

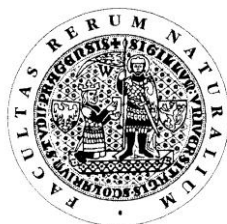
UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

---

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Analytická chemie



Bc. Nikola Trojánková

Speciační analýza toxikologicky významných forem arsenu:  
rozvoj a porovnání technik využívajících generování těkavých  
hydridů s detekcí ICP-MS

Speciation analysis of toxicologically important forms of arsenic:  
development and comparison of hydride generation based  
methods with ICP-MS detection

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Mgr. Tomáš Matoušek, Ph.D.

Konzultant: Doc. RNDr. Petr Rychlovský, CSc.

Praha 2012

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

## Prohlášení

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

Jsem si 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 16. května 2012

.....  
Nikola Trojánková

Tato práce byla vypracována v Laboratoři stopové prvkové analýzy Ústavu analytické chemie Akademie věd České republiky, v.v.i, Vídeňská 1083, Praha 4, 142 20

## Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala zejména svému školiteli panu Mgr. Tomáši Matouškovi, Ph.D. za odborné vedení při experimentální činnosti, množství cenných rad a informací při zpracovávání této diplomové práce.

Děkuji také celému vědeckému týmu Oddělení stopové prvkové analýzy Ústavu analytické chemie AV ČR, v. v. i. za spolupráci i jejich vstřícný přístup.

Dále děkuji svému konzultantovi panu Doc. RNDr. Petru Rychlovskému, CSc. za všestrannou pomoc.

Děkuji Dr. Zoltánu Mesterovi, Institute for National Measurement Standards, National Research Council, Canada, za poskytnutí referenčních materiálů vod.

Poděkování patří i projektům, díky jejichž finanční podpoře mohla být tato diplomová práce vykonána:

Výzkumné záměry UIACH AV ČR, v.v.i. č. AV0Z40310501 a č. RVO: 68081715, dále Grantová agentura České Republiky projekt č. GA 203/09/1783,

Analytical Laboratory for Development of Biomarkers of Environmental Exposures to Arsenic supported by a Gillings Innovation Laboratory award from the UNC Gillings School of Global Public Health.

Děkuji také své rodině za veškerou podporu, lásku i péči.

## Abstrakt

V dnešní době se (nejen) arsen stává významným prvkem znečišťujícím životní prostředí. Chronická expozice arsenem má za následek vážné zdravotní potíže. Proto je na místě rozvoj analytických metod pro speciální analýzu As, tj. stanovení množství jednotlivých forem nebo fází, ve kterých se As nachází, ve stopových koncentracích.

Tato diplomová práce se zabývá zejména porovnáním čtyř metod stopové speciální analýzy se zaměřením na jejich detekční a kvantifikační limity a srovnání výsledků analýz referenčních materiálů říční a mořské vody. Metody založené na generování hydridů s prekoncentrací vymrazováním a detekcí AAS a ICP-MS, kde je dosaženo limitů detekce v jednotkách, resp. desetinách  $\text{ng} \cdot \text{dm}^{-3}$ , jsou srovnány s postupy založeným na HPLC s detekcí ICP-MS. Součástí práce je vývoj a optimalizace kroku postkolonového generování hydridů s on-line předredukci pětimocných sloučenin arsenu kyselinou thioglykolovou za účelem zvýšení citlivosti tohoto stanovení. Podařilo se tak dosáhnout limitů detekce okolo  $10 \text{ ng} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Výsledky analýz jednotlivými metodami byly ve vynikající shodě.

### *Klíčová slova:*

Arsen, speciální analýza, generování hydridů, atomová absorpční spektrometrie, hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem, vysokoúčinná kapalinová chromatografie, limity detekce.

## Abstract

Nowadays, arsenic is becoming an important pollutant in the environment. Chronic exposure to arsenic can cause number of serious diseases. Therefore, a development of analytical methods for trace and ultratrace speciation analysis- analysis of individual forms or phases in which As is found in the sample - is fully in place.

This Thesis compares four methods of trace speciation analysis, with focus on limits of detection and quantification, and on comparison of results of analysis of river and sea water reference materials. Methods based on hydride generation with preconcentration by cryotrapping and AAS or ICP-MS detection, with limits of detection in ng or tenths of  $\text{ng}\cdot\text{dm}^{-3}$ , are compared with procedures employing HPLC, with ICP-MS detection. The Thesis includes development and optimization of a pre-reduction step of postcolumn hydride generation with on-line pre-reduction of pentavalent arsenic species, in order to improve sensitivity of this method. Limits of detection around  $10 \text{ ng}\cdot\text{dm}^{-3}$  are achieved. The results of analyses obtained by individual methods are in excellent agreement.

### *Keywords:*

Arsenic, speciation analysis, hydride generation, atomic absorption spectrometry, inductively coupled plasma- mass spectrometry, high efficiency liquid chromatography, limits of detection.

# Obsah

Obsah .....	6
Seznam zkratek .....	8
Úvod .....	9
1 Teoretická část .....	10
1.1 Arsen .....	10
1.1.1 Toxicita arsenu .....	10
1.1.2 Metabolismus arsenu .....	10
1.2 Generování hydridů pro analytickou atomovou spektrometrii.....	11
1.2.1 Redukce analytu.....	12
1.2.2 Elektrochemické generování.....	12
1.2.3 Metody přímého přenosu.....	12
1.2.4 Metody kolekce.....	13
1.3 Atomizace pro AAS.....	14
1.3.1 Externě vyhřívaná křemenná trubice.....	14
1.3.2 Multiatomizátor.....	15
1.4 Interference v metodě HG – AAS .....	16
1.5 Detekce pomocí ICP-MS.....	16
1.6 Interference v metodě ICP-MS.....	17
1.7 Speciační analýza.....	18
1.7.1 Speciační analýza využívající generování hydridů.....	18
1.7.1.1 Selektivní generování hydridů s použitím předredukce.....	18
1.7.1.2 Generování substituovaných hydridů .....	19
1.7.1.3 Postkolonové generování.....	19
1.8 Porovnání technik.....	20
1.8.1 HG-CT-AAS .....	20
1.8.2 HG-CT-ICP-MS.....	20
1.8.3 HPLC-ICP-MS.....	20
1.8.4 HPLC-(TGA)-HG-ICP-MS .....	21
2 Experimentální část.....	22
2.1 Chemikálie.....	22
2.2 Referenční materiály.....	23
2.2.1 Mořská voda CASS-5.....	23
2.2.2 Říční voda SLRS-5.....	23
2.2.3 Říční voda SLRS-4.....	24
2.2.4 Mořská voda NASS-5.....	24
2.3 Experimentální uspořádání.....	24
2.3.1 HG-CT-AAS.....	24
2.3.1.1 Přístrojové vybavení a části systému.....	24
2.3.1.2 Separátor fází.....	25
2.3.1.3 Sušící trubice.....	25
2.3.1.4 Kryogenní past.....	25
2.3.1.5 Multiatomizátor.....	25
2.3.1.6 Popis experimentu.....	26
2.3.1.7 Měřicí cyklus.....	27
2.3.2 HG-CT-ICP-MS.....	28
2.3.2.1 Přístrojové vybavení a části systému.....	28
2.3.2.2 Popis experimentu .....	29
2.3.2.3 Měřicí cyklus.....	30

2.3.3 HPLC-ICP-MS.....	30
2.3.3.1 Přístrojové vybavení a části systému.....	30
2.3.3.2 Analytická kolona.....	30
2.3.3.3 Mobilní fáze.....	30
2.3.3.4 Popis experimentu.....	30
2.3.4 HPLC-(TGA)-HG-ICP-MS.....	31
2.3.4.1 Přístrojové vybavení a části systému.....	31
2.3.4.2 Separátor fází.....	32
2.3.4.3 Popis experimentu.....	33
2.3.5 Další použité přístroje.....	34
2.4 Zpracování dat.....	35
3 Výsledková část.....	36
3.1 HG-CT-AAS.....	36
3.1.1 Chromatogram.....	36
3.1.2 Kalibrační závislosti, LOD a LOQ.....	37
3.1.3 Referenční materiály.....	38
3.2 HG-CT-ICP-MS.....	38
3.2.1 Chromatogram.....	38
3.2.2 Kalibrační závislosti.....	39
3.2.3 LOD a LOQ.....	39
3.2.4 Referenční materiály.....	41
3.3 HPLC-ICP-MS.....	42
3.3.1 Chromatogram.....	42
3.3.2 Kalibrační závislosti, LOD a LOQ.....	42
3.3.3 Referenční materiály.....	43
3.3.4 Ztráty specií arsenu na koloně.....	44
3.4 HPLC-TGA-HG-ICP-MS.....	45
3.4.1 Vývoj metody.....	45
3.4.1.1 Reakční medium.....	45
3.4.1.2 Reakční cívka.....	47
3.4.1.3 Separátor fází.....	48
3.4.1.4 On-line předredukce TGA.....	50
3.4.1.5 Průtok plynu reakční/kolizní celou.....	51
3.4.1.6 Zapojení do mlžné komory.....	53
3.4.2 Kalibrační závislosti, LOD a LOQ.....	54
3.4.3 Referenční materiály.....	55
3.5 HPCL-ICP-MS vs. HPLC-(TGA)-HG-ICP-MS.....	56
3.6 Souhrnné porovnání metod.....	57
3.6.1 LOD a LOQ.....	57
3.6.2 Referenční materiály.....	58
4 Závěr.....	60
5 Seznam použité literatury.....	61

## Seznam zkratek

$\alpha$	směrnice kalibrační závislosti
c	koncentrace
CASS-5	referenční materiál mořské vody
cps	ionty za vteřinu
CT	kolekce vymrazováním
DIV	deionizovaná voda
EHQTA	externě vyhřívaný atomizátor
EPA	agentura pro ochranu životního prostředí
HG	generování hydridů
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
ICP-MS	hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem
i.d.	vnitřní průměr
l	délka
LD <sub>50</sub>	smrtelná dávka, dávka po které uhynie 50% sledovaných jedinců
LOD	limit detekce
LOQ	limit kvantifikace
m	metr
n	počet měření
NaBH <sub>4</sub>	tetrahydridoboritan sodný
NASS-5	referenční materiál mořské vody
P	plocha píku
PTFE	polytetrafluorethylen (teflon)
S	signál
s	sekunda
SLRS-4	referenční materiál říční vody
SLRS-5	referenční materiál říční vody
t	čas
TGA	kyselina thioglykolová
WHO	Světová zdravotnická organizace



## Úvod

Hlavním cílem této diplomové práce je porovnání vybraných charakteristik čtyř analytických metod využívajících generování hydridů pro speciální analýzu toxikologicky významných forem arsenu – tzn. arsenitany, arzeničnany a jejich methylsubstituované formy. Významnou částí práce je zavedení metody HPLC-ICP-MS a zejména metodický rozvoj metody využívající postkolonové generování hydridů s použitím kyseliny thioglykolové jako on-line předredukce s následnou detekcí ICP-MS. Kyselina thioglykolová zde plní funkci postkolonové on-line předredukce, která zajišťuje redukci pětimocných forem na formy trojmocné ještě před samotným zahájením generování hydridů.

Důvodem pro vývoj této metody jsou předpokládané velmi nízké detekční limity, které se očekávají nižší než jednotky  $\text{ng} \cdot \text{dm}^{-3}$  díky vysoké účinnosti generování hydridů. Pak by tuto metodu bylo možné použít jako referenční metodu pro extrémně citlivé metody založené na generování hydridů s prekoncentrací vymrazováním a detekcí AAS nebo ICP-MS.

Konkrétními úkoly této diplomové práce byly:

1. zavedení metody HPLC-ICP-MS v laboratoři oddělení stopové prvkové analýzy Ústavu analytické chemie AV ČR, v.v.i.,
2. vývoj a optimalizace nové metody spojující postkolonové generování hydridů spojené s on-line předredukcí kyselinou thioglykolovou a následnou detekcí ICP-MS,
3. následné porovnání a zhodnocení výsledků analýz referenčních materiálů mořské a říční vody jednotlivými metodami.

Tato práce je součástí rozsáhlejšího společného projektu Ústavu analytické chemie AV ČR, v.v.i., a Univerzity Severní Karolíny v Chapel Hill, který se zabývá rozvojem stopové speciální analýzy arsenu pro toxikologický výzkum chronické expozice arsenem.

# 1. Teoretická část

## 1.1 Arsen

Arsen, prokázaný karcinogen, patří mezi prvky 5. hlavní skupiny periodické soustavy prvků a je znám ve svých čtyřech barevných alotropických modifikacích.

Je také jedním z prvků, o které je velký zájem ze stran vědců, díky jeho množství v životním prostředí a jeho toxicitě pro živé organismy.<sup>1</sup>

Arsen je tedy možné nalézt prakticky všude: v atmosféře, ve vodě, v půdě a usazeninách, také v organismech<sup>2</sup> a je součástí 245 minerálů.<sup>3</sup> Konkrétně se řadí na 20. místo v zemské kůře, na 14. místo v mořské vodě a na místo 12. v lidském těle. Agentura pro ochranu životního prostředí (EPA) a Světová zdravotnická organizace (WHO) stanovily maximální přípustnou koncentraci arsenu v pitné vodě na  $50 \mu\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$  a také doporučenou koncentraci  $10 \mu\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$  (cit. <sup>4</sup>). V České republice je nejvyšší mezní hodnota arsenu v pitné vodě stanovena Vyhláškou č. 252/2004 Sb., kterou se stanoví hygienické požadavky na pitnou a teplou vodu a četnost a rozsah kontroly pitné vody, na  $10 \mu\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$  (cit <sup>5</sup>).

### 1.1.1 Toxicita arsenu

Toxicita specií arsenu je úzce spjata s jejich mobilitou ve vodě a tělních tekutinách a také závisí na oxidačním čísle. Platí, že specie arsenu s oxidačním číslem +III jsou toxicitější než ty s oxidačním číslem +V a toxicita sloučenin arsenu klesá v pořadí: arsan (arsenoxid) > anorganické arsenitany > methylované arsenitany > anorganické arseničnany > methylované arseničnany > arsoniové soli > elementární arsen.<sup>2, 6</sup>

LD<sub>50</sub> podaná člověku perorálně se pohybuje v rozmezí 1-2 mg/kg. Vystavení chronické expozici může mít negativní následky v oblasti vývojové i reprodukční, kožní, hematologické, projevuje se rakovinou kůže, močového měchýře, jater a plic.<sup>7</sup>

### 1.1.2 Metabolismus arsenu

Anorganický arsen je metabolizován jako odpadní produkt moči prostřednictvím redukčních a oxidačních procesů. Metabolická cesta je následující:

anorganické arseničnany → anorganické arsenitany → kyselina methylarseničná → kyselina methylarsenitá → kyselina dimethylarseničná → kyselina dimethylarsenitá → trimethylarseničný oxid ( $i\text{As}^{\text{V}} \rightarrow i\text{As}^{\text{III}} \rightarrow \text{MAs}^{\text{V}} \rightarrow \text{MAs}^{\text{III}} \rightarrow \text{DMAs}^{\text{V}} \rightarrow \text{DMAs}^{\text{III}} \rightarrow \text{TMAOs}^{\text{V}}$ ).<sup>8</sup>

Arsen se v přírodě také vyskytuje v organických sloučeninách jako jsou arsenobetain

a arsenocholin, které jsou považovány za netoxické, nemetabolizují se a jsou vylučovány močí. Tyto sloučeniny je možné najít zejména v mořských živočiších.<sup>9, 10</sup>

V mořských řasách se formy arsenu vyskytují jako deriváty ribózy, které jsou společně označovány jako arsenocukry. Avšak ani tyto arsenocukry nejsou považovány za toxické.<sup>11</sup>

Přehled sloučenin stanovovaných při této práci je zobrazen v tabulce 1.1.

**Tab. 1.1** Sloučeniny arsenu tvořících těkavé hydridy

zkratka v textu	název sloučeniny	strukturní vzorec
$iAs^{III}$	kyselina trihydrigenarsenitá	$\begin{array}{c} HO-As-OH \\   \\ OH \end{array}$
$iAs^V$	kyselina trihydrogenarseničná	$\begin{array}{c} O \\    \\ HO-As-OH \\   \\ OH \end{array}$
$MAs^V$	kyselina methylarseničná	$\begin{array}{c} O \\    \\ H_3C-As-OH \\   \\ OH \end{array}$
$DMAs^V$	kyselina dimethylarseničná	$\begin{array}{c} O \\    \\ H_3C-As-OH \\   \\ CH_3 \end{array}$
$TMA_s^VO^*$	oxid trimethylarseničný	$\begin{array}{c} O \\    \\ H_3C-As-CH_3 \\   \\ CH_3 \end{array}$

$TMA_s^VO$  netvoří hydrid, ale je redukován na  $(CH_3)_3As$ , který je těkavý a atomizuje se podobně jako ostatní hydridy

## 1.2 Generování hydridů pro analytickou atomovou spektrometrii

Generování spočívá v uvolnění hydridy z roztoku vzorku (tj. v konverzi analytu na hydrid a v jeho přechodu do plynné fáze) a v transportu uvolněného hydridu proudem nosného plynu do atomizátoru.<sup>12</sup> Procedura se skládá ze tří nezávislých kroků: příprava vzorků, generování hydridů a atomizace hydridů a detekce.<sup>13</sup>

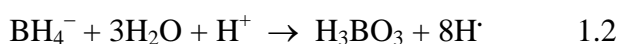
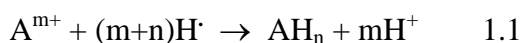
Základním rysem této techniky je separace analytu od matrice a vysoká účinnost jeho

transportu do atomizátoru ve srovnání s klasickým zmlžováním. To vede ke zvýšení citlivosti a k výraznému omezení interferencí.<sup>14</sup>

Generování hydridů se používá pro zlepšení detekčních limitů párových metod, které kombinují separační metody jako je HPLC nebo kapilární elektroforéza s prvkově specifickými detekčními metodami, jako je AAS nebo ICP-MS.<sup>15</sup>

### 1.2.1 Redukce analytu

Selektivní redukční procesy jsou založeny na reakci mezi speciemi analytu a tetrahydridoboritanem sodným v kyselém prostředí za vzniku hydridů.<sup>16</sup> NaBH<sub>4</sub> je během několika mikrosekund zcela rozložen podle rovnice 1.1. a dále dochází k převedení analytu na hydrid reakcí s atomárním vodíkem, rovnice 1.2.<sup>12</sup>



Podle některých pozdějších studií probíhá tento mechanismus daleko složitějším způsobem. Dochází k postupné hydrolyze NaBH<sub>4</sub>, kdy právě tyto produkty redukuje analyt na hydrid.<sup>17</sup> Vodík, vznikající v přebytku při rozkladu NaBH<sub>4</sub>, pomáhá uvolnit vzniklý hydrid z reakční směsi.<sup>18, 19</sup>

### 1.2.2 Elektrochemické generování

Jinou možností přípravy těkavých sloučenin je jejich elektrochemické (elektrolytické) generování. Elektrochemické generování těkavých hydridů představuje alternativní techniku přípravy těkavých hydridů, kdy místo redukčního činidla je redukce provedena průchodem elektrického proudu pouze v prostředí velmi čistých minerálních kyselin. Tím odpadá možnost kontaminace analyzovaného vzorku redukčním činidlem.<sup>20</sup>

Existují dva základní přístupy pro generování hydridů. Prvním je přímý přenos, při kterém je hydrid uvolněný z reakční směsi veden přímo do atomizátoru. Druhým je kolekce, při níž je hydrid uvolněný z reakční směsi shromažďován v generátoru hydridů a až po ukončení reakce je do atomizátoru přiveden najednou.<sup>18</sup>

### 1.2.3 Metody přímého přenosu

Při metodách přímého přenosu jsou hydridy vedeny přímo do atomizátoru a patří mezi ně: kontinuální uspořádání, dávkování do proudu a dávkové uspořádání (batch).

Při kontinuálním uspořádání je konstantní tok roztoku vzorku smíchán s konstantním proudem  $\text{NaBH}_4$  a nosného plynu a je veden do separátoru fází. Odsud jsou plynný hydrid s vodíkem a nosným plynem vedeny do atomizátoru a kapalina odtéká do odpadu.

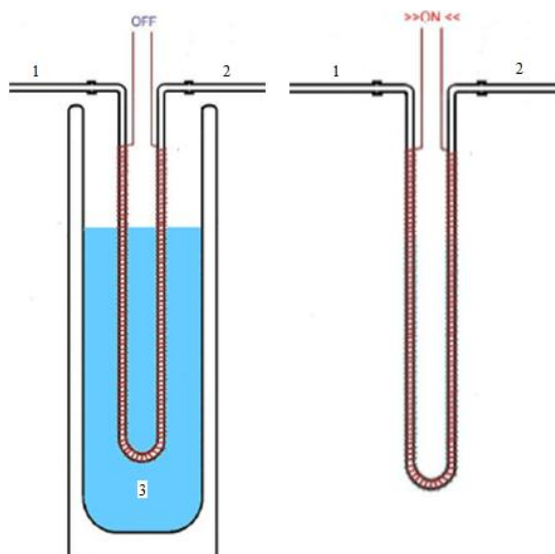
Experimentální uspořádání při přenosu dávkováním do proudu je velmi podobné jako u kontinuálního uspořádání s tím rozdílem, že samotný tok roztoku vzorku je nahrazen konstantním tokem nosného média. Vzorek je pak do tohoto média injektován pomocí injekčního ventilu.

Dávkový generátor je skleněná nebo plastová nádoba sloužící zároveň jako reaktor i jako separátor fází. Do reaktoru je pak přiváděno redukční činidlo buď pomocí čerpadla nebo ručně pomocí stříkačky.<sup>18</sup>

### 1.2.4 Metody kolekce

V kolekčních metodách dochází k zachycení vygenerovaného hydridu v jisté části aparatury. Mezi tyto metody se řadí kolekce v absorpčním médiu, tlaková kolekce, kolekce vymrazováním a tzv. „in situ“ kolekce.

Pro kolekci vymrazováním je zapotřebí chladné pasti, kterou je obvykle U-trubice plněná sorbentem ponořená do kapalného dusíku. Trubicí prochází nosný plyn a vodík uvolněný při reakci, oproti tomu hydridy jsou zde zachyceny a po následném ohřevu trubice jsou separovány podle vlastních teplot varu a následně jsou transportovány proudem nosného plynu do atomizátoru. Obrázek 1.1 ukazuje ponoření U-trubice do kapalného dusíku a následné vyjmutí z něj a ohřev.<sup>18</sup>



**Obr. 1.1** Fáze zachycení hydridů v U-trubici ponořené v kapalném dusíku a fáze ohřátí trubice – odstranění kapalného dusíku a uvolnění hydridů. 1 – přívod hydridů z HG, 2 – odvod hydridů do detektoru, 3 – kapalný dusík (cit. <sup>18</sup>)

„In-situ“ kolekce se využívá hlavně u grafitových atomizátorů, ale lze ji uplatnit i při kolekci v křemenném atomizátoru při vysokých teplotách, kdy kolekce i uvolnění analytu do atomizátoru je řízeno průtokem vodíku křemennou pastí. Nevýhodou je, že se hydridy při záchytu rozkládají a nelze tedy „in situ“ kolekce využívat pro speciaci.<sup>21</sup>

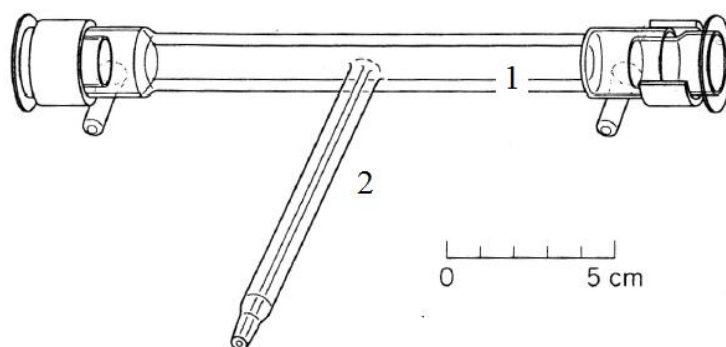
### 1.3 Atomizace pro AAS

Pro atomizaci hydridů je možné využít následujících atomizátorů: grafitový atomizátor, difúzní plamen (inertní plyn-vodík), plamínek v křemenné trubici a externě vyhřívaný atomizátor.

#### 1.3.1 Externě vyhřívaná křemenná trubice

V současnosti velmi používaným atomizátorem je externě vyhřívaná křemenná trubice (obr. 1.2). Obvykle má tvar písmene T, jejíž vodorovné rameno (optická trubice) leží v optické ose spektrometru a je vyhříváné buď plamenem acetylen-vzduch, nebo pomocí odporově zahříváné pícky (700 - 1100°C).<sup>12</sup>

Do přívodního ramene atomizátoru je hydrid přiváděn směsí argonu a vodíku z generátoru hydridů a je zde převeden na volné atomy. Atomizace hydridů není obvykle termický proces, hydridy jsou atomizovány interakcí s vysoce energetickými vodíkovými radikály.<sup>12, 22</sup>



**Obr. 1.2** Externě vyhřívaný křemenný atomizátor EHQA. 1 – optická trubice, 2 – přívodní rameno. (cit. <sup>18</sup>)

Na začátku přívodního ramene (horké zóny) se tvoří oblak volných vodíkových radikálů, vzniklý reakcemi mezi vodíkem z  $\text{NaBH}_4$  a kyslíkem. Potřebné množství kyslíku je pokryto stopami ve vzorku, reagentech, plynech a difúzí stěnami.<sup>23</sup>

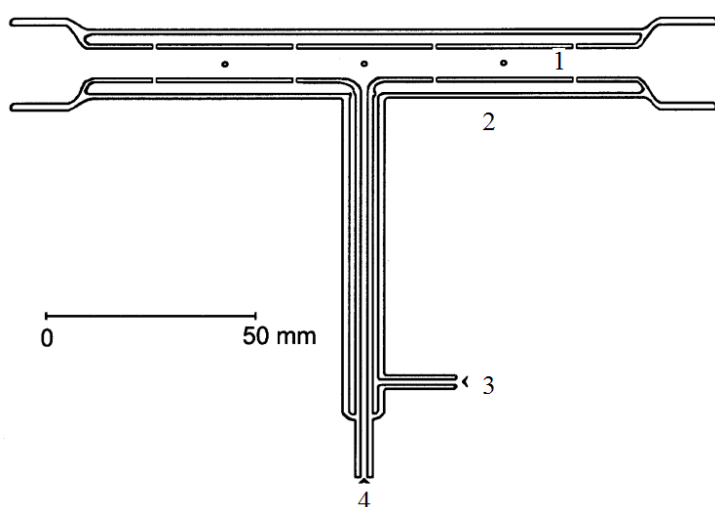
I přes to, že EHQA poskytuje dostatečně dlouhou dobu volným atomům v optické

dráze a také velmi vysokou citlivost, její celkové „chování“ není dostačující zejména kvůli vysokým atomizačním interferencím a špatné linearitě kalibrační křivky. To se děje díky tomu, že volnými vodíkovými radikály není vyplněna celá optická trubice, ale pouze její část a volné atomy analytu mohou podléhat dalším chemickým reakcím.<sup>24</sup>

### 1.3.2 Multiatomizátor

Nevýhody EHQTA mohou být potlačeny, pokud by byl analyt udržován ve stavu volných atomů.<sup>23</sup> K tomu se používá tzv. *multiatomizátor* (obr. 1.3), ve kterém vznikají mnohačetná oblaka vodíkových radikálů a analyt je opakovaně atomizován.<sup>12</sup>

Je to dvouplášťový externě vyhřívaný atomizátor, jehož vnitřní trubice má mnohačetné malé otvory po celé své délce, kterými sem vstupuje kyslík přiváděný společně s nosným plynem dovnitř trubice vnější. U každého otvoru tedy dochází k reakci s vodíkem a v celém objemu trubice vznikají oblaka volných vodíkových radikálů, které analyt udržují ve formě volných atomů.<sup>25,26</sup> Funkce přívodního ramene zůstává stejná, a to přívod hydridu uvolněného z generátoru hydridů proudem nosného plynu a vodíku.



**Obr. 1.3** Multiatomizátor (cit. <sup>15</sup>). 1 – vnitřní trubice, 2 – vnější trubice, 3 – vstup pro vnější plyn obsahující kyslík, 4 – vstup pro nosný plyn s analytem

V porovnání s EHQTA zde dochází ke zlepšení linearitě kalibračních závislostí a ke zvýšení tolerančního limitu vůči atomizačním interferencím o jeden řád.<sup>27</sup>

## 1.4 Interference v metodě HG - AAS

Správnost stanovení jednotlivých analytů může být ovlivněna řadou rušivých vlivů, které se u generování hydridů projevují snížením účinnosti redukční reakce.<sup>13</sup>

Spektrální interference nejsou díky separaci analytu od matrice v této metodě výrazné a zpravidla je lze snadno eliminovat korektorem pozadí.<sup>12</sup> V úvahu přichází pouze nespecifická, molekulární absorpce, kterou lze snadno vykompenzovat.<sup>28</sup>

Při nespektrálních interferencích v kapalně fázi dochází ke snížení účinnosti redukce a interference se tak projevují neúplným převedením analytu do plynné fáze. Zdroje interferencí jsou heterogenní fáze přítomné ve vzorku, rozpuštěné organické i anorganické látky. Z anorganických látek jsou to především ionty přechodných a vzácných kovů, ze kterých v průběhu generování vznikají redukované formy, které mohou reagovat s hydridy, a také silné oxidanty, rušící stanovení tím, že oxidují analyty na formu s nejvyšším oxidačním číslem, která buď není redukována na hydrid vůbec, nebo pomaleji.

Nespektrální interference v plynné fázi jsou obvykle způsobeny těkavými látkami unikajícími z reakční směsi nebo drobnými kapičkami rozprášenými při reakci v generátoru hydridů, ale zdaleka nejobvyklejšími interferenty jsou ostatní hydridy. Dochází k reakcím volných atomů analytu s interferentem, což vede ke snížení populace volných atomů v atomizátoru a tedy i ke snížení pozorovaného signálu.

Tyto interference je možné eliminovat zředěním vzorku, metodou přídavek, snížením účinnosti generování interferujícího hydridu, zvýšením průtoku nosného plynu a zejména volbou atomizátoru (viz 1.3.2).<sup>12, 29</sup>

## 1.5 Detekce pomocí ICP-MS

Vzorek je obvykle do indukčně vázaného plazmatu veden ve formě aerosolu, vznikajícího průchodem kapalného vzorku přes pneumatický zmlžovač. Větší kapičky aerosolu jsou odstraněny mlžnou komorou a ty zbývající malé jsou vtaženy do proudu argonového plazmatu o velmi vysoké teplotě, který zajišťuje jejich ionizaci. Průchodem přes dva konusy s vnitřním průměrem několik desetin milimetru se analyt dostává do vakuovaného prostředí, které je zajištěno vakuovými pumpami. Ionty jsou dále vedeny přes iontovou optiku a kolizní celu, která slouží pro odstranění polyatomických interferencí, až na kvadrupólový filtr.

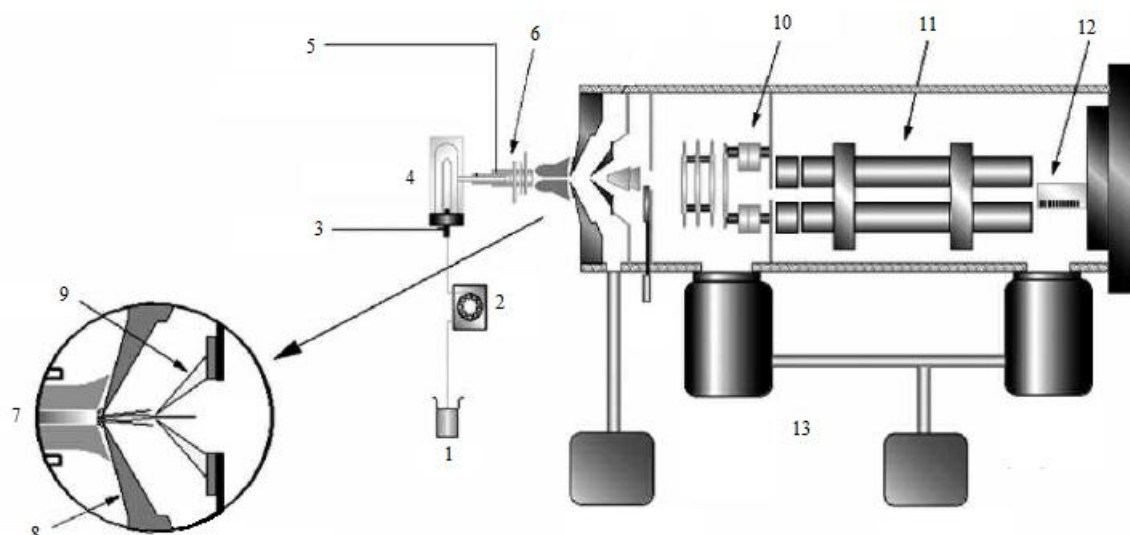
Kvadrupól je sekvenční hmotnostní filtr, na kterém dochází k oddělení jednotlivých iontů na základě poměru jejich hmotnosti a náboje. Skládá se ze dvou párů rovnoběžných tyčí



uspořádaných do čtverce kolem iontového paprsku.

Ionty dále postupují na vícekanálový elektronásobič, který je použit pro detekci a kvantifikaci dopadlých iontů.<sup>28</sup>

Schéma přístroje ICP-MS je zobrazeno na obrázku 1.4.



**Obr. 1.4** Schéma přístroje ICP-MS. 1 – vzorek, 2 – peristaltická pumpa, 3 – nosný plyn, 4 – mlžná komora, 5 – plazmatický plyn, 6 – ICP lampa, 7 – plazma, 8 – první konus, 9 – druhý konus, 10 – iontová optika, 11 – kvadrupól, 12 – detektor, 13 – vakuové pumpy (cit. <sup>28</sup>)

## 1.6 Interference v metodě ICP-MS

Největší podíl na interferencích v metodě ICP-MS mají spektrální interference.<sup>30</sup> Je několik zdrojů spektrálních interferencí. Izobarické interference vznikají v důsledku přítomnosti různých izobarů (stejně nukleonové, hmotnostní číslo a odlišné číslo protonové). Molekulární interference vznikají rekombinací vzorku a / nebo matrice s argonem, jako jsou kyslík, dusík, vodík, uhlík, chlor, síra, železo a další.<sup>31</sup> Při stanovení arsenu  $^{75}\text{As}$ , který je v přírodě monoizotopický, je nejdůležitější interferencí je  $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$  (cit. <sup>32</sup>).

Existuje několik způsobů jak tyto interference odstranit, nebo je alespoň zmírnit. Oxidy a dvojmocné ionty je možné výrazně redukovat pomocí správného nastavení podmínek plazmy a plazmového hořáku. Nejjednodušší způsob, jak se vyhnout izobarickým interferencím (resp. odstranit je), je volba jiného izotopu tohoto prvku, pokud je dostupný.

Oproti tomu nejpoužívanější metodou pro odstranění izobarických interferencí u moderních ICPMS spektrometrů je použití kolizní nebo reakční cely, která se nachází za hlavními iontovými čočkami. Toto zařízení sestává z iontového vedení, které je umístěno

v cele, kam může být přiváděno menší množství kolizního / reakčního plynu. V případě arsenu je to helium.

Odstranění polyatomických interferencí může být provedeno dvěma způsoby:

1. reakčním způsobem, kdy plyn reaguje s interferujícími ionty a převádí je na jiné
2. kolizním způsobem, kdy se pouze kolizní plyn srazí s interferujícím iontem, což způsobí pokles jeho kinetické energie. Vzhledem k větší velikosti molekulárních iontů, pravděpodobnost reakce – kolize se zvětšuje a tím jsou účinněji odstraňovány.<sup>28, 33, 34</sup>

## 1.7 Speciační analýza

Speciační analýzou se rozumí identifikace a kvantitativní stanovení různých forem nebo fází, ve kterých se daný prvek nachází.<sup>35</sup>

### 1.7.1 Speciační analýza využívající generování hydridů

Speciační analýzu s využitím generování hydridů lze rozdělit podle tří přístupů ke stanovení na: selektivní generování hydridů, generování substituovaných hydridů a postkolonové generování hydridů.<sup>21</sup>

#### 1.7.1.1 Selektivní generování hydridů s použitím předredukce

Při selektivním generování hydridů je využíváno toho, že hydridy některých forem analytu se generují pouze za určitých podmínek. V případě arsenu se proto z jednoho alikvótu vzorku generují selektivně pouze formy trojmocné. Pro toto je vhodný TRIS·HCl pufr o koncentraci  $0,75 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  a hodnotě  $\text{pH} = 6,0$ , kterým je řízena kyselost v jednotlivých fázích generování hydridů.<sup>37</sup>

V druhém alikvótu se pak provádí generování za podmínek, kdy se hydridy generují z trojmocných i pětímocných forem, obvykle při nízkém pH, např. v prostředí HCl o koncentraci  $1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ , nebo generováním po předredukci pětímocných forem. Tak se získá celkový obsah arsenu. Z rozdílu hodnot se tak získá obsah pětímocných forem.

Velmi často používanými látkami pro předredukci jsou jodid draselný (často v kombinaci s kyselinou askorbovou) a zejména L-cystein (v kombinaci s HCl).

Reakce sloučenin arsenu s L-cysteinem probíhá podle následujícího schéma:

1. redukce pětímocného arsenu přes reakci s  $\text{NaBH}_4$   
$$2 \text{ Cys-SH} + \text{R}_n\text{AsO}(\text{OH})_{3-n} \rightarrow \text{Cys-S-S-Cys} + \text{R}_n\text{As}(\text{OH})_{3-n} + \text{H}_2\text{O}$$

2. reakce trojmocného arsenu s cysteinem za vzniku komplexu



Při použití L-cysteinu při HG je jako reakční medium používána HCl, která je však pro účinné generování použitelná jen ve velmi úzkém rozhraní koncentrace (0,01 – 0,1 mol·dm<sup>-3</sup>). Vhodný způsob pro udržení optimální kyselosti pro generování po předredukci L-cysteinem je použití vhodného pufru, např. výše zmíněného TRIS·HCl pufru o koncentraci 0,75M a o hodnotě pH = 6,0. (cit. <sup>37</sup>)

Výhodou L-cysteinu je, že se sám chová jako maskovací činidlo a tím zvyšuje toleranční limit vůči interferencím. Naopak jeho nevýhodou je dlouhá doba kompletní předredukce, která za laboratorní teploty trvá přibližně 60 minut.<sup>37, 39</sup>

Další možností předredukce je použití kyseliny thioglykolové, která stejně jako L-cystein obsahuje thiolovou skupinu. Při použití kyseliny thioglykolové, probíhá proces redukce daleko rychleji (1 – 2 min) a se srovnatelnými citlivostmi a limity detekce jako při použití 2% roztoku L-cysteinu.<sup>40</sup> Již 0,5 % roztok kyseliny thioglykolové v roztoku způsobuje účinnou redukci všech pětimocných forem arsenu.

### 1.7.1.2 Generování substituovaných hydridů

Speciální analýza založená na generování substituovaných hydridů se používá v případech, kdy je možné jednotlivé formy analytu převést na různé substituované hydridy. Analýza probíhá v následujícím pořadí:

1. generování směsi alkyl-substituovaných hydridů
2. separace jednotlivých forem
3. atomizace, detekce.

V případě arsenu je typickou aplikací speciace iontových methyl a dimethyl sloučenin. Výsledkem generování je směs methyl substituovaných hydridů a příslušného hydridu AsH<sub>3</sub>. Následně dochází k separaci směsi hydridů a zastoupení jednotlivých forem hydridů udává zastoupení analyzovaných forem analytu. Separace je prováděna pomocí kolekce vymrazováním (viz. 1.2.4).<sup>13</sup>

### 1.7.1.3 Postkolonové generování

Při postkolonovém generování dochází před vlastním generováním nejprve k separaci jednotlivých forem separační metodou, nejčastěji HPLC. Hydridy jsou pak postupně

generovány z jednotlivých specií.

Cílem postkolonového generování je zejména zvýšení citlivosti díky vyšší účinnosti transportu analytu do detektoru.

## **1.8 Porovnání technik**

### **1.8.1 HG-CT-AAS: Metoda generování hydridů ve spojení s kolekcí vymrazováním a atomovou absorpční spektrometrií**

Generování hydridů spojené s atomovou absorpční spektrometrií je základní technika pro speciální analýzu a stanovení kvantifikace arsenu. Je to metoda využívající spojení generování hydridů s kolekcí vymrazováním, kdy po vygenerování hydridů dochází k jejich záchytu v U-trubicí ponořené v kapalném dusíku. Po jejím následném ohřevu jsou hydridy podle svého bodu varu postupně unášeny proudem nosného plynu až do detektoru.<sup>16</sup>

Výhodou HG-CT-AAS ve srovnání s chromatografickou separací specií arsenu s detekcí ICP-MS je, že k analýze významných biologických matric, jako je moč nebo buněčné lyzáty, je možné použít větší množství vzorku a také jsou nutné pouze minimální úpravy.<sup>38</sup> Další výhodou je, že u těchto biologických vzorků tedy není vyžadován ani rozklad nebo extrakce a proto omezuje vznik artefaktů spojených s oxidací nebo vzniklých na koloně navázáním reaktivních ale nestabilních methylovaných trojmocných metabolitů.<sup>36</sup>

### **1.8.2 HG-CT-ICP-MS: Metoda generování hydridů ve spojení s kolekcí vymrazováním a hmotnostním spektrometrem s indukčně vázaným plazmatem**

Tato metoda je založena na stejném principu jako výše popsaná metoda HG-CT-AAS, pouze s rozdílným detektorem – ICP-MS.

Výhodou této metody jsou zatím nejnižší detekční limity a díky ní je možné provádět analýzy arsenu o velmi nízkých koncentracích, které umožní studovat mechanismus působení arsenu na nízkých hladinách expozice.

### **1.8.3 HPLC-ICP-MS: Vysokoučinná kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostním detektorem s indukčně vázaným plazmatem**

Spojení kapalinové chromatografie s ICP-MS je technicky velmi jednoduché a sestává

z napojení výstupu z chromatografické kolony do nebulizátoru. Optimalizace rozhraní je omezena volbou nebulizátoru odpovídajícímu průtoku mobilní fáze a zajištěním stability plazmatu v přítomnosti mobilní fáze.

Toto spojení je velmi výkonné pro detekci a stanovení netěkavých kovových specií v živočišné a rostlinné biochemii i v klinické biochemii. Je to i multielementární metoda, která nabízí nízké detekční limity.<sup>40</sup> Ačkoli je v dnešní době velmi používanou metodou pro speciální analýzu, její citlivost je omezená. Objem vzorku je limitován separační metodou (obvykle objem vzorku nepřesahuje 100  $\mu$ l) a zároveň zóna vzorku je během separace rozšířena.<sup>41, 42</sup>

#### **1.8.4 HPLC-HG-ICP-MS: Metoda spojující postkolonové generování hydridů s on-line předredukcí kyselinou thioglykolovou a detekci hmotnostní spektrometrií s indukčně vázaným plazmatem**

Při zavádění metody využívající postkolonové generování je cílem zvýšit účinnost transportu analytu do detektoru a tím zvýšit citlivost.

Protože off-line předredukce L-cysteinem není vhodná pro průtokové systémy, bude nahrazena on-line předredukcí pětimocných forem na formy trojmocné pomocí kyseliny thioglykolové, která byla jako redukční činidlo vyvinuta a optimalizována právě v laboratoři na AV ČR v Praze-Krči. Tato on-line předredukce je postkolonová a k redukci na trojmocné formy dochází ještě před samotným generováním hydridů.

Předpokládá se, že při tomto postkolonovém generování hydridů dojde ke zvýšení citlivosti stanovení a také ke zvýšení selektivity trojmocných forem. Další výhodou je také možnost stanovení signálů trojmocných i pětimocných forem zároveň.<sup>40</sup>

## 2. Experimentální část

### 2.1 Chemikálie

Pracovní roztoky  $iAs^V$  o požadovaných koncentracích byly připravovány přesným ředěním ze zásobního standardního roztoku o koncentraci  $1000 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ . Zásobní roztok byl připraven z oxidu arseničného rozpuštěného ve 2%  $\text{HNO}_3$ .

Pracovní roztoky  $iAs^{III}$  o požadovaných koncentracích byly připravovány přesným ředěním ze zásobního standardního roztoku o koncentraci  $1000 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ . Zásobní roztok byl již dříve připraven rozpuštěním oxidu arsenitého ( $\text{As}_2\text{O}_3$ ;  $M_r = 198$ ; Lach-Ner, s.r.o., Neratovice, ČR) v 1 ml roztoku KOH (Lach-Ner, s.r.o., Neratovice, ČR)

Pracovní roztoky  $MAs^V$  o požadovaných koncentracích byly připravovány přesným ředěním ze zásobního standardního roztoku o koncentraci  $1000 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ . Zásobní roztok byl již dříve připraven z hexahydrátu methylarseničnanu sodného ( $\text{Na}_2\text{CH}_3\text{AsO}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ;  $M_r = 292$ ; Chem. Service, West Chester, USA) v deionizované vodě. Pracovní roztoky  $DMAs^V$  o požadovaných koncentracích byly připravovány přesným ředěním ze zásobního standardního roztoku o koncentraci  $1000 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ . Zásobní roztok byl již dříve připraven z dimethylarseničné kyseliny ( $\text{C}_2\text{H}_7\text{AsO}_2$ ;  $M_r = 138$ ; Strem. Chemicals, USA) v deionizované vodě.

Pracovní roztoky  $TMas^V$  o požadovaných koncentracích byly připravovány přesným ředěním ze zásobního standardního roztoku o koncentraci  $1000 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ . Zásobní roztok byl již dříve připraven z oxidu trimethylarseničného ( $(\text{CH}_3)_3\text{AsO}$ ;  $M_r = 36$ ; University of British Columbia, Vancouver, Canada) v deionizované vodě a doplněn na výsledný objem 25 ml.

Pro ředění všech roztoků byla použita deionizovaná voda pořízená z přístroje Watrex Ultrapur (Watrex, USA).

Tetrahydridoboritan sodný, používaný jako redukční činidlo při generování hydridů, byl připravován rozpuštěním 1 tablety ( $\text{NaBH}_4$ ; FLUKA, Steinheim, Germany) v 100 ml deionizované vody v prostředí 0,1 % roztoku KOH (Lach-Ner, s.r.o., Neratovice, ČR).

Roztok Tris·HCl byl připraven rozpuštěním 59,1 g tris(hydroxymethyl)aminomethan hydrochloridu ( $\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3\cdot\text{HCl}$ ;  $M_r = 157,6$ ; Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) a doplněním deionizovanou vodou do 500 ml. Výsledné pH bylo upraveno pomocí 10% roztoku KOH (Lach-Ner, s.r.o., Neratovice, ČR) na hodnotu  $\text{pH} = 6$ .

Redukční činidlo L-cystein hydrochlorid monohydrát ( $\text{C}_3\text{H}_8\text{ClNO}_2\text{S}\cdot\text{H}_2\text{O}$ ;  $M_r = 176$ ; Merck, Darmstadt, Germany).

Kyselina thioglykolová byla připravena naředěním 1,630 ml kyseliny thioglykolové

deionizovanou vodou do celkového objemu 50 ml.

Kyselina chlorovodíková, použitá jako další reakční medium, byla připravena ředěním 6M HCl.

Mobilní fáze byla připravena přesným ředěním ze zásobních roztoků  $0,2 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$  EDTA a  $2,0 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$   $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  a doplněním deionizovanou vodou na výsledný objem 500 ml. Výsledné pH bylo upraveno pomocí 10% roztoku KOH (Lach-Ner, s.r.o., Neratovice, ČR) na hodnotu  $\text{pH} = 6$ .

Perly NaOH p.a. (Lach-Ner, s.r.o., Neratovice, ČR) jako náplň do sušící trubice.

Kalibrační pH pufr,  $4,01 \pm 0,02$ , Mettler-Toledo (Greifensee, Švýcarsko).

Kalibrační pH pufr,  $7,00 \pm 0,02$ , Mettler-Toledo (Greifensee, Švýcarsko).

Použité plyny:

Argon čistoty 99,996% , (SIAD).

Dusík čistoty 99,99%, (SIAD).

Vodík čistoty 99,95%, (SIAD).

Helium čistoty 99,998%, (SIAD).

## 2.2 Referenční materiály

Jako referenční materiály byly použity 3 typy vod s různým obsahem arsenu, získané z Institute for National Measurement Standards, National Research Council, Canada,

### 2.2.1 Mořská voda z blízkosti pobřeží CASS-5

Vzorek mořské vody byl odebrán v červenci roku 2007 v přístavu Halifax v Novém Skotsku v hloubce 12 metrů. Následně byl vzorek okyselen ultračistou kyselinou dusičnou na  $\text{pH} = 1,6$  a po dalších úpravách je nyní uchovávan v chladu v 500 ml polyethylenové láhvi.

Hmotnostní podíl arsenu ve vzorku je  $1,21 \pm 0,09 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$  a podíl koncentrační je  $1,24 \pm 0,09 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$ .

### 2.2.2 Říční voda SLRS-5

Vzorek říční vody byl odebrán ve městě Ottawa v úpravně pitné vody. Následně byl vzorek okyselen ultračistou kyselinou dusičnou na  $\text{pH} = 1,6$  a po dalších úpravách je nyní uchovávan v chladu v 500 ml polyethylenové láhvi.

Hmotnostní podíl arsenu ve vzorku je  $0,413 \pm 0,039 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ .

### 2.2.3 Říční voda SLRS-4

Vzorek říční vody byl odebrán z řeky Ottawy v Chenaux, Ontario, přibližně 100 km proti proudu řeky od města Ottawa. Následně byl vzorek okyselen ultračistou kyselinou dusičnou na  $\text{pH} = 1,6$  a po dalších úpravách je nyní uchováván v chladu v 500 ml polyethylenové láhvi.

Koncentrační podíl arsenu ve vzorku je  $0,68 \pm 0,06 \mu\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$ .

### 2.2.4 Mořská voda NASS-5

Vzorek mořské vody byl odebrán v severním Atlantiku v hloubce 10 m jihovýchodně od Halifaxu, Kanada. Následně byl vzorek okyselen ultračistou kyselinou dusičnou na  $\text{pH} = 1,6$  a po dalších úpravách je nyní uchováván v chladu v 500 ml polyethylenové láhvi.

Koncentrační podíl arsenu ve vzorku je  $1,27 \pm 0,12 \mu\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$ .

## 2.3 Experimentální uspořádání

### 2.3.1.HG-CT-AAS

Jednotlivé části a parametry optimalizace pro metodu generování hydridů (koncentrace redukčního činidla a reakčního média, objem reakční cívky, objem separátoru fází, průtok nosného plynu, konstrukce pasti, rozměry a průtok vzduchu do atomizátoru) byly optimalizovány a popsány již dříve.<sup>43,44</sup>

#### 2.3.1.1 Přístrojové vybavení a části systému

- atomový absorpční spektrometr AAnalyst 800 Perkin-Elmer (Massachusetts, USA)
- zdroj záření: arsenová bezelektroková výbojka EDL systém 2, Perkin-Elmer
  - o vlnová délka 193,7 nm
  - o šířka štěrbin 0,7 mm
  - o napájecí proud 376 mA
- systém peristaltických pump s injekčním ventilem, FIAS 400, Perkin-Elmer
- PTFE hadičky, vnitřní průměr 1,0 mm VICI® (Waterbury, Houston, TX)
- Tygon hadičky, vnitřní průměr 0,89 mm Ismatec (Weirtheim-Mondfeld, Německo)
- Tygon hadičky, vnitřní průměr 1,41 mm Ismatec (Weirtheim-Mondfeld, Německo)
- T-konektory s průměry 0,75 a 1 mm, VICI® (Waterbury, Houston, TX)
- digitální průtokoměr pro helium, 32915-84, Cole-Parmer Instrument Company (Vernor Hills, Illinois, USA)



- průtokoměr pro vodík, FMA – 2604A, Omega Engineering, Inc.(Stamford, CT, USA)
- průtokoměr pro vzduch, FMA – 2604A, Omega Engineering, Inc.(Stamford, CT, USA)
- software WinLab 32, Perkin-Elmer (Massachusetts, USA)

### **2.3.1.2 Separátor fází**

Separátor fází s nuceným odtahem je používán pro oddělení plynné fáze a fáze kapalně, která je pomocí peristaltické pumpy odčerpávána do odpadu.

V metodě HG-CT-AAS je kvůli přetlaku v U-trubici použit separátor fází s nuceným odtahem, který byl vyroben již dříve z 50 ml polypropylenové zkumavky se šroubovacím uzávěrem se třemi otvory. PTFE hadičkou, která byla stočená ke stěně separátoru, aby směs stékala právě po jeho stěně, byla do separátoru fází přiváděna reakční směs. Plynná fáze byla odváděna PTFE hadičkou o vnitřním průměru 1,6 mm přes sušící trubici dále do kryogenní pasti a odpadní kapalná fáze byla odváděna pomocí peristaltické pumpy PTFE hadičkou ponořenou až na dno zkumavky.

### **2.3.1.3 Sušící trubice**

Sušící trubice je plastová trubice o délce 11,4 cm naplněná pevným NaOH p.a. Tato trubice byla podrobně popsána již v předchozích projektech.<sup>45</sup>

### **2.3.1.4 Kryogenní past**

Kryogenní past je tvořena křemennou U-trubicí o vnitřním průměru 2,5 mm, která je celá ovinuta odporově vyhřívaným drátem Ni80-Cr20 (o.d. 0,6 mm;  $5,275 \Omega \cdot m^{-1}$ ; 15  $\Omega$ , Omega engineering, inc., Stamford, USA). Trubice byla naplněna chromatografickou náplní a pro zabránění jejímu vysypání byla do obou konců U-trubice vložena skelná vata.

U-trubice byla přibližně ze 4/5 ponořena do kapalného dusíku v Dewarově skleněné nádobě s ochranným pláštěm o celkovém objemu 4,3 l.

Trubicí volně prochází nosný plyn a vodík uvolněný při reakci, oproti tomu hydridy jsou zde zachyceny. Po ukončení generování je Dewarova nádoba s dusíkem ručně sejmuta a po následném ohřevu odporově vyhřívaným drátem dochází k separaci jednotlivých forem podle jejich teplot varu (viz. 1.2.4).

### **2.3.1.5 Multiatomizátor**

Vygenerované hydridy jednotlivých forem arsenu byly atomizovány

v multiatomizátoru, jehož optická trubice měla délku 120 mm, vnitřní průměr 7 mm a byl opatřen celkem 14-ti otvory.

Optické rameno multiatomizátoru bylo vyhříváno na teplotu 900°C pískou s regulátorem teploty. Vzduch byl do multiatomizátoru přiváděn PTFE hadičkou o konstantním průtoku  $35 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ , která byla udržována pomocí hmotnostního průtokoměru (viz. 1.3.2).

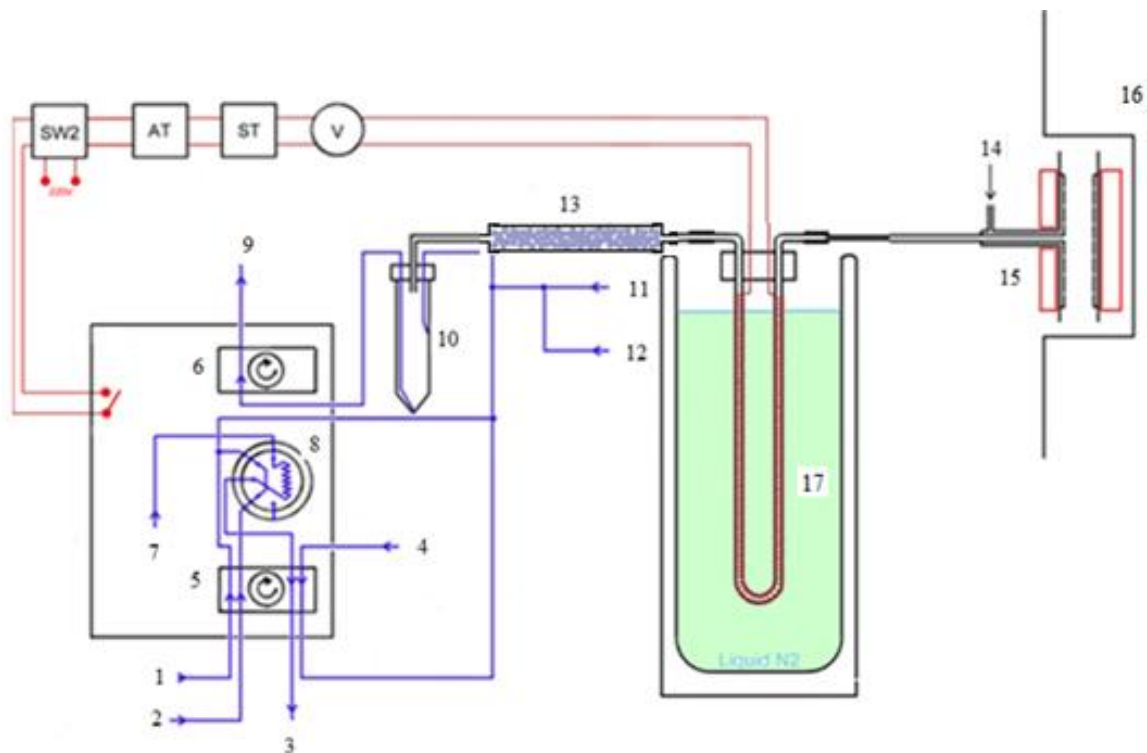
### **2.3.1.6 Popis experimentu**

Automatizovaný systém pro generování hydridů využívá systému „flow injection“, tedy systému peristaltických pump s injekčním ventilem, který je ovládaný softwarem spektrometru WinLab 32.

Do injekčního ventilu, který je tvořen 500  $\mu\text{l}$  smyčkou, je dávkován vzorek do proudu nosného media, deionizované vody. Pomocí FIAS 400 systému byl čerpán roztok TRIS·HCl pufru, který byl veden do prvního T-konektoru, kde byl smíchán s přivedeným roztokem vzorku. Takto smíchaný roztok byl veden do druhého T-konektoru, kam byl přiváděn pomocí FIAS 400 také roztok redukčního činidla  $\text{NaBH}_4$ . Tento výsledný roztok byl veden přes reakční cívku o objemu 790  $\mu\text{l}$  do třetího T-konektoru, kde byl přidáván nosný plyn, helium, o průtoku  $75 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$  a vodík o průtoku  $15 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ .

Reakční směs byla přivedena do separátoru fází s nuceným odtahem (viz 2.3.1.2), kdy plynná fáze, generované hydridy, je vedena dále až do detektoru a kapalná směs je pomocí peristaltické pumpy odčerpávána do odpadu.

Generované hydridy jsou dále vedeny přes sušící trubici (viz 2.3.1.3) do kryogenní pasti (viz 2.3.1.4) a dále do atomizátoru (viz 2.3.1.5). Schéma metody HG-CT-AAS je zobrazeno na obrázku 2.1.



**Obr. 2.1** Schéma metody HG- CT-AAS. 1 – HCl, 2 – voda, nosné medium, 3 – odpad, 4 – tetrahydridoboritanu sodný, 5 – peristaltická pumpa 1, 6 – peristaltická pumpa 2, 7 – vzorek, 8 – injekční ventil, 9 – odpad, 10 – separátor fází, 11 – helium, 12 – vodík, 13 – sušící trubice, 14 – vzduch, 15 – multiatomizátor, 16 – atomový absorpční spektrometr, 17 – kapalný dusík

### 2.3.1.7 Měřicí cyklus

Celý měřicí cyklus byl kontrolován automatickým systémem FIAS 400. Program je zobrazen v tabulce 2.1.

**Tab. 2.1** Program FIAS 400 pro metodu HG-CT-AAS<sup>22</sup>

krok	čas [s]	pumpa 1 [ot. · min <sup>-1</sup> ]	pumpa 2 [ot. · min <sup>-1</sup> ]	injekční ventil	ohřev U- trubice	pozn.
P	20	31	100	plnění	vypnuto	plnění injekční cívky
1	60	31	0	nástřik	vypnuto	generování a transport hydridů
2	90	0	0	nástřik	vypnuto	
3	23	0	0	plnění	zapnuto	předehřátí U-trubice
4*	33	0	0	plnění	zapnuto	ohřátí U-trubice
5*	7	0	0	plnění	vypnuto	přestávka v ohřevu
6*	20	0	0	plnění	zapnuto	ohřátí U-trubice
7	35	0	100	plnění	zapnuto	chlazení U-trubice
8	1	0	0	plnění	vypnuto	příprava na další cyklus

\* krok čtení signálu

## 2.3.2 HG-CT-ICP-MS

### 2.3.2.1 Přístrojové vybavení a části systému

- hmotnostní spektrometr s indukčně vázaným plazmatem, 7700x Agilent Technologies
- autosampler ASX – 500 Series, Agilent Technologies
- Integrated Sample Introduction System, Agilent Technologies
- digitální průtokoměr pro helium, 32915-84, Cole-Parmer Instrument Company (Vernor Hills, Illinois, USA)
- Tygon hadičky, vnitřní průměr 1,02 mm Ismatec (Weirtheim-Mondfeld, Německo)
- PTFE hadičky, vnitřní průměr 1,00 mm VICI® (Waterbury, Houston, TX)
- T-konektory s průměry 0,75 a 1,00 mm, VICI® (Waterbury, Houston, TX)
- software MassHunter, Agilent Technologies

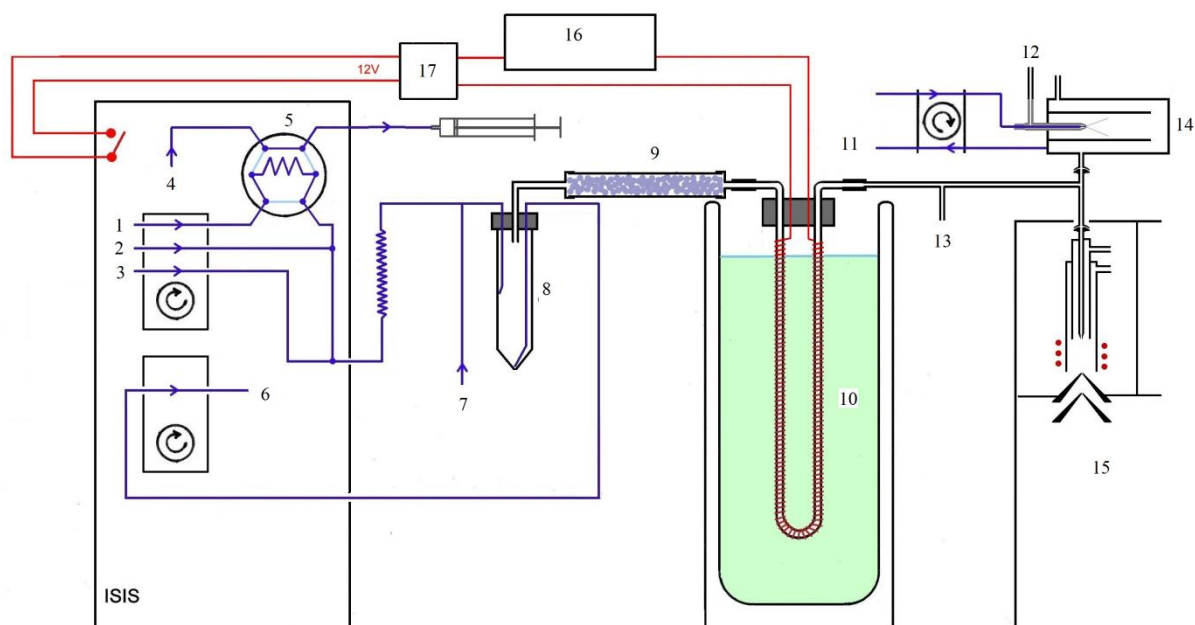
### 2.3.2.2 Popis experimentu

Automatizovaný systém pro generování hydridů s detekcí ICP-MS využívá systému „ISIS“, tedy systému peristaltických pump spojených se systémem ICP-MS, ovládaných softwarem ICP-MS.

Do injekčního ventilu s 500  $\mu\text{l}$  smyčkou, je manuálně nasáván roztok vzorku do proudu nosného média, kterým je deionizovaná voda, vedený do prvního T-konektoru, kde se smíchává s TRIS·HCl pufrům čerpaným první peristaltickou pumpou. Jí je zároveň čerpán i roztok  $\text{NaBH}_4$ , který se v proudu nosného média smíchává s roztokem TRIS·HCl pufru a vzorku. Tato reakční směs prochází reakční cívkou o délce 1,0 m a vnitřním průměru 1,00 mm až do třetího T-konektoru, kde dochází ke smísení s nosným plynem, heliem, o průtoku  $75 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ . Směs přechází do separátoru fází, který je shodný s výše popsáním, použitým při metodě HG-CT-AAS (viz 2.3.1.2).

Generované hydridy jsou dále vedeny přes sušící trubici (viz. 2.3.1.3) do kryogenní pasti (viz 2.3.1.4) a dále do mlžné komory. Zde dochází k jejich zmlžování zmlžovačem a tento aerosol je přes zmlžovací komoru veden do plazmatu, kde je analyt ionizován. Ionty jsou vedeny přes iontovou optiku a kolizní celu na kvadrupólový filtr a na detektor.

Schéma metody HG-CT-ICP-MS je zobrazeno na obrázku 2.2.



**Obr. 2.2** Schéma metody HG-CT-ICP-MS. 1 – deionizovaná voda, 2 – TRIS·HCl pufr, 3 –  $\text{BH}_4^-$ , 4 – roztok vzorku, 5 – injekční ventil, 6 – odpad, 7 – helium, 8 – separátor fází, 9 – sušící trubice s NaOH, 10 – kapalný dusík, 11 – odpad, 12 - nosný plyn, 13 – ředící plyn, 14 – mlžná komora, 15 - systém ICPMS, 16 – zdroj napětí, 17 – spínací relé

### 2.3.2.3 Měřicí cyklus

V této metodě je měřicí cyklus totožný s cyklem v metodě HG-CT-AAS (viz. 2.3.1.7).

## 2.3.3 HPLC-ICP-MS

### 2.3.3.1 Přístrojové vybavení a části systému

- hmotnostní spektrometr s indukčně vázaným plazmatem, 7700x Agilent Technologies
- autosampler ASX – 500 Series, Agilent Technologies
- Integrated Sample Introduction System, Agilent Technologies
- digitální průtokoměr pro helium, 32915-84, Cole-Parmer Instrument Company (Vernor Hills, Illinois, USA)
- chromatografická kolona pro speciaci arsenu v pitné vodě, Agilent G3154-65001, Agilent Technologies
- chromatografická předkolona PRP – X100, Chromservis
- HPLC isokratická pumpa 1200 Series, Agilent Technologies
- manuální injekční šesticečný ventil 7725i, Rhodyne
- Tygon hadičky, vnitřní průměr 1,02 mm Ismatec (Weirtheim-Mondfeld, Německo)
- PTFE hadičky, vnitřní průměr 1,00 mm VICI® (Waterbury, Houston, TX)
- software MassHunter, Agilent Technologies

### 2.3.3.2 Analytická kolona

Analytická kolona Agilent G3154-65001 o délce 150 mm a průměru 4.6 mm je aniontově výměnná kolona již předem naplněná aniontově výměnnou pryskyřicí a hydrofilním polymethakrylátem. Tato kolona se používá pro speciální analýzu arsenu v pitné vodě v metodě HPLC-ICP-MS a jí metodám odvozeným.

### 2.3.3.3 Mobilní fáze

Mobilní fáze byla připravena přesným ředěním ze zásobních roztoků  $2,0 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$   $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  a  $0,2 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$  EDTA a doplněním deionizovanou vodou na výsledný objem 500 ml. Poté byla mobilní fáze zfiltrována přes vodní vývěvu

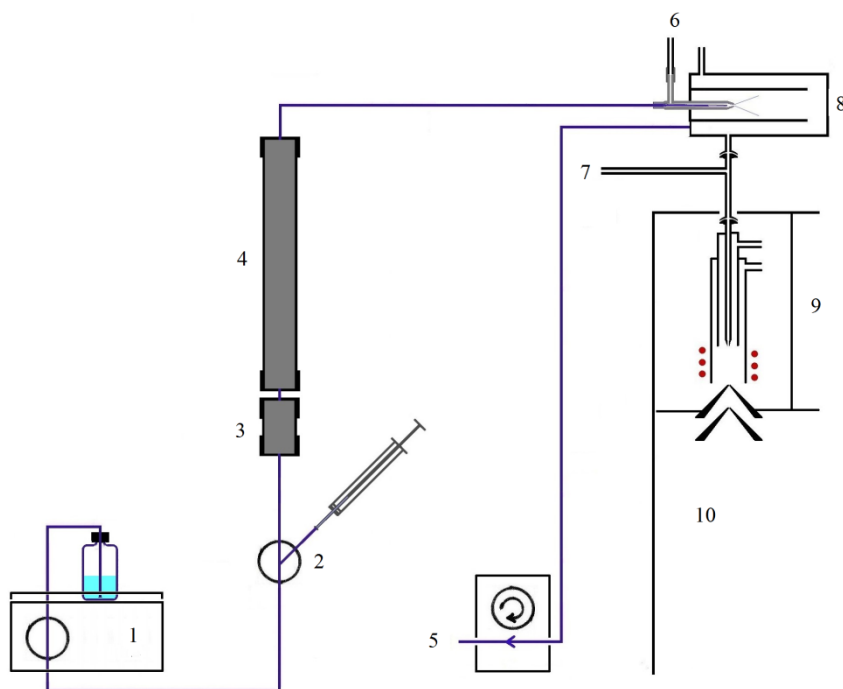
### 2.3.3.4 Popis experimentu

Automatizovaný systém pro metodu HPLC-ICP-MS je ovládaný softwarem hmotnostního spektrometru MassHunter. Mobilní fáze je do kolony čerpána HPLC

isokratickou pumpou o konstantním průtoku  $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ .

Manuální injekční ventil s cívkou o objemu  $50 \mu\text{l}$  je plněn Hamiltonovou pipetou. Vzorek je vnášen do proudu mobilní fáze, je unášen dále do předklony a následně do analytické kolony, kde dochází k separaci jednotlivých forem. Odtud je vzorek dále unášen do koncentrického zamlžovače a přes mlžnou komoru je aerosol veden do plazmatu, kde je analyt ionizován. Přes iontovou optiku a kolizní celu jsou ionty vedeny na kvadrupólový filtr a na detektor.

Schéma metody HPLC-ICP-MS je zobrazeno na obrázku 2.3.



**Obr. 2.3** Schéma systému pro HPLC-ICPMS. 1 – HPLC pumpa, 2 – injekční ventil, 3 – předkolona, 4 – analytická kolona, 5 – odpadní peristaltická pumpa, 6 – zmlžovač, 7 – přívod ředícího plynu, 8 – mlžná komora, 9 – plazmový hořák, 10 – ICP-MS spektrometr

## 2.3.4 HPLC-TGA-HG-ICP-MS

### 2.3.4.1 Přístrojové vybavení a části systému

- hmotnostní spektrometr s indukčně vázaným plazmatem, 7700x Agilent Technologies
- autosampler ASX – 500 Series, Agilent Technologies
- Integrated Sample Introduction System, Agilent Technologies

- digitální průtokoměr pro helium, 32915-84, Cole-Parmer Instrument Company (Vernor Hills, Illinois, USA)
- Tygon hadičky, vnitřní průměr 1,02 mm Ismatec (Weirtheim-Mondfeld, Německo)
- PTFE hadičky, vnitřní průměr 1,00 mm VICI® (Waterbury, Houston, TX)
- digitální průtokoměr pro helium, 32915-84, Cole-Parmer Instrument Company (Vernor Hills, Illinois, USA)
- T-konektory s průměry 0,75 a 1 mm, VICI® (Waterbury, Houston, TX)
- software MassHunter, Agilent Technologies

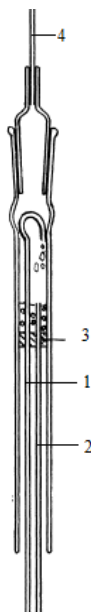
#### **2.3.4.2 Separátor fází**

Separátor fází s nuceným odtahem je používán pro oddělení plynné fáze a fáze kapalně, která je pomocí peristaltické pumpy odčerpávána do odpadu.

V této metodě je tvořen křemennou trubičkou o celkovém objemu 2 ml, která je ze spodní strany utěsněna septem se dvěma otvory, kudy jsou vedeny přívodní PTFE hadička a PTFE hadička pro odvod kapalně fáze do odpadu. Přívodní PTFE hadička byla stočená ke stěně separátoru, aby směs stékala právě po jeho stěně. Plynná fáze byla vedena přes teflonovou pásku další PTFE hadičkou do ICP-MS detektoru. Tento separátor fází je zobrazen na obrázku 2.4 a byl detailně popsán v předchozí práci.<sup>46</sup>

Další porovnávaný miniaturní separátor fází pocházel z komerčního systému „FIAS“. Je vyrobený z plastu a má velmi malý vnitřní objem (0,8 ml). Ve svrchní části plynná fáze procházela teflonovou membránou pro odstranění aerosolu.





**Obr. 2.4** Křemenný separátor fází s nuceným odtahem. 1 – přívodní PTFE hadička, 2 – Odvodní PTFE hadička, 3 – těsnící septum, 4 – odvod do generátoru. (cit. <sup>46</sup>)

### 2.3.4.3 Popis experimentu

Při této metodě byly některé části a parametry optimalizace (koncentrace redukčního činidla a reakčního média, průtok nosného plynu, koncentrace a pH mobilní fáze) převzaty z předchozích metod HG-CT-ICPMS a HPLC-ICP-MS.

Tato metoda využívá on-line předredukce kyselinou thioglykolovou, která byla vyvinuta a optimalizována v předchozích projektech pro metodu HG-CT-AAS.<sup>21</sup>

Automatizovaný systém pro metodu HPLC-(TGA)-HG-ICP-MS je ovládaný softwarem hmotnostního spektrometru s indukčně vázaným plazmatem, 7700x Agilent Technologies. Mobilní fáze je do kolony čerpána s konstantním průtokem  $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ .

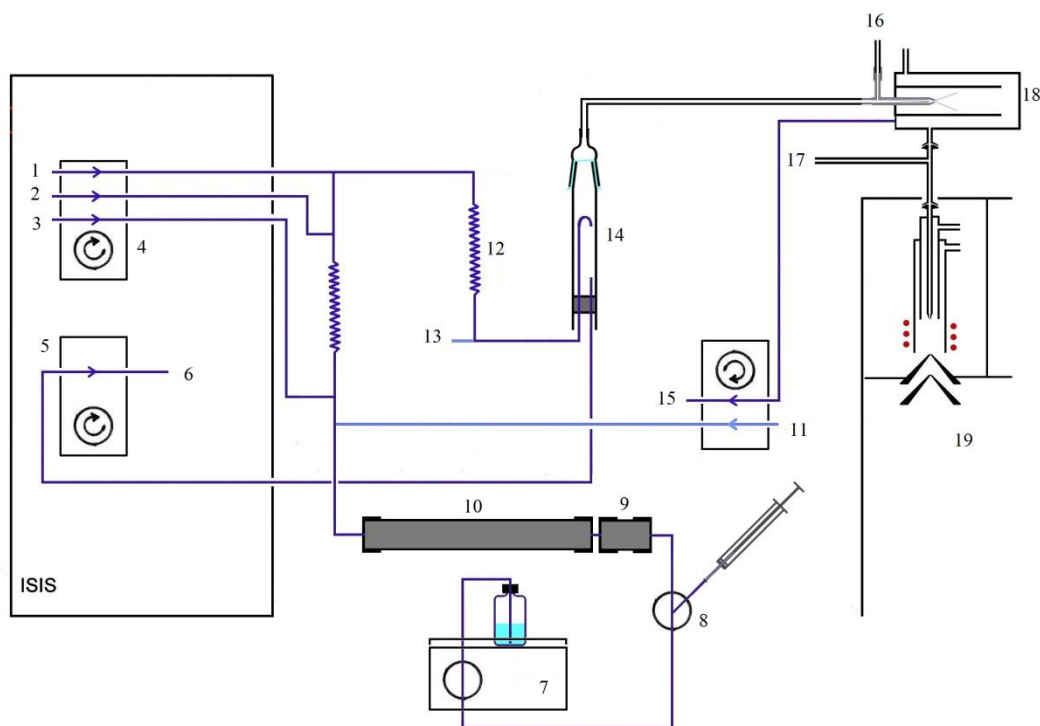
Do injekčního ventilu s cívkou  $50 \mu\text{l}$  je Hamiltonovou pipetou injektován roztok vzorku, který je vnášen do proudu mobilní fáze a prochází přes předklonu do analytické kolony, kde dochází k separaci jednotlivých forem. Odtud je vzorek dále unášen do prvního T-konektoru, kde se mísí se vzduchem, pro vytvoření segmentovaného toku, který je čerpán peristaltickou pumpou rychlostí  $0,25 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ .

Zároveň je pomocí ISIS systému (systému peristaltických pump spojených se systémem ICP-MS) přiváděn roztok TGA rychlostí  $0,3 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$  vedené do druhého T-konektoru pro on-line předredukci pětimocných forem arsenu. Ve třetím T-konektoru je k roztoku přičerpáván TRIS·HCl pufr a ve čtvrtém T-konektoru se do roztoku přidává  $\text{NaBH}_4$  oba rychlostí  $1,0$

$\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ . Takto vzniklá reakční směs je vedena do reakční cívky tvořené PTFE hadičkou o celkovém objemu 2,01 ml. Roztok dále postupuje do posledního T-konektoru, kam je přiváděn nosný plyn o konstantním průtoku  $75 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ .

Vzorek je PTFE hadičkou veden do separátoru fází (viz 2.3.4.2) a dále do ICP-MS spektrometru.

Schéma metody HPLC-(TGA)-HG-ICP-MS je zobrazeno na obrázku 2.5.



**Obr. 2.5** Schéma systému HPLC-(TGA)-HG-ICP-MS. 1 –  $\text{NaBH}_4$ , 2 –  $\text{TRIS}\cdot\text{HCl}$  pufr, 3 – TGA, 4, 5 – peristaltické pumpy systému ISIS, 6 – odpad, 7 – HPLC, 8 – injekční ventil, 9 – analytická předkolona, 10 – analytická kolona, 11 – vzduch, 12 – cívka o objemu 2,01 ml, 13 – helium, 14 – separátor fází, 15 – odpad, 16 – zmlžovač, 17 – přívod ředícího plynu, 18 – mlžná komora, 19 – plazmový hořák, 20 – ICPMS spektrometr

### 2.3.5 Další použité přístroje

- pH metr, Seven easy pH, Mettler Toledo (Greifensee, Švýcarsko)
- elektroda InLab®413 pH, Mettler Toledo (Greifensee, Švýcarsko)
- magnetická míchačka, IKA® lab disc [WHITE] (Staufen, Německo)
- analytické váhy s přesností 0,00001 g, Sartorius R160P (Německo)
- předvážky s přesností 0,01 g, KERN EW 600-2M (Německo)
- automatické pipety 10 – 100  $\mu\text{l}$ , 20 – 200  $\mu\text{l}$ , 100 – 1000  $\mu\text{l}$ , Biohit

## 2.4 Zpracování dat

Naměřené signály byly zaznamenávány v softwaru WinLab 32 (pro AAS) a v softwaru MassHunter (pro ICP-MS), odkud byly dále exportovány, integrovány a vyhodnocovány v programu Microsoft® Excel 2003.

Udávané hodnoty jsou průměrem z alespoň 3 paralelních měření. Výsledky stanovení specií As v referenčních materiálech jsou udávány jako výsledná hodnota a 95% interval spolehlivosti.

Výška základní linie signálu byla získána jako průměrná hodnota signálu v intervalu 30 s v oblasti signálu, kde není pozorován žádný pík. Měřítkem šumu základní linie je směrodatná odchylka bodů v tomto intervalu.

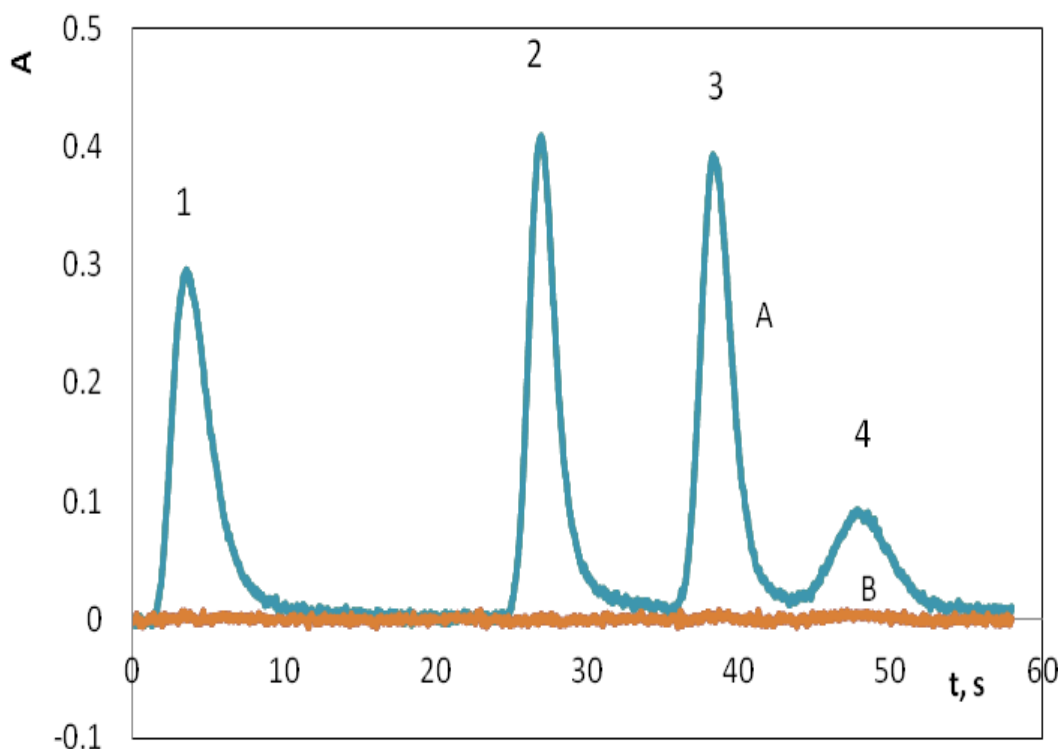
### 3. Výsledková část

#### 3.1 Metoda generování hydridů ve spojení s kolekcí vymrazování a detekcí atomové absorpční spektrometrie

Metoda HG-CT-AAS byla vyvinuta a optimalizována již dříve a v této diplomové práci je použita zejména pro porovnání citlivostí s dalšími metodami.

##### 3.1.1 Chromatogram

Pomocí této metody byly generovány a stanoveny některé formy anorganického arsenu i jeho methylovaných forem. Ukázkový chromatogram forem iAs, MAs, DMAs a TMAsO o koncentraci  $2 \mu\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$  společně se slepým vzorkem (2% roztok v L-cysteinu v deionizované vodě) je zobrazen na obr. 3.1. Formy iAs<sup>III</sup>, MAs<sup>V</sup> a DMAs<sup>V</sup> o koncentraci  $2 \mu\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$  každé formy byly stanoveny po předchozí předredukci v roztoku 2% L-cysteinu·HCl (koncentrace  $2 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ).



**Obr. 3.1** Ukázkový chromatogram měření. A - směsný standard o koncentraci jednotlivých forem  $2 \mu\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$  v roztoku 2% L-cysteinu. 1 – iAs<sup>III</sup>; 2 – MAs<sup>V</sup>; 3 – DMAs<sup>V</sup>; 4 - TMAs<sup>V</sup>O. B – slepý vzorek (2% roztok L-cysteinu v DIV)

Hodnota slepého vzorku je pod limitem detekce.

Z grafu je patrné, že pro  $\text{TMAAs}^{\text{V}}\text{O}$  je použití L-cysteinu jako předredukce nevhodné, protože se redukuje pomocí L-cysteinu, přidávaného jako předredukční činidlo, na těkavý  $(\text{CH}_3)_3\text{As}$ , který je zčásti uvolněn ještě před analýzou. Z tohoto důvodu je výška posledního píku představujícího právě  $\text{TMAAs}^{\text{V}}\text{O}$  v porovnání s ostatními píky nižší.  $\text{TMAAs}^{\text{V}}\text{O}$  se musí stanovovat z alikvótu bez použití předredukce L-cysteinu.

### 3.1.2 Kalibrační závislosti, limity detekce a kvantifikace

Kalibrační závislosti forem  $\text{iAs}^{\text{V}}$ ,  $\text{MAAs}^{\text{V}}$ ,  $\text{DMAAs}^{\text{V}}$  a  $\text{TMAAs}^{\text{V}}\text{O}$  byly naměřeny z roztoků směsných standardů předredukovaných v roztoku 2% L-cysteinu, s výjimkou  $\text{TMAAs}^{\text{V}}\text{O}$ .

Pro každou koncentraci byla provedena tři měření. Hodnoty směrnic kalibračních závislostí zobrazuje tabulka 3.1.

Pro zjištění limitů detekce a kvantifikace pro jednotlivé formy byl použit slepý vzorek, 2% roztok L-cysteinu v deionizované vodě a deionizovaná voda pro  $\text{TMAAs}^{\text{V}}$ , u kterých bylo provedeno 10 měření a byly použity hodnoty směrnice kalibračních závislostí. Limity detekce byly vypočítány jako hodnota koncentrace slepého vzorku, která odpovídá signálu o velikosti třech směrodatných odchylek. V případě limitů kvantifikace se jedná o velikost deseti směrodatných odchylek. Limity detekce i kvantifikace shrnuje tabulka 3.1.

**Tab. 3.1** Limity detekce a kvantifikace jednotlivých pětímocných forem arsenu;  $\alpha$  – směrnice kalibrační závislosti

Forma As	$\alpha$ [ml·s·ng <sup>-1</sup> ]	LOD [ng·l <sup>-1</sup> ]	LOQ [ng·l <sup>-1</sup> ]
$\text{iAs}^{\text{V}}$	2,6234	9,2	30,7
$\text{MAAs}^{\text{V}}$	2,2841	2,3	7,7
$\text{DMAAs}^{\text{V}}$	3,6333	2,0	6,6
$\text{TMAAs}^{\text{V}}\text{O}$	1,9905	3,4	11,4

### 3.1.3 Referenční materiály

Výše popsané referenční materiály mořské a říční vody byly analyzovány pomocí této metody, byly získány koncentrace jednotlivých forem arsenu ve vzorcích a výsledky včetně certifikované celkové hodnoty obsahu arsenu ukazuje tabulka 3.2.

Referenční materiály, stejně jako směsné roztoky standardů a slepé vzorky, byly při prvním měření nejprve předredukovány 2% roztokem L-cysteinu. Druhým měřením byla zjišťována koncentrace TMA<sup>V</sup>O v alikvótu bez předredukce.

**Tab. 3.2** Měření koncentrace jednotlivých forem arsenu v referenčních materiálech

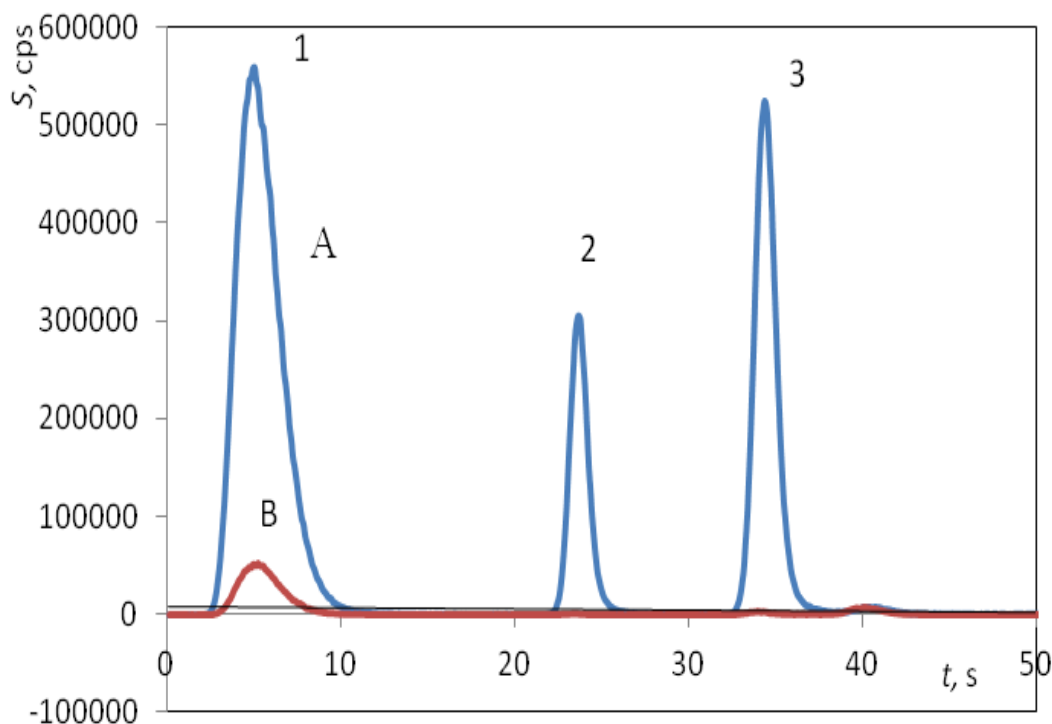
Referenční materiál	iAs [ng·ml <sup>-1</sup> ]	MAs [ng·ml <sup>-1</sup> ]	DMAs [ng·ml <sup>-1</sup> ]	TMA <sup>V</sup> O [ng·ml <sup>-1</sup> ]	Celkem [ng·ml <sup>-1</sup> ]	Certifikovaná hodnota [ng·ml <sup>-1</sup> ]
CASS-5	1036 ± 44	9 ± 4	121 ± 18	17 ± 3	1183 ± 48	1210 ± 90
SLRS-5	313 ± 10	42 ± 6	46 ± 8	19 ± 2	420 ± 14	413 ± 39

## 3.2 Metoda generování hydridů ve spojení s kolekcí vymrazováním a hmotnostním spektrometrem s iontově vázaným plazmatem

Metoda HG-CT-ICP-MS je totožná s metodou HG-CT-AAS (viz 3.1), pouze s tím rozdílem, že detektor ICP-MS v této metodě je citlivější.

### 3.2.1 Chromatogram

Pomocí generování hydridů, jejich zachycení v kryogenní pasti a následnému uvolnění do detektoru ICP-MS byly získány chromatogramy směsných standardů. Na obrázku 3.2 je zobrazen ukázkový chromatogram forem iAs, MAs a DMAs o různé koncentraci, předredukováných 2% roztokem L-cysteinem společně se slepým vzorkem (2% roztok L-cysteinu v deionizované vodě).



**Obr. 3.2** Ukázkový chromatogram měření. A - směsný roztok standardů o koncentraci  $c(\text{iAs}^{\text{V}}) = 125 \text{ ng} \cdot \text{dm}^{-3}$ ;  $c(\text{MAs}^{\text{V}}) = 31,5 \text{ ng} \cdot \text{dm}^{-3}$ ;  $c(\text{DMAs}^{\text{V}}) = \text{ng} \cdot \text{dm}^{-3}$  v roztoku 2% L-cysteinu. 1 –  $\text{iAs}^{\text{V}}$ ; 2 –  $\text{MAs}^{\text{V}}$ ; 3 –  $\text{DMAs}^{\text{V}}$  B – slepý vzorek (2% roztok L-cysteinu v DIV)

### 3.2.2 Kalibrační závislosti

Kalibrační závislosti forem  $\text{iAs}^{\text{V}}$ ,  $\text{MAs}^{\text{V}}$ ,  $\text{DMAs}^{\text{V}}$  a  $\text{TMA}^{\text{V}}\text{O}$  byly naměřeny z roztoků směsných standardů předredukovaných v roztoku 2% L-cysteinu, s výjimkou  $\text{TMA}^{\text{V}}\text{O}$ , u kterého nebyla předredukce provedena.

Měření probíhala za různých experimentálních podmínek: jednak v tzv. „no gas mode“, při nulovém průtoku helia kolizní celou, a při průtoku helia  $3,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$  (cela je přepnutá do kolizního režimu (viz. 1.6). Pokud není uvedeno jinak, v průběhu celé diplomové práce je reakční/kolizní cela nastavena právě do kolizního režimu, kdy jí prochází helium o konstantním průtoku  $3,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ .

Jednotlivé hodnoty směrnic kalibračních závislostí v tzv. „no gas mode“ zobrazuje tabulka 3.3 a hodnoty směrnic kalibračních závislostí v kolizním režimu zobrazuje tabulka 3.4.

### 3.2.3 Limity detekce a kvantifikace

Měření limitů detekce této metody probíhalo při obou nastaveních kolizní cely. V prvním případě probíhalo měření v tzv. „no gas mode“ (viz. 3.2.2). Během těchto podmínek

byl použit slepý vzorek (2% roztok L-cysteinu v deionizované vodě) pro měření LOD a LOQ u forem  $iAs^V$ ,  $MAs^V$  a  $DMAs^V$ , u kterého bylo provedeno 10 měření a byly použity hodnoty směrnice kalibračních závislostí.

Limity detekce byly vypočítány jako hodnota koncentrace, která odpovídá signálu o velikosti třech směrodatných odchylek. V případě limitů kvantifikace se jedná o velikost deseti směrodatných odchylek. Jednotlivé limity detekce i kvantifikace shrnuje tabulka 3.3.

**Tab. 3.3** Limity detekce a kvantifikace jednotlivých pětimocných forem arsenu v režimu „no gas mode“;  $\alpha$  – směrnice kalibrační závislosti

Forma As	$\alpha$ [ml·s·ng <sup>-1</sup> ]	LOD [ng·l <sup>-1</sup> ]	LOQ [ng·l <sup>-1</sup> ]
$iAs^{III+V}$	53258	2,83	9,43
$MAs^{III+V}$	48231	0,05	0,15
$DMAs^{III+V}$	48596	0,08	0,28

Ve druhém případě byl nastaven kolizní režim s průtokem helia 3,5 ml·min<sup>-1</sup>. K měření byl použit slepý vzorek (2% roztok L-cysteinu v deionizované vodě) pro měření LOD a LOQ u forem  $iAs^V$ ,  $MAs^V$  a  $DMAs^V$ , u kterého bylo provedeno 10 měření a byly použity hodnoty směrnice kalibračních závislostí. Stejným způsobem probíhalo měření i pro formu  $TMAAs^VO$ , jen bez použití předredukce L-cysteinu.

Výpočet LOD a LOQ za těchto podmínek je totožný jako v předchozím případě. Limity detekce a kvantifikace naměřené v těchto experimentálních podmínkách shrnuje tabulka 3.4.



**Tab. 3.4** Limity detekce a kvantifikace jednotlivých pětimocných forem arsenu s průtokem kolizního plynu helia 3,5 ml·min<sup>-1</sup>;  $\alpha$  – směrnice kalibrační závislosti

Forma As	$\alpha$ [ml·s·ng <sup>-1</sup> ]	LOD [ng·l <sup>-1</sup> ]	LOQ [ng·l <sup>-1</sup> ]
iAs <sup>III+V</sup>	13608	2,45	8,16
MAs <sup>III+V</sup>	12504	0,06	0,20
DMAs <sup>III+V</sup>	12522	0,14	0,46
TMA <sup>V</sup> O	10251	0,19	0,64

Z obou tabulek vyplývá, že při použití kolizní cely sice dochází k poklesu citlivosti, ovšem vliv na hodnoty limitů detekce je minimální.

### 3.2.4 Referenční materiály

Tabulka 3.5 obsahuje výsledky jednotlivých forem, včetně certifikovaných hodnot koncentrací, které byly získány měřením referenčních materiálů mořské a říční vody touto metodou.

Referenční materiály, stejně jako směsné roztoky standardů a slepé vzorky, byly při prvním měření nejprve předredukovány 2% roztokem L-cysteinu. Druhým měřením byla zjišťována koncentrace TMA<sup>V</sup>O v alikvótu bez předredukce.

**Tab. 3.5** Měření koncentrace jednotlivých forem arsenu v referenčních materiálech

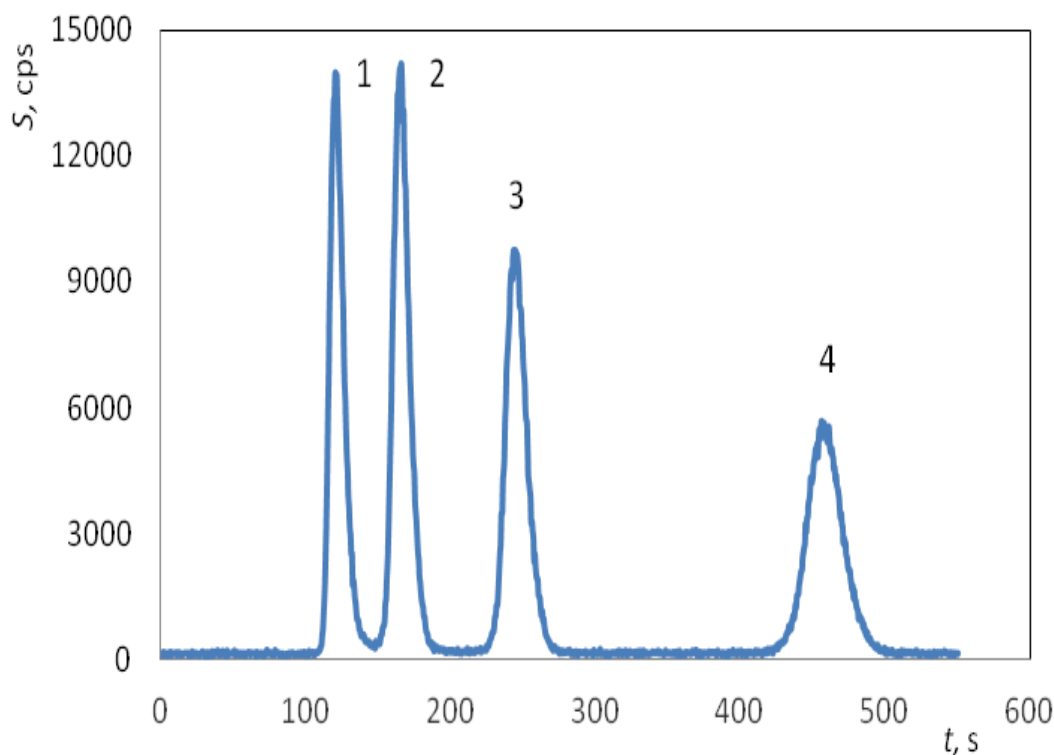
Referenční materiál	iAs [ng·l <sup>-1</sup> ]	MAs [ng·l <sup>-1</sup> ]	DMAs [ng·l <sup>-1</sup> ]	TMA <sup>V</sup> O [ng·l <sup>-1</sup> ]	Celkem [ng·l <sup>-1</sup> ]	Certifikovaná hodnota [ng·l <sup>-1</sup> ]
CASS-5	998 ± 4	23 ± 1	75 ± 1	20 ± 0	1116 ± 4	1210 ± 90
SLRS-5	267 ± 6	37 ± 1	44 ± 1	24 ± 0	372 ± 6	413 ± 39
SLRS-4	482 ± 8	62 ± 0	125 ± 1	56 ± 0	725 ± 8	680 ± 60
NASS-5	1084 ± 4	2 ± 0	39 ± 1	47 ± 1	1172 ± 4	1270 ± 120

### 3.3 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostním spektrometrem s indukčně vázaným plazmatem

#### 3.3.1 Chromatogram

Pomocí této metody byly získány chromatogramy anorganického trojmocného i pětímocného arsenu a také methylovaných forem  $\text{MAs}^{\text{V}}$  a  $\text{DMAs}^{\text{V}}$ .

Na obrázku 3.3 je zobrazen ukázkový chromatogram směsného standardu forem  $\text{iAs}^{\text{III}}$ ,  $\text{DMAs}^{\text{V}}$ ,  $\text{MAs}^{\text{V}}$  a  $\text{iAs}^{\text{V}}$  v tomto pořadí o koncentraci  $5 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  každé formy.



**Obr. 3. 3** Ukázkový chromatogram směsného standardu 1-  $\text{iAs}^{\text{III}}$ , 2-  $\text{DMAs}^{\text{V}}$ , 3-  $\text{MAs}^{\text{V}}$  4-  $\text{iAs}^{\text{V}}$  o koncentraci  $5 \mu\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$  každé formy

#### 3.3.2 Kalibrační závislosti a limity detekce a kvantifikace

Kalibrační závislosti forem  $\text{iAs}^{\text{III}}$ ,  $\text{DMAs}^{\text{V}}$ ,  $\text{MAs}^{\text{V}}$  a  $\text{iAs}^{\text{V}}$  byly naměřeny z roztoků směsných standardů a pro každou koncentraci byla provedena tři měření. Hodnoty směrnice kalibračních závislostí zobrazuje tabulka 3.6.

Pro zjištění limitů detekce a kvantifikace pro jednotlivé formy byl použit slepý vzorek, směsný roztok standardů  $\text{iAs}^{\text{III}}$ ,  $\text{DMAs}^{\text{V}}$ ,  $\text{MAs}^{\text{V}}$  a  $\text{iAs}^{\text{V}}$  o koncentraci  $25 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$  pro každou formu, u kterého bylo provedeno 11 měření a byly použity hodnoty směrnice kalibračních

závislostí. Limity detekce byly vypočítány jako hodnota koncentrace, která odpovídá signálu o velikosti třech směrodatných odchylek. V případě limitů kvantifikace se jedná o velikost deseti směrodatných odchylek. Jednotlivé limity detekce i kvantifikace shrnuje tabulka 3.6.

**Tab. 3.6** Limity detekce a kvantifikace jednotlivých pětimocných forem arsenu;  $\alpha$  – směrnice kalibrační závislosti

Forma As	$\alpha$ [ml·s·ng <sup>-1</sup> ]	LOD [ng·l <sup>-1</sup> ]	LOQ [ng·l <sup>-1</sup> ]
iAs <sup>V</sup>	30950	25,6	85,3
MAs <sup>V</sup>	33074	15,6	52,1
DMA <sup>V</sup>	37273	15,5	51,7
iAs <sup>III</sup>	31663	15,4	51,5

### 3.3.3 Referenční materiály

Tabulka 3.7 obsahuje výsledky jednotlivých forem, včetně certifikovaných hodnot koncentrací, které byly získány měřením referenčních materiálů mořské a říční vody touto metodou.

Během tohoto měření nebyla použita žádná předredukce, pouze bylo potřeba roztoky referenčních materiálů alespoň částečně zneutralizovat, tzn. pH v rozmezí 5 – 7.

Kvůli použité koloně, nebylo možné změřit referenční materiál mořské vody „CASS-5“, díky vysoké koncentraci chloridových aniontů v koloně, protože během přímé analýzy vzorků s vysokým obsahem soli (např. mořská voda, lidská moč) je dělení na použité nemožné.<sup>47, 48, 49)</sup> Bylo by nutné použít jinou kolonu, například iontově výměnnou kolonu se sulfonovou pryskyřicí a zředěnou kyselinou dusičnou o pH = 2,0 jako mobilní fázi.<sup>50</sup> Hledání vhodné kolony a mobilní fáze však nebylo předmětem této diplomové práce.

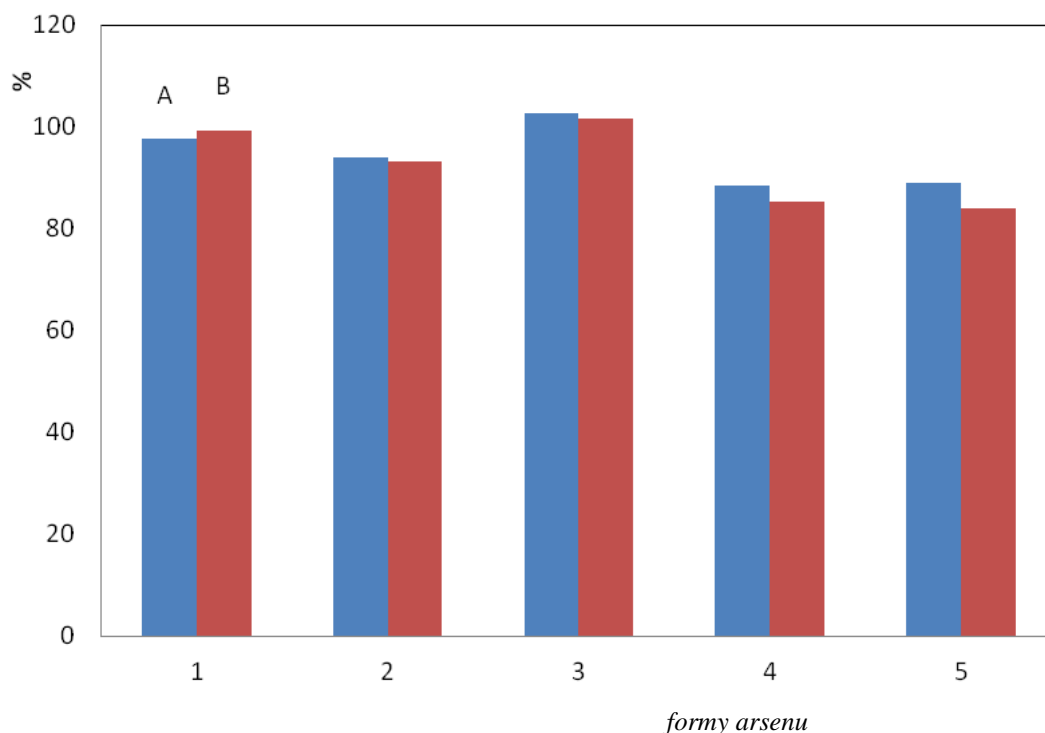
**Tab. 3.7** Měření koncentrace jednotlivých forem arsenu v referenčních materiálech

Referenční materiál	iAs [ng·l <sup>-1</sup> ]	MAs [ng·l <sup>-1</sup> ]	DMAs [ng·l <sup>-1</sup> ]	TMA <sub>s</sub> O [ng·l <sup>-1</sup> ]	Celkem [ng·l <sup>-1</sup> ]	Certifikovaná hodnota [ng·l <sup>-1</sup> ]
SLRS-5	279 ± 16	< LOQ	52 ± 4	< LOD	373 ± 20	413 ± 39
SLRS-4	535 ± 30	56 ± 3	63 ± 12	< LOD	657 ± 31	680 ± 60

### 3.3.4 Ztráty specií arsenu na koloně

Ve třech použitých metodách je nedílnou součástí systému i analytická iontově výměnná kolona s předkolonou pro separaci jednotlivých forem arsenu. Bylo ověřováno, zda při průchodu předkolonou nebo analytickou kolonou nedochází ke ztrátám specií.

Následující obrázek 3.4 pomocí grafického znázornění porovnává průchod vybraných forem arsenu o koncentraci 20 µg·dm<sup>-3</sup> jednotlivými částmi systému HPLC, tedy průchod arsenu pouze analytickou předkolonou a jeho průchod analytickou předkolonou i kolonou.



**Obr. 3.4** Grafické znázornění vlivu jednotlivých částí HPLC systému na účinnost generování. Porovnání plochy piků jednotlivých forem arsenu o koncentraci 100 µg·dm<sup>-3</sup> vztažené na plochu piků získaného přímým nástřikem do proudu mobilní fáze bez přítomnosti předklony i kolony. 1 – iAs<sup>V</sup>; 2 – MAs<sup>V</sup>; 3 – DMAs<sup>V</sup>; 4 – TMA<sub>s</sub><sup>V</sup>; 5 – iAs<sup>III</sup>; A - analytická předkolona; B – analytická předkolona i kolona.

I přes to, že u většiny sledovaných forem byly pozorovány ztráty po průchodu předkolonou i analytickou kolonou, tyto ztráty nebyly velkého rozsahu a další práci byly zanedbávány. Nebyla pozorována ani žádná vzájemná přeměna specií mezi sebou při průchodu analytickou kolonou.

### **3.4 Metoda spojující postkolonové generování hydridů s on-line předredukcí kyselinou thioglykolovou a detekci hmotnostní spektrometrií s iontově vázaným plazmatem**

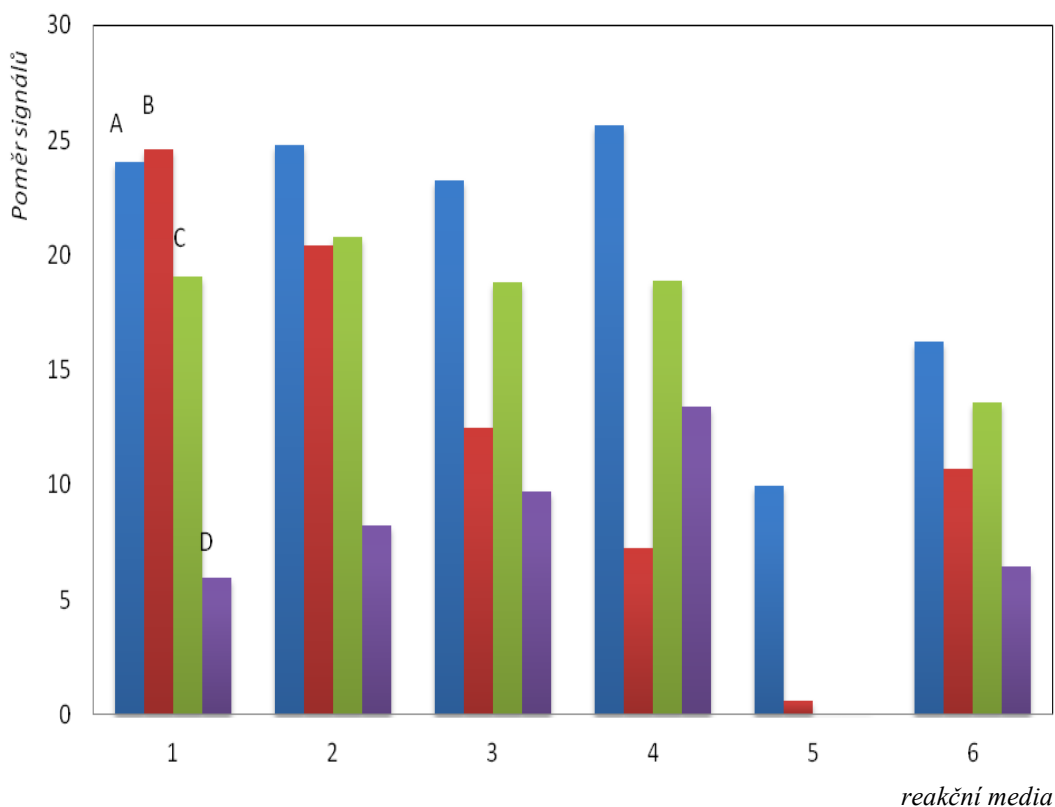
#### **3.4.1 Vývoj metody**

Metoda spojující HPLC a postkolonové generování hydridů s následnou detekcí ICP-MS byla vyvíjena zejména jako srovnávací metoda pro výše hodnocenou HG-CT-ICP-MS. Důvodem je snaha o zvýšení citlivosti a snížení detekčních limitů metody HPLC-ICP-MS. Experimentální podmínky byly voleny co nejpodobněji – byla použita totožná analytická kolona a voleny stejné průtoky použitých plynů. Zpočátku on-line předredukce kyselinou thioglykolovou nebyla používána, ale byla začleněna do metody až v průběhu jejího vývoje.

##### **3.4.1.1 Reakční medium**

Během vývoje byla porovnána tři různá reakční media: kyselina chlorovodíková o koncentracích  $0,5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ;  $1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ;  $2 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  a  $4 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ; kyselina dusičná o koncentraci  $1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  a TRIS·HCl pufr, pH = 6.

Obrázek 3.5 zobrazuje grafické znázornění poměru účinnosti generování metody HPLC-(TGA)-HG-ICP-MS vztahované k metodě HPLC-ICP-MS u jednotlivých forem arsenu v jednotlivých reakčních mediích.

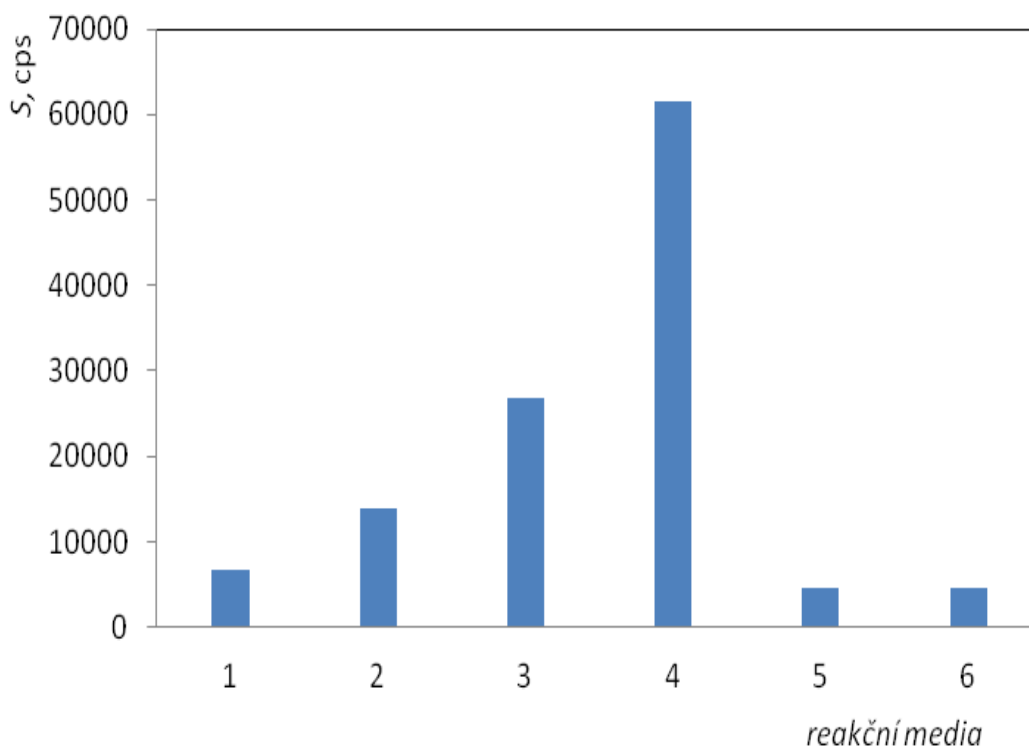


**Obr. 3.5** Grafické znázornění poměru odezvy metody HPLC-HG-ICP-MS v porovnání s metodou HPLC-ICP-MS různých forem arsenu v jednotlivých reakčních mediích. 1 – HCl,  $c = 0,5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ; 2 – HCl,  $c = 1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ; 3 – HCl,  $c = 2 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ; 4 – HCl,  $c = 4 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ; 5 – TRIS·HCl (pH = 6); 6 – HNO<sub>3</sub>  $1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ; A – iAs<sup>III</sup>; B – DMAs<sup>V</sup>; C – MAs<sup>V</sup>; D – iAs<sup>V</sup>.

Z obrázku 3.5 je patrné, že kyselina dusičná o koncentraci  $1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  je v tomto případě pro generování hydridů méně vhodné než kyselina chlorovodíková. V případě TRIS·HCl pufru o pH = 6 dochází k selektivnímu generování pouze trojmocných forem a také s velmi nízkou účinností DMAs<sup>V</sup>.

Při použití reakčního media kyseliny chlorovodíkové se ve všech případech iAs<sup>III</sup> a MAs<sup>V</sup> generují s vysokou a velmi podobnou účinností, ale účinnost generování DMAs<sup>V</sup> s rostoucí koncentrací HCl klesá a u iAs<sup>V</sup> naopak vzrůstá.

Obrázek 3.6 zobrazuje grafické znázornění hodnot základní linie pro různá reakční media.



**Obr. 3.6** Grafické znázornění hodnot základní linie vztaheným k metodě HPLC – ICP-MS pro jednotlivá reakční media. 1 – HCl,  $c = 0,5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ; 2 – HCl,  $c = 1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ; 3 – HCl,  $c = 2 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ; 4 – HCl,  $c = 4 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ; 5 – TRIS·HCl (pH = 6); 6 – HNO<sub>3</sub>  $1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ .

Na obrázku 3.6 je pozorováno zvyšování základní linie vztahené k metodě HPLC-ICP-MS se vzrůstající koncentrací HCl. Patrně se jedná o interferenci iontu  $\text{ArCl}^+$ , která není dostatečně odstraněna kolizní celou.

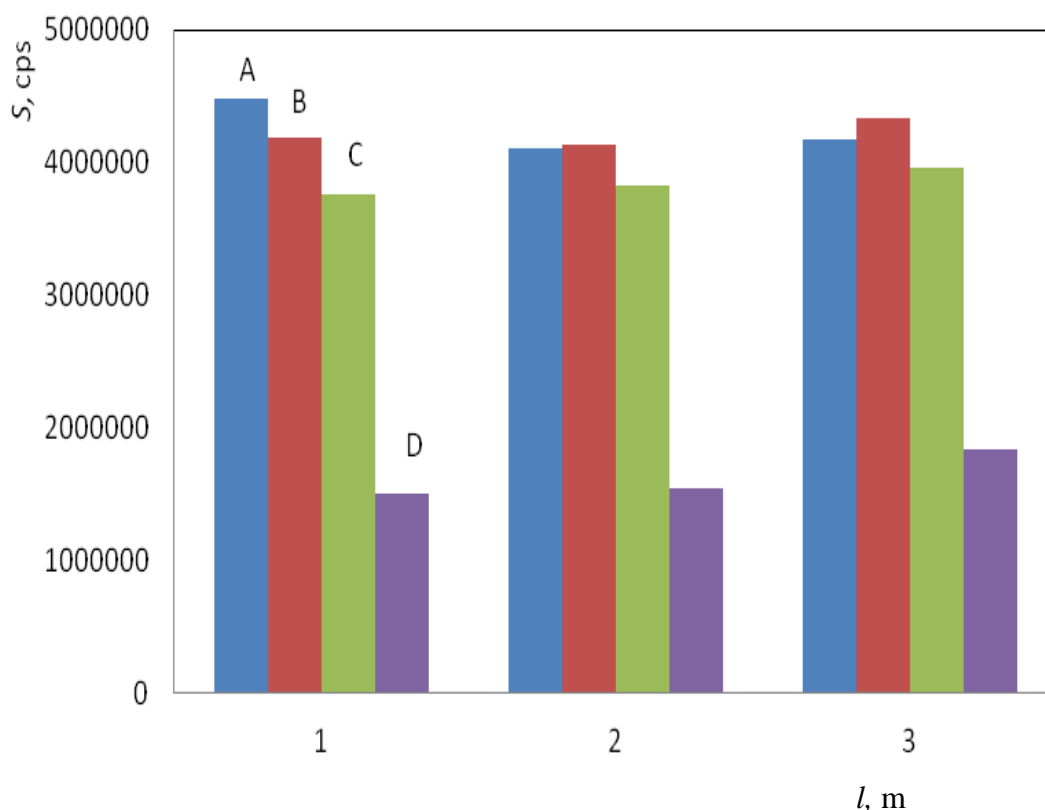
Vzhledem k nevyrovnanému generování jednotlivých forem arsenu v různých koncentracích HCl, nebyla nalezena žádná vhodná koncentrace HCl. Jako potenciálně vhodné reakční medium byla tedy vybrána HCl o koncentraci  $1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ .

### 3.4.1.2 Reakční cívka

Vzhledem ke skutečnosti, že nebyla nalezena optimální koncentrace HCl, jako reakčního media, další optimalizace byla zaměřena na délku reakční cívky, díky které by mělo dojít ke zvýšení účinnosti generování.

Obrázek 3.7 zobrazuje grafické znázornění účinnosti generování jednotlivých forem arsenu v reakčním mediu, kyselině chlorovodíkové o koncentraci  $1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Studované délky reakční cívky byly 1 m, 2 m a

3 m, cívka je vyrobená z PTFE hadičky o vnitřním průměru 1 mm.



**Obr. 3.7** Grafické znázornění účinnosti generování jednotlivých forem arsenu o koncentraci  $20 \mu\text{l}\cdot\text{dm}^{-3}$  každé formy v závislosti na délce reakční cívky v reakčním mediu HCl o koncentraci  $1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ . 1 – 1 m; 2 – 2 m; 3 – 3 m; A –  $\text{iAs}^{\text{III}}$ ; B –  $\text{DMAs}^{\text{V}}$ ; C –  $\text{MAs}^{\text{V}}$ ; D –  $\text{iAs}^{\text{V}}$ .

V prostředí HCl bylo očekáváno, že čím delší bude cívka a bude zde více času pro reakci, tím bude generování účinnější. Po zhodnocení získaných výsledků tato hypotéza nebyla potvrzena a jako vhodná délka reakční cívky byla ponechána cívka o délce 1 m.

### 3.4.1.3 Separátor fází

V separátoru fází dochází k oddělení kapalných fází, která je odváděna do odpadu a fáze plynné, vlastních hydridů, která dále pokračuje do detektoru.

Byly studovány dva separátory fází s nuceným odtahem se zaměřením zejména na jejich vnitřní objem. Tabulka 3.8 zobrazuje porovnání účinností generování při použití jednotlivých separátorů fází. Výslednou srovnávací hodnotou je poměr účinností generování metody využívající generování hydridů vztahované k metodě HPLC-ICP-MS, tedy bez generování hydridů. Rozdíl mezi dvěma porovnávanými separátory fází je především v jejich vnitřním objemu, a objemu reakční směsi uvnitř. Separátor č. 1 je plastový a jeho vnitřní



objem je 0,8 ml, v porovnání se separátorem č. 2, o vnitřním objemu 2 ml (viz. 2.3.4.2).

**Tab. 3.8** Porovnání účinnosti generování. Výslednou srovnávací hodnotou je poměr účinnosti generování metody využívající generování hydridů vztahené k metodě HPLC-ICP-MS bez generování hydridů. (č. 1 – plastový separátor fázi s vnitřním objemem 0,8 ml; č. 2 – křemenný separátor fázi s vnitřním objemem 2 ml)

GLS	Poměr účinnosti generování			
	iAs <sup>V</sup>	MAs <sup>V</sup>	DMAs <sup>V</sup>	TMA <sup>V</sup>
č. 1	6	14	14	19
č. 2	9	23	23	29

Skleněný separátor fázi, separátor č. 2, má vyšší účinnost generování, což je způsobeno právě jeho větším vnitřním objemem. Kapaliny zde setrvávají delší dobu a mají tedy více času k reakci a vzniku hydridů a jejich následnému uvolnění do plynné fáze.

I přes větší objem separátoru fázi č. 2, rozlišení forem zůstalo stejné v porovnání s metodou HPLC-ICP-MS, což potvrzuje tabulka 3.9. Zde jsou zaznamenány šířky píků v polovině jejich výšky pro obě sledované metody i oba porovnávané separátory fázi.

**Tab. 3.9** Šířky píků v polovině jejich výšky pro jednotlivé formy arsenu o koncentraci 20  $\mu\text{l}\cdot\text{dm}^{-3}$  každé formy i jednotlivé separátory fázi v porovnání s metodou HPLC-ICP-MS (bez HG)

GLS	Šířky píků v polovině výšky [s]			
	iAs <sup>V</sup>	MAs <sup>V</sup>	DMAs <sup>V</sup>	TMA <sup>V</sup>
č. 1	20	11	7,5	8,5
č. 2	20,5	11,9	8	8
bez HG	22	13	10	9

Při metodě HPLC-ICP-MS, kdy je výstup z kolony veden přímo do zmlžovače, dochází k rozšíření píků při průchodu mlžnou komorou. V případě metody s použitím HG byl analyt veden až za mlžnou komoru a tím tedy nedochází k jejich rozmytí.

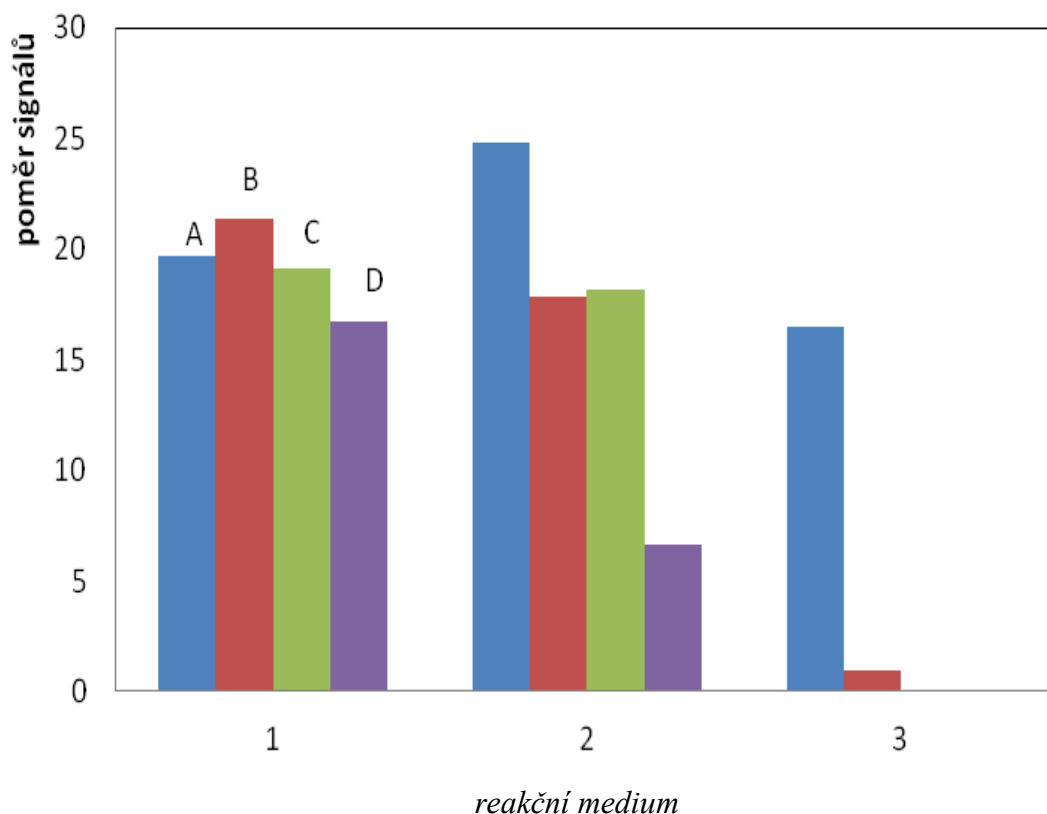
Rozlišení separační metody při použití HG se tedy nezhoršilo.

### 3.4.1.4 On-line předredukce kyselinou thioglykolovou

Během dosavadního vývoje není účinnost generování stále dostatečná. Proto bylo testováno generování hydridů s on-line předredukcí. Do systému je zaváděna TGA o koncentraci 1%, která zde plní funkci on-line předreduktantu, a jako reakční medium bylo použito roztok pufru TRIS·HCl o pH = 6, který tvoří vhodné prostředí pro generování hydridů za těchto podmínek (viz. 1.7.1.1, cit. <sup>20,39</sup>).

TGA je čerpána samostatným kanálem, v předreakční cívce reaguje s roztokem vzorku a redukuje pětimocné formy arsenu na trojmocné.

Zapojení TGA do systému znamená zvýšení účinnosti generování některých sledovaných forem, zejména  $iAs^V$ , jak ukazuje obrázek 3.8. Ten porovnává účinnost generování při použití TGA v reakčním mediu TRIS·HCl pufru, generování bez použití TGA, která byla nahrazena deionizovanou vodou v reakčním mediu  $1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  HCl a generování bez TGA opět nahrazené deionizovanou vodou v prostředí TRIS·HCl pufru vztahované k metodě HPLC-ICP-MS.



**Obr. 3.8** Grafické znázornění poměru odezvy metody HPLC-HG-ICP-MS v porovnání s metodou HPLC-ICP-MS různých forem arsenu o koncentraci  $20 \mu\text{l} \cdot \text{dm}^{-3}$  každé formy při použití TGA v prostředí TRIS·HCl pufru o pH = 6, generování s použitím deionizované vody v prostředí HCl o koncentraci  $1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  a generování s použitím deionizované vody s použitím TRIS·HCl pufru o pH = 6 vztahované k metodě HPLC – ICP-MS. 1 –

TGA (TRIS·HCl); 2 – DIW (HCl); 3 – DIW (TRIS·HCl); A – iAs<sup>III</sup>; B – DMAs<sup>V</sup>; C – MAs<sup>V</sup>; D – iAs<sup>V</sup>.

Podle tabulky 3.10 je patrné, že vyšší účinnosti generování je dosaženo s použitím kyseliny thioglykolové jako on-line předredukce v porovnání s deionizovanou vodou i v porovnání s metodou HPLC-ICP-MS.

**Tab. 3.10** Porovnání ploch píků jednotlivých forem arsenu (o koncentraci 1 ng každé formy) s použitím on-line předredukce TGA v prostředí TRIS·HCl pufru o pH = 6 a bez jejího použití, nahrazením deionizovanou vodou v prostředí 1 mol·dm<sup>-3</sup> HCl v porovnání s metodou HPLC-ICP-MS

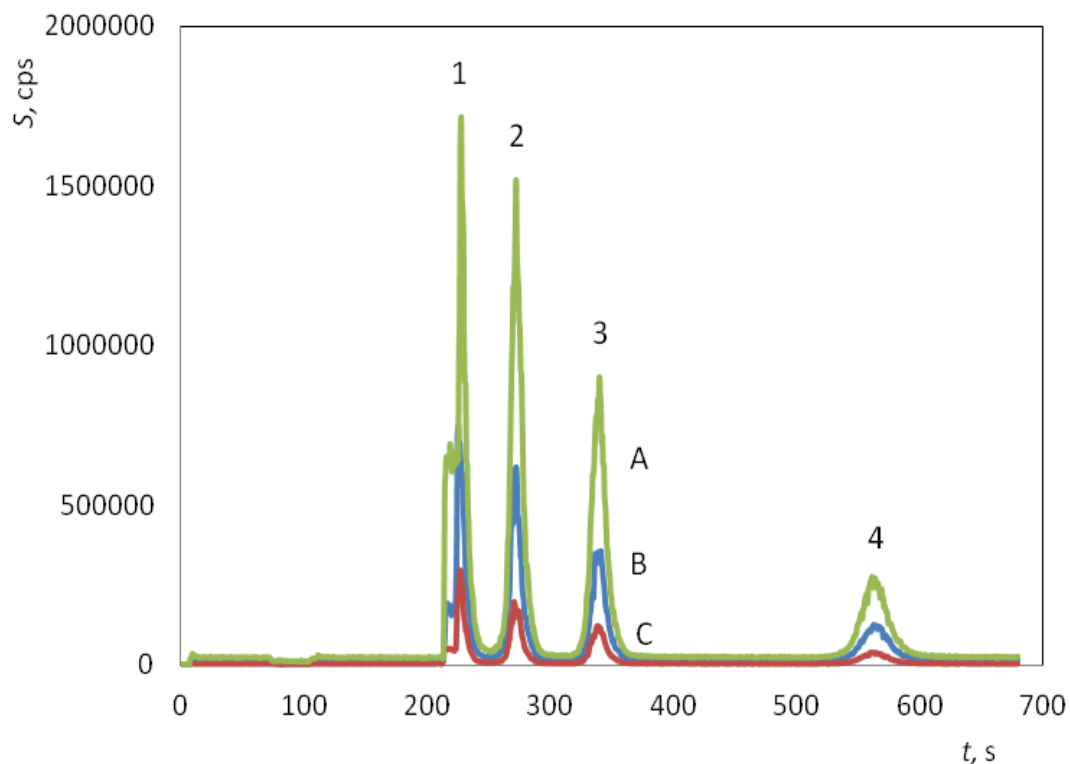
reakční medium	plochy píků ( $\cdot 10^5$ ) [s]			
	iAs <sup>V</sup>	MAs <sup>V</sup>	DMAs <sup>V</sup>	iAs <sup>III</sup>
bez HG	2	3	3	3
DIW (HCl)	14	43	48	71
TGA (TRIS·HCl)	34	46	60	55

Z předchozí tabulky je zřejmé, že v metodě HPLC-ICP-MS je účinnost generování řádově nižší než v případě metody s HG a s použitím on-line předredukce TGA v prostředí TRIS·HCl pufru dochází k účinnějšímu generování jednotlivých forem arsenu (s výjimkou iAs<sup>III</sup>). Na základě těchto výsledků je TGA jako on-line předredukce zařazena do systému generování hydridů.

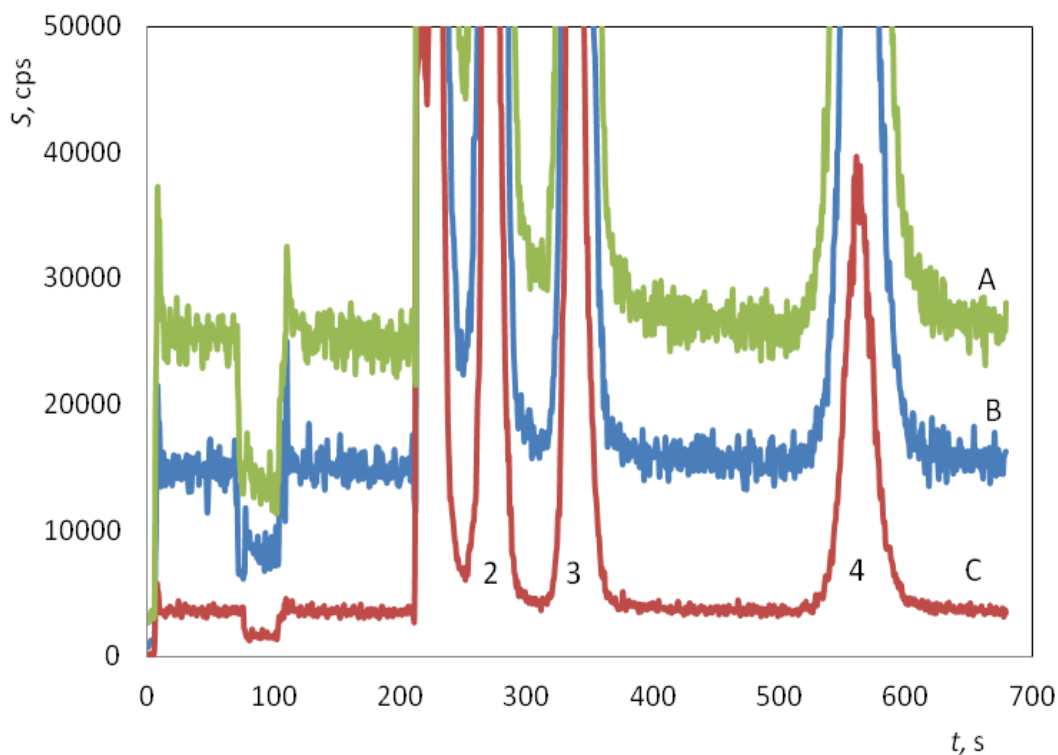
### 3.4.1.5 Průtok plynu reakční/kolizní celou

Při zvýšení průtoku nosného plynu dochází ke snížení citlivosti i základní linie signálu, viz obrázek 3.9a, 3.9b.

Tabulka 3.11 zobrazuje hodnoty citlivostí. Poměr ploch píku ku hodnotě základní linie při nulovém průtoku helia, při průtoku helia 3,5 ml·min<sup>-1</sup> a při průtoku helia 4,8 ml·min<sup>-1</sup> však nebyl významně odlišný.



**Obr. 3.9a** Záznam chromatogramu porovnávající různé průtoky helia reakční/kolizní celou. A - nulový průtok helia; B – průtok helia  $3,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ ; C – průtok helia  $4,8 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ . 1 -  $\text{iAs}^{\text{III}}$ ; 2 -  $\text{DMAs}^{\text{V}}$ ; 3 -  $\text{MAs}^{\text{V}}$ ; 4 -  $\text{iAs}^{\text{V}}$ .

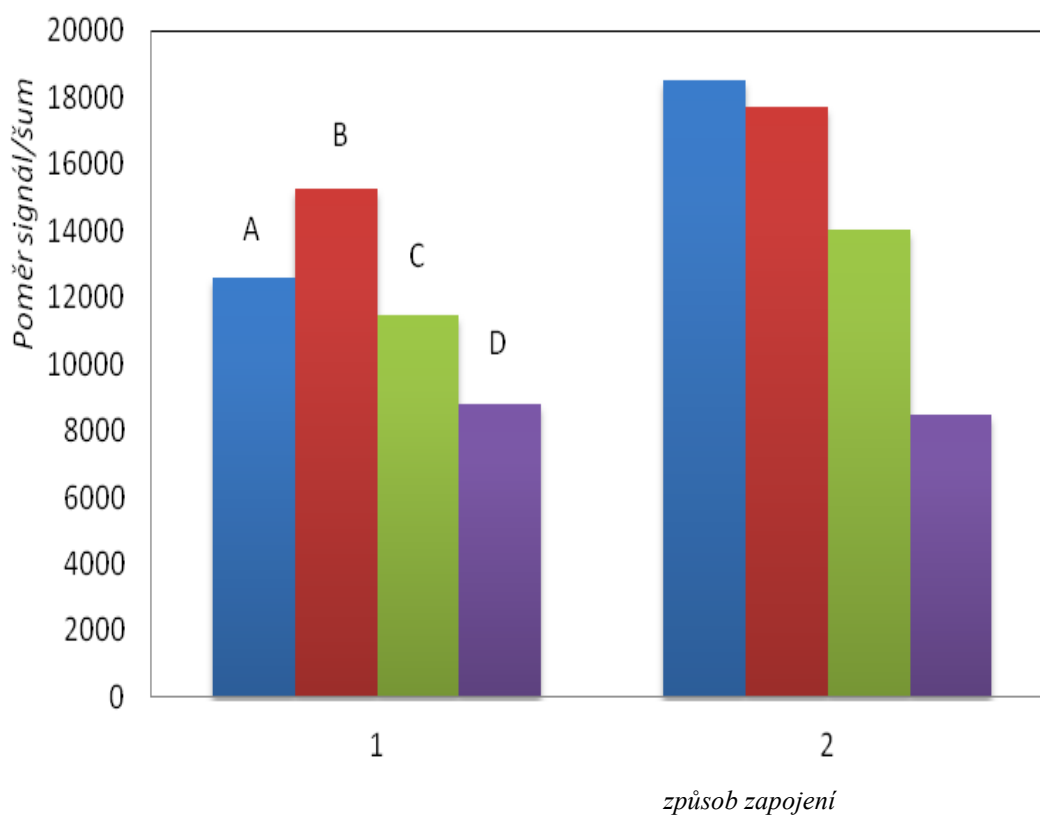


**Obr. 3.9b** Detailní záznam chromatogramu, porovnání základních linií při generování hydridů při různém průtoku helia kolizní/reakční celou. A - nulový průtok helia; B – průtok helia  $3,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ ; C – průtok helia  $4,8 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ . 1 -  $\text{iAs}^{\text{III}}$ ; 2 -  $\text{DMAs}^{\text{V}}$ ; 3 -  $\text{MAs}^{\text{V}}$ ; 4 -  $\text{iAs}^{\text{V}}$ .

### 3.4.1.6 Zapojení do mlžné komory

Až do současného stádia vývoje byl vývod plynné fáze ze separátoru fází veden až za mlžnou komoru. Tím však pravděpodobně docházelo k přenosu fluktuací průtoků nosného plynu a vodíku z generátoru do plazmatu, které se projevovalo zvýšeným šumem signálu. Proto byl výstup ze separátoru připojen do mlžné komory namísto zmlžovače.

Na obrázku 3.10 je grafické znázornění porovnání poměrů signálů jednotlivých forem arsenu o koncentraci  $20 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  každé formy k základní linii generování při zapojení vývodu ze separátoru fází do mlžné komory a za mlžnou komoru.



**Obr. 3.10** Grafické znázornění poměrů signálů jednotlivých forem arsenu o koncentraci  $20 \mu\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$  k šumu generování. 1 – zapojení před mlžnou komorou; 2 – zapojení do mlžné komory; A –  $i\text{As}^{\text{III}}$ ; B –  $\text{DMAs}^{\text{V}}$ ; C –  $\text{MAs}^{\text{V}}$ ; D –  $i\text{As}^{\text{V}}$ . A –  $i\text{As}^{\text{III}}$ ; B –  $\text{DMAs}^{\text{V}}$ ; C –  $\text{MAs}^{\text{V}}$ ; D –  $i\text{As}^{\text{V}}$ .

Citlivost generování byla v obou případech srovnatelná, záleží tedy na hodnotě poměru signálu ku šumu. Při zapojení přímo do mlžné komory dochází k výraznému snížení šumu základní linie, tedy ke snížení směrodatné odchylky bodů základní linie v intervalu 30 vteřin z hodnoty 440 na hodnotu 400.

Tabulka 3.11 porovnává hodnoty šířek píků v polovině jejich výšek, tedy rozlišení jednotlivých forem. Rozlišení píků zůstalo při změně zapojení do mlžné komory téměř shodné jako se zapojením před mlžnou komoru. Mírné rozšíření píků odpovídá hodnotám získaných metodou HPLC-ICP-MS, kde je vývod z analytické kolony veden přímo do mlžné komory.

**Tab. 3.11** Šířky píků v polovině jejich výšky pro zapojení výstupu z GSL před mlžnou komoru, do mlžné komory a do mlžné komory bez použití HG.

zapojení	Šířky píků v polovině výšky [s]			
	iAs <sup>V</sup>	MAs <sup>V</sup>	DMAs <sup>V</sup>	iAs <sup>III</sup>
před komoru	27	15	11	9
do komory	28	16	13	10
bez HG	26	16	12	10

### 3.4.2 Kalibrační závislosti, limity detekce a kvantifikace

Kalibrační závislosti forem iAs<sup>III</sup>, MAs<sup>V</sup>, DMAs<sup>V</sup> a iAs<sup>V</sup> byly naměřeny z roztoků směsných standard a měření probíhala za výše popsaných podmínek. Hodnoty směrnic kalibračních závislostí zobrazuje tabulka 3.12.

Limity detekce byly zjištěny na základě směrodatné odchylky 12 měření směsného standardu iAs<sup>III</sup>, DMAs<sup>V</sup>, MAs<sup>V</sup> a iAs<sup>V</sup> o koncentraci 25 ng·l<sup>-1</sup> pro každou formu.

Limity detekce byly vypočítány jako hodnota koncentrace, která odpovídá signálu o velikosti třech směrodatných odchylek. V případě limitů kvantifikace se jedná o velikost deseti směrodatných odchylek. Jednotlivé limity detekce i kvantifikace shrnuje tabulka 3.12.

**Tab. 3.12** Limity detekce a kvantifikace jednotlivých forem arsenu;  $\alpha$  – směrnice kalibrační závislosti

formy arsenu	$\alpha$ [ml·s·ng <sup>-1</sup> ]	LOD [ng·l <sup>-1</sup> ]	LOQ [ng·l <sup>-1</sup> ]
iAs <sup>V</sup>	613525	11,3	37,7
MAs <sup>V</sup>	707735	9,2	30,8
DMAs <sup>V</sup>	871761	9,6	31,9
iAs <sup>III</sup>	719421	12,3	41,0

### 3.4.3 Referenční materiály

Výsledné koncentrace jednotlivých forem, včetně certifikovaných hodnot koncentrací, které byly získány měřením referenčních materiálů metodou HPLC-(TGA)-HG-ICP-MS, zobrazuje tabulka 3.13.

Během tohoto měření bylo potřeba roztoky referenčních materiálů alespoň částečně zneutralizovat, tzn. pH v rozmezí 5 – 7. Kvůli použité koloně, nebylo možné touto metodou změřit referenční materiál mořské vody „CASS-5“, kvůli vysoké koncentraci chloridových aniontů v koloně (viz. 3.3.4).

**Tab. 3.13** Měření koncentrace jednotlivých forem arsenu v referenčních materiálech

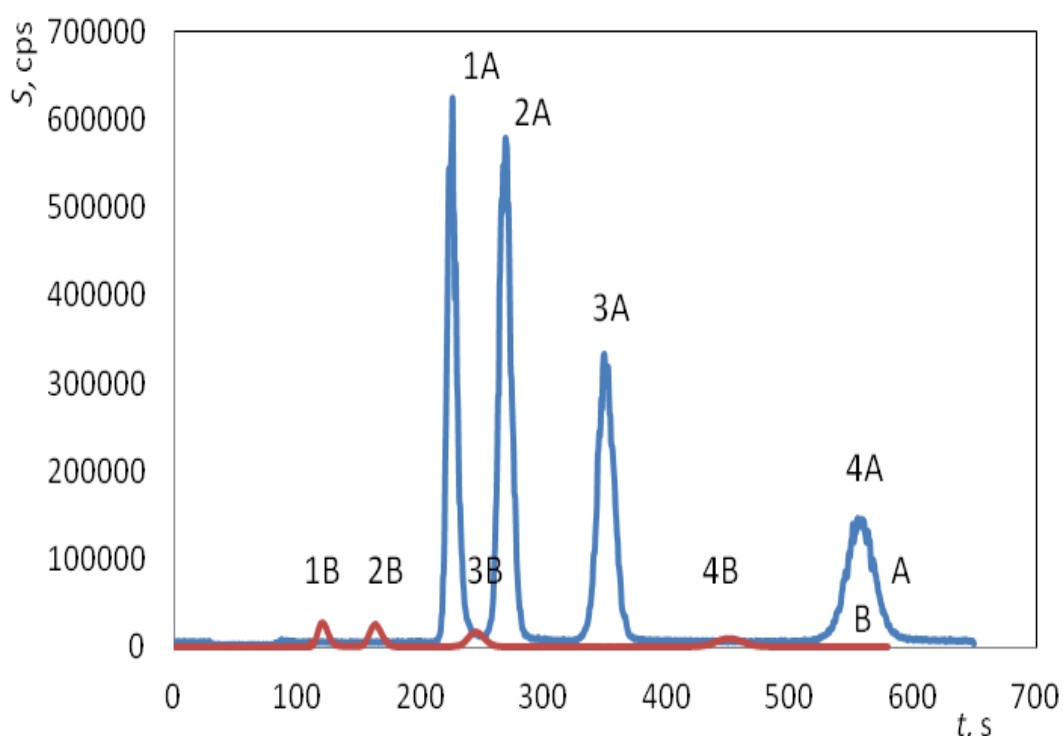
Referenční materiál	formy arsenu				Celkem [ng·l <sup>-1</sup> ]	Certifikovaná hodnota [ng·l <sup>-1</sup> ]
	iAs [ng·l <sup>-1</sup> ]	MAs [ng·l <sup>-1</sup> ]	DMAs [ng·l <sup>-1</sup> ]	TMAso [ng·l <sup>-1</sup> ]		
SLRS-5	261 ± 16	48 ± 3	41 ± 12	< LOD	369 ± 20	413 ± 39
SLRS-4	566 ± 30	45 ± 1	73 ± 4	< LOD	692 ± 31	680 ± 60

### 3.5 HPLC-ICPMS vs. HPLC-(TGA)-HG-ICP-MS

Během vývoje byla nová metoda porovnávána s metodou HPLC-ICPMS, která je také velmi rozšířenou metodou ve speciální analýze.

Počátečním předpokladem před vývojem metody HPLC-(TGA)-HG-ICPMS byla vysoká účinnost vnášení analytu do plazmatu (až 100%), oproti nízké účinnosti zmlžování v metodě HPLC-ICP-MS (maximálně jednotky procent).

Obrázek 3.12 zobrazuje záznam chromatogramu, který porovnává účinnost generování právě při použití těchto dvou výše zmíněných metod. Retenční časy všech specií jsou zařazením předredukční cívky u metody HPLC-(TGA)-HG-ICPMS posunutě o 110 s.



**Obr. 3.12** Záznam chromatogramu porovnávající účinnost generování metod A - HPLC- (TGA)-HG-ICP-MS a B - HPLC-ICPMS. 1A, 1B –  $iAs^{III}$ ; 2A, 2B –  $DMAs^V$ ; 3A, 3B –  $MAs^V$ ; 4A, 4B -  $iAs^V$

Citlivost, která je úměrná účinnosti vnášení analytu do plazmatu, je při metodě HPLC-(TGA)-HG-ICP-MS v závislosti na jednotlivých formách arsenu přibližně 18krát vyšší. Konkrétně pro jednotlivé formy arsenu:  $iAs^{III}$  18krát vyšší,  $DMAs^V$  21krát vyšší,  $MAs^V$  18krát vyšší a  $iAs^V$  je 17krát vyšší.



### 3.6 Souhrnné porovnání metod

Následující tabulky (3.14 – 3.16) zobrazují výsledky sledovaných parametrů (limitů detekce, limitů kvantifikace a koncentrace jednotlivých forem arsenu v referenčních materiálech) všech čtyř porovnávaných metod.

#### 3.6.1 Limity detekce a limity kvantifikace

Limity detekce jednotlivých forem arsenu všech porovnávaných metod zobrazuje tabulka 3.14 a limity kvantifikace tabulka 3.15.

Z tabulek 3.14 pro limity detekce a 3.15 pro limity kvantifikace je patrné, že u nově vyvíjené metody HPLC-(TGA)-HG-ICP-MS se tyto hodnoty oproti metodě HPLC-ICP-MS podařilo snížit jen přibližně na polovinu, a k velmi nízkým limitům detekce metody HG-CT-ICP-MS se stále pouze přibližují. Zde se projevuje velká přednost kolekce vymrazováním, kterou je zachycení hydridu z velkého objemu vzorku.

**Tab. 3.14** Limity detekce jednotlivých forem arsenu porovnávaných metod

metoda	LOD pro jednotlivé formy arsenu [ $\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$ ]				
	iAs <sup>V</sup>	MAs <sup>V</sup>	DMAs <sup>V</sup>	TMA <sup>V</sup> O	iAs <sup>III</sup>
HG-CT-AAS	9,2	2,3	2,0	3,4	-
HG-CT-ICP-MS	2,45	0,06	0,14	0,19	-
HPLC-ICP-MS	25,6	15,6	15,5	-*	15,4
HPLC-(TGA)-HG-ICP-MS	11,3	9,2	9,6	-*	12,3

\*LOD pro TMA<sup>V</sup>O nebyly pro metody HPLC-ICP-MS a HPLC-(TGA)-HG-ICP-MS změřeny, ale vzhledem k výskytu zvýšené hodnoty slepého pokusu po neutralizaci vzorku jsou předpokládány LOD obdobné jako u iAs<sup>V</sup>.

**Tab. 3.15** Limity kvantifikace jednotlivých forem arsenu porovnávaných metod

metoda	LOQ pro jednotlivé formy arsenu [ $\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$ ]				
	$\text{iAs}^{\text{V}}$	$\text{MAs}^{\text{V}}$	$\text{DMAs}^{\text{V}}$	$\text{TMA}^{\text{V}}\text{O}$	$\text{iAs}^{\text{III}}$
HG-CT-AAS	30,7	7,7	6,6	11,4	-
HG-CT-ICP-MS	8,16	0,20	0,46	0,64	-
HPLC-ICP-MS	85,3	52,1	51,7	-*	51,5
HPLC-(TGA)-HG-ICP-MS	37,7	30,8	31,9	-*	41,0

\*LOQ pro  $\text{TMA}^{\text{V}}\text{O}$  nebyly pro metody HPLC-ICP-MS a HPLC-(TGA)-HG-ICP-MS změřeny, ale vzhledem k výskytu zvýšené hodnoty slepého pokusu po neutralizaci vzorku jsou předpokládány LOD obdobné jako u  $\text{iAs}^{\text{V}}$ .

### 3.6.2 Referenční materiály

Tabulka 3.16 zobrazuje hodnoty jednotlivých forem arsenu v referenčních materiálech u všech porovnávaných metod včetně certifikovaných hodnot celkové koncentrace arsenu. Nejobjektivnější hodnocení metod je možné na základě porovnání výsledků zejména u vzorku říční vody SLRS-5, který byl změřen všemi čtyřmi sledovanými metodami.

Z této tabulky je patrné, že výsledky jednotlivých použitých metod jsou v dobré shodě spolu mezi sebou a také jsou součty specií ve všech případech velmi blízko certifikované hodnotě celkového obsahu arsenu.

Vyvíjená metoda je v těchto výsledcích srovnatelná právě s metodou HG-CT-ICPMS, která prozatím nebyla překonána ve svých limitech detekce.

Bohužel není možné porovnat získané hodnoty speciace v uvedených referenčních materiálech s hodnotami publikovanými v literatuře. Speciační analýza As na takto nízkých koncentračních úrovních je velmi obtížná, a zřejmě proto se údaje pro stanovení metylovaných specií nepodařilo nalézt.

**Tab. 3.16** Hodnoty jednotlivých forem arsenu v měřených referenčních materiálech včetně certifikovaných hodnot

vzorek	metoda	formy arsenu				Celkem [ng·l <sup>-1</sup> ]	Certifikovaná hodnota [ng·l <sup>-1</sup> ]
		iAs [ng·l <sup>-1</sup> ]	MAs [ng·l <sup>-1</sup> ]	DMAs [ng·l <sup>-1</sup> ]	TMA <sub>5</sub> O [ng·l <sup>-1</sup> ]		
CASS-5	HG-CT-AAS	1036 ± 44	9 ± 4	121 ± 18	17 ± 3	1183 ± 48	1210 ± 90
	HG-CT-ICPMS	998 ± 4	23 ± 1	75 ± 1	20 ± 0	1116 ± 4	
SLRS-5	HG-CT-AAS	313 ± 10	42 ± 6	46 ± 8	19 ± 2	420 ± 14	413 ± 39
	HG-CT-ICPMS	267 ± 6	37 ± 1	44 ± 1	24 ± 0	372 ± 6	
	HPLC-ICPMS	279 ± 16	< LOQ	52 ± 4	< LOD	373 ± 20	
	HPLC-pr-HG	261 ± 16	48 ± 3	41 ± 12	8 ± 1	369 ± 20	
SLRS-4	HG-CT-ICPMS	482 ± 8	62 ± 0	125 ± 1	56 ± 0	725 ± 8	680 ± 60
	HPLC-ICPMS	535 ± 30	56 ± 3	63 ± 12	< LOD	657 ± 31	
	HPLC-pr-HG	566 ± 30	45 ± 1	73 ± 4	19 ± 3	692 ± 31	

## 4. Závěr

Hlavním cílem této diplomové práce bylo porovnání celkem čtyř metod pro speciální analýzu arsenu využívajících generování hydridů.

K velmi citlivým metodám pro stopovou speciální analýzu As, založeným na HG-CT-AAS a HG-CT-ICP-MS, vyvinutým a zavedeným v laboratoři oddělení stopové prvkové analýzy Ústavu analytické chemie AV ČR, v.v.i., byla potřeba najít a zavést srovnávací metodu založenou na jiném principu.

Dílními kroky k tomuto cíli bylo mimo jiné zavedení metody HPCL-ICP-MS a dále vývoj a optimalizace nové metody spojující postkolonové generování hydridů spojené s on-line předredukci kyselinou thioglykolovou a následnou detekcí ICP-MS.

Druhá zmiňovaná metoda byla zaváděna proto, že byly očekávány vyšší citlivost a velmi nízké detekční limity (pod  $\text{ng}\cdot\text{dm}^{-3}$ ) oproti standardní metodě HPLC-ICP-MS.

Dosažené výsledky zatím bohužel nespĺňují očekávání a teoretickým předpokladům odpovídají jen zčásti. U citlivosti jsme dosáhli zlepšení oproti metodě HPLC-ICP-MS přibližně 20krát v závislosti na jednotlivých formách arsenu. Získané detekční limity jsou však přibližně na hodnotě  $10\text{ ng}\cdot\text{dm}^{-3}$  pro všechny studované formy arsenu, tedy o jeden až dva řády vyšší než bylo očekáváno.

V budoucnu bude potřeba další optimalizace reakčních podmínek pro vyvíjenou metodu HPLC-(TGA)-HG-ICP-MS, např. snížení základní linie, co nejvíce snížit průtok činidel, který v porovnání s roztokem vzorku je mnohonásobný a také použití co nejčistších chemikálií tak, aby se dosáhlo co největšího snížení základní linie při analýze.

I přes horší limity detekce u metod založených na HPLC byly výsledky analýz referenčních materiálů říční vody všemi čtyřmi metodami ve vynikající shodě.

## Seznam použité literatury

1. Burguera, J. L.; Burguera, M., Rivas, C.; Carrero, P.: On-line cryogenic trapping with microwave heating for the determination and speciation of arsenic by flow injection:hydride generation:atomic absorption spectrometry. *Talanta* 45, 1998, 531 – 542
2. Cornelis, R.; Caruso, J.; Crews, H.; Heumann, K.: *Handbook of elemental speciation II – Species in the environment, food, medicine and occupation health*. Chichester, West Sussex, 2005
3. Guha Mazumder, D. N.: Chronic arsenic toxicity & human health. *Indian J. Med. Res.* 128, 2008, 436-447
4. Mandal, B. K.; Suzuki, K. T.: Arsenic round the word: a review. *Talanta* 58, 2002, 201 – 235
5. <http://www.tzb-info.cz/pravni-predpisy/vyhlaska-c-252-2004-sb-kterou-se-stanovi-hygienicke-pozadavky-na-pitnou-a-teplou-vodu-a-cetnost-a-rozsah-kontroly-pitne-vody> (2. 5. 2012)
6. Jain, C. K.; Ali, I.: Arsenic: occurrence, toxicity and speciation techniques. *Water research*, 34, 2000, 4304 – 4312
7. Hughes, M. F.: Biomarkers of exposure: A case study with inorganic arsenic. *Environmental Health Perspectives*, 114, 2006
8. Sun, H.: *Biological chemistry of Arsenic, Antimony and Bismuth*. Chichester, West Sussex, 2011
9. Francesconi, K. A.; Kuehnelt, D.: Determination of arsenic species: A critical review of methods and applications, 2000–2003. *The Analyst*, 129, 2004, 373 – 395
10. Regmi, R.; Milne, B. F.; Feldmann, J.: Hydride generation activity of arsenosugars and thioarsenicals. *Anal. Bioanal. Chem.*, 388, 2007, 775 – 782
11. Andrewes, P.; Demarini, D. M.; Funasaka, K.; Wallace, K.; Lai, V. W.; Sun, H.; Cullen W. R.; Kitchin, K. T.: Do arsenosugars pose a risk to human health? The comparative toxicities of a trivalent and pentavalent arsenosugar. *Environ Sci Technol.* 2004, 1; 38(15):4140-8
12. Dočekal, B. a kol.: *Atomová absorpční spektrometrie, Sborník přednášek z kurzu. 2. upravené a doplněné vydání*, Ing. Václav Helán – 2 THETA, Český Těšín, 2003
13. Pavelka, J.; Spěváčková, V.; Fara, M.; Koliňová, D.; Sysalová, J.; Kubáň, V.; Hoenig, M.; Kučera, J.; Plško, E.; Dědina, J.; Černohorský, T.: *Kurz atomové absorpční spektrometrie (pro pokročilé)*. Spektroskopická společnost Jana Marka Marci, Praha, 1996
14. Černohorský, T.; Fara, M.; Koliňová, D.; Mestek, O.; Plško, E.; Spěváčková, V.; Sysalová, J.; Száková, J.: *Atomová absorpční spektrometrie I (základní kurz)*. Spektroskopická společnost Jana Marka Marci, Praha, 2003
15. Sneddon, J.: *Advances in atomic spectroscopy*. Volume 7, Elsevier Science B.V.
16. Sigrist, M. E.; Beldoménico, H. R.: Determination of inorganic arsenic species by flow injection hydride generation atomic absorption spectrometry with variable sodium tetrahydroborate concentrations. *Spectrochimica Acta Part B*, 59, 2004, 1041 – 1045
17. D'Ulivo, A.: Chemical vapor generation by tetrahydroborate(III) and other borane complexes in aqueous media: A critical discussion of fundamental processes and mechanisms involved in reagent decomposition and hydride formation. *Spectrochimica Acta Part B*, 59, 2004, 793 – 825
18. Dědina, J.; Tsalev, D. L.: *Hydride generation atomic absorption spectrometry*. Chichester, Wiley 1995

19. D'Ulivo, A.; Dědina, J.; Mester, Z.; Sturgeon, R. E.; Wang, Q.; Welz, B.: Mechanisms of chemical generation of volatile hydrides for trace element determination (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.*, 83, 2011, 1283 – 1340
20. Červený, V.; Rychlovský, P.; Hraniček, J.; Šíma, J.: Elektrochemické generování těkavých sloučenin pro potřeby spektrálních analytických metod. *Chem. listy* 103, 2009, 652 – 660
21. Musil, S.: On-line předredukce pětimocných sloučenin arsenu kyselinou thioglykolovou pro speciální analýzu atomovou absorpční spektrometrií se selektivním generováním hydridů a kolekcí vymrazováním. *Diplomová práce*, Univerzita Karlova, Praha, 2007
22. Dědina, J.; D'Ulivo, A.: Argon shielded, highly fuel-rich, hydrogen–oxygen diffusion microflame—a new hydride atomizer. *Spectrochimica Acta Part B*, 52, 1997, 1737 – 1746
23. D'Ulivo, A.; Dědina, J.; Lampugnani, L.: Effect of contamination by oxygen at trace level in miniature flame hydride atomizers. *J. Anal. At. Spectrom.*, 20, 2005, 40-45
24. Dědina, J.: Atomization of volatile compounds for atomic absorption and atomic fluorescence spectrometry: On the way towards the ideal atomizer. *Spectrochimica Acta Part B*, 62, 2007, 846 – 872
25. Dědina, J.; Matoušek, T.: Multiple microflame – a new approach to hydride atomization for atomic absorption spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.* 15, 2000, 301 – 304
26. Matoušek, T.; Dědina, J.; Selecká, A.: Multiple microflame quartz tube atomizer — further development towards the ideal hydride atomizer for atomic absorption spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B*, 57, 2002, 451 – 462
27. D'Ulivo, A.; Dědina, J.: Interferences in hydride atomization studied by atomic absorption and atomic fluorescence spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B*, 51, 1996, 481 – 498
28. *ICP-MS Inductively coupled plasma mass spectrometry – A Primer*. Agilent - Technologies
29. Dědina, J.; Fara, M.; Koliňová, D.; Korečková, J.; Musil, J.; Plško, E.; Sychra, V.: *Vybrané metody analytické atomové spektrometrie*. Praha, Česká spektroskopická společnost 1987
30. Bandura, D. R.; Baranov, V. I.; Tanner, S. D.: Reaction chemistry and collisional processes in multipole device for resolving isobaric interferences in ICP-MS. *Fresenius J. anal. chem.* 370, 2001, 454 – 470
31. <http://inorganicventures.com/tech/trace-analysis/icp-ms-measurement/interferences> (10.4.2012)
32. Minnich, M.; Miller, D. C.; Parson, P. J.: Determination of As, Cd, Pb, and Hg in urine using inductively coupled plasma mass spectrometry with the direct injection high efficiency nebulizer. *Spectrochimica Acta Part B*, 63, 2008, 389 – 395
33. Darrouzes, J.; Bueno, M.; Lespes, G.; Holeman, M.; Potin-Gautier, M.: Optimisation of ICPMS collision/reaction cell conditions for the simultaneous removal of argon based interferences of arsenic and selenium in water samples. *Talanta*, 71, 2007, 2080 – 2084
34. Tanner, S. D.; Baranov, V. I.; Bandura, D. R.: Reaction cells and collision cells for ICP-MS: a tutorial review. *Spectrochimica Acta Part B*, 57, 2002, 1361 – 1452
35. Lobinski, R.: Elemental speciation and coupled techniques. *App. Spectrosc.* 51, 1997, 260A – 278A
36. Currier, J. M.; Svoboda, M.; de Moraes, D. P.; Matoušek, T.; Dědina, J.; Stýblo, M.: Direct analysis of methylated trivalent arsenicals in mouse liver by hydride generation-cryotrapping-atomic absorption spectrometry. *Chem. res. toxicol.* 24, 2011, 478 – 480

37. Matoušek, T.; Hernández-Zavala, A.; Svoboda, M.; Langrová, L.; Adair, B. M.; Drobná, Z.; Thomas, D. J.; Stýblo, M.; Dědina, J.: Oxidation state specific generation of arsines from methylated arsenicals based on L-cysteine treatment in buffered media for speciation analysis by hydride generation-automated cryotrapping-gas chromatography-atomic absorption spectrometry with the multiatomizer. *Spectrochimica Acta Part B*, 63, 2008, 396 – 406
38. Niedzielski, P.; Siepak, M.; Siepak, J.; Przybyłek, J.: Determination of different forms of arsenic, antimony and selenium in water samples using hydride generation, *Polish Journal of Environmental Studies*, Vol. 11, No. 3, 2002, 219-224
39. Wieteska, E.; Ziólek, A.; Drzewinska, A.: Effectiveness of L-cysteine as a pre-reducing agent in the process of arsenic determination in natural materials by batch system hydride generation atomic absorption spectrometry (HG AAS). *Chem. anal. (Warsaw)*, 48, 313, 2003
40. Musil, S.; Matoušek, T.: On-line pre-reduction of pentavalent arsenicals by thioglycolic acid for speciation analysis by selective hydride generation–cryotrapping–atomic absorption spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B*, 63, 2008, 396 – 406
41. Szpunar, J.; Lobinski, R.: *Hyphenated techniques in speciation analysis*. The Royal society of chemistry, Cambridge, 2003
42. Vieira, M. A.; Grinberg, P.; Robeda, C. R. R.; Reyes, M. N. M.; Campos, R. C.: Non-chromatographic atomic spectrometric methods in speciation analysis: A review. *Spectrochimica Acta Part B*, 64, 2009, 459 – 476
43. Langrová, L.: Selektivní generování těžkých forem arsenu pro speciální analýzu atomovou absorpční spektrometrií. *Diplomová práce*, Univerzita Karlova, Praha 2005
44. Svoboda, M.: Generování hydridů pro speciální analýzu atomovou absorpční spektrometrií. *Diplomová práce*, Univerzita Karlova, Praha 2006.
45. Taurková, P.; Svoboda, M.; Musil, S.; Matoušek, T.: Loss of di- and trimethylarsine on Nafion membrane dryers following hydride generation. *J. anal. at. spectrom.*, 26, 2011, 220
46. Matoušek, T.; Johansson, M.; Dědina, J.; Frech, W.: Spatially resolved absorption measurements of antimony atom formation and dissipation in quartz tube atomizers following hydride generation. *Spectrochimica acta Part B*, 54, 1999, 631 – 643
47. Larsen, E. H.: Method optimization and quality assurance in speciation analysis using high performance liquid chromatography with detection by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B*, 53, 1998, 253 – 265
48. Krupp, E. M.; Johnson, C.; Rechsteiner, C.; Moir, M.; Leong, D.; Feldmann, J.: Investigation into the determination of trimethylarsine in natural gas and its partitioning into gas and condensate phases using (cryotrapping)/gas chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry and liquid/solid sorption techniques. *Spectrochimica Acta Part B*, 62, 2007, 970 – 977
49. Issa, N. B.; Rajakovic-Ognjanovic, V. N.; Marinkovic, A. D.; Rajakovic, L. V.: Separation and determination of arsenic species in water by selective exchange and hybrid resins. *Analytica chimica acta* 706, 2011, 191 – 198
50. Nakazato, T.; Tao, H.; Taniguchi, T.; Isshiki, K.: Determination of arsenite, arsenate, and monomethylarsonic acid in seawater by ion-exclusion chromatography combined with inductively coupled plasma mass spectrometry using reaction cell and hydride generation techniques. *Talanta* 58, 2002, 121 – 132