÝZA TOXIKOLOGICKY VÝZNAMNÝCH FOREM ARSENU V POLÉTAVÉM PRACHU S DETEKCÍ QF-AAS

The speciation analysis of the toxicological important forms of the arsenic in urban particulate matter samples with the detection QF-AAS

Diplomová práce
studijního oboru Analytická chemie

Praha 2010 Petr Jelínek

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

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval samostatně, pod vedením školitele Doc. RNDr. Petra Rychlovského, CSc. a že jsem všechny použité prameny řádně citoval.

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

V Praze dne 1. září 2010. …….

Petr Jelínek

Poděkování

Můj dík patří především mému školiteli Doc. RNDr. Petru Rychlovskému, CSc., za ochotné umožnění vykonání diplomové práce v jeho laboratoři a za rady poskytnuté nejen při vlastní laboratorní práci, ale i při jejím převádění do písemné podoby.

Dále bych velmi rád poděkoval Mgr. Václavu Červenému, Ph.D., za pomoc při řešení všemožných potíží v laboratoři a paní Doc. Ing. Jiřině Szákové, CSc., z České zemědělské univerzity v Praze za poskytnutí reálných vzorků pro analýzu. Za laskavou spolupráci při centrifugaci těchto vzorků děkuji katedře biochemie PřF UK a zvláště panu Prof. RNDr. Petru Hodkovi, CSc.

Chtěl bych také poděkovat své rodině za finanční zázemí během celého studia, dále Kpt. Ing. Zdeňkovi Mikulkovi za motivaci pro studium přírodních věd na UK a Zuzce Skoumalové za pochopení, že takové studium vyžaduje čas.

Panu Doc. RNDr. Juraji Dianovi, CSc., z MFF UK jsem vděčný za první podnět ke studiu analytické chemie a za nadšení pro spektrometrii.

ABSTRAKT

Tématem této diplomové práce byla speciační analýza toxikologicky významných forem arsenu v polétavém prachu. Detekční metoda používaná v této práci byla atomová absorpční spektrometrie s křemenným atomizátorem.

Octová kyselina, octan amonný, hydroxylamin, hydroxid draselný a uhličitan sodný jsou doporučovaná vyluhovací činidla pro extrakci kovů z polétavého prachu.

Výsledky předkládané práce jsou následující:

Kyselá extrakční činidla nelze doporučit pro speciační analýzu arsenu, protože tato činidla snižují citlivost stanovení As^{3+} i As^{5+} a poškozují křemenný atomizátor. Alkalická extrakční činidla nesnižují citlivost stanovení As^{3+} a neničí atomizátor, ale snižují citlivost stanovení As^{5+}. Doporučovaná činidla jsou tedy pro extrakci kovů z polétavého prachu pro speciační analýzu nepoužitelná.

Klíčová slova: speciační analýza, arsen, atomová absorpční spektrometrie, generování hydridů, extrakce

ABSTRACT

The topic of this diploma thesis was the speciation analysis of the toxicological important forms of the arsenic in urban particulate matter samples. The detection technique used in this work was atomic absorption spectrometry with quartz atomizer.

Acetic acid, ammonium acetate, hydroxylamine, potassium hydroxide and sodium carbonate are recommended leaching agents for extraction of metals from urban particulate matter samples.

Results of the presenting work are following:

Acidic extraction reagents can be not recommended for the speciation analysis of the arsenic, because these reagents lower sensitivity of the determination of As^{3+} and As^{5+} too and destroy the quartz atomizer. Alkaline extraction reagents don't lower sensitivity of the determination of As^{3+} and these reagents don't destroy the atomizer, but lower sensitivity of the determination of As^{5+} was obtained. Recommended reagents aren't useful for extraction of the metals from urban particulate matter samples for the speciation analysis.

Keywords: speciation analysis, arsenic, atomic absorption spectrometry, hydride generation, extraction

OBSAH

	Abstrakt, klíčová slova	4
	Abstract, keywords	5
	Obsah	6
	Seznam zkratek a symbolů	8
1	CÍL PRÁCE	10
2	TEORETICKÝ ÚVOD	11
2.1	**Arsen a jeho sloučeniny**	11
2.1.1	Toxicita sloučenin arsenu	11
2.1.2	Výskyt a použití arsenu	13
2.2	**Atomová absorpční spektrometrie**	16
2.2.1	Fyzikální základ atomové absorpční spektrometrie	16
2.2.2	Selektivní generování AsH_3 pro atomovou absorpční spektrometrii	21
2.3	**Extrakce arsenu z reálných vzorků**	24
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	26
3.1	**Chemikálie**	26
3.2	**Přístroje a další vybavení**	27
3.3	**Příprava roztoků**	28
3.4	**Metody zpracování dat**	29
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	31
4.1	**Optimalizace podmínek měření**	31
4.1.1	Optimalizace průtokové rychlosti nosného plynu	31
4.1.2	Optimalizace průtokové rychlosti borohydridu	32
4.1.3	Kalibrační křivka As^{3+}	33
4.1.4	Optimalizace předredukce As^{5+} na As^{3+}	34
4.1.4.1	Předredukce L-cysteinem za zvýšené teploty	35
4.1.4.2	Předredukce L-cysteinem za laboratorní teploty	38
4.1.4.3	Předredukce silně kyselým prostředím za laboratorní teploty	40
4.1.4.4	Předredukce L-cysteinem a zároveň silně kyselým prostředím za laboratorní teploty	41
4.1.4.5	Předredukce L-cysteinem a zároveň kyselým prostředím za zvýšené teploty	41
4.1.4.6	Vyhodnocení optimalizačních experimentů předredukce As^{5+} na As^{3+}	41

4.2 Kontrola čistoty a stability zásobních roztoků 42
4.2.1 Kontrola čistoty a stability zásobního roztoku 1000 mg dm^{-3} As^{3+} v 0,5 M HNO_3 42
4.2.2 Kontrola čistoty zásobního roztoku 1000 mg dm^{-3} As^{3+} v 0,5 M HCl 45
4.2.3 Kontrola čistoty a stability zásobního roztoku 1000 mg dm^{-3} As^{5+} v 0,5 M HNO_3 45
4.3 Kontrola činnosti TRIS pufru v extrakčních činidlech 46
4.4 Vliv extrakčních činidel na stanovení arsenu 46
4.4.1 Vliv extrakčních činidel na stanovení As^{3+} 47
4.4.2 Vliv alkalických extrakčních činidel na stanovení As^{5+} 55
4.4.3 Shrnutí vlivu extrakčních činidel na speciační analýzu arsenu 57
4.5 Rozdíly v absorbanci stejných standardů 58
4.6 Speciační analýza arsenu v reálných vzorcích 59
4.6.1 Kalibrace a analytické parametry pro stanovení obsahu As^{3+} 59
4.6.2 Kalibrace a analytické parametry pro stanovení obsahu As^{5+} 61
4.6.3 Speciační analýza arsenu ve vzorcích polétavého prachu a půdy 64

5 ZÁVĚR 66

Literatura 67

SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ

a	směrnice lineární regrese
A	absorbance
A_{exp}	absorbance změřená experimentálně
AAS	atomová absorpční spektrometrie
°C	stupeň Celsia
c	koncentrace
cm	centimetr
DDT	dichlordifenyltrichlorethan
dm	decimetr
E	energie
exp	exponenciální funkce
FeAsS	arzenopyrit
g	gram
h	Planckova konstanta
H_3AsO_4	kyselina arseničná
HCL	výbojka s dutou katodou
HG-AAS	generování hydridů pro atomovou absorpční spektrometrii
i.d.	vnitřní průměr
ICP-AES	atomová emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem
ICP-MS	hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem
J	Joule
l	litr
l	tloušťka absorpčního prostředí
LD50	smrtelná dávka pro 50% zvířat určeného druhu po její podání
LOD	limit detekce
LOQ	limit stanovitelnosti
m	metr
M	molarita
mA	miliamper
mg	miligram

min	minuta
mm	milimetr
mol	jednotka látkového množství, mol
N	počet volných atomů
nm	nanometr
O	opakovatelnost
p.a.	pro analysi (lat.) – označení chemikálií k analytickým účelům
Q	průtoková rychlost
QF-AAS	atomová absorpční spektrometrie s křemenným atomizátorem
R	korelační koeficient
s	sekunda
SH-	thiolová skupina
$s_{x/y}$	směrodatná odchylka lineární regrese
t	čas
T	teplota
TRIS	tris(hydroxymethyl)-aminomethan – hydrochlorid (1:1)
$\bar{x}$	střední hodnota
Δ	rozdíl
κ_ν	atomový absorpční koeficient pro fotony o dané frekvenci ν
λ	vlnová délka
μg	mikrogram
ν	frekvence elektromagnetického záření
φ	Tok rozptýleného záření
Φ	Tok záření propuštěného analytem
Φ_0	Tok záření vstupujícího do prostředí volných atomů analytu

1 CÍL PRÁCE

V přírodním prostředí i v životním prostředí člověka se dnes vlivem lidské činnosti nachází sloučeniny arsenu v množství větším, než v předindustriálním období. Tyto sloučeniny jsou často velmi toxické, a tak musí být vyvíjena snaha o minimalizaci jejich úniku do životního prostředí a o likvidaci těch, které se do něj již dostaly. Těmto aktivitám nutně musí předcházet jejich vyhledání v přírodě a následné stanovení v odebraných biologických vzorcích i vzorcích životního prostředí. Analytická chemie tak hraje nezastupitelnou roli v ochraně člověka i přírody před nebezpečím arsenu. Součástí zpracování vzorků analytickým chemikem je i extrakce sloučenin arsenu z pevných přírodních materiálů do roztoku, aby v nich mohlo být posléze provedeno stanovení arsenu. Pro extrakci je možné použít pouze jedno činidlo, nebo je možné provést postupnou extrakci několika činidly, tzv. sekvenční extrakci. Běžně používanými extrakčními činidly pro tyto účely jsou octová kyselina, hydroxylamin, octan amonný, hydroxid draselný a uhličitan sodný. Dokud bylo prováděno stanovení celkového množství arsenu, nezáleželo na tom, zda tato činidla při extrakci nějakým způsobem ovlivní oxidační stav arsenu. Již dávno se však ví, že toxicita jeho sloučenin je závislá právě i na jeho oxidačním čísle. Z tohoto důvodu je vhodnější provádět v reálných vzorcích namísto stanovení celkového arsenu stanovení koncentrace jeho jednotlivých specií. A pro potřeby takového stanovení je nutné vědět, zda uvedená extrakční činidla neovlivňují oxidační stav arsenu.

Zjistit, zda je stabilita obou oxidačních stupňů ovlivněna jednotlivými extrakčními činidly, je cílem předkládané diplomové práce. Činidla, u kterých nebude zjištěno ovlivnění oxidačního stavu arsenu, budou dále použita pro extrakci arsenu z prachových částic a pro stanovení As^{3+} a As^{5+} v těchto extraktech metodou selektivního generování hydridů pro atomovou absorpční spektrometrii, která je pro stanovení kovů běžně používaná.

2 TEORETICKÝ ÚVOD

2.1 Arsen a jeho sloučeniny

2.1.1 Toxicita sloučenin arsenu

Arsen je prvek velmi populární i mezi laiky. Příčinou jeho slávy je ovšem jedna ryze záporná vlastnost. Je to prvek, jehož rozpustné sloučeniny jsou vesměs jedovaté. Dle údajů světové zdravotnické organizace World Health Organization z roku 1981 představuje arsen spolu se rtutí, kadmiem a olovem skupinu nejzávažnějších rizikových prvků, ohrožujících životní prostředí; přičemž hlavním zdrojem jejich kontaminace je lidská činnost [1].

- Nejtoxičtější As_2O_3 zvaný otrušík má hodnotu LD50 při podání myším orálně 31,5 mg/kg, nitrožilně 10,7 mg/kg a podkožně dokonce jen 9,8 mg/kg. Hodnota LD50 při orálním podání krysám je 14,6 mg/kg a králíkům 20,19 mg/kg [2]. Nejnižší smrtelné dávky pro dospělého člověka jsou 60-80 mg, průměrné 200-300 mg [3, s. 81].
- As_2O_5 má hodnotu LD50 při orálním podání myším 55 mg/kg a krysám jen 8 mg/kg [2].
- H_3AsO_4 má hodnotu LD50 při orálním podání krysám 48 mg/kg [2].

Z uvedených dat vyplývá, že především anorganické sloučeniny arsenu mohou být velmi nebezpečné. Je-li lidský organismus vystavován koncentraci arsenu nevedoucí ke smrti, arsen se v lidském organismu hromadí v játrech a posléze v ledvinách, čímž je dáno jeho vyloučení močí [3, s. 78]. Při vdechování se arsen hromadí v plících [1]. Dále se hromadí v kostech a malé množství arsenu se nachází také v mozku, srdci a děloze. Proniká placentou a nachází se i v mateřském mléku. Nízké koncentrace se nachází obvykle i ve svalstvu, přičemž celkové množství z pozřené dávky, jež se ve svalstvu nahromadí, je vzhledem k podílu svalstva na hmotnosti člověka značné. K výraznému hromadění arsenu dochází v kůži [3, s. 78], vlasech a nehtech [1]. Je to dáno afinitou arsenu k SH-skupinám, na které je bohatá stavební bílkovina keratin nacházející se především v těchto částech těla [3, s. 78] [4a].

Vzhledem k hromadění arsenu komplexně v celém těle je pochopitelné, že chronická otrava arsenem se na člověku projevuje mnoha způsoby. Dochází k poškození zraku a sluchu, ke snížení potence, tvorbě ekzémů a bílých, příčných proužků na nehtech. Sloučeniny arsenu jsou neurotoxické, intoxikovaný člověk může trpět bolestmi hlavy, spavostí, zmateností i ztrátou paměti. Další účinky arsenu jsou hematologické, dochází k anémii, mutagenní, teratogenní a karcinogenní. U poškozeného může nastat rakovina kůže, jater, plic [3, s. 81-83, 86-87] či močového měchýře [5]. Vzhledem k hromadění arsenu právě v kůži, plících a játrech a vzhledem k jeho vylučování močí to není překvapující.

Podstatná část arsenu je z těla vyloučena již zmíněnou močí [1] [3, s. 78]. Vyloučení stolicí tvoří z celkového vyloučení zpravidla méně než 10%. Toxičtější sloučeniny arsenu jsou vázány rychleji a pevněji a vylučovány pomaleji než méně toxické. Proto je arsen z těla vylučován až po biotransformaci, při které jsou toxičtější sloučeniny postupně methylovány až na výrazně méně toxickou kyselinu dimethylarseničnou, která tvoří hlavní podíl arsenu vyloučeného močí [3, s. 78-79]. Metabolismus těchto přeměn postupuje od kyseliny arseničné až po kyselinu dimethylarseničnou v následujícím pořadí [6]:

- Kyselina arseničná
- Kyselina arsenitá
- Kyselina monomethylarseničná
- Kyselina monomethylarsenitá
- Kyselina dimethylarseničná

Vzhledem k celkové nebezpečnosti sloučenin arsenu, především k jeho karcinogenním vlastnostem, neexistuje žádná bezpečná prahová koncentrace tohoto prvku a musíme se snažit snižovat antropogenní vstup arsenu do životního prostředí i do lidského organismu na minimum [1]. V souvislosti s touto potřebou se jako alarmující jeví zprávy, že desítky milionů lidí pijí vodu tímto prvkem značně kontaminovanou. Především v Západním Bengálsku a v přilehlé oblasti Bangladéše [5] [7], dále v Mexiku, Chile a na Tchaj-wanu [5]. V Evropské Unii je snaha spotřebitele chránit, a tak není divu, že Evropská Unie požaduje po členských státech, aby stanovily pro

pitnou [8] a přírodní minerální vodu [9] maximální koncentraci celkového arsenu 10 μg dm^{-3}. Česká republika těmto požadavkům vyhovuje, protože nejvyšší mezní hodnota arsenu v balených přírodních minerálních vodách [10] i v pitné vodě [11] je u nás právě 10 μg dm^{-3}. V balených kojeneckých a pramenitých vodách je u nás nejvyšší mezní hodnota arsenu dokonce jen 5 μg dm^{-3} [10].

2.1.2 Výskyt a použití arsenu

World Health Organization rozlišuje celkem 6 základních skupin sloučenin arsenu, které se na Zemi vyskytují [1]:

1. anorganické sloučeniny rozpustné ve vodě (rozpustné arsenité a arseničné soli a oxidy);
2. anorganické sloučeniny ve vodě málo rozpustné nebo nerozpustné (různé arsenité a arseničné soli, arsenidy, selenid a sulfid arsenitý);
3. organické sloučeniny arsenu (většinou methylované sloučeniny arsenu přírodního a umělého původu, např. pesticidy);
4. organické sloučeniny arsenu mořských biotopů (např. arsenobetain);
5. organické sloučeniny arsenu používané jako přísada do potravin (např. kyselina arsanilová);
6. plynné anorganické a organické sloučeniny arsenu (např. arsan);

S výskytem arsenu na Zemi je spojen jeden pozoruhodný paradox. Na jedné straně je arsen prvek velmi vzácný, tvoří méně než 0,0002 % litosférické hmoty, což arsen kvalifikuje jako typický stopový prvek, na druhé straně na arsen velmi často narážíme, a i pokud dbáme na životní prostředí, máme s ním velké problémy. To je dáno hlavně jeho těsným vztahem k některým nerostům obsahujícím síru. Společně s ní se arsen hojně vyskytuje na určitých typech rudních ložisek obsahujících hlavně velmi užitečné barevné a vzácné kovy [12].

V přírodě se arsen vyskytuje nejvíce ve formě sulfidu arzenopyritu, FeAsS, a doprovází sulfidy Pb, Ag, Cu, Ni, Sb, Co, Fe [1] [3, s. 77]. Arsen také doprovází rudy obsahující Au, Sn a U [13]. Vysoké koncentrace arsenu jsou bohužel také v málo

kvalitních sirnatých druzích uhlí [12], především v uhlí hnědém [1] [3, s. 85]. Soustředění arsenu do těch přírodních zdrojů, které využívá člověk, nutně vede k tomu, že antropogenní činností se do životního prostředí uvolňuje velké množství arsenu.

Přirozené vstupy arsenu do ovzduší způsobují následující činitelé, v pořadí podle svého významu: vulkanická činnost, polétavý prach, těkavé sloučeniny arsenu mořského původu, oceánský sprej (vodní tříšť), těkavé sloučeniny suchozemského původu, biogenní tuhé částice a lesní požáry. Vzhledem k výše uvedenému ovšem v globálním měřítku antropogenní emise arsenu nad jeho přirozenými vstupy do ovzduší převyšují, a to 1,6 – 2,8x.

V České republice bude toto číslo kvůli těžkému průmyslu nepochybně mnohem větší [12]. Během 12. – 20. století u nás antropogenní kontaminace životního prostředí z těžby a hutnění primárních rud Ag, Au, Sn, W a Pb dosáhla přibližně 1 milionu tun arsenu. Novodobou hutní činností se na Příbramsku dostalo do ovzduší téměř 100 000 tun arsenu, což ročně činí 300 – 400 tun. V důsledku toho je arsenem kontaminovaná půda z údolí tamější řeky Litávky [13], v jejímž vzorku bude provedena v rámci této práce speciační analýza arsenu.

Tab. 2.1 Antropogenní zdroje arsenu v různých složkách životního prostředí v tisících tun za rok, převzato z [5]

Odvětví lidské činnosti	atmosféra	půda	Voda
metalurgie mědi, niklu	14,3	67,5	28,4
spalování uhlí	6,2	35,1	-
chemikálie v zemědělství a lesnictví	3,5	4,6	-
Ocelářství	0,06	5,9	-
vypalování lesů a pastvin	3,0	-	-
výroba cementu	2,1	-	-

Z tab. 2.1 vyplývá, že lidstvo ročně do přírody uvolní přibližně 170 700 tun arsenu. Nemalá část tohoto obrovského množství je ve formě nejtoxičtějšího As_2O_3. Např. převážná část arsenu v emisích tepelných elektráren je vázána ve formě As_2O_3 adsorbovaného na povrchu nejjemnějších frakcí popílku [3, s. 85]. Zřejmě větší část arsenu je ovšem uvolněna jako méně toxická H_3AsO_4. To je dáno tím, že arzenopyrit, nejběžnější forma arsenu nacházející se v rudních ložiskách člověkem těžených kovů, se poté, co se dostane do styku s atmosférou, začíná poměrně rychle rozkládat a oxidovat.

Arsen je pak v přírodní povrchové vodě přítomen zprvu ve formě nedisociované kyseliny arzenité, která se s poločasem reakce v řádu hodin až dní oxiduje právě na ionty kyseliny arzeničné [12] [14].

Jak uvádí 3. řádek tab. 2.1, lidstvo arsen nevypouští do přírody jen při zpracování jiných produktů, ve kterých se arsen nachází pouze jako nečistota, ale i přímo vědomým využíváním arsenu. Některé chemikálie arsen obsahují záměrně. Před vyvinutím DDT a jiných, z hlediska akutní toxicity méně nebezpečných preparátů než jsou sloučeniny arsenu, byl arsen obsažen v celé řadě pesticidů. Dále byl přítomen v bojových chemických látkách, např. Lewisitu a v herbicidech používaných mj. i Američany ve válce ve Vietnamu v roli defoliantů. Dodnes je arsen součástí konzervačních prostředků na dřevo a kůže, otrávených vnadidel či jedů proti kobylkám. Používá se pro veterinární účely, ve farmaceutickém průmyslu, ve sklářství, při výrobě pigmentů, protiparazitálních lázní či při preparaci loveckých trofejí. Kovový arsen se používá při výrobě slitin a přidává se do olova na výrobu broků [3, s. 77-78, 81]. Galium arsenidový laser, galium aluminium arsenidový laser a indium galium arsenid fosfidový laser jsou dnes masově vyráběné a rozšířené polovodičové lasery, protože jsou součástí každého CD přehrávače [15, s. 110].

Vzhledem k výskytu arsenu napříč tolika odvětvími je pochopitelné, že Vláda České republiky vydala nařízení [16], ve kterém stanovuje mj. i přípustné koncentrace arsenu pro odpadní vody vypouštěné z různých průmyslových odvětví. V případě výroby a zpracování skla jde o 1 mg dm^{-3}. V případě těžby a zpracování neuranových rud, povrchové úpravy kovů a plastů a také v případě elektrotechnické výroby jde o 0,5 mg dm^{-3}. U spaloven odpadů už jde pouze o 0,15 mg dm^{-3}. Stejné nařízení dále stanovuje hodnotu přípustného znečištění povrchových vod arsenem jako 20 μg dm^{-3} a přípustnou koncentraci arsenu v povrchových vodách, které jsou využívány nebo u kterých se předpokládá jejich využití jako zdroje pitné vody, pouze 10 μg dm^{-3}. Velikost této hodnoty je již stejná, jako nejvyšší mezní hodnota arsenu v pitné vodě (viz oddíl 2.1.2).

2.2 Atomová absorpční spektrometrie

Atomová absorpční spektrometrie je velice citlivá analytická metoda využívající absorpce elektromagnetického záření volnými atomy prvků. Je vhodná pro stanovení kovů a polokovů v koncentracích od jednotek μg dm^{-3} až po několik desetin g dm^{-3} [17, s. 7]. V uspořádání pro kolekci vymrazováním je její LOD dokonce v jednotkách ng dm^{-3} [18, s. 148].

2.2.1 Fyzikální základ atomové absorpční spektrometrie

Elektrony se v elektronových obalech atomů mohou nacházet jen v určitých energetických stavech, na konkrétních energetických hladinách s diskrétními hodnotami energie. Mezi jednotlivými hladinami energie atomů stejného prvku jsou odpovídající energetické rozdíly, mající tedy také diskrétní hodnoty. Pro každý prvek jsou energetické hladiny všech jeho elektronů specifické, čímž je dáno, že jsou pro něj specifické i energetické rozdíly mezi jednotlivými hladinami. Vnitřní elektrony, tedy elektrony nacházející se blíže atomovému jádru, mají nižší energii, než elektrony vnější, nacházející se dál od jádra. Přesněji řečeno, systém „atomové jádro – vnitřní elektron“ má nižší potenciálovou energii než systém „atomové jádro – vnější elektron“. Nicméně, jak vyplývá ze Schrödingerovy rovnice, mezi vnitřními elektronovými hladinami je větší energetická vzdálenost než mezi hladinami vnějšími [19, s. 1066-1067].

Elektron může ze své hladiny přejít na hladinu energetičtější, tedy dál od jádra, tím způsobem, že z okolí přijme energii odpovídající rozdílu těchto dvou hladin. Přijatou energií může být např. i kvantum elektromagnetického záření, foton [19, s. 1066-1067]. Na další, energeticky ještě bohatší a od jádra ještě vzdálenější hladinu energie, může tento elektron přejít pohlcením dalšího fotonu, jehož energie tentokrát musí odpovídat rozdílu těchto dvou hladin. Vzhledem k postupnému vzájemnému energetickému sbližování hladin směrem od jádra je tato energie nižší, než energie prvního fotonu. V tomto teoretickém sledu absorpce fotonů elektronem lze pokračovat až do úplného odtržení elektronu od atomu. Celkové množství energie, které je třeba elektronu dodat, aby byl odtržen od atomu, se nazývá ionizační energie, protože po odtržení elektronu od atomu je atom ionizován a stává se iontem [17, s. 7].

Lze vykonat i proces opačný, při němž volný elektron část své energie odevzdává, např. vyzářením fotonu elektromagnetického záření. Vyzáří-li energie tolik, že jeho zbývající energie odpovídá energetickému stavu vnější elektronové hladiny, stává se součástí elektronového obalu příslušného atomu a nachází se na dané hladině. Při vyzáření dalšího fotonu, jehož energie tentokrát odpovídá rozdílu této hladiny a hladiny nižší, se elektron ocitne na této nižší hladině, tedy blíže k jádru. Na další, energeticky ještě nižší a k jádru ještě bližší hladinu energie, může tento elektron přejít emisí dalšího fotonu, jehož energie tentokrát musí odpovídat rozdílu těchto dvou hladin. Vzhledem k postupnému vzájemnému energetickému vzdalování hladin směrem k jádru je tato energie vyšší, než energie předešlého fotonu. V tomto teoretickém sledu emise fotonů elektronem lze pokračovat až na energeticky nejnižší hladinu, jež se nachází jádru nejblíže.

Přechod elektronu mezi jednotlivými hladinami je tedy spojen s přijetím či vyzářením energie. Je-li touto energií foton elektromagnetického záření [19, s. 1034], platí pro diskutovaný přechod známý Planckův vztah

$$\Delta E = \boldsymbol{h} \cdot \nu \tag{2.1}$$

kde ΔE je energetický rozdíl mezi těmito hladinami, ν je frekvence absorbovaného či emitovaného fotonu a $\boldsymbol{h}$ je Planckova konstanta, jejíž hodnota je $6{,}626\,068\,96 \cdot 10^{-34}$ J s [20].

Mezi vnitřními hladinami je větší rozdíl energie, tedy fotony absorbované či emitované elektrony kovů a polokovů při přechodech mezi vnitřními hladinami mají takovou frekvenci, která odpovídá fotonům rentgenového až ultrafialového záření. Mezi vnějšími hladinami je menší rozdíl energie, tedy fotony absorbované či emitované elektrony kovů a polokovů při přechodech mezi vnějšími hladinami mají takovou frekvenci, která odpovídá fotonům ultrafialového až viditelného záření [17, s. 7-8].

Bylo uvedeno, že pro každý prvek jsou energetické rozdíly mezi jednotlivými hladinami specifické, což samozřejmě platí i pro energetické rozdíly mezi vnějšími hladinami. Toho se využívá pro rozlišení prvků v metodě AAS, kdy jsou volné atomy analytu ozářeny fotony, jejichž energie je totožná s energií charakteristickou pro rozdíl vnějších hladin daného analytu. Tedy fotony ultrafialového až viditelného záření o

specifické hodnotě energie. Tím je zaručeno, že záření budou absorbovat pouze atomy stanovovaného analytu, protože jen mezi jejich vnějšími hladinami je příslušný energetický rozdíl. Nápadně to připomíná kvalitativní analýzu, avšak záměrně nebyl použit tento termín, ale pouze „rozlišení prvků“. V metodě AAS je díky uvedenému principu interakce záření pouze s analytem sice zajištěna, ale AAS se pro kvalitativní analýzu nepoužívá. A to proto, že již použitý zdroj záření je třeba zvolit podle toho, jaký prvek bude stanovován. Energetickým rozdílům vnějších hladin stanovovaného prvku musí odpovídat energie fotonů emitovaných použitým zdrojem záření. A vhodný zdroj záření musí být samozřejmě vybrán ještě před vlastní analýzou. Stanovit koncentraci analytu ve vzorku pak lze z úbytku použitého záření v prostředí volných atomů analytu a to z Lambertova – Beerova zákona

$$\Phi = \Phi_0 \cdot \exp(-\kappa_\nu \cdot N \cdot l) \tag{2.2}$$

kde Φ je tok záření propuštěného analytem do detektoru, Φ_0 je tok záření vstupujícího do prostředí volných atomů analytu, tedy tok záření emitovaného zdrojem záření, κ_ν je atomový absorpční koeficient (účinný průřez atomu pro absorpci v jednotkách plochy), ve kterém je index ν z důvodu platnosti dané hodnoty κ_ν jen pro absorpci fotonů o energii odpovídající frekvenci ν a N je počet volných atomů v prostředí o tloušťce l [17, s. 11].

Určit tloušťku absorpčního prostředí v metodě AAS, kde se plynný analyt nachází v otevřeném prostoru, je prakticky nemožné. Proto je AAS typická komparativní metoda [17, s. 12]. Nejprve je třeba změřit kalibrační křivku, což v tomto případě znamená závislost změřené absorbance volných atomů analytu v absorpčním prostředí na koncentraci analytu v roztoku, z něhož byl analyt do plynného skupenství volných atomů převeden. Tuto závislost pak lze využít pro stanovení koncentrace analytu v neznámém vzorku, aniž bychom znali hodnoty N a l vyskytující se ve vzorci (2.2), takže vzorec (2.2) s několika neznámými není pro výpočet koncentrace analytu ve vzorku nutné použít.

Významná výhoda metod atomové spektrometrie spočívá v tom, že zmíněný atomový absorpční koeficient má běžně o 3 až 4 řády vyšší hodnotu než molekulový absorpční koeficient. Molekula má nižší účinný průřez pro absorpci z toho důvodu, že

elektronová hustota je v ní soustředěna do chemické vazby a elektrony tedy nejsou pro prolétající fotony k dispozici po celé ploše průřezu molekulou stejně výhodně. Atomy, jejichž elektronová hustota není žádnou chemickou vazbou koncentrována do určité části orbitalu, mají nutně větší účinný průřez pro absorpci. Šlo by tedy jistě stanovit koncentraci molekul obsahujících arsen pomocí absorpce záření přímo těmito molekulami, ale stanovení této koncentrace pomocí absorpce záření volných atomů arsenu uvolněných z molekul analytu je výhodnější, protože díky vyššímu atomovému absorpčnímu koeficientu lze dosáhnout nižšího LOD, a to právě o ty 3 až 4 řády, o které je atomový absorpční koeficient vyšší než molekulový absorpční koeficient. Toto je hlavní důvod, proč se metody atomové spektrometrie včetně AAS vůbec používají, ač jsou experimentálně náročnější, neboť se v nich nepracuje pouze s roztoky, ale nutně i s plyny.

Významná nevýhoda AAS je nízký lineární dynamický rozsah, který zpravidla nepřesahuje 1 řád. Brzké zakřivení kalibrační závislosti je způsobeno více faktory, ale nejvýznamnější je zeslabení záření způsobené jinými činiteli, než absorpce záření atomy analytu [21, s. 20-23]. Záření může být zeslabeno především rozptylem světla na částečkách aerosolu, nevypařených pevných částicích nebo absorpcí molekul anorganických i organických látek ze vzorku [17, s. 23], což jsou všechno objekty, které mohou být proti vůli experimentátora proudem nosného plynu do atomizátoru zaneseny spolu s vlastními molekulami analytu. Žádoucí jsou na detektoru pouze fotony ze zdroje záření s energií rovnou rozdílu vnějších hladin, mezi nimiž k přechodu elektronu dochází a které nebyly atomy analytu absorbovány. Ovšem z důvodu rozptylu světla, nedokonalosti monochromátoru i z dalších důvodů, se v optické části spektrometru vyskytují a na detektor dopadají i jiné fotony, které zkreslují měření. Nadále o nich bude psáno jen jako o rozptýleném záření. Toto rozptýlené záření při dopadu na detektor způsobuje zvýšení elektrického signálu, tedy snížení absorbance při dané koncentraci analytu a v důsledku toho se kalibrační závislost zakřivuje směrem k ose x. Ze vztahu (2.2) lze po zlogaritmování a dalších úpravách získat známý lineární tvar Lambertova – Beerova zákona

$$-\log\frac{\Phi}{\Phi_0} = \boldsymbol{k}\cdot c \tag{2.3}$$

kde záporný dekadický logaritmus Φ/Φ_0 je absorbance, kterou bychom měli teoreticky změřit na základě platnosti Lambertova – Beerova zákona, *c* je koncentrace analytu v roztoku (úměrná počtu volných atomů N z rovnice (2.2), které se nacházejí v absorpčním prostředí [18, s. 15]) a ***k*** je konstanta zahrnující ostatní prvky rovnice (2.2). Z rovnice (2.3) lze vyjádřit Φ jako:

$$\Phi = \Phi_0 \cdot 10^{-k \cdot c} \tag{2.4}$$

V důsledku dopadu rozptýleného záření na detektor je ovšem experimentálně naměřená hodnota absorbance odlišná od teoretické absorbance z Lambertova – Beerova zákona. Velikost této experimentální absorbance A_{exp} vyjadřuje rovnice [21, s. 22] (2.5):

$$A_{\text{exp}} = -\log \frac{\Phi + \varphi}{\Phi_0 + \varphi} \tag{2.5}$$

kde φ je tok rozptýleného záření dopadající na detektor a ostatní veličiny byly vysvětleny výše. Zcela jistě můžeme zanedbat φ oproti Φ_0 [21, s. 22]. Po tomto zjednodušení a dosazení za Φ ze vztahu (2.4) do vztahu (2.5) získáváme:

$$A_{\text{exp}} = -\log\left(10^{-k \cdot c} + \frac{\varphi}{\Phi_0}\right) \tag{2.6}$$

kde všechny symboly byly vysvětleny výše. Takto lze tedy spočítat hodnotu absorbance, která je při experimentu naměřena. Vzhledem k tomu, že argumentem logaritmu je dvojčlen a druhý člen není nijak závislý na koncentraci analytu, nutně musí být závislost A_{exp} na koncentraci analytu od jisté hodnoty této koncentrace zakřivená směrem k ose x. Kdy k tomuto zakřivení dojde, záleží podle vztahu (2.6) na velikosti poměru φ/Φ_0. Čím je tento poměr vyšší, pro tím nižší koncentraci analytu ve vzorku se kalibrační závislost začne zakřivovat. Zvýšení lineárního dynamického rozsahu v metodě AAS je tedy možné buď použitím kvalitnější instrumentace, především optické části spektrometru nebo použitím takového separátoru fází a roztoků, ze kterých nejsou kromě plynného analytu do atomizátoru unášeny pokud možno žádné jiné

objekty, především žádný aerosol ani pevné částečky hmoty. Značné zakřivení kalibračních závislostí v důsledku používání pro AAS nevhodných roztoků bylo pozorováno i při experimentální činnosti prováděné v rámci této diplomové práce.

2.2.2 Selektivní generování AsH_3 pro atomovou absorpční spektrometrii

Při generování těkavých látek z roztoku, ve kterých má být analyt stanoven, dochází k oddělení analytu od matrice. Ta není přítomna v atomizačním prostředí a neruší tak stanovení (vyjma aerosolů apod. diskutovaných v oddíle 2.2.1). To je hlavní výhoda generování těkavých hydridů pro stanovení v metodě AAS [17, s. 46-47].

Speciační analýzou jsou analytické aktivity směřující k identifikaci nebo ke stanovení jedné nebo více jednotlivých chemických specií ve vzorku. Chemická specie je specifická forma prvku definovaná strukturou komplexu či molekuly, oxidačním stavem apod. [22]. Jednotlivými chemickými speciemi arsenu jsou např. ionty As^{3+} a As^{5+}. Z toxikologického hlediska je důležité znát obsah jednotlivých forem arsenu v biologických vzorcích i vzorcích životního prostředí, protože tyto jeho jednotlivé formy jsou různě toxické (viz oddíl 2.1.1). Pro stanovení jednotlivých forem, tedy speciační analýzu, se dobře hodí metoda generování těkavých hydridů pro atomovou absorpční spektrometrii. Kyselinu arsenitou i arseničnou lze totiž ve vodných roztocích převést na těkavý arzan, který lze jednak uvolnit z netěkavé matrice a lze ho i snadno atomizovat [23, s. 82].

Tvorba arzanu z přímo z kyseliny arseničné je sice možná, probíhá však velmi pomalu. Proto je nejprve nutné ji zredukovat na kyselinu arsenitou. Jako redukční činidlo se k tomuto účelu hodí roztok KI v kyselině askorbové [24], 15% KI v 6 M HCl za zvýšené teploty [25], samotná HCl o koncentraci 1-6 M [18, s. 144] a také L-cystein v kyselém prostředí HCl za teploty laboratorní či zvýšené [26]. Použití L-cysteinu jako redukčního činidla není vzhledem k afinitě arsenu k SH-skupinám překvapující (viz oddíl 2.1.1) [3, s. 78]. Thiolová skupina L-cysteinu je velmi reaktivní a snadno se oxiduje za vzniku disulfidové vazby [4b], čímž je redoxní partner L-cysteinu redukován, např. As^{5+} na As^{3+}, a dvě molekuly cysteinu se spojí disulfidovým můstkem v jednu molekulu cystinu [4c].

Z uvedeného vyplývá, že speciační analýzu forem As^{3+} a As^{5+} v jednom vzorku lze provést tak, že do jednoho alikvotu vzorku L-cystein přidán není a tak je v něm převeden na hydrid pouze As^{3+}. Následně je hydrid veden do atomizátoru, kde je stanoven arsen pouze ve formě As^{3+}. Do druhého alikvotu vzorku L-cystein přidán je a tak je v něm převeden na hydrid jak As^{3+}, tak As^{5+}. Následně je hydrid veden do atomizátoru, kde je stanoven arsen v obou formách. Koncentraci As^{5+} ve vzorku pak lze stanovit z rozdílu těchto dvou měření. Tento způsob provedení speciační analýzy hydridotvorných prvků obecně, nejen arsenu, se používá již od počátku sedmdesátých let [18, s. 141].

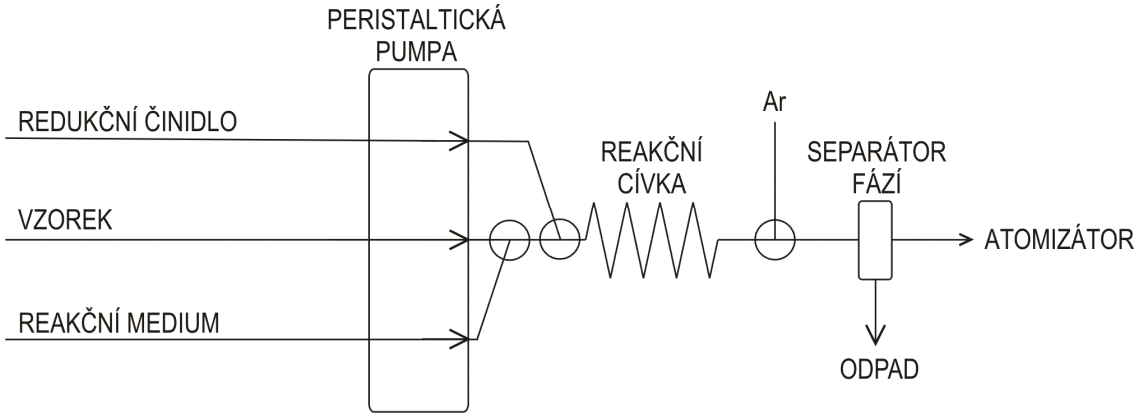
Konverze analytu na hydrid se běžně provádí redukčním činidlem $NaBH_4$ [17, s. 47] [18, s. 143]. Borohydrid se v kyselém prostředí velmi rychle rozkládá a proto je pro zajištění stability uchováván v prostředí alkalickém. V roztoku je tedy přítomen jako 1% $NaBH_4$ v 0,4% KOH či 0,4% NaOH [18, s. 142-143] [27] [28]. Rozklad borohydridu je naopak žádoucí při samotném generování hydridů, a tak se v aparatuře borohydrid v alkalickém prostředí smíchává se vzorkem v kyselém prostředí. Tímto kyselým prostředím je TRIS pufr zajišťující optimální pH pro generování arzanu pouze z nižšího oxidačního stupně [27]. Při rozkladu borohydridu vzniká kyselina boritá a pravděpodobně i nascentní vodík, z jehož podstatné části dále vznikají molekuly vodíku a z malé části, odpovídající stopové koncentraci arsenu v roztoku, vzniká sledem následných reakcí výsledný arsan. Podle nové teorie probíhá reakce vedoucí ke vzniku arzanu přes boranové komplexy. Vodík vzniklý rozkladem borohydridu je ve srovnání s arzanem v obrovském nadbytku, čímž je zaručeno, že vodík unikající do plynné fáze s sebou strhne veškerý hydrid. Účinnost převedení hydridu do plynné fáze a následně atomizačního prostředí je tak prakticky 100% [17, s. 47] [18, s. 143] [27], což je značná výhoda oproti jiným způsobům převedení analytu ze vzorku do atomizátoru. Např. oproti zmlžovačům pro plamenový atomizátor, kde je účinnost převedení do atomizačního prostředí pouze asi 10% [18, s. 53].

Pro generování hydridů lze využít dva základní přístupy. První jsou metody přímého přenosu. Při nich je hydrid uvolněný z reakční směsi přímo veden do atomizátoru. Druhý přístup jsou metody kolekční. Při nich je hydrid uvolněný z reakční směsi zachycen ve vhodném prostředí, např. v trubici ponořené do kapalného dusíku, a do atomizátoru je z tohoto prostředí uvolněn až po nakoncentrování v trubici [18, s.

145]. Především díky onomu nakoncentrování lze tímto přístupem dosáhnout o tři řády nižšího LOD, jak bylo uvedeno v úvodu podkapitoly 2.2 [18, s. 148]. S oběma dvěma zmíněnými přístupy lze použít pro generování hydridů trojí možné uspořádání [17, s. 47-48]:

- uspořádání pro kontinuální generování;
- uspořádání pro dávkování do proudu, tzv. flow injection;
- uspořádání pro dávkové generování.

V této práci byla využívána metoda přímého přístupu a kolekční metody, jakožto ani rozdělení na tyto dvě skupiny, nadále nebude vůbec zmiňováno. Dále bylo v této práci využíváno výhradně uspořádání pro kontinuální generování hydridů, jehož schéma je na obr. 2.1.



Obr. 2.1 Schéma pro kontinuální generování hydridů, převzato z [27]

Principem kontinuálního generování je neustálý tok vzorku do toku reakčního média, kterým je TRIS pufr zajišťující pH pro generování hydridů borohydridem, a dále tok vzorku smíchaného s TRIS pufrem do toku borohydridu. Reakcí borohydridu s analytem v prostředí TRIS pufru začíná v reakční cívce vznikat plynný hydrid, který je nosným plynem, obvykle argonem či dusíkem, unášen dále. Pro maximální zabránění úniku kapaliny do atomizátoru, která v něm může rušit stanovení a zakřivovat kalibrační závislost (viz oddíl 2.2.1) nebo dokonce atomizátor poškozovat (viz oddíl 4.4.1), následuje v aparatuře tzv. separátor fází, ze kterého pokud možno veškerá kapalina odchází do odpadu. Separátorů fází je více typů. Nejběžnější jsou separátory

hydrostatické, ze kterých kapalina do odpadu odchází přepadovým ramenem obdobným v sifonu a separátory s nuceným odtahem, ze kterých je kapalina odsávána do odpadu pumpou. Ze separátoru fází je hydrid unášen nosným plynem dále do atomizátoru [18, s. 145-146] [27].

Zmíněné uspořádání pro dávkování do proudu je od uspořádání pro kontinuální generování odlišné pouze v tom, že vzorek je do proudu reakčního média injektován. Při dávkovém generování jsou pro změnu všechny reagenty smíchány v jedné v nádobce, která slouží zároveň jako reaktor i separátor fází [18, s. 145-146] [27].

Posledním prvkem z obr. 2.1 je atomizátor. Pro generování hydridů se používají plamenové i grafitové atomizátory [18, s. 149-150], ale nejčastěji atomizátory typu křemenná trubice. Obvykle jsou odporově vyhřívané na vysokou teplotu [18, s. 150-152]. Některé atomy arsenu se začínají formovat již od 650 až 700 °C, ale s konvenčním křemenným atomizátorem je teplota pro atomizaci arsenu optimalizována zpravidla na 900 až 1000 °C, jen výjimečně dokonce i na 1100 °C [29, s. 185-186]. Při těchto relativně nízkých teplotách jsou volné atomy analytu termodynamicky zakázány. Atomizace hydridů v křemenných atomizátorech tedy není termický proces [18, s. 154] [27]. Do atomizačního prostoru je nosným plynem unášen nejen hydrid, ale jak již bylo řečeno, i vodík vzniklý hydrolýzou borohydridu. Dále jsou v atomizátoru přítomny stopy kyslíku pocházející z netěsností ve spojích hadiček, z reagencií, ze vzorku a především z nosného plynu, ve kterém jsou jako kontaminant [27]. Tyto stopy kyslíku reagují v zevně ohřívaném atomizátoru s přítomným vodíkem, takže se v atomizátoru nachází oblak vysoce energetických vodíkových radikálů. A právě interakcí těchto radikálů s hydridem dochází k jeho atomizaci. V této interakci pravděpodobně převažuje radikálový mechanismus [29, s. 185].

2.3 Extrakce arsenu z reálných vzorků

Pro extrakci kovů z půdních a prachových materiálů se používají dva samostatné postupy [30]. Jeden zahrnuje extrakci kyselými činidly, druhý činidly alkalickými. Oba postupy jsou standardizované a v obou případech se jedná o tzv. postupnou extrakci, při níž jsou po sobě použity roztoky o vyšší iontové síle nebo zcela chemicky odlišné.

Posloupnost kyselých činidel je následující:

- 0,11 M CH_3COOH
- 0,1 M $NH_2OH \cdot HCl$
- 8,8 M H_20_2
- 1 M CH_3COONH_4

Posloupnost alkalických činidel je následující, avšak lze je použít i ve společné směsi:

- 0,1 M KOH
- 0,3 M Na_2CO_3

V každém vyluhovacím činidle má být pevný vzorek 16 hodin. Tento ani jiné, zde neuvedené, detaily extrakce však nejsou pro účely této diplomové práce důležité, protože v ní extrakce arsenu z pevných materiálů nebyla těmito činidly vůbec provedena. Uvedená činidla byla v daných koncentracích použita pouze pro zjištění jejich vlivu na stanovení As^{3+} a As^{5+} v připravených vodných roztocích, standardech o známé koncentraci arsenu. Byl zjištěn vliv negativní a tak byla veškerá činidla vyloučena z dalších experimentů, viz podkapitola 4.4. Činidlo H_20_2 nebylo testováno vůbec, neboť má ze všech uvedených nejvyšší oxidační vlastnosti, a vzhledem ke zjištění negativního vlivu ostatních činidel je jisté, že H_20_2 je pro extrakci nepoužitelný. O této látce již nebude v dalším textu žádná zmínka.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Chemikálie

V diplomové práci byly používány následující chemikálie:

- Standardní roztok arsenu pro AAS, As, 1,000 ± 0,002 g/l, Analytika Praha
- borohydrid sodný, $NaBH_4$, pure, Ubichem
- borohydrid sodný, $NaBH_4$, zur Synthese, >96%, Merck
- hydroxid draselný, KOH, p.a., Lachema
- hydroxid sodný, NaOH, p.a., Lachema, Chemapol
- hydroxylamin – hydrochlorid (1:1), $NH_2OH \cdot HCl$, p.a., Merck
- jodid draselný, KI, p.a., Merck
- kyselina dusičná, HNO_3, p.a., Merck
- kyselina fluorovodíková, HF, Analpure, Analytika Praha
- kyselina chlorovodíková, HCl, p.a., Merck
- L-cystein – hydrochlorid – voda (1:1:1), $C_3H_7NO_2S \cdot HCl \cdot H_2O$, pro biochemii, Merck
- n-hydrát oxidu arseničného, $As_2O_5 \cdot nH_2O$ (certifikát pro tuto látku s číslem šarže 12410JB obsahuje následující údaj o čistotě: titrací KSCN stanoveno 63,8% arsenu; v rámci diplomové práce bylo výpočtem ověřeno, že tento hmotnostní zlomek odpovídá bezvodému As_2O_5), ≥ 99,99%, Aldrich
- octan amonný, CH_3COONH_4, p.a, Penta
- octová kyselina, CH_3COOH, p.a., Lachema
- oxid arsenitý, As_2O_3, ≥ 99,5%, Fluka Chemika
- tris(hydroxymethyl)-aminomethan – hydrochlorid (1:1), $C_4H_{11}NO_3 \cdot HCl$, reagent grade ≥ 99,0%, Sigma-Aldrich
- uhličitan sodný, Na_2CO_3, bezvodý, p.a., Lachema

K přípravě všech roztoků byla používána deionizovaná voda připravená na přístroji Milli-Q Water Purification System (Millipore,USA).

3.2 Přístroje a další vybavení

Pro měření byl používán atomový absorpční spektrometr Solaar 939 AA spectrometer (Unicam, UK), ovládaný přes standardní počítač. Uspořádání tohoto přístroje je jednopaprskové. Přístroj umožňuje deuteriovou korekci pozadí, která však nebyla používána, protože může zvýšit šum [17, s. 27], čímž se zhoršuje LOD. Jako zdroj záření byla používána výbojka s dutou katodou určená pro stanovení arsenu. Její předehřívací proud měl hodnotu 7,5 mA a následný napájecí proud měl podle zadání výrobce hodnotu 10 mA. Při veškerých měřeních byla absorbance odečítána pro vlnovou délku 193,7 nm [21, s. 131]. Detektorem v přístroji je fotonásobič.

Pro generování hydridů bylo využíváno pouze kontinuální uspořádání, jehož schéma je na obrázku (2.1) v oddíle 2.2.2 (s. 23). V této práci se používané uspořádání aparatury od obrázku mírně lišilo. Nosný plyn argon, jehož průtoková rychlost byla ovládána kuličkovým rotametrem, je podle obrázku (2.1) zaváděn za reakční cívku. V této práci byl zpočátku zaváděn za reakční cívku a zároveň zespodu do separátoru fází přes fritu. Používaná průtoková rychlost argonu pak odpovídala součtu průtokových rychlostí v obou kanálech, mezi něž se rozdělila podle fyzikálních zákonů platných pro plyny. Poměr rychlostí v obou kanálech nebyl v této práci nijak zkoumán ani ovlivňován. Toto dvoukanálové vedení nosného plynu bylo využito pro veškeré experimenty popsané v podkapitolách 4.1 a 4.2. V průběhu měření s kyselými extrakčními činidly (viz oddíl 4.4.1) se ukázalo, že zavádění argonu pouze jedním kanálem, a to zespodu do separátoru fází přes fritu, je výhodnější. Aparatura byla náležitě upravena a zůstala tak až do konce měření diplomové práce.

Čerpací hadičky byly tygonové a měly vnitřní průměr 1,02 mm (barevné označení: white white). Rekční cívka byla zrealizována teflonovou hadičkou o délce 1 m s vnitřním průměrem 1 mm. Separátor fází byl hydrostatický s fritou a do konvenčního křemenného atomizátoru z něj vedla teflonová hadička o vnitřním průměru 1,6 mm. Atomizátor byl zevně vyhříván odporovou pícku na teplotu 950 °C.

Pro měření pH roztoků byl používán přístroj Conductivity & pH Meter 4330 (Jenway, NSR), s kombinovanou skleněnou elektrodou. Přístroj byl kalibrován vždy v den měření.

Pro separaci pevných částic od výluhu v extraktech reálných vzorků byla použita centrifuga MLW, typ K32 (Janecky, NSR). V této centrifuze je vzdálenost dna centrifugační kyvety od osy otáčení 15 cm a centrifuga pracuje za teploty 5 °C.

3.3 Příprava roztoků

- Zásobní roztok As^{5+} o koncentraci 1000 mg dm^{-3} – Navážka 1,53392 g $As_2O_5 \cdot nH_2O$ byla rozpuštěna v 0,5 dm^3 0,5 M HNO_3 [28]. Roztok byl uchováván v lednici.
- Zásobní roztok As^{3+} o koncentraci 1000 mg dm^{-3} v 0,5 M HNO_3 – Navážka 1,32034 g As_2O_3 byla rozpuštěna v roztoku NaOH o takové koncentraci a objemu, které stačily na její rozpuštění a poté byla doplněna roztokem HNO_3 tak, aby se As^{3+} nacházel v 0,5 dm^3 0,5 M HNO_3 [28]. Roztok byl uchováván v lednici.
- Zásobní roztok As^{3+} o koncentraci 1000 mg dm^{-3} v 0,5 M HCl – Navážka 1,32035 g As_2O_3 byla rozpuštěna v roztoku NaOH o takové koncentraci a objemu, které stačily na její rozpuštění a poté byla doplněna roztokem HCl tak, aby se As^{3+} nacházel v 0,5 dm^3 0,5 M HCl. Roztok byl uchováván v lednici.
- Kalibrační roztoky arsenu – Příprava kalibračních roztoků As^{3+} i As^{5+} má stejný postup. Ze zásobního roztoku byl připraven roztok o koncentraci 10 mg dm^{-3} arsenu podle potřeby v prostředí 0,02 M HNO_3 [26], 0,5 M HCl nebo v prostředí deionizované vody. Tento roztok byl uchováván v lednici maximálně týden, poté byl připraven čerstvý. Z tohoto roztoku byly připravovány všechny roztoky pro jednotlivé body kalibrační křivky. Roztoky arsenu v extrakčních činidlech byly připravovány vždy čerstvé. Roztoky arsenu v 0,02 M HNO_3, v 0,5 M HCl a v deionizované vodě byly uchovávány v lednici maximálně 4 dny.
- 1% $NaBH_4$ v 0,4% KOH či 0,4% NaOH [18, s. 143] [27] [28] – Navážka hydroxidu byla rozpuštěna ve vodě, poté byla do roztoku hydroxidu přidána navážka $NaBH_4$ a po jeho úplném rozpuštění byl roztok zfiltrován přes nálevku s filtračním papírem do čisté a suché plastové láhve. Nebyl-li roztok spotřebován téhož dne, byl do dalšího měření v této láhvi uchován při teplotě pod 0 °C v mrazícím boxu.
- TRIS pufr – Navážka $C_4H_{11}NO_3 \cdot HCl$ byla rozpuštěna ve vodě tak, aby měl $C_4H_{11}NO_3 \cdot HCl$ koncentraci 118,2 g dm^{-3} [28].

- Vodné roztoky extrakčních činidel mají následující koncentrace [30]:

CH_3COOH	0,11 mol dm^{-3}
CH_3COONH_4	1 mol dm^{-3}
$NH_2OH \cdot HCl$	0,1 mol dm^{-3}
KOH	0,1 mol dm^{-3}
Na_2CO_3	0,3 mol dm^{-3}

3.4 Metody zpracování dat

U stanovení jednotlivých standardů byla pro každý standard provedena nejméně tři měření a jejich výsledky byly následně zpracovány běžnými statistickými postupy [31]. V případech, kdy byl počet stanovení nižší než tři, je to uvedeno a zdůvodněno. Lineární závislosti dvou proměnných byly zpracovány metodou lineární regrese s vyhodnocením příslušných odchylek a korelačních koeficientů v programu Microcal^{TM}Origin, ver. 6.0 (Microcal Software).

Statistický limit detekce kalibračních závislostí (LOD) a statistický limit stanovitelnosti kalibračních závislostí (LOQ) byly vypočítány podle vztahů:

$$\mathrm{LOD} = \frac{3 \cdot s_{x/y}}{a} \tag{3.1}$$

$$\mathrm{LOQ} = \frac{10 \cdot s_{x/y}}{a} \tag{3.2}$$

kde $s_{x/y}$ je směrodatná odchylka lineární regrese pro standard o koncentraci pokud možno co nejnižší a a je směrnice lineární regrese získané z kalibrace pro nízké koncentrace s konstantními rozestupy v koncentracích mezi použitými standardy.

Opakovatelnost stanovení (O) byla spočítána ze vztahu:

$$O = 100 \cdot \frac{s_{x/y}}{\bar{x}} \tag{3.3}$$

kde [O] = %, dále $s_{x/y}$ je směrodatná odchylka lineární regrese pro standard o zvolené koncentraci stanovené 10x a $\bar{x}$ je střední hodnota koncentrace tohoto standardu.

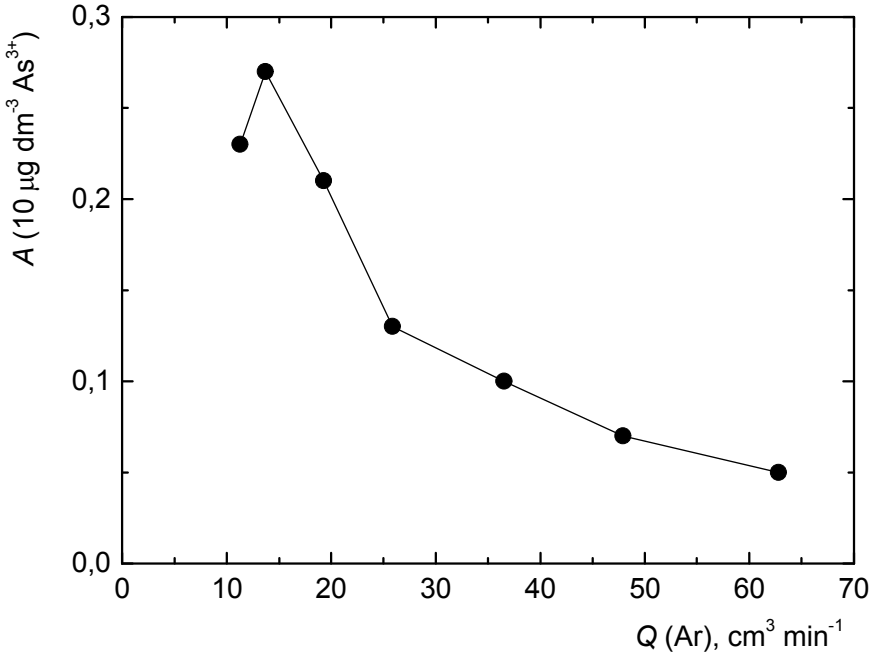
4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Optimalizace podmínek měření

Pro všechny optimalizační experimenty byl používán $NaBH_4$ od firmy Ubichem a zásobní roztok As^{3+} o koncentraci 1000 mg dm^{-3} připravený v 0,5 M HNO_3. Kalibrační roztoky As^{3+} byly v prostředí 0,02 M HNO_3, kalibrační roztoky As^{5+} byly v různých prostředích (viz oddíl 4.1.4).

4.1.1 Optimalizace průtokové rychlosti nosného plynu

Nejprve byla optimalizována průtoková rychlost argonu. K tomuto účelu byl použit kuličkový rotametr s rozsahem 0 až 62,8 cm^3 min^{-1} Ar a standardní roztok As^{3+} o koncentraci 10 μg dm^{-3}. Průtoková rychlost standardu, TRIS pufru a borohydridu byla 1 cm^3 min^{-1}. Průtoková rychlost argonu pod 10 cm^3 min^{-1} byla na použitém rotametru nenastavitelná, neboť ocelová kulička rotametru při takto nízkém průtoku značně měnila svoji polohu. Závislost absorbance připraveného standardu As^{3+} na vyšších průtocích argonu je uvedena na obr. 4.1.

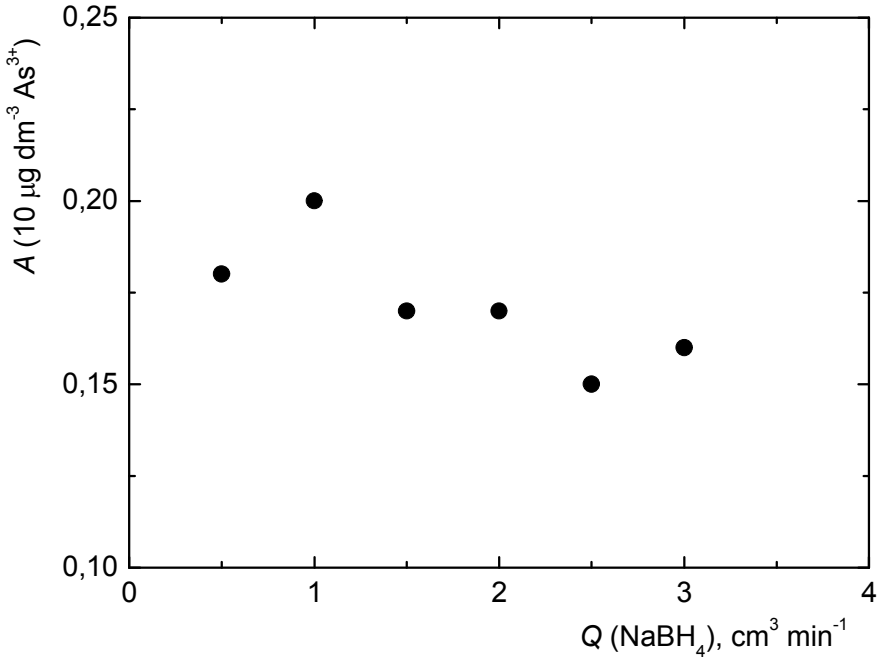


Obr. 4.1 Závislost signálu 10 μg dm^{-3} As^{3+} na průtokové rychlosti argonu.
Podmínky měření: Jednopaprskový spektrometr bez korekce pozadí; HCL pro As napájená proudem 10 mA; λ = 193,3 nm; čerpací tygonová hadička o i.d. = 1,02 mm; teflonová reakční cívka o i.d. = 1 mm; teflonová hadička o i.d. = 1,6 mm mezi hydrostatickým separátorem fází s fritou a konvenčním křemenným atomizátorem (T = 950 °C); argon zaváděn za reakční cívku a zároveň přes fritu do separátoru fází o součtové Q na ose x; Průtoková rychlost 10 μg dm^{-3} As^{3+}, 118,2 g dm^{-3} TRIS pufru i 1% $NaBH_4$ je 1 cm^3 min^{-1}.

Z tohoto grafu je patrné, že nejvyšší hodnoty absorbance je pro danou koncentraci As^{3+} dosaženo při použití 13,7 cm^3 min^{-1} argonu. Tato jeho průtoková rychlost byla tedy používána při všech dalších měřeních.

4.1.2 Optimalizace průtokové rychlosti borohydridu

Průtoková rychlost 1% $NaBH_4$ v 0,4% KOH byla optimalizována pro standardní roztok As^{3+} o koncentraci 10 μg dm^{-3}, stejně jako při optimalizaci průtoku argonu. Průtoková rychlost standardu byla 1 cm^3 min^{-1} a průtoková rychlost TRIS pufru taktéž. Závislost absorbance připraveného standardu As^{3+} na různých průtocích borohydridu je uvedena na obr. 4.2.

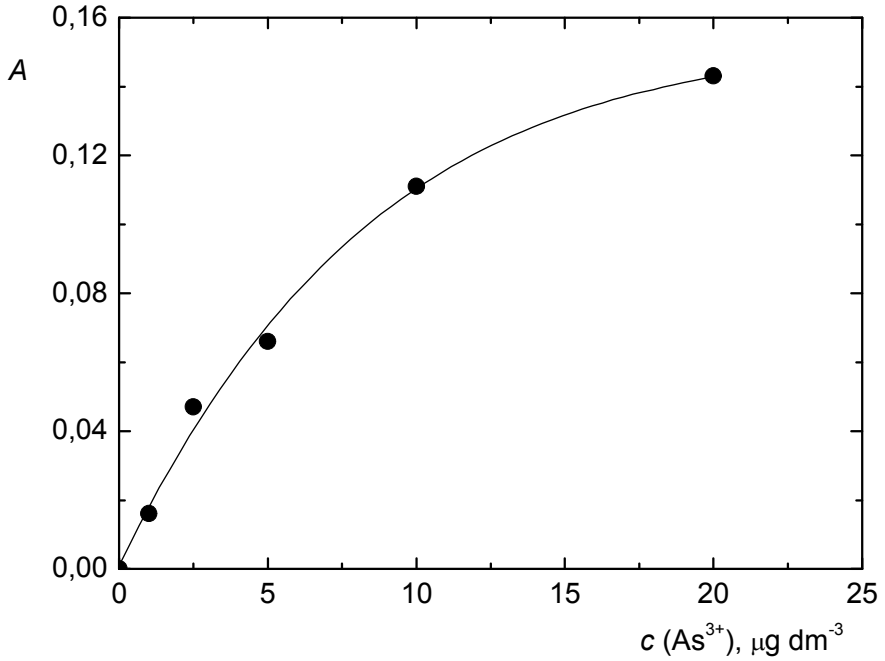


Obr. 4.2 Závislost signálu 10 μg dm^{-3} As^{3+} na průtokové rychlosti borohydridu.
Podmínky měření: Jednopaprskový spektrometr bez korekce pozadí; HCL pro As napájená proudem 10 mA; λ = 193,3 nm; čerpací tygonová hadička o i.d. = 1,02 mm; teflonová reakční cívka o i.d. = 1 mm; teflonová hadička o i.d. = 1,6 mm mezi hydrostatickým separátorem fází s fritou a konvenčním křemenným atomizátorem (T = 950 °C); argon zaváděn za reakční cívku a zároveň přes fritu do separátoru fází o součtové Q = 13,7 cm^3 min^{-1}; Průtoková rychlost 10 μg dm^{-3} As^{3+} i 118,2 g dm^{-3} TRIS pufru je 1 cm^3 min^{-1}.

Z tohoto grafu vyplývá, že průtoková rychlost borohydridu nemá na hodnotu absorbance příliš výrazný vliv. Maximální absorbance je pro standardní roztok As^{3+} o koncentraci 10 μg dm^{-3} dosaženo při průtoku borohydridu 1 cm^3 min^{-1}. Tato jeho průtoková rychlost byla tedy používána při všech dalších měřeních.

4.1.3 Kalibrační křivka As^{3+}

Za optimálních podmínek (viz předešlé pododdíly 4.1.1 a 4.1.2) byla změřena kalibrační křivka As^{3+}, viz obr. 4.3.



Obr. 4.3 Kalibrační křivka As^{3+} změřená za optimálních podmínek.
Podmínky měření: Jednopaprskový spektrometr bez korekce pozadí; HCL pro As napájená proudem 10 mA; λ = 193,3 nm; čerpací tygonová hadička o i.d. = 1,02 mm; teflonová reakční cívka o i.d. = 1 mm; teflonová hadička o i.d. = 1,6 mm mezi hydrostatickým separátorem fází s fritou a konvenčním křemenným atomizátorem (T = 950 °C); argon zaváděn za reakční cívku a zároveň přes fritu do separátoru fází o součtové Q = 13,7 cm^3 min^{-1}; Průtoková rychlost As^{3+}, 118,2 g dm^{-3} TRIS pufru i 1% $NaBH_4$ je 1 cm^3 min^{-1}.

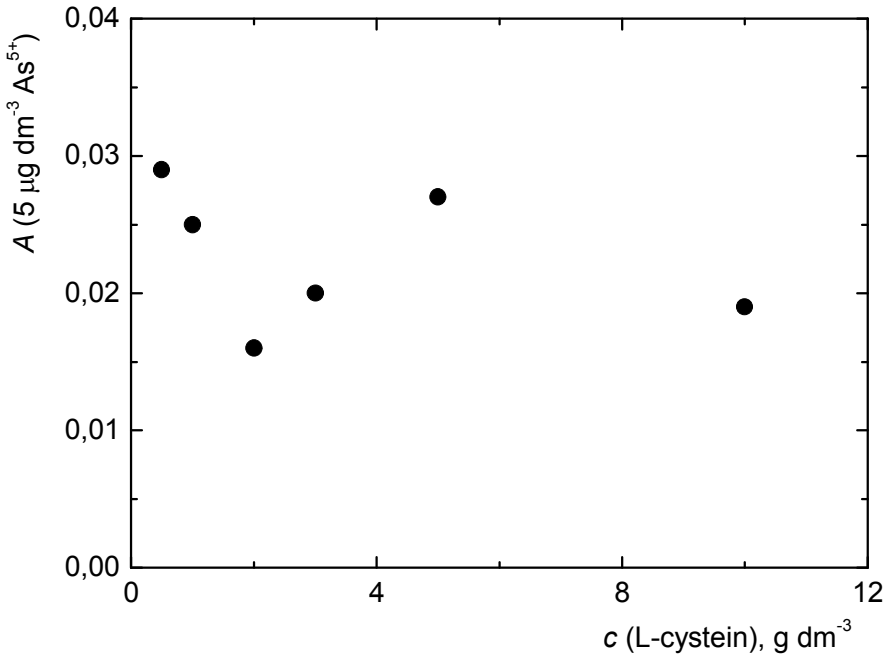
Jak je vidět z obr. 4.3, již od koncentrace 5 μg dm^{-3} As^{3+} dochází k zakřivení kalibrační závislosti. Více bude o tomto grafu pojednáno v pododdíle 4.2.1.

4.1.4 Optimalizace předredukce As^{5+} na As^{3+}

Následujících optimalizačních experimentů je velké množství. Je to z toho důvodu, že citlivost stanovení As^{5+} (viz 4.1.3) byla neustále výrazně nižší než citlivost stanovení As^{3+}, a tak byly hledány podmínky, za kterých by bylo dosaženo stejné citlivosti.

4.1.4.1 Předredukce L-cysteinem za zvýšené teploty

Do roztoku As^{5+} o koncentraci 5 μg dm^{-3} v 0,02 M HNO_3 byla přidána navážka L-cysteinu a ihned poté byl roztok vložen do vroucí lázně. Přesně po 5 minutách z ní byl vyjmut a po následných 10 minutách chladnutí do něj byla ponořena čerpací hadička určená pro vzorek. Absorbance arsenu vzniklého v aparatuře byla změřena celkem asi 8x po sobě. Poté byl stejným způsobem připraven a změřen další vzorek, lišící se od prvého pouze v jiné navážce L-cysteinu. Takto byla postupně změřena absorbance As^{5+} o koncentraci 5 μg dm^{-3} v závislosti na koncentraci L-cysteinu redukujícího As^{5+} za zvýšené teploty ve vodné vroucí lázni. Jak tato závislost vypadá, ukazuje obr. 4.4.



Obr. 4.4 Optimalizace koncentrace L-cysteinu přidávaného k As^{5+} o koncentraci 5 μg dm^{-3}.
Podmínky měření: Jednopaprskový spektrometr bez korekce pozadí; HCL pro As napájená proudem 10 mA; λ = 193,3 nm; čerpací tygonová hadička o i.d. = 1,02 mm; teflonová reakční cívka o i.d. = 1 mm; teflonová hadička o i.d. = 1,6 mm mezi hydrostatickým separátorem fází s fritou a konvenčním křemenným atomizátorem (T = 950 °C); argon zaváděn za reakční cívku a zároveň přes fritu do separátoru fází o součtové Q = 13,7 cm^3 min^{-1}; Redukce As^{5+} na As^{3+} L-cysteinem 5 min ve vroucí vodné lázni, následně 10 min chladnutí; Průtoková rychlost 5 μg dm^{-3} As^{5+}, 118,2 g dm^{-3} TRIS pufru i 1% $NaBH_4$ je 1 cm^3 min^{-1}.

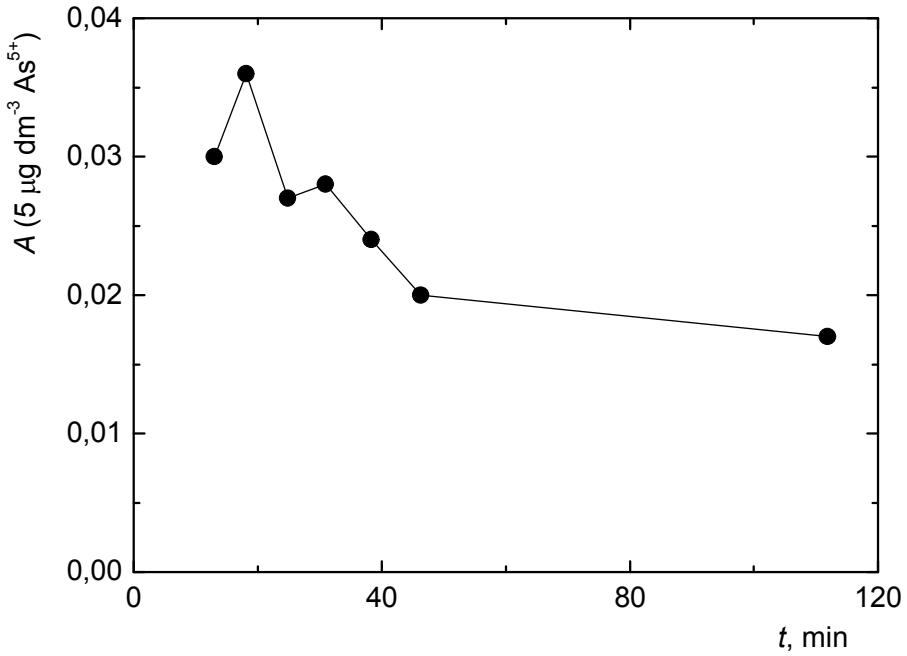
Zvolená koncentrace As^{5+} vykazuje nejvyšší absorbanci při koncentraci L-cysteinu 0,5 g dm^{-3}. Zdálo by se tedy, že z vyzkoušených koncentrací L-cysteinu je tato nejvýhodnější. Všech 10 změřených hodnot absorbance 5 μg dm^{-3} As^{5+} v 0,5 g dm^{-3} L-cysteinu je uvedeno v tabulce 4.1.

Tab. 4.1 Hodnoty absorbance změřené pro 5 μg dm^{-3} As^{5+} v 0,5 g dm^{-3} L-cysteinu

č. měření	A
1	0,038
2	0,029
3	0,020
4	0,028
5	0,020
6	0,020
7	0,035
8	0,025
9	0,048
10	0,040

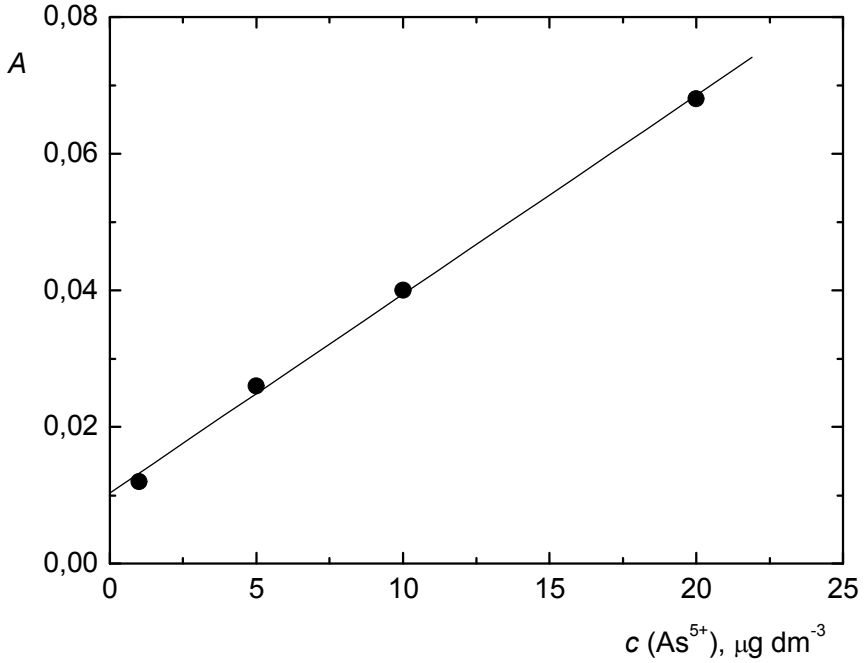
Z tabulky je patrné, že experimenty nejsou příliš dobře opakovatelné a že zvolená koncentrace As^{5+} vykazuje nejvyšší absorbanci při koncentraci L-cysteinu 0,5 g dm^{-3} jen kvůli několika vysokým hodnotám absorbance. Z těchto důvodů bylo rozhodnuto, že koncentrace 0,5 g dm^{-3} L-cysteinu není optimální a nebude nadále využívána.

Jako optimální koncentrace L-cysteinu se dále nabízí 1 g dm^{-3} a 5 g dm^{-3}. Měření absorbance 5 μg dm^{-3} As^{5+} v 5 g dm^{-3} L-cysteinu však nevykazuje časovou stabilitu, protože signál použitého standardního roztoku s časem klesá. Jeho absorbance byla změřena 7x po sobě a časová posloupnost těchto měření je znázorněna v obr. 4.5.



Obr. 4.5 Časová závislost absorbance 5 μg dm^{-3} As^{5+} v 5 g dm^{-3} L-cysteinu.
Podmínky měření: Jednopaprskový spektrometr bez korekce pozadí; HCL pro As napájená proudem 10 mA; λ = 193,3 nm; čerpací tygonová hadička o i.d. = 1,02 mm; teflonová reakční cívka o i.d. = 1 mm; teflonová hadička o i.d. = 1,6 mm mezi hydrostatickým separátorem fází s fritou a konvenčním křemenným atomizátorem (T = 950 °C); argon zaváděn za reakční cívku a zároveň přes fritu do separátoru fází o součtové Q = 13,7 cm^3 min^{-1}; Redukce As^{5+} na As^{3+} pomocí 5 g dm^{-3} L-cysteinu 5 min ve vroucí vodné lázni, následně chladnutí po dobu t (na ose x); Průtoková rychlost 5 μg dm^{-3} As^{5+}, 118,2 g dm^{-3} TRIS pufru i 1% $NaBH_4$ je 1 cm^3 min^{-1}.

Z obr. 4.5 je časová nestabilita absorbance 5 μg dm^{-3} As^{5+} v 5 g dm^{-3} L-cysteinu velmi dobře vidět. Z důvodu značné časové nestability byla i koncentrace 5 g dm^{-3} L-cysteinu vyloučena. Jako nejvhodnější koncentrace L-cysteinu byla nakonec zvolena hodnota 1 g dm^{-3}. Měření absorbance 5 μg dm^{-3} As^{5+} v 1 g dm^{-3} L-cysteinu při 5-ti minutovém ohřevu ve vroucí lázni totiž vykazuje lepší časovou stabilitu i opakovatelnost, než měření absorbance 5 μg dm^{-3} As^{5+} v 0,5 g dm^{-3} L-cysteinu i v 5 g dm^{-3} L-cysteinu při stejném ohřevu. Za těchto podmínek byla proměřena kalibrační křivka znázorněná v obr. 4.6.



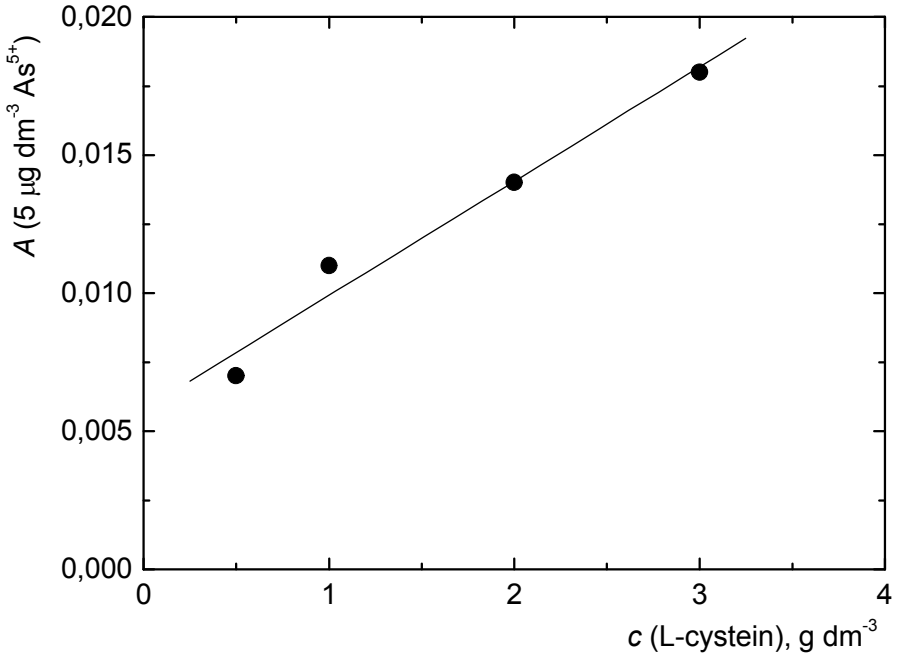
Obr. 4.6 Kalibrační křivka As^{5+} v 0,02 M HNO_3.
Podmínky měření: Jednopaprskový spektrometr bez korekce pozadí; HCL pro As napájená proudem 10 mA; λ = 193,3 nm; čerpací tygonová hadička o i.d. = 1,02 mm; teflonová reakční cívka o i.d. = 1 mm; teflonová hadička o i.d. = 1,6 mm mezi hydrostatickým separátorem fází s fritou a konvenčním křemenným atomizátorem (T = 950 °C); argon zaváděn za reakční cívku a zároveň přes fritu do separátoru fází o součtové Q = 13,7 cm^3 min^{-1}; Redukce As^{5+} na As^{3+} pomocí 1 g dm^{-3} L-cysteinu 5 min ve vroucí vodné lázni, následně 10 min chladnutí; Průtoková rychlost As^{5+}, 118,2 g dm^{-3} TRIS pufru i 1% $NaBH_4$ je 1 cm^3 min^{-1}.
Směrnice získané lineární závislosti je 0,0032 dm^3 μg^{-1}.

Ke každému kalibračnímu roztoku byla přidána taková navážka L-cysteinu, aby L-cystein vytvořil roztok o koncentraci 1 g dm^{-3}. Ihned poté byl roztok na 5 minut vložen do vroucí lázně a po následných 10 minutách chladnutí bylo započato měření. Směrnice získané lineární závislosti je 0,0032 dm^3 μg^{-1}.

4.1.4.2 Předredukce L-cysteinem za laboratorní teploty

Do roztoku As^{5+} o koncentraci 5 μg dm^{-3} v 0,02 M HNO_3 byla přidána navážka L-cysteinu, roztok byl protřepán a po 1 hodině stání za laboratorní teploty bylo započato měření obsahu arsenu. Absorbance arsenu vzniklého v aparatuře byla takto změřena 2x

– 3x. Poté byl stejným způsobem připraven a změřen další vzorek, lišící se od prvého pouze v jiné navážce L-cysteinu. Takto byla postupně změřena absorbance As^{5+} o koncentraci 5 μg dm^{-3} v závislosti na koncentraci L-cysteinu redukujícího As^{5+} za laboratorní teploty. Jak tato závislost vypadá, ukazuje obr. 4.7.



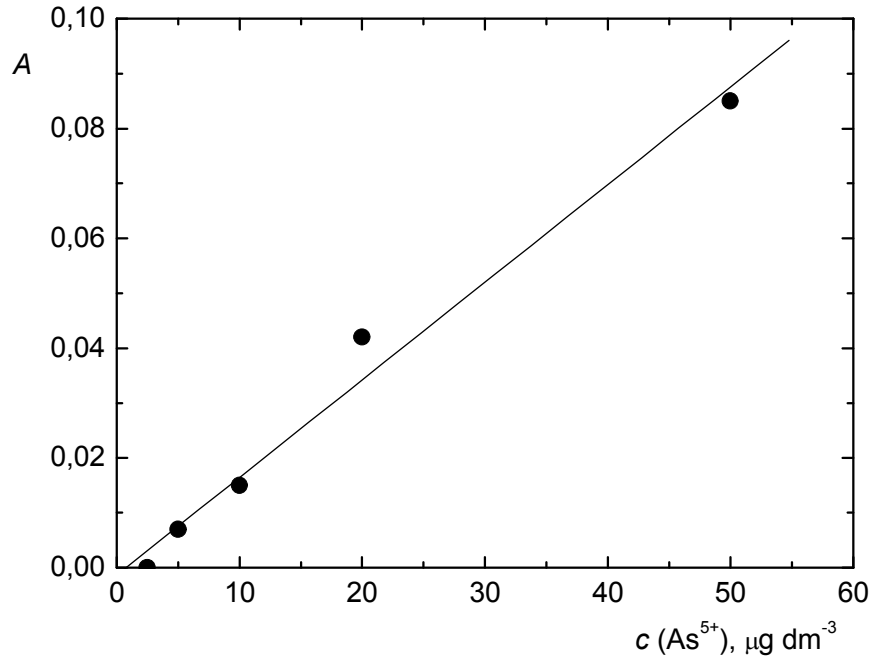
Obr. 4.7 Optimalizace koncentrace L-cysteinu přidávaného k As^{5+} o koncentraci 5 μg dm^{-3}.
Podmínky měření: Jednopaprskový spektrometr bez korekce pozadí; HCL pro As napájená proudem 10 mA; λ = 193,3 nm; čerpací tygonová hadička o i.d. = 1,02 mm; teflonová reakční cívka o i.d. = 1 mm; teflonová hadička o i.d. = 1,6 mm mezi hydrostatickým separátorem fází s fritou a konvenčním křemenným atomizátorem (T = 950 °C); argon zaváděn za reakční cívku a zároveň přes fritu do separátoru fází o součtové Q = 13,7 cm^3 min^{-1}; Redukce As^{5+} na As^{3+} L-cysteinem 1h za laboratorní teploty; Průtoková rychlost 5 μg dm^{-3} As^{5+}, 118,2 g dm^{-3} TRIS pufru i 1% $NaBH_4$ je 1 cm^3 min^{-1}.
V rozsahu od 0,5 do 3 g dm^{-3} L-cysteinu je směrnice získané lineární závislosti 0,0041 dm^3 g^{-1}.

Z testovaných koncentrací L-cysteinu redukujícího As^{5+} za laboratorní teploty je optimální ta nejvyšší, tedy 3 g dm^{-3}.

Nicméně absorbance 5 μg dm^{-3} As^{5+} je i v tomto případě nižší, než při použití 1 g dm^{-3} L-cysteinu redukujícího As^{5+} v 0,02 M HNO_3 za zvýšené teploty ve vroucí lázni (viz pododdíl 4.1.4.1).

4.1.4.3 Předredukce silně kyselým prostředím za laboratorní teploty

Roztoky As^{5+} o různé koncentraci byly připraveny v silně kyselém prostředí 6 M HCl, která má redukční účinky. Poté byly roztoky použity pro změření kalibrační křivky, která je v obr. 4.8.



Obr. 4.8 Kalibrační křivka As^{5+} v 6 M HCl.
Podmínky měření: Jednopaprskový spektrometr bez korekce pozadí; HCL pro As napájená proudem 10 mA; λ = 193,3 nm; čerpací tygonová hadička o i.d. = 1,02 mm; teflonová reakční cívka o i.d. = 1 mm; teflonová hadička o i.d. = 1,6 mm mezi hydrostatickým separátorem fází s fritou a konvenčním křemenným atomizátorem (T = 950 °C); argon zaváděn za reakční cívku a zároveň přes fritu do separátoru fází o součtové Q = 13,7 cm^3 min^{-1}; Redukce As^{5+} na As^{3+} pomocí 6 M HCl za laboratorní teploty; Průtoková rychlost As^{5+}, 118,2 g dm^{-3} TRIS pufru i 1% $NaBH_4$ je 1 cm^3 min^{-1}.
Směrnice získané lineární závislosti je 0,0018 dm^3 μg^{-1}.

Pro koncentrace 1 μg dm^{-3} As^{5+} a 2,5 μg dm^{-3} As^{5+} byly naměřeny nulové hodnoty absorbance. Směrnice získané lineární závislosti je 0,0018 dm^3 μg^{-1}.

Naproti tomu při použití 1 g dm^{-3} L-cysteinu redukujícího As^{5+} v 0,02 M HNO_3 za zvýšené teploty ve vroucí vodné lázni byly naměřeny nenulové hodnoty absorbance i

pro 1 μg dm^{-3} As^{5+} a směrnice kalibrační přímky činila Směrnice získané lineární závislosti je 0,0032 dm^3 μg^{-1} (viz obr. 4.6).

4.1.4.4 Předredukce L-cysteinem a zároveň silně kyselým prostředím za laboratorní teploty

Do roztoku As^{5+} o koncentraci 20 μg dm^{-3} v prostředí 6 M HCl byla přidána taková navážka L-cysteinu, aby se L-cystein nacházel v roztoku v koncentraci 1 g dm^{-3}. Roztok byl protřepán a po 1 hodině stání za laboratorní teploty bylo započato měření. Absorbance arsenu vzniklého v aparatuře byla změřena 3x a její medián byl 0,060.

Naproti tomu při použití 1 g dm^{-3} L-cysteinu redukujícího As^{5+} v 0,02 M HNO_3 za zvýšené teploty ve vroucí vodné lázni byla naměřena pro 20 μg dm^{-3} As^{5+} střední hodnota absorbance 0,068 (viz pododdíl 4.1.3.1).

4.1.4.5 Předredukce L-cysteinem a zároveň kyselým prostředím za zvýšené teploty

Do roztoku As^{5+} o koncentraci 20 μg dm^{-3} v prostředí 1 M HCl byla přidána taková navážka L-cysteinu, aby se L-cystein nacházel v roztoku v koncentraci 1 g dm^{-3}. Roztok byl ihned po přídavku L-cysteinu vložen do vroucí vodné lázně, ve které byl ponechán 5 minut. Pouhá 1 M koncentrace HCl byla zvolena z důvodu bezpečnosti. Po vyjmutí roztoku z lázně byl 10 minut ponechán při laboratorní teplotě a poté bylo započato měření. Absorbance arsenu vzniklého v aparatuře byla změřena 5x a její medián byl 0,060.

Naproti tomu při použití 1 g dm^{-3} L-cysteinu redukujícího As^{5+} v 0,02 M HNO_3 za zvýšené teploty ve vroucí vodné lázni byla naměřena pro 20 μg dm^{-3} As^{5+} střední hodnota absorbance 0,068 (viz pododdíl 4.1.3.1).

4.1.4.6 Vyhodnocení optimalizačních experimentů předredukce As^{5+} na As^{3+}

Ze zkoumaných způsobů redukce As^{5+} je nejúčinnější použití L-cysteinu v koncentraci 1 g dm^{-3} a to během 5-ti minutového ohřevu ve vodné vroucí lázni. As^{5+} se nemusí nacházet v silně kyselém prostředí HCl, protože L-cystein má vyšší redukční

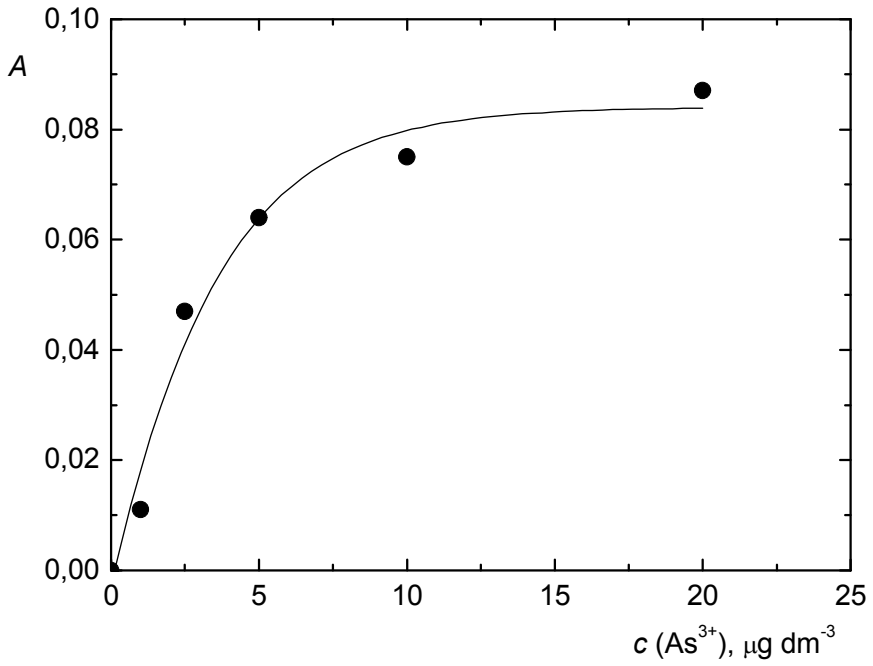
účinky vůči As^{5+}, než HCl. Tento závěr potvrzuje i literatura [26]. Tímto způsobem tedy byly prováděny všechny další předredukce As^{5+} na As^{3+}.

4.2 Kontrola čistoty a stability zásobních roztoků

Pro všechny následující experimenty byl opět používán zásobní roztok $NaBH_4$ od firmy Ubichem. Kalibrační roztoky As^{3+} i As^{5+} z oddílů 4.2.1 a 4.2.3 byly v prostředí 0,02 M HNO_3, jako doposud.

4.2.1 Kontrola čistoty a stability zásobního roztoku 1000 mg dm^{-3} As^{3+} v 0,5 M HNO_3

Na obr. 4.3 (s. 34) je kalibrační křivka As^{3+} změřená za optimálních podmínek pro stanovení As^{3+}. Dále byla změřena kalibrační křivka As^{3+} za optimálních podmínek pro stanovení As^{5+}. V případě kontaminace zásobního roztoku As^{3+} stopami As^{5+} by tyto stopy byly zredukovány L-cysteinem na As^{3+} a zvýšily by naměřenou absorbanci. Takto získaná kalibrační závislost As^{3+} je v obr. 4.9.



Obr. 4.9 Kalibrační křivka As^{3+} změřená za optimálních podmínek pro stanovení As^{5+}.

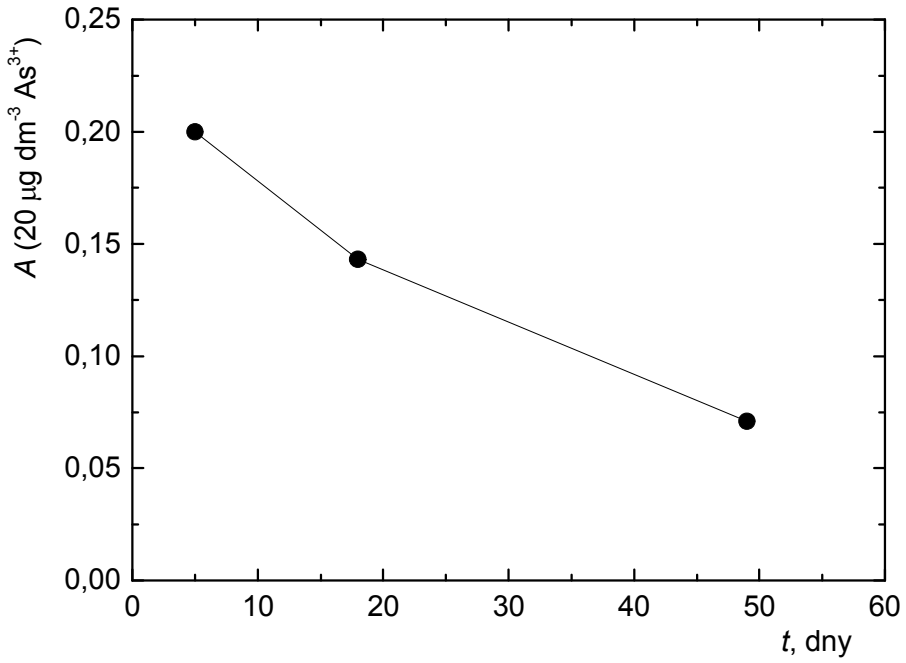
Podmínky měření: Jednopaprskový spektrometr bez korekce pozadí; HCL pro As napájená proudem 10 mA; λ = 193,3 nm; čerpací tygonová hadička o i.d. = 1,02 mm; teflonová reakční cívka o i.d. = 1 mm; teflonová hadička o i.d. = 1,6 mm mezi hydrostatickým separátorem fází s fritou a konvenčním křemenným atomizátorem (T = 950 °C); argon zaváděn za reakční cívku a zároveň přes fritu do separátoru fází o součtové Q = 13,7 cm^3 min^{-1}; Redukce případných kontaminantů As^{5+} na As^{3+} pomocí 1 g dm^{-3} L-cysteinu 5 min ve vroucí vodné lázni, následně 10 min chladnutí; Průtoková rychlost As^{3+}, 118,2 g dm^{-3} TRIS pufru, 1% $NaBH_4$ je 1 cm^3 min^{-1}.

Při porovnání obou grafů je vidět, že signál naměřený pro As^{3+} za optimálních podmínek pro stanovení As^{5+}, tedy s předredukcí L-cysteinem, není ani pro jednu koncentraci As^{3+} vyšší, než signál naměřený pro As^{3+} za optimálních podmínek pro stanovení As^{3+}, tedy bez předredukce L-cysteinem. Tato skutečnost je pro lepší názornost uvedena v tab. 4.2. Jedná se o důkaz, že zásobní roztok As^{3+} není kontaminován stopami As^{5+}. Resp. důkaz, že pevný As_2O_3 použitý pro přípravu zásobního roztoku As^{3+}, není kontaminován stopami As^{5+}.

Tab. 4.2 Porovnání kalibračních bodů As^{3+} změřených bez předredukce L-cysteinem a s ní

c (As^{3+}), μg dm^{-3}	A, bez předredukce	A, s předredukcí
1	0,016	0,011
2,5	0,047	0,047
5	0,066	0,064
10	0,111	0,075
20	0,143	0,087

Nicméně od přípravy zásobního roztoku docházelo s postupem času ke snižování absorbance arsenu vygenerovaného z roztoků o stejné koncentraci As^{3+}. Tento trend nebyl očekáván a vědomě sledován, proto je v obr. 4.10 znázorněn jen několika použitelnými body. Jedná se o absorbanci arsenu vygenerovaného z roztoků o koncentraci 20 μg dm^{-3} As^{3+} v závislosti na stáří zásobního roztoku.



Obr. 4.10 Úbytek As^{3+} vlivem oxidace As^{3+} na As^{5+} v zásobním roztoku 0,5 M HNO_3. Osa y udává pokles absorbance pro uvedený standard v závislosti na době (osa x) uplynuvší od přípravy diskutovaného zásobního roztoku.
Podmínky měření: Jednopaprskový spektrometr bez korekce pozadí; HCL pro As napájená proudem 10 mA; λ = 193,3 nm; čerpací tygonová hadička o i.d. = 1,02 mm; teflonová reakční cívka o i.d. = 1 mm; teflonová hadička o i.d. = 1,6 mm mezi hydrostatickým separátorem fází s fritou a konvenčním křemenným atomizátorem (T = 950 °C); argon zaváděn za reakční cívku a zároveň přes fritu do separátoru fází o součtové Q = 13,7 cm^3 min^{-1}; Průtoková rychlost 20 μg dm^{-3} As^{3+}, 118,2 g dm^{-3} TRIS pufru i 1% $NaBH_4$ je 1 cm^3 min^{-1}.

Postupný pokles absorbance kalibračních roztoků As^{3+} patrný z obr. 4.10 byl podnětem k domněnce, že HNO_3 v zásobním roztoku postupně oxiduje As^{3+} na As^{5+}. Proto byl 49. den od přípravy zásobního roztoku, tedy v den změření posledního bodu vyneseného do obr. 4.10, z tohoto zásobního roztoku připraven kalibrační roztok o teoretické koncentraci 20 μg dm^{-3} As^{3+} a s ním bylo provedeno měření až po předredukci L-cysteinem. Ze třech měření byl určen medián absorbance jako 0,122. Naproti tomu bez předredukce L-cysteinem byla změřena absorbance pro stejně připravený roztok As^{3+} pouze 0,071 (jde o absorbanci uvedenou v obr. 4.10). Vzhledem k dřívějšímu vyloučení kontaminace pevného As_2O_3 stopami As^{5+} je jisté, že 0,5 M HNO_3 tvořící prostředí zásobního roztoku As^{3+}, tento As^{3+} oxiduje na As^{5+}. To, že se v literatuře vyskytuje doporučení uchovávat As^{3+} v HNO_3, je zřejmě způsobeno tím, že

autoři literatury nepočítali se speciační analýzou arsenu a nezáleželo jim na tom, v jakém oxidačním stavu se arsen v roztoku nachází.

Na základě těchto měření byl připraven nový zásobní roztok As^{3+} o koncentraci 1000 mg dm^{-3}, a to v prostředí 0,5 M HCl. Dále bylo rozhodnuto o tom, že také kalibrační roztoky připravované z tohoto zásobního roztoku budou připravovány v 0,5 M HCl, aby se předešlo oxidaci As^{3+} na As^{5+} i v nich.

4.2.2 Kontrola čistoty zásobního roztoku 1000 mg dm^{-3} As^{3+} v 0,5 M HCl

Čistota pevného As_2O_3 již byla potvrzena dříve (viz oddíl 4.2.1), proto bylo provedeno jen jedno jednoduché kontrolní měření. Ze zásobního roztoku As^{3+} v 0,5 M HCl byl připraven kalibrační roztok o koncentraci 10 μg dm^{-3} As^{3+} (taktéž v prostředí 0,5 M HCl) a byla změřena absorbance arsenu z tohoto roztoku vygenerovaného.

Dále byl ze standardu firmy Analytika Praha o koncentraci 1,000 ± 0,002 g/l As ve 2% HNO_3 připraven kalibrační roztok o koncentraci 10 μg dm^{-3} As^{3+} v prostředí 0,5 M HCl. Vzhledem k neznámému oxidačnímu stavu arsenu v tomto standardu a vzhledem k tomu, že prostředím standardu je 2% HNO_3 s oxidačními účinky, byl kalibrační roztok z tohoto standardu připravený zredukován L-cysteinem, jako by šlo o As^{5+}. Poté byla změřena absorbance arsenu z tohoto roztoku vygenerovaného.

Obě změřené absorbance byly srovnatelné. Jedná se o druhý důkaz, že pevný As_2O_3 použitý pro přípravu zásobního roztoku As^{3+}, není kontaminován stopami As^{5+}, a že tedy zásobní roztok As^{3+} není kontaminován stopami As^{5+}.

4.2.3 Kontrola čistoty a stability zásobního roztoku 1000 mg dm^{-3} As^{5+} v 0,5 M HNO_3

Na obr. 4.6 (s. 38) je kalibrační křivka As^{5+} změřená za optimálních podmínek pro stanovení As^{5+}. Dále byly proměřeny všechny body kalibrační křivky As^{5+} za optimálních podmínek pro stanovení As^{3+}. V případě kontaminace zásobního roztoku As^{5+} stopami As^{3+} by tyto stopy poskytovaly signál i bez použití předredukce L-cysteinem. Změřená hodnota absorbance byla ovšem pro všechny body kalibrační křivky nulová. Jedná se o důkaz, že zásobní roztok As^{5+} není kontaminován stopami

As^{3+}. Resp. důkaz, že pevný As_2O_5 použitý pro přípravu zásobního roztoku As^{5+}, není kontaminován stopami As^{3+}.

Na základě těchto měření bylo rozhodnuto, že zásobní roztok As^{5+} o koncentraci 1000 mg dm^{-3} v prostředí 0,5 M HNO_3 bude v diplomové práci i nadále používán. Přesto však bylo rozhodnuto o tom, že kalibrační roztoky připravované z tohoto zásobního roztoku budou nadále připravovány v 0,5 M HCl; tedy stejně jako kalibrační roztoky As^{3+}. A to z důvodu předejití oxidace As^{3+} na As^{5+} po ukončení redukce As^{5+} na As^{3+}.

4.3 Kontrola činnosti TRIS pufru v extrakčních činidlech

Jednou čerpací hadičkou je čerpán TRIS pufr o koncentraci 118,2 g dm^{-3}, a to průtokovou rychlostí 1 cm^3 min^{-1}. Bylo změřeno, že pH takto koncentrovaného TRIS pufru je 3,4.

Další čerpací hadičkou je čerpán 1% $NaBH_4$ v 0,4% KOH či 0,4% NaOH, a to opět průtokovou rychlostí 1 cm^3 min^{-1}. Bylo, změřeno, že pH roztoku vzniklého smísením TRIS pufru a borohydridu o uvedených koncentracích v poměru 1:1 (protože mají stejné průtokové rychlosti), je 7,3. Je třeba ověřit, zda tuto hodnotu příliš nepřevyšuje pH směsi odpovídající svým složením reakční směsi v reakční cívce, tedy směs TRIS pufru s borohydridem a zároveň se vzorkem v extrakčním činidle, a to opět v odpovídajících poměrech. Kyselý TRIS pufr hůře pufruje v alkalické oblasti, a proto bylo změřeno pH směsi pouze s alkalickými činidly a s hydroxylaminem. Výsledné pH směsi s NH_2OH bylo 6,9; pH směsi s Na_2CO_3 bylo 7,7 a pH směsi s KOH bylo 7,6. Porovnáním těchto tří hodnot s hodnotou pH = 7,3 lze usoudit, že extrakční činidla činnost TRIS pufru negativně neovlivňují.

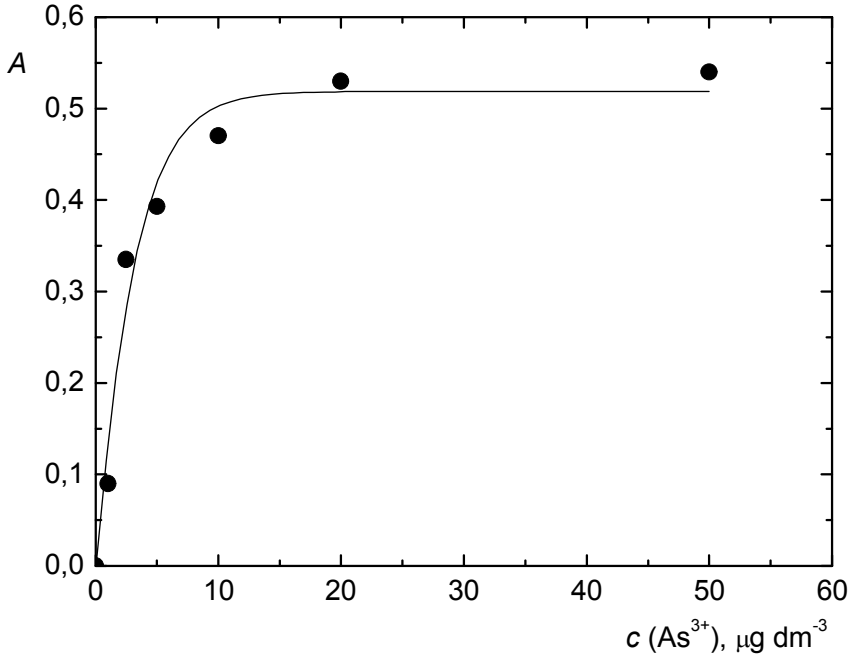
4.4 Vliv extrakčních činidel na stanovení arsenu

Pro všechny následující experimenty byl již používán $NaBH_4$ od firmy Merck. Z uvedených zásobních roztoků As^{3+} o koncentraci 1000 mg dm^{-3} pak nový roztok připravený v 0,5 M HCl. Kalibrační roztoky As^{3+} i As^{5+} byly buď také v prostředí 0,5 M HCl, nebo v extrakčních činidlech. Pokud byly v jiném prostředí, je to uvedeno.

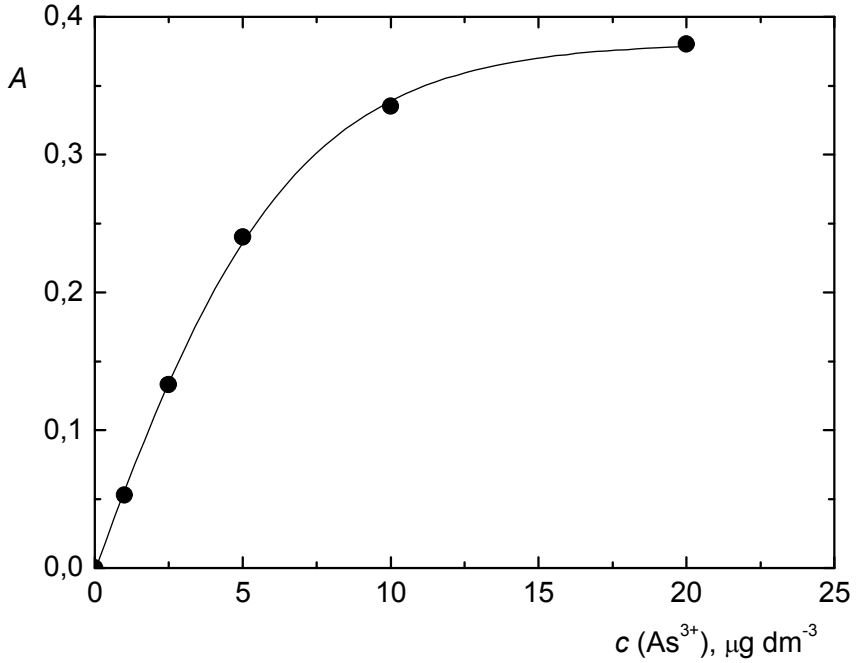
Naprostá většina následujících stanovení jednotlivých standardů byla provedena jen dvakrát. Při práci s extrakčními činidly se totiž ukázalo, že některá z nich velmi výrazně ovlivňují signál arsenu a také ničí součásti používané aparatury včetně atomizátoru. Roztoky arsenu v extrakčních činidlech tedy byly do aparatury zaváděny po minimální nutnou dobu, aby došlo k co nejmenšímu poškození aparatury. Správnost zjištění jejich vlivu na stanovení arsenu jen ze dvou měření je sice omezená, ale větší počet opakování měření by pouze vedl k postupnému snižování signálu, způsobenému postupným narušením aparatury. Navíc v této diplomové práci není potřeba zjistit, jak přesně daná extrakční činidla signál arsenu ovlivňují, stačí zjistit, jestli jej ovlivňují tak, že je jejich použití k extrakci arsenu z pevných materiálů pro účely speciační analýzy nevhodné. Aby byly zajištěny alespoň podobné výchozí podmínky při sledování vlivu jednotlivých činidel, byla vždy po skončení sledování vlivu jednoho konkrétního činidla aparatura rozebrána a vyčištěna. Atomizátor byl promyt kyselinou dusičnou a fluorovodíkovou (po dobu 1h naplněn 7 M HNO_3 a poté po dobu 30 minut naplněn koncentrovanou HF [27]), ostatní součásti aparatury pouze kyselinou dusičnou.

4.4.1 Vliv extrakčních činidel na stanovení As^{3+}

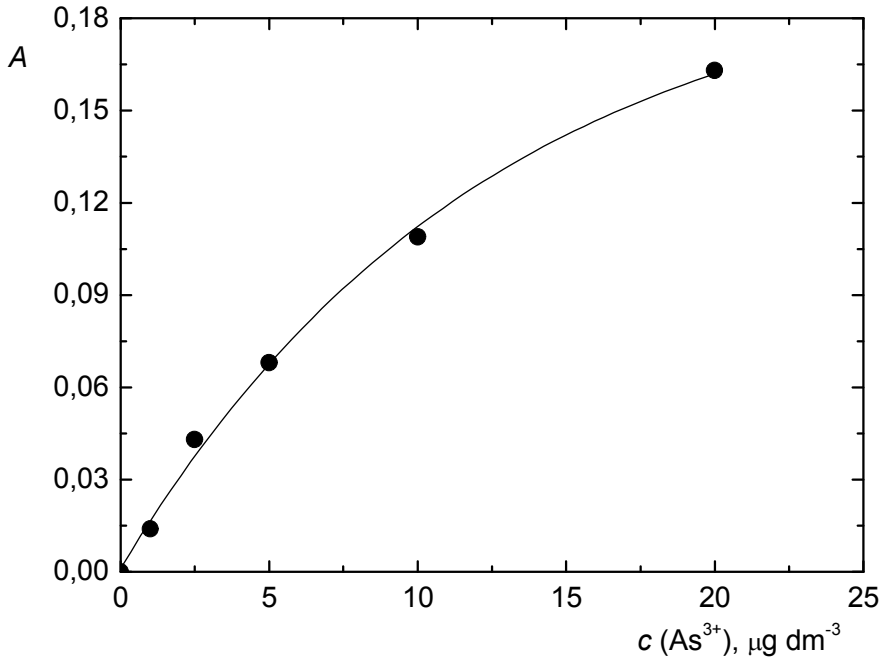
V rozsahu 1 až 50 μg dm^{-3} byla proměřena kalibrační křivka As^{3+} v prostředí 0,5 M HCl, viz obr. 4.11. Dále byly proměřeny kalibrační křivky As^{3+} v kyselých extrakčních činidlech tom pořadí, v jakém jsou uvedeny na obr. 4.12 až 4.14. Z dosažených citlivostí je patrné, že As^{3+} poskytuje v každém použitém činidle nižší signál, než v HCl.



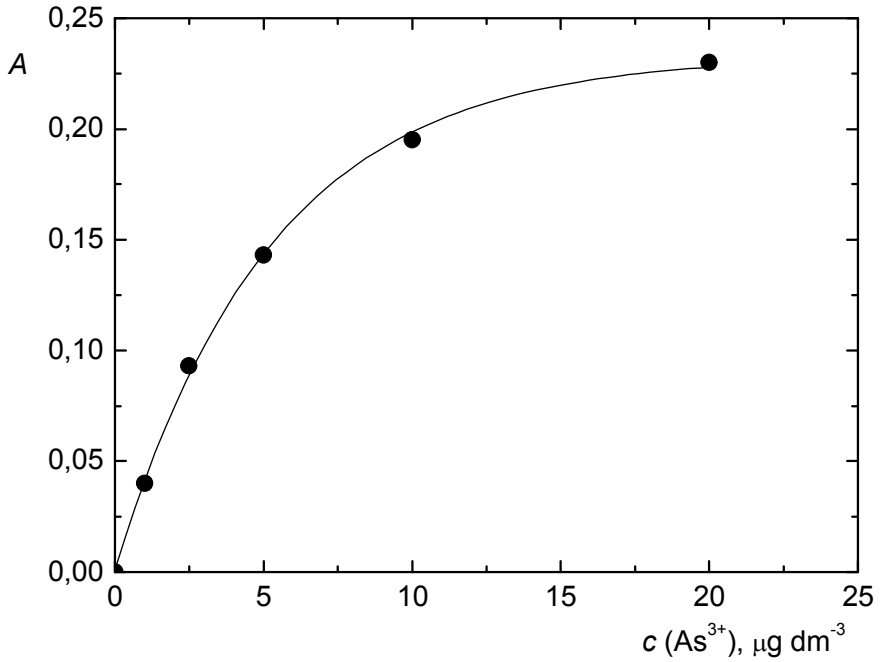
Obr. 4.11 Kalibrace As^{3+} v 0,5 M HCl.



Obr. 4.12 Kalibrace As^{3+} v 0,11 M CH_3COOH.



Obr. 4.13 Kalibrace As^{3+} v 0,1 M NH_2OH.



Obr. 4.14 Kalibrace As^{3+} v 0,1 M CH_3COONH_4.

Podmínky měření závislostí na obr. 4.11 až 4.14: Jednopaprskový spektrometr bez korekce pozadí; HCL pro As napájená proudem 10 mA; λ = 193,3 nm; čerpací tygonová hadička o i.d. = 1,02 mm; teflonová reakční cívka o i.d. = 1 mm; teflonová hadička o i.d. = 1,6 mm mezi hydrostatickým separátorem fází s fritou a konvenčním křemenným atomizátorem (T = 950 °C); argon zaváděn za reakční cívku a zároveň přes fritu do separátoru fází o součtové Q = 13,7 cm^3 min^{-1}; As^{3+} v HCl nebo činidlech o koncentraci uvedené v názvech jednotlivých grafů; Průtoková rychlost As^{3+}, 118,2 g dm^{-3} TRIS pufru i 1% $NaBH_4$ je 1 cm^3 min^{-1}.

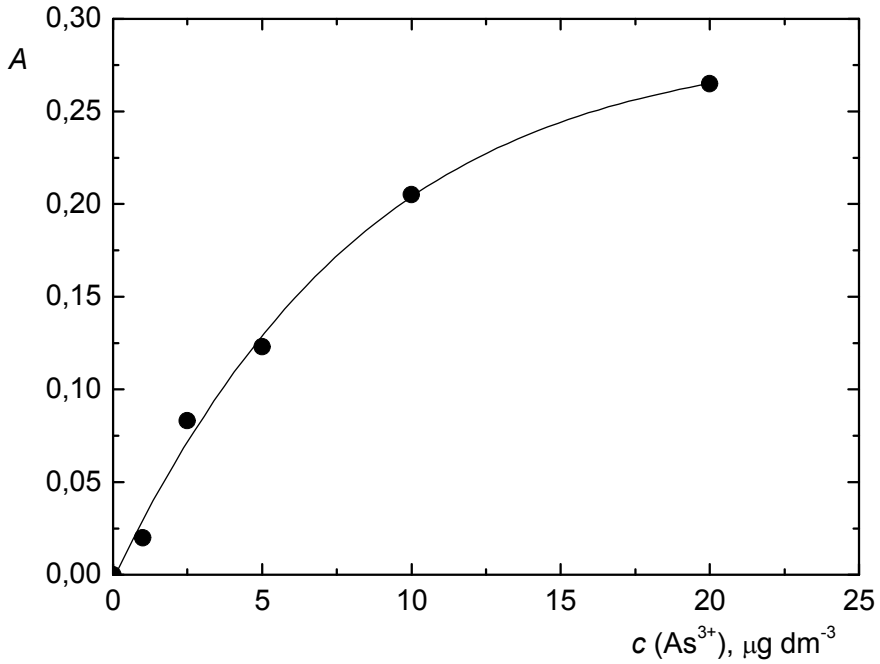
Porovnáním dosažené citlivosti jednotlivých závislostí je patrné, že roztoky As^{3+} připravené v kyselém extrakčním činidle poskytují výrazně nižší signál, než standard připravený pouze v HCl.

V 0,5 M HCl poskytuje 10 μg dm^{-3} As^{3+} signál A = 0,470. Po proměření vlivu těchto vyluhovacích činidel byla opět proměřena kalibrační křivka As^{3+} v samotné 0,5 M HCl. Byla zjištěna výrazně nižší citlivost stanovení, např. pro koncentraci 10 μg dm^{-3} byl naměřen signál pouze A = 0,175. Toto výrazné snížení citlivosti stanovení As^{3+} v 0,5 M HCl po použití kyselých extrakčních činidel vedlo k domněnce, že daná činidla poškozují aparaturu.

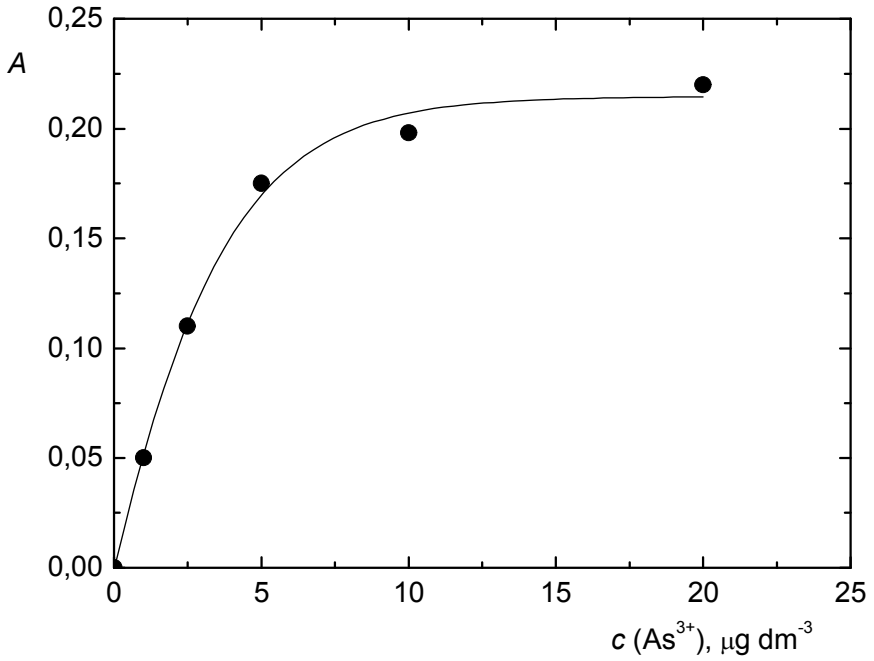
Tím začala několikadenní řada servisních prací, při které byly postupně vyměňovány jednotlivé hadičky a spoje hadiček, měněna poloha separátoru fází tak, aby se zabránilo úniku plynných produktů do odpadu, odstraněn přívod nosného plynu za reakční cívku (viz podkapitola 3.2), opět umyt atomizátor (po dobu 1h naplněn 7 M HNO_3 a poté po dobu 30 minut naplněn koncentrovanou HF [27]), atd.

Vždy po každé dílčí úpravě aparatury byl kontrolován dosažený signál standardu o koncentraci 10 μg dm^{-3} As^{3+} v 0,5 M HCl. Absorbanci se z hodnoty 0,175 podařilo pro daný standard zvýšit pouze na přibližně 0,200. Tato hodnota je sice stále výrazně nižší než 0,470 z obr. 4.11, avšak byla opakovatelná v průběhu několika dní, z čehož vyplývá, že aparatura a přístroj již fungují beze změn v čase a lze je tedy používat.

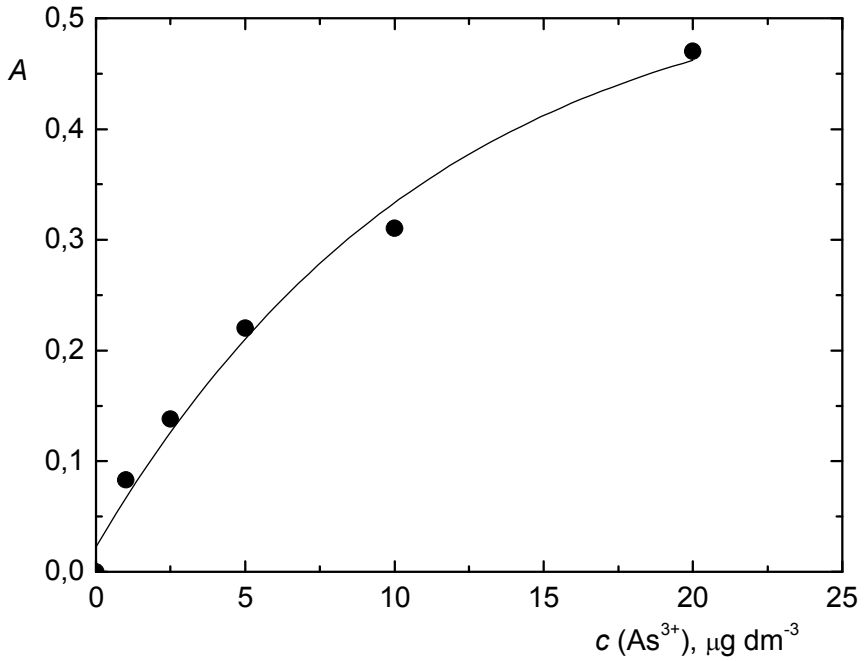
Z obavy před dalším poškozením aparatury kyselými činidly bylo rozhodnuto, že dále budou nejdříve proměřeny kalibrační křivky v zásaditých extrakčních činidlech a až poté opět v činidlech kyselých. Ty je třeba proměřit znovu, protože následující kalibrační křivky v zásaditých činidlech nelze kvůli změněné citlivosti stanovení As^{3+} v 0,5 M HCl s předešlými měřeními v kyselých činidlech srovnat. Všech šest změřených kalibračních závislostí je v následujících grafech v tom pořadí, v jakém byly skutečně naměřeny.



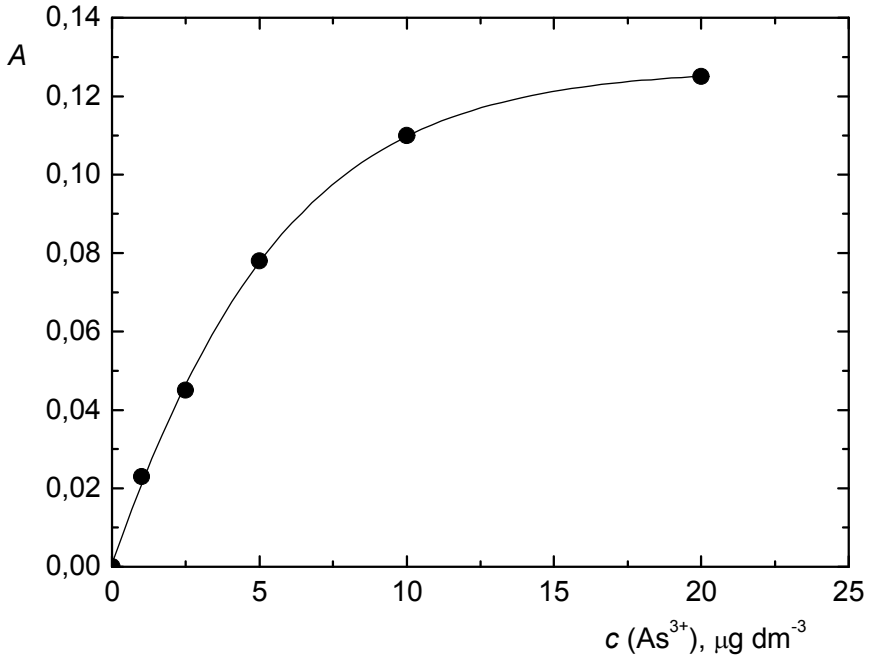
Obr. 4.15 Kalibrace As^{3+} v 0,5 M HCl.



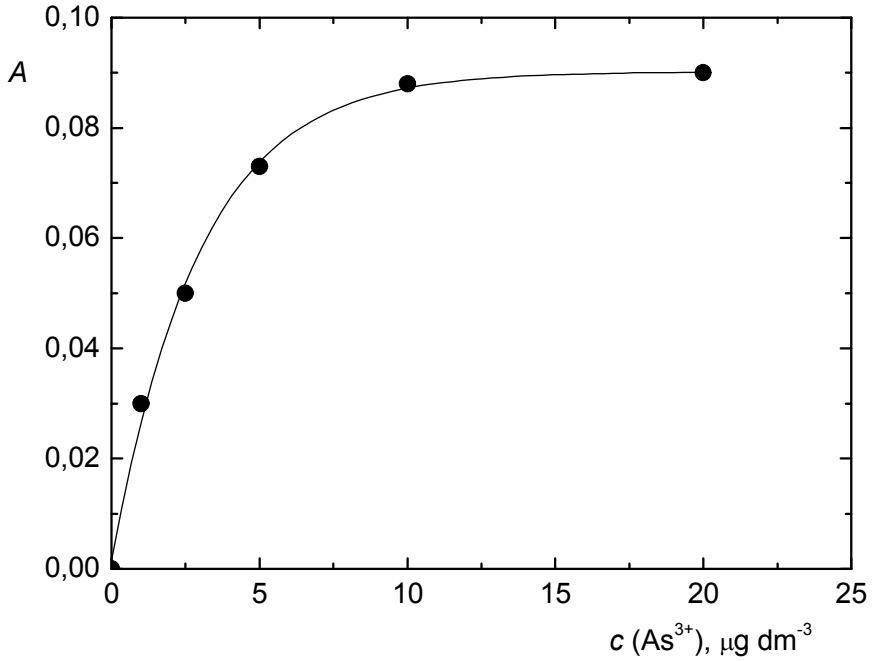
Obr. 4.16 Kalibrace As^{3+} v 0,1 M KOH.



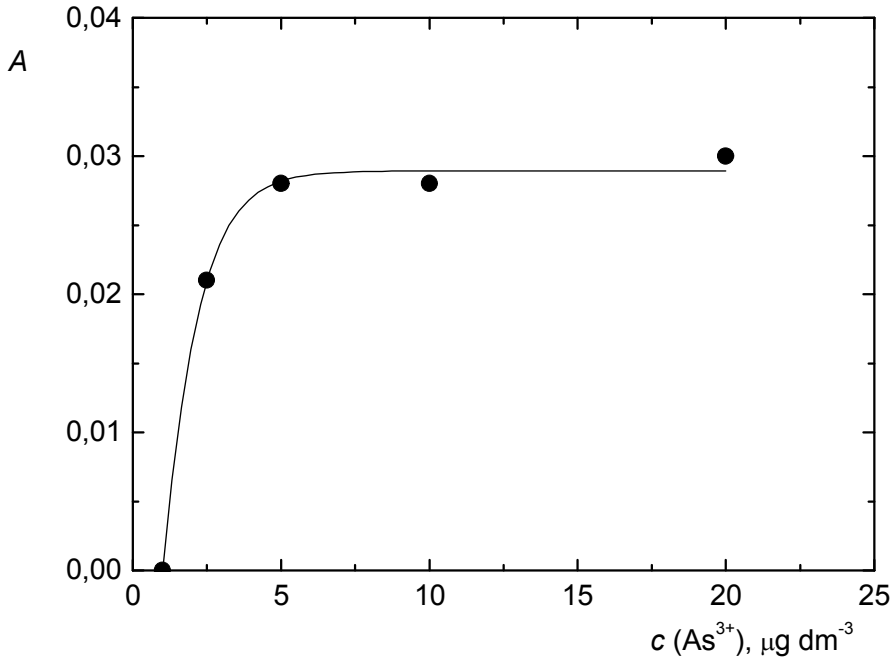
Obr. 4.17 Kalibrace As^{3+} v 0,3 M Na_2CO_3.



Obr. 4.18 Kalibrace As^{3+} v 0,1 M CH_3COONH_4.



Obr. 4.19 Kalibrace As^{3+} v 0,11 M CH_3COOH.



Obr. 4.20 Kalibrace As^{3+} v 0,1 M $NH_2OH \cdot HCl$.

Podmínky měření závislostí na obr. 4.15 až 4.20: Jednopaprskový spektrometr bez korekce pozadí; HCL pro As napájená proudem 10 mA; λ = 193,3 nm; čerpací tygonová hadička o i.d. = 1,02 mm; teflonová reakční cívka o i.d. = 1 mm; teflonová hadička o i.d. = 1,6 mm mezi hydrostatickým separátorem fází s fritou a konvenčním křemenným atomizátorem (T = 950 °C); argon zaváděn do separátoru fází pouze přes fritu, Q = 13,7 cm^3 min^{-1}; As^{3+} v HCl nebo činidlech o koncentraci uvedené v názvech jednotlivých grafů; Průtoková rychlost As^{3+}, 118,2 g dm^{-3} TRIS pufru i 1% $NaBH_4$ je 1 cm^3 min^{-1}.

Porovnáním dosažené citlivosti jednotlivých závislostí je stejně jako v případě obr. 4.11 až 4.14 patrné, že roztoky As^{3+} připravené v kyselém extrakčním činidle poskytují výrazně nižší signál, než standard připravený pouze v HCl.

Naproti tomu v zásaditých extrakčních činidlech je signál As^{3+} srovnatelný se signálem As^{3+} v HCl, přičemž kalibrace v roztoku Na_2CO_3 má dokonce větší lineární dynamický rozsah.

Proměřené závislosti potvrzují, že kyselá extrakční činidla nejsou pro stanovení As^{3+} vhodná, kdežto zásaditá činidla ano. Obecně je tedy možné říci, že kyselá extrakční činidla není možné použít pro speciační analýzu arsenu s použitím techniky selektivního generování hydridů ve spojení s QF-AAS detekcí.

Mezi jednotlivými kalibračními křivkami byl měřen kontrolní vzorek As^{3+} v 0,5 M HCl, konkrétně o koncentraci 10 µg dm^{-3} As^{3+}. Na obr. 4.15 tento standard poskytl signál A = 0,205. Měření As^{3+} v alkalických extrakčních činidlech tento signál nesnižovalo, avšak po změření každé ze tří kalibračních křivek As^{3+} v kyselých extrakčních činidlech signál kontrolního vzorku poklesl o několik desítek procent. Nelze tedy s úplnou správností říci, že signál As^{3+} v jednotlivých kyselých činidlech je tolikrát nižší, kolikrát nižší absorbance v nich byla naměřena ve srovnání s absorbancí naměřenou na obr. 4.15, protože kdyby byla po každém použití kyselého činidla změřena znovu celá kalibrační křivka As^{3+} v 0,5 M HCl, měla by stále nižší a nižší směrnici ve srovnání s obr. 4.15. Nelze tedy přesně říci, jak moc kyselá činidla stanovení As^{3+} ruší, ale s jistotou lze říci, že jej ruší a že ničí používanou aparaturu. Pro extrakci arsenu z pevných materiálů jsou tedy v doporučovaných koncentracích naprosto nepoužitelná a v této diplomové práci už s nimi nadále vůbec nebylo pracováno.

Jak bylo uvedeno na s. 47, téměř každý standard byl změřen právě dvakrát. Kyselá činidla byla tři a průběh kalibračních křivek As^{3+} v těchto činidlech je na obr. 4.18 až 4.20. Kalibrační křivky z obr. 4.18 a 4.19 mají šest bodů. Na křivce z obr. 4.20

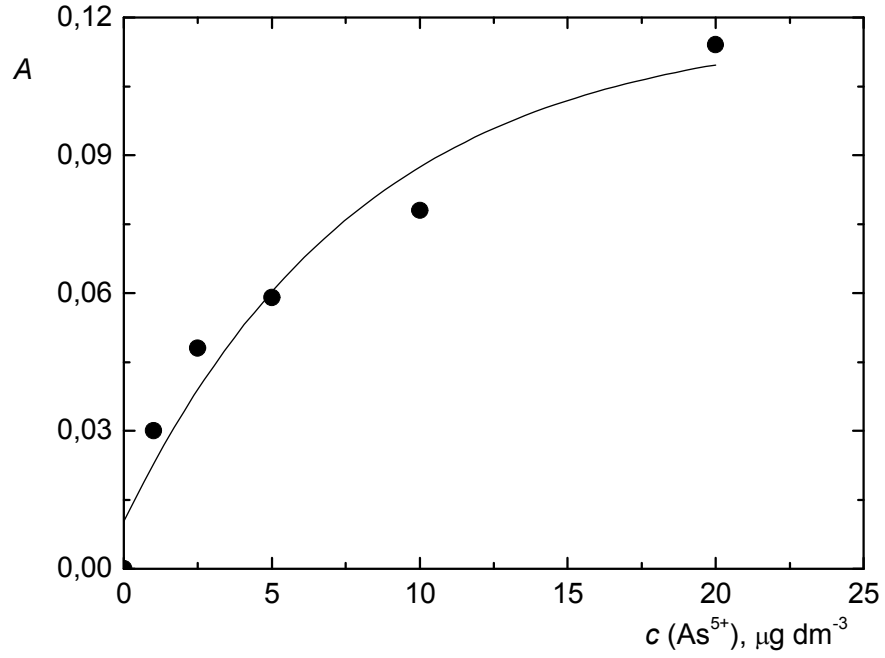
je zobrazeno pouze 5 bodů, protože hydroxylamin negativně ovlivňuje citlivost stanovení As^{3+} natolik, že již koncentrace 1 μg dm^{-3} As^{3+} neposkytuje žádný signál, avšak samozřejmě i v tomto případě byl měřen slepý vzorek obsahující nulovou koncentraci As^{3+}. Šest kalibračních bodů bylo tedy změřeno i v případě křivky z obr. 4.20, ač jich je zobrazeno pouze pět. Celkem tedy bylo změřeno 36 vzorků As^{3+} v kyselých extrakčních činidlech (3 činidla x 2 měření x 6 kalibračních bodů). Těchto 36 experimentů s kyselými činidly snížilo původní signál 10 μg dm^{-3} As^{3+} v 0,5 M HCl z A = 0,205 na přibližně A = 0,040. Opět tedy nastala několikadenní řada servisních prací obdobných těm předešlým. Především byl umyt atomizátor kyselinou dusičnou a fluorovodíkovou. Signál se tak povedlo zvýšit na přibližně A = 0,060. Při takto nízkém signálu pro 10 μg dm^{-3} As^{3+} v 0,5 M HCl nelze smysluplně pokračovat v měření. Vzhledem k nepříliš velkému efektu servisních prací byl vyměněn atomizátor za zcela nový. Pro standard 10 μg dm^{-3} As^{3+} v 0,5 M HCl byl naměřen signál A = 0,240. Takový radikální nárůst absorbance s novým atomizátorem je důkazem, že kyselá extrakční činidla trvale poškozují funkčnost atomizátoru.

Pro další měření tedy byly používány z vyluhovacích činidel již jen alkalická činidla a byl používán pouze nový atomizátor. Opět tedy platí, že dosavadní měření se s těmi následujícími nedají porovnávat, protože aparatura pro HG-AAS má s jiným atomizátorem jinou citlivost stanovení. Tím však platnost a užitečnost předešlých ani následujících měření není nijak ovlivněna, protože v této práci nejde o porovnání vlivu extrakčních činidel na stanovení As^{3+} s vlivem extrakčních činidel na stanovení As^{5+}, ale o zjištění, zda takový vliv vůbec existuje a jestli je závažný.

4.4.2 Vliv alkalických extrakčních činidel na stanovení As^{5+}

V rozsahu 1 až 20 μg dm^{-3} byla proměřena kalibrační křivka standardů As^{5+} připravených v prostředí 0,5 M HCl, viz obr. 4.21. Dále byly proměřeny kalibrační křivky As^{5+} v obou alkalických extrakčních činidlech. I v tomto případě byl mezi jednotlivými kalibračními křivkami měřen kontrolní vzorek 10 μg dm^{-3} As^{3+} v 0,5 M HCl. Jednotlivé absorbance kontrolního vzorku nevykazovaly statisticky významné odchylky. Tím je opět potvrzeno, že alkalická extrakční činidla aparaturu ani atomizátor

nepoškozují a také je to důkazem toho, že diskutované tři kalibrace lze navzájem porovnávat.



Obr. 4.21 Kalibrace As^{5+} v 0,5 M HCl.
Podmínky měření: Jednopaprskový spektrometr bez korekce pozadí; HCL pro As napájená proudem 10 mA; λ = 193,3 nm; čerpací tygonová hadička o i.d. = 1,02 mm; teflonová reakční cívka o i.d. = 1 mm; teflonová hadička o i.d. = 1,6 mm mezi hydrostatickým separátorem fází s fritou a konvenčním křemenným atomizátorem (T = 950 °C); argon zaváděn do separátoru fází pouze přes fritu, Q = 13,7 cm^3 min^{-1}; Redukce As^{5+} na As^{3+} pomocí 1 g dm^{-3} L-cysteinu 5 min ve vroucí vodné lázni, následně 10 min chladnutí; Průtoková rychlost As^{5+}, 118,2 g dm^{-3} TRIS pufru i 1% $NaBH_4$ je 1 cm^3 min^{-1}.

Při použití alkalických vyluhovacích činidel jako prostředí pro As^{5+} nebylo signálu z obr. 4.21 dosaženo a v těchto činidlech naměřené kalibrační závislosti svým tvarem kalibrační závislost ani nepřipomínaly. Nejvyšší naměřená hodnota absorbance pro As^{5+} v 0,1 M KOH byla A = 0,041 (pro As^{5+} o koncentraci 2,5 μg dm^{-3}). Nejvyšší naměřená hodnota absorbance pro As^{5+} v 0,3 M Na_2CO_3 byla A = 0,073 (pro As^{5+} o koncentraci 20 μg dm^{-3}).

Tyto signály jsou výrazně nižší než absorbance pro stejnou koncentraci As^{5+} v 0,5 M HCl. Zdá se tedy, že použití alkalických činidel pro vyluhování As^{5+} z pevných materiálů je také nevhodné. Aby se tato domněnka potvrdila nebo vyvrátila, bylo nutné

zkusit alespoň jeden bod kalibračních křivek As^{5+} v HCl i v extrakčních činidlech změřit nějakým alternativním způsobem. Byla vyzkoušena předredukce 15% KI v 6 M HCl za teploty přibližně 70 °C po dobu 15 minut. Postupně byly připraveny tři kalibrační roztoky As^{5+}. Jeden v 0,5 M HCl, druhý v 0,1 M KOH a třetí v 0,3 M Na_2CO_3. Poté byl ke každému roztoku přidán roztok KI v HCl tak, aby vznikl roztok As^{5+} o koncentraci 10 μg dm^{-3} v prostředí 15% KI v 6 M HCl. Každý takto připravený roztok byl přesně 15 minut umístěn ve vodné lázni o teplotě přibližně 70 °C. Následně byl 10 minut ponechán za laboratorní teploty a poté změřen. Takto byly postupně zpracovány a proměřeny všechny tři vzorky. I v tomto případě byl signál získaný pro As^{5+} v obou alkalických činidlech výrazně nižší, než signál získaný pro As^{5+} v HCl. A to sice přibližně poloviční. Alkalická vyluhovací činidla se tedy opět ukázala pro extrakci As^{5+} z pevných materiálů nepoužitelná.

4.4.3 Shrnutí vlivu extrakčních činidel na speciační analýzu arsenu

Kyselá extrakční činidla v používaných koncentracích velmi výrazně snižují absorbanci As^{3+} a trvale poškozují funkčnost měřící aparatury. Proto nebyla na roztocích As^{5+} ani vyzkoušena. Alkalická extrakční činidla v používaných koncentracích absorbanci As^{3+} nesnižují, ale výrazně snižují absorbanci arsenu vygenerovaného z roztoků As^{5+}. Nabízí se tedy možnost extrahovat As^{3+} z pevných materiálů alkalickými činidly a As^{5+} nějak jinak. Potíž by ovšem byla v tom, že každý extrakční postup by vyextrahoval z pevného materiálu jiný podíl arsenu a tak by následně stanovené frakce As^{3+} a As^{5+} nebyly srovnatelné. Speciační analýza arsenu by tedy touto cestou umožněna nebyla. Obě formy arsenu je bezpodmínečně nutné extrahovat stejným postupem. Druhá možnost je tedy vyzkoušení nižších koncentrací alkalických činidel, př. vyzkoušení úplně jiných činidel. Metoda postupné extrakce kovů z půdních materiálů je ovšem standardizovaná a nelze ji měnit. Lze ji pouze nepoužít. Ač by tedy třeba jiná extrakční činidla či stávající alkalická činidla v nižších koncentracích byla pro extrakci arsenu z pevných materiálů s následnou speciační analýzou arsenu použitelná, pro účely stanovení As^{3+} a As^{5+} v prachových a půdních vzorcích v této diplomové práci bylo rozhodnuto, že z nich může být arsen extrahován pouze deionizovanou vodou.

4.5 Rozdíly v absorbanci stejných standardů

Porovnáním signálů změřených pro totožné standardní roztoky v různých grafech lze mnohdy spatřit výraznou odlišnost. Např. na obr. 4.2 (s. 33) má 10 μg dm^{-3} As^{3+} v prostředí 0,02 M HNO_3 signál A = 0,193, kdežto na obr. 4.3 (s. 34) poskytuje stejný standard signál A = 0,111. Dále třeba na obr. 4.11 (s. 48) má 10 μg dm^{-3} As^{3+} v prostředí 0,5 M HCl signál hodnotu A = 0,470, kdežto o pár dní později poskytl čerstvě připravený stejný standard signál A = 0,175 (viz s. 50). Některé příčiny tohoto jevu již byly diskutovány. Spolu s ostatními jsou na následujících řádcích seřazeny podle pravděpodobné klesající důležitosti.

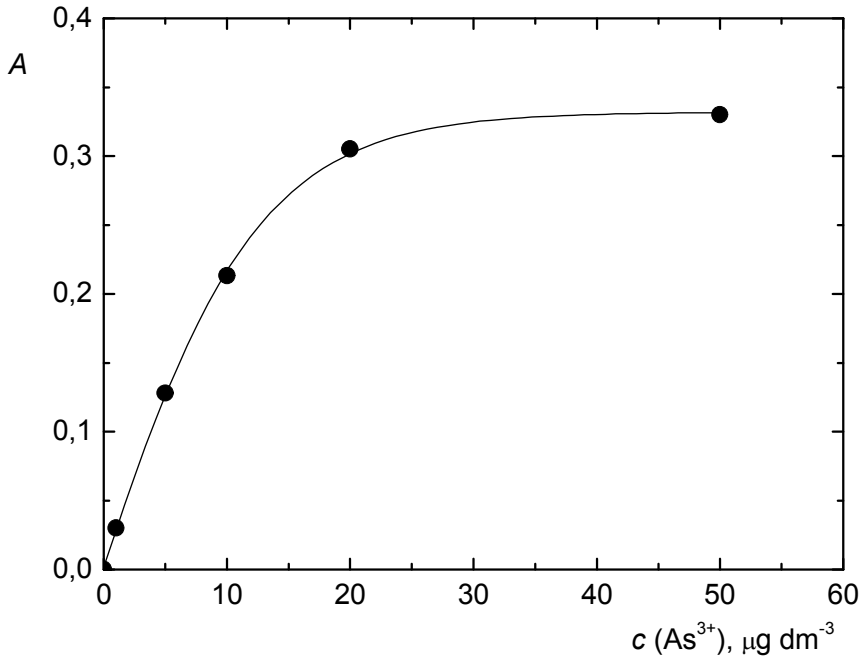
- Především během optimalizačních prací se zásobní roztok As^{3+} nacházel v oxidačním prostředí 0,5 M HNO_3 a kalibrační roztoky As^{3+} i As^{5+} v prostředí 0,02 M HNO_3. Kvůli tomu optimalizační experiment sice poskytl důvěryhodnou informaci o tom, jaká je optimální hodnota zkoumané proměnné podmínky, ale nemohl poskytnout informaci o jejím absolutním vlivu na hodnotu absorbance. Při případném vykonání stejného optimalizačního experimentu v jiný den by informace o tom, jaká je optimální hodnota zkoumané proměnné podmínky, byla stejná, ale všechny naměřené hodnoty absorbance by byly jiné. Protože by se však změnily všechny stejně, jsou závěry vyvozené z optimalizačních experimentů důvěryhodné. Následně se již zásobní roztok As^{3+} nacházel v redukčním prostředí 0,5 M HCl a kalibrační roztoky As^{3+} i As^{5+} taktéž.
- Kyselá extrakční činidla postupně snižovala funkčnost atomizátoru. O tomto jevu i o jeho eliminaci je podrobně pojednáno v podkapitole 4.4.
- Začátkem práce byly používány dvě starší výbojky s dutou katodou, které neměly v čase stabilní světelný tok. Proto byla zakoupena nová výbojka s dutou katodou. Začala být používána až při zkoumání vlivu extrakčních činidel na stanovení arsenu (podkapitola 4.4).
- Během experimentální práce si spektrometr vyžádal zásah servisního technika, po kterém vykazoval pro danou koncentraci arsenu vyšší a opakovatelnější absorbanci. K tomuto zásahu došlo taktéž před začátkem zkoumání vlivu extrakčních činidel na stanovení arsenu (podkapitola 4.4).

4.6 Speciační analýza arsenu v reálných vzorcích

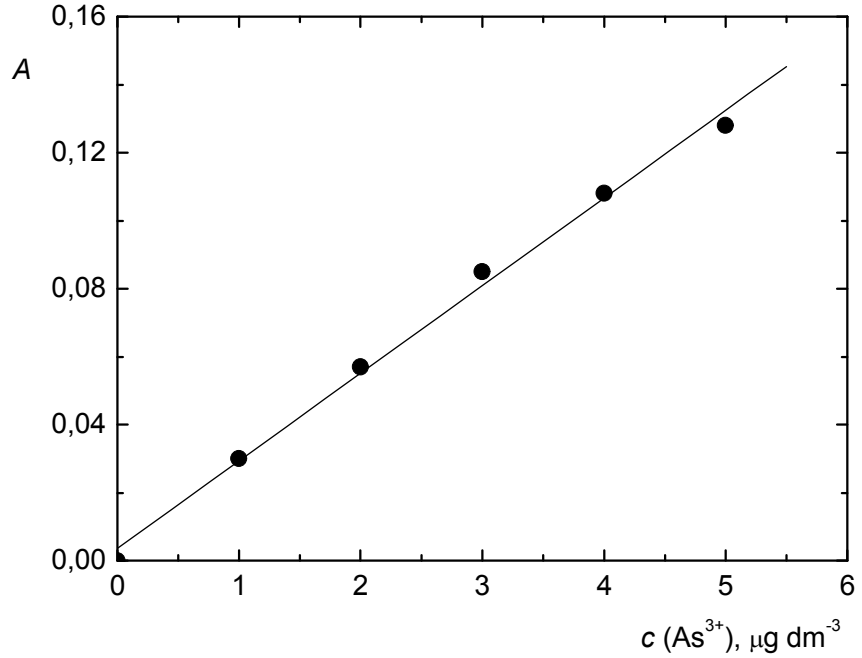
Veškeré kalibrační roztoky z následujících experimentů byly připravovány ze zásobních roztoků As^{3+} v 0,5 M HCl a As^{5+} v 0,5 M HNO_3. Po rysku byly doplňovány vodou, protože i arsen byl později z pevných vzorků extrahován vodou.

4.6.1 Kalibrace a analytické parametry pro stanovení obsahu As^{3+}

Nejprve byla naměřena kalibrační křivka s větším rozsahem koncentrací a poté s nižším rozsahem koncentrací pro určení LOD a LOQ. Obě křivky jsou na obr. 4.22 a 4.23.



Obr. 4.22 Kalibrační křivka pro stanovení As^{3+} ve vodě metodou HG-AAS.



Obr. 4.23 Kalibrační přímka pro stanovení LOD a LOQ As^{3+} ve vodě pro metodu HG-AAS.

Podmínky měření závislostí na obr. 4.22 a 4.23: Jednopaprskový spektrometr bez korekce pozadí; HCL pro As napájená proudem 10 mA; λ = 193,3 nm; čerpací tygonová hadička o i.d. = 1,02 mm; teflonová reakční cívka o i.d. = 1 mm; teflonová hadička o i.d. = 1,6 mm mezi hydrostatickým separátorem fází s fritou a konvenčním křemenným atomizátorem (T = 950 °C); argon zaváděn do separátoru fází pouze přes fritu, Q = 13,7 cm^3 min^{-1}; As^{3+} v deionizované vodě; Průtoková rychlost As^{3+}, 118,2 g dm^{-3} TRIS pufru i 1% $NaBH_4$ je 1 cm^3 min^{-1}.

Podle kalibrační křivky z obr. 4.22 nebyly vyhodnocovány žádné vzorky, protože se později při jejich měření ukázalo, že obsahují tak nízké koncentrace As^{3+}, že pro jeho stanovení postačuje kalibrační přímka z obr. 4.23 původně určená pouze pro stanovení hodnoty LOD a LOQ As^{3+}. Tato přímka má následující regresní rovnici, ve které A je absorbance, c je koncentrace analytu ve vzorku v jednotkách μg dm^{-3} a R je korelační koeficient:

$$A = 0{,}0258 \cdot c + 0{,}0036 \qquad (4.1)$$
$$R = 0{,}9976$$

Standard o koncentraci 1 μg dm^{-3} As^{3+} byl změřen 10x a pomocí rovnic (3.1), (3.2) a (4.1) byly z těchto měření spočítány hodnoty LOD a LOQ:

LOD = 0,265 μg dm^{-3} (4.2)

$$LOQ = 0{,}885\ \mu g\ dm^{-3} \quad (4.3)$$

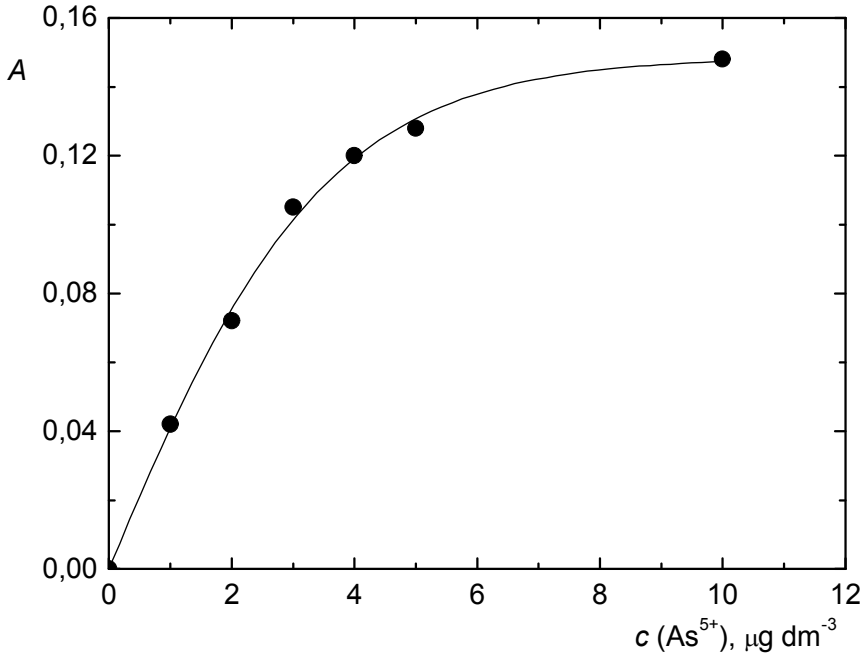
Standard o koncentraci 10 μg dm^{-3} As^{3+} byl změřen 10x a pomocí rovnice (3.3) byla z těchto měření spočítána hodnota opakovatelnosti:

$$O = 4{,}24\ \% \quad (4.4)$$

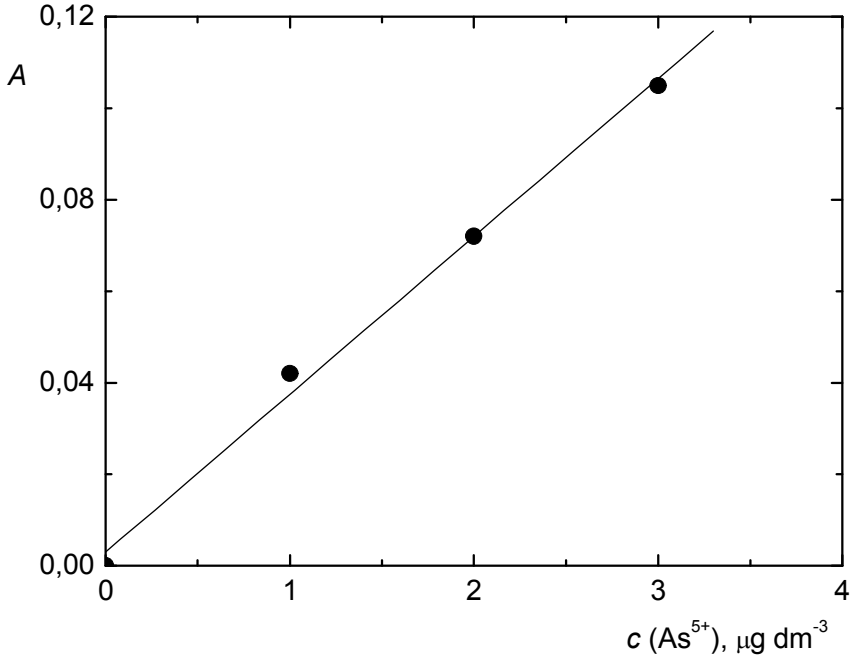
Pro zjištění časové stability byl standard o koncentraci 20 μg dm^{-3} As^{3+} měřen v období 5 dnů pravidelně každých 24 hodin. Mezi jednotlivými měřeními byl uchováván v uzavřené nádobě v lednici. Ionty As^{3+} mohou být oxidovány vzdušným kyslíkem a proto u vzorků obsahujících As^{3+} nelze očekávat příliš velkou časovou stabilitu. Právě z tohoto důvodu byl standard v onom 5-ti denním období měřen denně. Signál se v průběhu těchto měření ovšem neměnil, čímž byla prokázána jeho časová stabilita po dobu 5 dní v uzavřené nádobě v lednici. Jak bylo uvedeno v podkapitole 3.3 (s. 28), kalibrační roztoky byly v lednici uchovávány max. 4 dny, tedy po dobu, kdy se jejich složení zcela určitě nemění.

4.6.2 Kalibrace a analytické parametry pro stanovení obsahu As^{5+}

Nejprve byla naměřena kalibrační křivka s větším rozsahem koncentrací a poté s nižším rozsahem koncentrací pro určení LOD a LOQ. Obě křivky jsou na obr. 4.24 a 4.25.



Obr. 4.24 Kalibrační křivka pro stanovení As^{5+} ve vodě metodou HG – AAS.



Obr. 4.25 Kalibrační přímka pro stanovení LOD a LOQ As^{5+} ve vodě pro metodu HG-AAS.

Podmínky měření závislostí na obr. 4.24 a 4.25: Jednopaprskový spektrometr bez korekce pozadí; HCL pro As napájená proudem 10 mA; λ = 193,3 nm; čerpací tygonová hadička o i.d. = 1,02 mm; teflonová reakční cívka o i.d. = 1 mm; teflonová hadička o i.d. = 1,6 mm mezi hydrostatickým separátorem fází s fritou a konvenčním křemenným atomizátorem (T = 950 °C); argon zaváděn do separátoru fází pouze přes fritu, Q = 13,7 cm^3 min^{-1}; As^{5+} v deionizované vodě; Redukce As^{5+} na As^{3+} pomocí 1 g dm^{-3} L-cysteinu 5 min ve vroucí vodné lázni, následně 10 min chladnutí; Průtoková rychlost As^{5+}, 118,2 g dm^{-3} TRIS pufru, 1% $NaBH_4$ je 1 cm^3 min^{-1}.

Podle kalibrační křivky z obr. 4.24 nebyly vyhodnocovány žádné vzorky, protože se později při jejich měření ukázalo, že obsahují koncentrace As^{5+} nacházející se pod hodnotou LOD. Kalibrační přímka z obr. 4.25 má následující regresní rovnici, ve které A je absorbance, c je koncentrace analytu ve vzorku v jednotkách μg dm^{-3} a R je korelační koeficient:

$$A = 0{,}0345 \cdot c + 0{,}003 \qquad (4.5)$$
$$R = 0{,}9974$$

Standard o koncentraci 1 μg dm^{-3} As^{5+} byl změřen 10x a pomocí rovnic (3.1), (3.2) a (4.5) byly z těchto měření spočítány hodnoty LOD a LOQ:

LOD = 0,466 μg dm^{-3} (4.6)

LOQ = 1,553 μg dm^{-3} (4.7)

Standard o koncentraci 5 μg dm^{-3} As^{5+} byl změřen 10x a pomocí rovnice (3.3) byla z těchto měření spočítána hodnota opakovatelnosti:

O = 6,11 % (4.8)

Standard o nižší koncentraci As^{5+} ve srovnání se standardem As^{3+} byl pro stanovení opakovatelnosti použit z důvodu dřívějšího zakřivování kalibrační závislosti. Ze stejného důvodu mají obě kalibrační křivky pro As^{5+} menší koncentrační rozsah. Pro vytvoření kalibrační přímky obr. 4.25 by jistě bylo vhodné naměřit více bodů, např. standardy o koncentracích 1,5 a 2,5 μg dm^{-3} As^{5+}. Avšak prvně byly změřeny kalibrace v takovém rozsahu, v jakém jsou zde prezentovány, s tím, že pak budou provedeny analýzy vzorků a následně se kalibrace doměří v oblastech, ve kterých to bude potřeba. Následně se analýzou vzorků zjistilo, že je v nich koncentrace As^{5+} nižší než LOD (viz oddíl 4.6.3). Kalibrace pro vzorky obsahující As^{5+} tedy nebyly potřeba a nebylo nutné doměřovat žádné další body.

Pro zjištění časové stability byl standard o koncentraci 10 mg dm^{-3} As^{5+} v období 5 dnů uchováván v uzavřené nádobě v lednici a v den první, druhý a pátý z něj byl připraven standard o koncentraci 5 μg dm^{-3} As^{5+}. Poté byla pro daný standard změřena hodnota absorbance. Ionty As^{5+} jsou v roztoku stabilnější než ionty As^{3+}, proto nebyl standard As^{5+} měřen denně, jako tomu bylo v případě standardu As^{3+}. Standard o nižší koncentraci As^{5+} (5 μg dm^{-3}) ve srovnání se standardem As^{3+} (10 μg dm^{-3}) byl pro zjištění časové stability měřen z důvodu dřívějšího zakřivování kalibrační závislosti. Byl však denně vytvářen ze standardu o vyšší koncentraci As^{5+} (10 mg dm^{-3}) ve srovnání s používaným standardem As^{3+} (10 μg dm^{-3}), což bylo z toho důvodu, že roztok As^{5+} obsahuje po použití L-cystein a L-cystin o celkové koncentraci 1 g dm^{-3} a takový roztok již není druhý den použitelný. Je třeba z vyšší koncentrace připravit roztok nový. Proto byl pro zjištění časové stability vodných roztoků obsahujících As^{5+} testován standard o koncentraci 10 mg dm^{-3} As^{5+} uvedeným způsobem, a ne standard o koncentraci 10 μg dm^{-3}, jako tomu bylo v případě standardu As^{3+}. Signál se v průběhu těchto měření neměnil, čímž byla prokázána časová stabilita testovaného standardu po dobu 5 dní v uzavřené nádobě v lednici. Jak bylo uvedeno v podkapitole 3.3 (s. 28), kalibrační roztoky byly v lednici uchovávány max. 4 dny, tedy po dobu, kdy se jejich složení zcela určitě nemění.

4.6.3 Speciační analýza arsenu ve vzorcích polétavého prachu a půdy

Vzorek prachu či půdy byl navážen v odměrné baňce a převrstven deionizovanou vodou, do níž byl arsen ze vzorku extrahován ultrazvukem po dobu 60 minut při teplotě 70 °C. Následně byl pro slehnutí pevných částic centrifugován při 4000 otáčkách za minutu po dobu 10 minut. Poté byl výluh nad sedlinou slit do čisté a suché skleněné nádoby vhodného objemu. V této nádobě připravený extrakt byl použit pro stanovení As^{3+} i As^{5+}. Výsledek všech stanovení je v tab. 4.3.

Tab. 4.3 Souhrn výsledků speciační analýzy výluhů reálných vzorků metodou HG-AAS

Popis vzorku	Navážka vzorku, mg	Objem odměrné baňky, cm^3	c (As^{3+}), $\mu g\ dm^{-3}$	c (As^{5+}), $\mu g\ dm^{-3}$
< 0,025 mm*	250,70	25,00	< LOQ	< LOD
< 0,063 mm*	254,43	25,00	1,043	< LOD
0,063 - 0,119 mm*	253,80	25,00	0,926	< LOD
0,119 - 0,507 mm*	252,76	25,00	1,120	< LOD
půda řeky Litávky	1 056,10	50,00	2,109	-

* velikost prachových částic v dané frakci

Mezi jednotlivými vzorky byl měřen i standard As^{3+} o koncentraci 20 $\mu g\ dm^{-3}$. Odezva spektrometru na tento roztok postupně klesala a tak musel být několikrát umyt atomizátor. Ukázalo se tak, že výluhy pevných vzorků zřejmě obsahují vysoké koncentrace různých látek, které poškozují aparaturu a komplikují stanovení podobně jako kyselá extrakční činidla. Z tohoto důvodu a také proto, že v extraktu půdy řeky Litávky došlo při ohřevu s L-cysteinem ve vodní lázni k vysrážení rozpuštěných látek, nebyla v tomto výluhu provedena analýza As^{5+}. Závěrem je jednak to, že As^{5+} nemůže být v extraktech některých pevných vzorků předredukován za horka a pak především to, že analyzovat neředěné zasolené extrakty pevných materiálů metodou AAS není dlouhodobě možné. Pro tyto analýzy je třeba zvolit nějakou robustnější metodu, např. ICP-MS nebo ICP-AES.

Speciační analýza vyžaduje zachování jednotlivých forem analytu i během jeho extrakce z pevných vzorků. Čili extrakční činidla musí mít co nejnižší iontovou sílu, aby jimi jednotlivé formy arsenu nebyly nijak ovlivněny. Na druhou stranu účinná extrakce vyžaduje použití extrakčních činidel o co nejvyšší iontové síle. Vzhledem k použití deionizované vody pro extrakci arsenu z pevných vzorků je pochopitelné, že většina provedených analýz nevedla k výsledku nad LOQ. Dvě možná řešení byla navrhnuta v oddíle 4.4.3. Buď vyzkoušení nižších koncentrací alkalických vyluhovacích činidel KOH a Na_2CO_3 nebo vyzkoušení úplně jiných činidel. Další možnost je použít pro stanovení jinou, citlivější metodu, např. HG-AAS s kolekcí vymrazováním (srov. [17, s. 7] s [18, s. 148]) nebo ICP-MS [23, s. 88].

5 ZÁVĚR

Kyselé roztoky 0,11 M CH_3COOH, 0,1 M $NH_2OH \cdot HCl$ a 1 M CH_3COONH_4 a alkalické roztoky 0,1 M KOH a 0,3 M Na_2CO_3 jsou v praxi používány pro extrakci arsenu z pevných přírodních materiálů, jako jsou vzorky půdy a prachu. V této práci byl zkoumán vliv těchto činidel na speciační analýzu arsenu metodou HG-AAS. Postupně byly zjištěny následující informace:

Všechna kyselá činidla výrazně snižují citlivost stanovení As^{3+}. Dále kyselá činidla poškozují aparaturu, a proto bylo od jejich používání v této práci upuštěno. Alkalická činidla citlivost stanovení As^{3+} nesnižují, ale snižují citlivost stanovení As^{5+}. V daných koncentracích jsou tedy i alkalická činidla pro extrakci arsenu z pevných přírodních materiálů pro účely speciační analýzy arsenu nepoužitelná. Z reálných vzorků prachu a půdy, ve kterých měla být v rámci této diplomové práce provedena speciační analýza arsenu, byl tedy arsen extrahován deionizovanou vodou. Pouze čtyři z deseti výsledků byly nad hodnotou LOQ.

Na základě těchto zjištěných informací lze do budoucna navrhnout následující možnosti:

- Extrahovat arsen z pevných přírodních materiálů deionizovanou vodou a speciační analýzu provést citlivější metodou, než je HG-AAS s přímým přenosem hydridů do atomizátoru. Např. HG-AAS s kolekcí vymrazováním nebo ICP-MS.
- Extrahovat arsen z pevných přírodních materiálů deionizovanou vodou a vyšší účinnosti extrakce dosáhnout např. zvýšením teploty při extrakci, prodloužením doby extrakce v ultrazvukové lázni apod. Pak bude pravděpodobně HG-AAS s přímým přenosem hydridů do atomizátoru jako detekční metoda vhodná.
- Pro extrakci arsenu z pevných přírodních materiálů vyzkoušet uvedená alkalická činidla o nižších koncentracích, př. vyzkoušet úplně jiná alkalická činidla. Nebudou-li snižovat citlivost stanovení ani As^{3+} ani As^{5+}, budou pro extrakci arsenu z pevných přírodních materiálů pro účely speciační analýzy arsenu použitelná. Z důvodu vyšší účinnosti extrakce, než u extrakce deionizovanou vodou, nebude pravděpodobně nutné použít citlivější detekční metodu než HG-AAS. Ovšem buď bude nutné arsen před jeho stanovením od ostatních složek extraktu oddělit separační metodou nebo bude nutné použít robustnější detekční metodu než je HG-AAS. Např. ICP-MS nebo ICP -AES.

LITERATURA

[1] Výzkumný ústav rostlinné výroby Praha-Ruzyně, Výzkumná stanice Chomutov, oddělení ekotoxikologie. Zpracoval Sergej Usťak. *Doporučení pro pěstování zemědělských plodin v podmínkách vysoké kontaminace zemědělských půd arsenem*. 2001. Dostupné z URL: <http://www.mu.kutnahora.cz/data/pageadds/1265_2000.doc.> [cit. 11.7.2010]

[2] United States National Library of Medicine. *ChemIDplus Advanced*. Dostupné z URL: <http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/> Nutno vyhledat danou sloučeninu a poté kliknout na ikonu: Toxicity. [cit. 9.7.2010]

[3] BENCKO, V. – CIKRT, M. – LENER, J. *Toxické kovy v životním a pracovním prostředí člověka*. 2. přep. a dopl. vyd. Praha, Grada 1995. 288 s.

[4a] KODÍČEK, M. *Biochemické pojmy: výkladový slovník: keratiny*. [online]. Praha, VŠCHT Praha 2007. Dostupné z URL: <http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002/ebook.html?p=keratiny> [cit. 9.7.2010]

[4b] KODÍČEK, M. *Biochemické pojmy: výkladový slovník: cystein*. [online]. Praha, VŠCHT Praha 2007. Dostupné z URL: <http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002/ebook.html?p=cystein> [cit. 9.7.2010]

[4c] KODÍČEK, M. *Biochemické pojmy: výkladový slovník: cystin*. [online]. Praha, VŠCHT Praha 2007. Dostupné z URL: <http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002/ebook.html?p=cystin> [cit. 9.7.2010]

[5] PERTOLD, Z. *Arsen v životním prostředí: Přírodní i jiné zdroje arsenu a způsoby, jak jej zneškodnit*. Vesmír **77**:6, 323-325 (1998). Dostupné z URL: <http://www.vesmir.cz/clanek/arzen-v-zivotnim-prostredi> [cit. 15.7.2010]

[6] VAHTER, M. – CONCHA, G. *Role of metabolism in arsenic toxicity*. Pharmacology & Toxicology **89**, 1-5 (2001).

[7] SMITH, A. H. – LINGAS, E. O. – RAHMAN, M. *Contamination of drinking-water by arsenic in Bangladesh: a public health emergency*. Bulletin of the World Health Organization **78**:9, 1093-1103 (2000).
Dostupné z URL:
<http://www.who.int/docstore/bulletin/pdf/2000/issue9/bu0751.pdf>
[cit. 14.7.2010]

[8] Směrnice Rady 98/83/ES ze dne 3. listopadu 1998 *o jakosti vody určené k lidské spotřebě*.

[9] Směrnice Komise 2003/40/ES ze dne 16. května 2003, *kterou se stanoví seznam, koncentrační limity a požadavky na označování složek přírodních minerálních vod a požadavky na použití vzduchu obohaceného ozonem při úpravě přírodních minerálních vod a pramenitých vod*.

[10] Vyhláška Ministerstva zdravotnictví č. 275/2004 Sb., ze dne 28. dubna 2004, *o požadavcích na jakost a zdravotní nezávadnost balených vod a o způsobu jejich úpravy*.

[11] Vyhláška Ministerstva zdravotnictví č. 252/2004 Sb., ze dne 22. dubna 2004, *kterou se stanoví hygienické požadavky na pitnou a teplou vodu a četnost a rozsah kontroly pitné vody*.

[12] SKŘIVAN, P. *Koloběh arzenu v přírodním prostředí: Rizika uvolňování do prostředí při těžbě zlata*. Vesmír **75**:5, 247-249 (1996). Dostupné z URL: <http://www.vesmir.cz/clanek/kolobeh-arzenu-v-prirodnim-prostredi> [cit. 15.7.2010]

[13] HOLUB, M. *Produkce arzenu při těžbě drahých a barevných kovů: Vliv těžby na životní prostředí dříve a dnes*. Vesmír **76**:7, 389-394 (1997). Dostupné z URL: <http://www.vesmir.cz/clanek/produkce-arzenu-pri-tezbe-drahych-a-barevnych-kovu> [cit. 15.7.2010]

[14] VELEBIL, D. Národní muzeum v Praze, mineralogicko-petrologické oddělení. *Geologie, mineralogie, historie dolování: arsenopyrit*. 2007. Dostupné z URL: <http://www.velebil.net/mineraly/arsenopyrit> [posl. akt. 11.7.2007]. [cit. 11.7.2010]

[15] NĚMCOVÁ, I. – ENGST, P. – JELÍNEK, I. – SEJBAL, J. – RYCHLOVSKÝ, P. *Spektrometrické analytické metody II*. 1. vyd. Praha, Karolinum 1998. 162 s.

[16] Nařízení vlády č. 61/2003 Sb., ze dne 29. ledna 2003 *o ukazatelích a hodnotách přípustného znečištění povrchových vod a odpadních vod, náležitostech povolení k vypouštění odpadních vod do vod povrchových a do kanalizací a o citlivých oblastech*.

[17] DOČEKAL, B. et al. *Atomová absorpční spektrometrie: Základy AAS, Příprava vzorků: Sborník přednášek z kurzu 9. – 11. 6. 1997 v Komorní Lhotce*. Český Těšín, 2 Theta 1997. 144 s.

[18] DĚDINA, J. et al. *Vybrané metody analytické atomové spektrometrie*. Praha, Československá spektroskopická společnost 1987. 218 s.

[19] HALLIDAY, D. – RESNICK, R. – WALKER, J. *Fyzika: Část 5 – Moderní fyzika*. Dotisk 1. českého vyd. Vysoké učení technické v Brně – Nakladatelství Vutium, Brno a Prometheus, Praha 2003.

[20] Physics Laboratory of National Institute of Standards and Technology. *The NIST Reference on Constants, Units and Uncertainty – Fundamental Physical Constants*. Dostupné z URL: <http://physics.nist.gov/cuu/Constants/Table/allascii.txt> [cit. 15.7.2010]

[21] RUBEŠKA, M. – MOLDAN, B. *Atomová absorpční spektrofotometrie*. 1. vyd. Praha, SNTL – Nakladatelství technické literatury 1967. 156 s.

[22] TEMPLETON, D. M. *Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements: Definitions, structural aspects, and methodological approaches (IUPAC Recommendations 2000)*. Pure Appl. Chem. **72**, 1453-1470 (2000).

[23] NĚMCOVÁ, I. – ČERMÁKOVÁ, L. – RYCHLOVSKÝ, P. *Spektrometrické analytické metody I*. 2. vyd. Praha, Karolinum 2004. 166 s.

[24] WELZ, B. – HE, Y. – SPERLING, M. *Flow injection on-line acid digestion and pre-reduction of arsenic for hydride generation atomic absorption spectrometry – a feasibility study*. Talanta **40**:12, 1917-1926 (1993).

[25] KRENZELOK, M. – RYCHLOVSKÝ, P. *The use of a membrane gas–liquid separator for flow injection hydride generation atomic absorption spectrometry on-line speciation and determination of As(III) and As(V)*. Collect. Czech. Chem. Commun. **63**, 2027-2035 (1998).

[26] CHEN, H. – BRINDLE, I. D. – LE, X. *Prereduction of Arsenic(V) to Arsenic (III), Enhancement of the Signal, and Reduction of Interferences by L–Cysteine in the Determination of Arsenic by Hydride Generation*. Anal. Chem. **64**, 667-672 (1992).

[27] DĚDINA, J. *Atomové absorpční a fluorescenční detektory pro speciační analýzu založenou na generování těkavých sloučenin*. Seminář PACI (listopad 2007).

[28] SVOBODA, M. *Generování hydridů pro speciační analýzu arsenu atomovou absorpční spektrometrií*. Diplomová práce. Praha, Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta 2006.

[29] DĚDINA, J. – TSALEV, D. L. *Hydride generation atomic absorption spectrometry*. Chichester, Wiley 1995.

[30] VOLDŘICHOVÁ, P. *Speciace anorganických forem chromu kombinovanou metodou HPLC – ICP AES*. Diplomová práce. Praha, Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta 2009.

[31] MILLER, J. C. – MILLER, J. N. *Statistics for Analytical Chemistry*. 2nd edition. Chichester, Ellis Horwood 1992.