

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie

**Studium generování hydridů pro
účely speciální analýzy arsenu
spojené s AAS a AFS detekcí**

Disertační práce

Praha 2012

Milan Svoboda

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto doktorskou práci vypracoval samostatně, pod vedením školitele doc. RNDr. Jiřího Dědiny, DSc. a konzultanta doc. RNDr. Petra Rychlovského, CSc. a že jsem všechny použité prameny řádně citoval. Práce nebyla využita jako závěrečná práce k získání jiného nebo obdobného druhu vysokoškolské kvalifikace. Všechny použité zdroje a literatura byly řádně citovány.

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

V Praze dne.....

podpis:

Milan Svoboda

**Tato disertační práce vznikla na Ústavu analytické chemie AV ČR, v.v.i.,
Detašovaném pracovišti - Oddělení stopové prvkové analýzy v Praze**

Poděkování

Děkuji všem pracovníkům Detašovaného pracoviště - oddělení stopové prvkové analýzy, Ústavu analytické chemie AV ČR, v.v.i., Vídeňská 1083, 14220 Praha 4, kde byla tato práce vypracována za všestrannou podporu v řešení problémů týkajících se nejen této práce.

Dále děkuji konzultantovi panu doc. RNDr. Petru Rychlovskému, CSc. za ochotu a porozumění.

Svým přátelům a rodině za vytvoření zázemí a všeobecnou podporu.

Nakonec děkuji výzkumnému záměru Ústavu analytické chemie AV ČR, v.v.i. (projekt AV0Z40310501), výzkumnému záměru Univerzity Karlovy, Přírodovědecké fakulty MSM0021620857, rozvojovému projektu RP 14/63, specifickému výzkumu a vývoji SVV 261204, dále NIH-FIRCA project No. 1 R03 TW007057-01 (PI: M. Stýblo), GA AVČR grant číslo: A400310507, GA UK (grant číslo: 133008), GA ČR (grant č. 203/09/1783), Gillings Innovation Labs project (PI: M. Stýblo), Development of instrumentation and methodologies for analysis of As species, 2008-2010 za finanční podporu.

Abstrakt

Cílem práce byl rozvoj metodiky a instrumentace speciální analýzy založené na kombinaci selektivního generování substituovaných hydridů s detekcí atomovou absorpční nebo atomovou fluorescenční spektrometrií.

Vývoj metodiky a instrumentace speciální analýzy arsenu založené na selektivním generování substituovaných arsanů a využívající záchytu v kryogenní pasti (t.j. chromosorbem plněné skleněné U-trubicí) s AAS detekcí (HG-CT-AAS) byl prvním tématem této práce. Byly optimalizovány podmínky selektivního generování substituovaných hydridů a podmínky provozování pasti (výběr přístupu k hydridovému generování, úprava teplotního programu pasti, nově použité sušidlo - patrona s NaOH, možnosti eliminace nespecifické absorpce, možné snížení detekčních limitů).

Důležitou součástí práce bylo použití optimalizovaného HG-CT-AAS systému s U-trubicí plněnou chromosorbem pro speciální analýzu arsenu v buněčné suspenzi myších jater. Bylo prokázáno, že buněčnou suspenzi lze dávkovat přímo do hydridového generátoru a tak správně uskutečnit speciální analýzu arsenu, včetně získání informace o oxidačním stavu ($iAs^{III,V}$, $MAs^{III,V}$ a $DMAs^{III,V}$). Pro tyto typy vzorků bylo nutné optimalizovat koncentrace tetrahydroboratu, TRIS pufru a L-cysteinu a také dobu předredukce L-cysteinem.

Bylo zjištěno, že nahrazení skleněné U-trubice křemennou vede k užším a lépe rozlišeným píkům jednotlivých arsanů, což významně přispělo ke zlepšení parametrů chromatogramu bez dramatického zásahu do celého systému kryogenní pasti. Spektrometrické i radiometrické (s využitím ^{73}As a ^{74}As radioindikátorů) experimenty prokázaly 100% účinnost záchytu arsanů i jejich uvolnění z U-trubice plněné chromosorbem. Tyto experimenty však zejména ukázaly na možnost miniaturizace kryogenní pasti. Na základě extenzivního testování různých materiálů a designů byla jako nejvhodnější varianta nové kryogenní pasti vybrána beznáplňová křemenná kapilára vnitřního průměru 0,53 mm ve tvaru písmene "I". Optimalizací podmínek pomocí radiometrických i spektrometrických experimentů byla dosažena 100% účinnost záchytu i uvolnění všech studovaných arsanů.

Posledním tématem práce bylo použití atomového fluorescenčního spektrometru pro testování možnosti dalšího snížení detekčních limitů pro jednotlivé specíe arsenu ve spojení s výše uvedeným systémem HG-CT. Dosažené extrémně nízké detekční limity dosahují hodnot 3,2 pg iAs^{III} ; 0,8 pg MAs^V ; 1,1 pg $DMAs^V$.

Abstract

The general aim of this work was a development of methodology and instrumentation for speciation analysis based on the combination of the selective generation of substituted hydrides with atomic absorption or atomic fluorescence spectrometry detection.

The first topic of this work was the development of methodology and instrumentation for arsenic speciation analysis based on selective generation of substituted arsines with trapping in the cryogenic trap (U-tube packed with chromosorb) with AAS detection (HG-CT-AAS). The conditions of the selective hydride generation approach as well as working procedure of the cryogenic trap were optimized (appropriate approach for hydride generation, set up of heating program of cryogenic trap, new dryer – cartridge with NaOH, elimination of unspecific absorption, decreasing of the detection limits).

The second important part of the work lay in applying of the developed method for arsenic speciation analysis in a homogenized mouse liver tissue. The direct slurry sampling to hydride generator was develop. Moreover the information about oxidation state (iAs^{III,V}, MAs^{III,V} a DMAs^{III,V}) was obtain. The effect of relevant experimental parameters such as tetrahydroborate concentration, TRIS buffer concentration and time of pre-reduction of the samples by L-cysteine was investigated.

The cryogenic trap made of quartz glass was successfully tested as an alternative to the borosilicate glass U-tube. Narrower peaks with higher resolution were obtained with this kind U-tube. The trapping and volatilization efficiency of arsines in the U-tube packed with chromosorb were 100% determined by spectrometry and radiometry (with ⁷³As a ⁷⁴As radioindicators) experiments. All these results showed the possibility of miniaturization of the cryogenic trap. Several materials of the cryogenic trap were tested. An „I“ shaped quartz capillary (0.53 mm i.d.) without filling was found the most suitable reaching 100% trapping and volatilization efficiency.

The final aim of this work was interfacing of the HG-CT system with the atomic fluorescence detector to reach lower detection limits for all arsenic forms. The detection limits 3.2 pg iAs^{III}; 0.8 pg MAs^V; 1.1 pg DMAs^V were achieved by this approach.

Obsah

SEZNAM ZKRATEK	8
ÚVOD	9
1 TEORETICKÁ ČÁST.....	11
1.1 SLOUČENINY ARSENU A JEJICH TOXICITA	11
1.2 GENEROVÁNÍ A ATOMIZACE HYDRIDŮ	12
1.2.1 Chemické generování hydridů	13
1.2.1.1 Metody přímého přenosu	14
1.2.1.2 Metody kolekční.....	15
1.2.2 Atomizace hydridů.....	16
1.2.2.1 Křemenné atomizátory	16
1.2.2.2 Mechanismus atomizace hydridů v křemenných atomizátorech	17
1.2.2.3 Difuzní plamen.....	19
1.2.2.4 Flame – in – gas – shield atomizátor.....	20
1.3 SPECIAČNÍ ANALÝZA ARSENU POMOCÍ GENEROVÁNÍ HYDRIDŮ	22
1.3.1 Selektivní generování hydridů	22
1.3.2 Generování substituovaných hydridů	23
1.3.3 Generování hydridů z biologických vzorků	24
1.4 SUŠENÍ PLYNNÉ SMĚSI OBSAHUJÍCÍ HYDRIDY ANALYTU.....	25
1.4.1 Nafionová membrána	25
1.4.2 Absorpční média.....	26
1.4.3 Vymrazování vody za nižších teplot.....	27
2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	28
2.1 CHEMIKÁLIE	28
2.2 PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ	29
2.3 HYDRIDOVÝ GENERÁTOR	31
2.4 PŘÍSTUPY KE SPECIAČNÍ ANALÝZE ARSENU	33
2.4.1 Selektivní generování hydridů založené na předredukci L-cysteinem	34
2.4.2 Selektivní generování hydridů založené na změně pH.....	35
2.5 SUŠICÍ ZAŘÍZENÍ.....	36
2.5.1 Nafionová membrána	36
2.5.2 Patrona s hydroxidem sodným.....	36
2.5.3 Kónický vymrazovač.....	37
2.6 KRYOGENNÍ PASTI.....	38
2.6.1 Skleněná U-trubice	38
2.6.2 Křemenná U-trubice.....	40
2.6.3 Teflonová U-kapilára	41
2.6.4 Křemenná U-kapilára.....	43
2.6.5 Křemenná I-kapilára	45
2.7 ATOMIZÁTORY	47
2.7.1 Křemenný multiatomizátor	47
2.7.2 Grafitová kyveta	47
2.7.3 Flame in gas shield atomizátor.....	48
2.8 RADIOINDIKÁTOROVÉ EXPERIMENTY	48
2.9 BUNĚČNÉ SUSPENZE – SLURRY SAMPLING.....	51
2.10 KONVENCE A ZPRACOVÁNÍ NAMĚŘENÝCH DAT	52
2.10.1 Software	53
2.10.2 Vyhodnocení naměřených dat.....	53
2.10.3 Statistické zpracování výsledků.....	55
3 VÝSLEDKY A DISKUZE	57
3.1 VÝVOJ SYSTÉMU HG-CT-AAS PRO SPECIAČNÍ ANALÝZU ARSENU	57
3.1.1 Selektivní generování substituovaných hydridů arsenu	58
3.1.1.1 Selektivní generování hydridů založené na změně pH.....	59
3.1.1.2 Selektivní generování hydridů založené na předredukci L-cysteinem.....	59
3.1.1.3 Stabilita forem arsenu.....	60

3.1.2	Vývoj systému HG-CT	61
3.1.2.1	Optimalizace U-trubice	62
3.1.2.2	Nespecifická absorpce	64
3.1.2.3	Sušení nafionovou membránou	65
3.1.2.4	Sušení patronou s hydroxidem sodným	67
3.1.3	Detekční limity	72
3.2	SPECIAČNÍ ANALÝZA ARSENU V BUNĚČNÝCH SUSPENZÍCH POMOCÍ HG-CT-AAS	74
3.2.1	Dávkování buněčných suspenzí	75
3.2.2	Optimalizace předredukce vzorku	76
3.2.3	Optimalizace koncentrace tetrahydroborátu sodného	78
3.2.4	Optimalizace koncentrace TRIS pufru	79
3.2.5	Detekční limity pro buněčné suspenze s AAS	80
3.3	VÝVOJ KRYOGENNÍ PASTI	81
3.3.1	Využití křemenné U-trubice	82
3.3.2	Radioindikátorové experimenty – U-trubice	83
3.4	MINIATURIZACE KRYOGENNÍ PASTI	86
3.4.1	Možnosti miniaturizace U-trubice	87
3.4.2	Studium záchytu v teflonové U-kapiláře	90
3.4.3	Studium záchytu v křemenné U-kapiláře	93
3.4.3.1	Vývoj uspořádání U-kapiláry	93
3.4.3.2	Radioindikátorové experimenty - křemenná U-kapilára	98
3.4.3.3	Optimalizace nosného plynu pro využití U-kapiláry	99
3.4.3.4	Sušení plynné směsi pro U-kapiláru	100
3.4.3.5	Studium účinnosti záchytu a uvolnění forem arsenu v U-kapiláře	101
3.4.4	Studium záchytu v křemenné I- kapiláře ve spojení s AAS	108
3.4.4.1	Vývoj I-kapiláry	108
3.4.4.2	Sušení plynné směsi pro I-kapiláru	111
3.4.4.3	Možnosti separace arsenových specií v MCT	113
3.5	MOŽNOSTI AFS DETEKCE PRO SPECIAČNÍ ANALÝZU ARSENU	115
	ZÁVĚR	120
	SEZNAM LITERATURY	124

Seznam zkratek

AAS	atomová absorpční spektrometrie
AFS	atomová fluorescenční spektrometrie
AES	atomová emisní spektrometrie
ICP OES/MS	indukčně vázané plazma s optickou/hmotnostní detekcí
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
GC	plynová chromatografie
HG-CT-AAS	spojení hydridového generování s kryogenní pastí a atomovým absorpčním spektrometrem
HG-CT-AFS	spojení hydridového generování s kryogenní pastí a atomovým fluorescenčním spektrometrem
DBC	deuteriová korekce pozadí
MCT	microcryotrap – komerčně dostupná jednotka kryogenní pasti
LOD	detekční limit
i.d.	vnitřní průměr
o.d.	vnější průměr
s	směrodatná odchylka
s_r	relativní směrodatná odchylka
t	čas (s)
\bar{x}	aritmetický průměr
t_R	retenční čas
FWHM	šířka píku v polovině výšky píku
v	výška píku
P	plocha píku
A	absorbance
t_N	doba nárůstu teploty
t_S	doba setrvání teploty
t_{gen}	doba zablokování (doba „běžícího“ hydridového generátoru do zablokování kryogenní pasti vymrazenou vodní párou a aerosolem)

Úvod

Atomová absorpční (AAS) popř. atomová fluorescenční spektrometrie (AFS) jsou základními metodami stopové prvkové analýzy. I ve srovnání s metodami indukčně vázaného plazmatu s hmotnostní či optickou detekcí (ICP MS/OES), jejichž podíl na analýzách různých materiálů stále narůstá, jsou AAS i AFS investičně i provozně levnější, dostatečně citlivými alternativami. Významným faktorem je také dlouholeté zastoupení AAS v různých odvětvích kde je třeba rychlé, dostatečně citlivé a spolehlivé metody pro prvkovou analýzu. Ve spojení s metodami např. využívající generování hydridů se rozšiřují její možnosti na speciální analýzu. Ve srovnání s metodami využívající ICP MS jsou obecně detekční limity vyšší. Ovšem v případě spojení s prekoncentračními technikami je AAS a ještě více AFS schopna se detekčním limitům pro danou sloučeninu přiblížit na srovnatelnou mez v porovnání s ICP MS detekcí. Mezi prekoncentrační techniky patří záchyt vymrazováním, záchyt v absorpčním médiu nebo v poslední době se rozvíjející záchyt na různých druzích povrchů. Tato práce využívá a studuje první zmíněnou prekoncentrační techniku. Spojení generování hydridů s prekoncentrací vymrazováním v kryogenní pasti s AAS detektorem je označováno HG-CT-AAS. Analogicky, HG-CT-AFS v případě AFS detektoru.

Arsen a jeho sloučeniny jsou pro lidský organismus většinou toxické. Studium metabolismu arsenu vyžaduje zajistit dostatečně citlivou, rychlou metodu se kterou je možné analyzovat i biologické materiály se složitou maticí jako jsou lyzáty nebo suspenze buněk, moč, apod. Předchozí výzkum oddělení stopové prvkové analýzy Ústavu analytické chemie AV ČR, v.v.i. i spolupracujících oddělení ukázal, že technika HG-CT-AAS je vhodná pro speciální analýzu arsenu, především pro stanovení toxikologicky důležitých methylovaných metabolitů anorganického arsenu. Velká výhoda této techniky spočívá v oddělení analytu od matrice díky vygenerování plynného hydridu/ů. Hydrid/y arsenu se nejdříve zachytí v kryogenní pasti v kroku záchytu kde dochází i k prekoncentraci a poté se uvolní v kroku uvolnění na základě rozdílného bodu varu. Kryogenní past tedy slouží i jako separační zařízení.

Obecným cílem této práce byl rozvoj metodiky a instrumentace speciální analýzy založené na kombinaci selektivního generování substituovaných hydridů s AAS nebo AFS detekcí.

Prvním z konkrétních cílů práce byl vývoj metodiky a instrumentace speciální analýzy arsenu založené na selektivním generování substituovaných arsanů využívající spojení HG-CT-AAS s U-trubicí jako kryogenní pasti.

Následným cílem bylo využít vyvinutého a optimalizovaného spojení HG-CT-AAS využívajícího kryogenní past v podobě skleněné U-trubice pro účely analýzy toxikologicky zajímavých arsenových forem v biologických materiálech jakými jsou suspenze buněk. Tento typ vzorků má vypovídající hodnotu v případě studia metabolických cest sloučenin arsenu v těle živočichů. Existují různé techniky pro stanovení jednotlivých sloučenin v takových typech vzorků. Ve většině případů jde o techniky zahrnující mineralizaci vzorku, při které dochází ke ztrátě speciální informace z důvodu lability jednotlivých arsenových specií vůči teplotě nebo oxidačnímu či redukčnímu prostředí. Ideálním případem je tedy využít přímo suspenzi buněk pro generování hydridů bez předřazené mineralizace. Existovalo nebezpečí rozdílných optimálních podmínek generování hydridů pro tento typ vzorků v porovnání se vzorky s vodnou matricí. Nalezení optimálních podmínek pro generování hydridů z tohoto typu vzorku bylo tedy nutnou podmínkou.

Dalším cílem práce bylo testování odlišného materiálu kryogenní pasti - křemenného skla a především studovat záchyt a uvolnění hydridů arsenu z kryogenní pasti podobě U-trubice. Zjištění účinnosti záchytu a uvolnění a distribuce arsanu v pasti pomocí radiondikátorů ^{73}As a ^{74}As bylo dalším důležitým krokem.

Časově i technicky nejnáročnějším cílem této práce byl vývoj miniaturizovaného uspořádání kryogenní pasti. Požadovaným výsledkem bylo miniaturizované zařízení se zjednodušenou obsluhou a též eventuální komerční dostupností jednotlivých částí. Dosavadní zařízení kryogenní pasti využívající skleněné U-trubice plněné chromosorbem je systém s vysokými nároky na operátora na jednu stranu, provozních znalostí a jeho šikovností při sestavování či výměně částí kryogenní pasti na straně druhé.

Posledním z cílů bylo zjištění potenciálu spojení HG-CT s detekcí AFS pro speciální analýzu arsenu založenou na generování substituovaných hydridů, zejména pro dosažení extrémně nízkých detekčních limitů jednotlivých arsenových forem. Využití tohoto systému by bylo výhodné pro speciální analýzu arsenu v biologických materiálech jejichž množství je obvykle značně omezené.

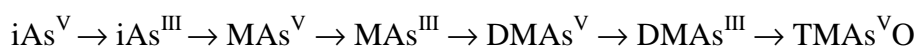
1 Teoretická část

1.1 Sloučeniny arsenu a jejich toxicita

Mezi anorganické sloučeniny arsenu patří sulfidy, oxidy, arsenitany, arseničnany apod. Velkou skupinou organických arsenových sloučenin jsou arsenocukry, organické kyseliny, jejich estery a soli, atd.

Mezi nejtoxičtější a nejrozšířenější skupinou arsenových sloučenin jsou anorganické formy. Tří- a pětimocné formy anorganických sloučenin arsenu ($iAs^{III,V}$) byly nalezeny jak v povrchové, tak podzemní vodě. Pitná voda kontaminovaná sloučeninami arsenu je nejčastější příčinou intoxikace lidského organismu. Vystavení lidského organismu anorganickým formám arsenu je spojováno s výskytem rakoviny kůže, močového měchýře, jater, ledvin a plic, stejně tak s poruchami oběhového a nervového systému [1–3].

Mezi toxikologicky významné sloučeniny patří i mono-, di- a trimethylované formy arsenu ($MAs^{III,V}$, $DMAs^{III,V}$, TMA_s^VO) uvedené v Tab.1.1-1. V těle savců dochází k redukci iAs^V na iAs^{III} s následnou methyloací a vznikem methylovaných forem. Methylace probíhá až na TMA_s^VO [4, 5]. Průběh metabolismu v těle savců obsahující kroky methylace a redukce uvádí následující schéma [6].



Pro živé organismy jsou různé formy arsenu různě toxické. Trojmocné soli jsou lépe rozpustné, nestálé a více toxické než pětimocné sloučeniny. Toxicita je úzce spojena s mobilitou ve vodě a tělních tekutinách. Pro sloučeniny arsenu platí, že anorganická trojmocná forma (iAs^{III}) a její methylované deriváty jsou více toxické než jejich pětimocné protějšky. V případě porovnání trojmocných sloučenin arsenu je dokázána vyšší akutní toxicita MAs^{III} než iAs^{III} . LD_{50} pro MA^{III} pro křečka je 2 mg As/kg živé váhy. Pro $DMAs^{III}$ platí nejnižší akutní toxicita ve srovnání s ostatními trojmocnými formami [7].

Přehled sloučenin arsenu využitých v této práci se zjednodušenými strukturálními vzorci uvádí Tab. 1.1-1. Zde jsou též uvedeny příslušné hydridy generované redukcí tetrahydroboratem sodným.

Tab. 1.1-1: přehled relevantních arsenových sloučenin

Zkratka užívaná v textu práce	Sumární vzorec sloučeniny vstupující do reakce	Strukturní vzorec	vzniklá těkavá sloučenina	T _v (°C)
iAs ^{III}	Arsenitan AsO ₃ ³⁻	$\begin{array}{c} \text{O}^- \\ \\ \text{As} \\ \\ \text{O}^- \end{array}$	AsH ₃	-55
iAs ^V	Arseničnan AsO ₄ ³⁻	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{O}^- - \text{As} - \text{O}^- \\ \\ \text{O}^- \end{array}$	AsH ₃	-55
MAs ^V	Methylarseničnan CH ₃ AsO ₃ ²⁻	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{H}_3\text{C} - \text{As} - \text{O}^- \\ \\ \text{O}^- \end{array}$	CH ₃ AsH ₂	2
DMA ^V	Dimethylarseničnan C ₂ H ₆ AsO ₂ ⁻	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{H}_3\text{C} - \text{As} - \text{CH}_3 \\ \\ \text{O}^- \end{array}$	(CH ₃) ₂ AsH	35,6
TMA ^V O	Oxid trimethylarseničný C ₃ H ₉ AsO	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{H}_3\text{C} - \text{As} - \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	(CH ₃) ₃ As	70

V případě (CH₃)₃As nejde o hydrid, ale o jeho trimethyl substituovanou formu. Nicméně se jedná o těkavou sloučeninu, s kterou lze pracovat analogicky jako s hydridy a proto bude pro jednoduchost nadále mezi hydridy zahrnována. V Tab.1.1-1 jsou dále uvedeny i teploty varu vygenerovaných hydridů na jejichž základě je možné uskutečnit záchyt i separaci v kolečném zařízení založeném na vymrazování jednotlivých forem, které je součástí hydridového generátoru (viz. 1.2 Generování a atomizace hydridů) [8–10].

1.2 Generování a atomizace hydridů

Technika generování hydridů je známa a využívána necelých 40 let [11]. Generování hydridů je možné provést několika způsoby. Mezi takové techniky patří

chemické generování [12–14], elektrochemické generování [15–17] a fotochemické generování [18–20]. Techniky generování hydridů je možné využít pro generování sloučenin více než poloviny prvků periodické tabulky např. As, Bi, Ge, Pb, Se, Sb, Sn, Te a dalších.

Nejrozšířenější metodou z výše uvedených je chemické generování hydridů, kdy je hydrid analytu vytvořen pomocí reakce analytu s redukčním činidlem [21]. Nejčastěji se využívá tetrahydroboratu sodného. Jeho reakcí s analytem vzniká hydrid prvku nebo tzv. studené páry prvku. Vznik těkavých sloučenin nebo atomů prvků reakcí s tetrahydroboratem je používán např. pro generování Hg nebo Cd [22]. Ke generování těkavých sloučenin reakcí s tetrahydroboratem přibylo v nedávné době i generování Ag [23, 24], Au [25], Ni [26], a Zn [27].

Technika chemického generování hydridů je často spojována s AAS. Existují i varianty v podobě spojení s AFS nebo s ICP-MS apod. Spojení chemického generování a AAS s křemenným atomizátorem je v porovnání s ostatními metodami (AFS, ICP-MS) metodou nabízející vysokou citlivost a nízký šum základní linie za nízké pořizovací i provozní náklady [28]. S využitím křemenného multiatomizátoru místo klasického křemenného atomizátoru je možné zvýšit odolnost vůči atomizačním interferencím a zvýšit lineární dynamický rozsah [29]. Spojení těchto dvou metod poskytuje účinnou alternativu elementárního stanovení i speciální analýzy. Vzhledem k rozšířenosti AAS v praxi je využita možnost spojení právě s chemickým generováním hydridů ze vzorků s vodnou maticí [30, 31], ale i vzorků s mnohem složitější maticí jako jsou biologické vzorky (moč, tkáň, krev) [32–34], sedimenty [35], metalurgické materiály [36], apod.

1.2.1 Chemické generování hydridů

Chemické generování hydridů se skládá ze dvou fází. První fáze spočívá v redukci analytu v kapalně fázi na hydrid nebo jinou těkavou sloučeninu a převedení této sloučeniny do plynné fáze. Transport hydridu či jiné těkavé sloučeniny do atomizátoru s eventuálně předřazeným záchytem analytu v plynné fázi obsahuje druhá fáze. Termín hydridový generátor označuje celou aparaturu, kde dochází k těmto procesům [37].

Metody generování hydridů mohou být realizovány dvěma způsoby: dávkovém a průtokovém uspořádání. Průtokové uspořádání může být realizováno jako kontinuální generování nebo průtokové injekční generování. Vygenerovaný hydrid může být veden

přímo k atomizaci (metody přímého přenosu) nebo je možnost záchytu analytu v zařízení, kde je analyt shromažďován. Po proběhnutí reakce redukčního činidla s analytem za tvorby hydridu či jiné těkavé sloučeniny dojde k uvolnění analytu do atomizačního zařízení [38].

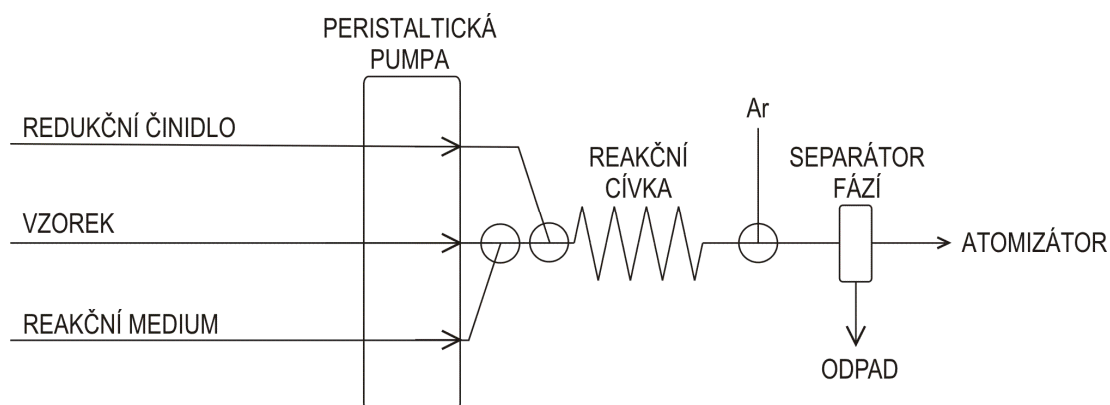
Dávkové generování spočívá ve vygenerování hydridu z připraveného objemu vzorku přidáním redukčního činidla z injekční stříkačky nebo peristaltickou pumpou [39].

1.2.1.1 Metody přímého přenosu

Mezi metody přímého přenosu se řadí kontinuální generování, dávkování do proudu a dávkové uspořádání [40].

Principem **kontinuálního generování** je plynulé míchání kapalného vzorku, reakčního media a redukčního činidla. Po zreagování reakční směsi v reakční cívce dochází k oddělení plynné a kapalně fáze v separátoru fází. Plynná fáze je vedena směrem k atomizátoru a kapalná fáze je odtahována jako odpad. Ve většině případů je před vstupem do separátoru fází přidáván nosný plyn.

Cílem uspořádání pro kontinuální generování je dosažení ustáleného stavu signálu. Citlivost při použití kontinuálního generování stoupá se stoupajícím průtokem hydridu analytu a s klesajícím celkovým průtokem plynů z hydridového generátoru do atomizátoru. Pro vyhodnocení se používá výška signálu [37]. Schéma uspořádání pro kontinuální generování s přidáváním nosného plynu (argon) před separátor fází ukazuje Obr.1.2-1.



Obr. 1.2-1: schéma uspořádání kontinuálního generování s přidáváním nosného plynu před separátor fází (argon)

Metoda **dávkování do proudu** se liší od kontinuálního uspořádání dávkování (injektováním) vzorku do proudu nosného média, které je čerpáno v kanálu pro vzorek na Obr. 1.2-1. Výsledný signál má tvar píku se strmou náběžovou hranou a s protaženou sestupovou hranou [40]. Výška signálu je nižší ve srovnání se signálem pro kontinuální generování díky disperzi v kapalně i plynné fázi. [39]

Dávkové uspořádání spočívá v generování hydridů z připravené dávky kapalného vzorku. Do připraveného vzorku v kapalně fázi obsahující analyt je peristaltickou pumpou nebo injekční stříkačkou přidáno redukční činidlo. Dávkový generátor hydridů tvoří nádoba nejlépe s kónickým dnem, která slouží jako reaktor a zároveň jako separátor fází. Výsledný signál má tvar píku. Stejně jako u metod kontinuálního generování a dávkování do proudu je výška signálu přímo úměrná průtoku hydridu a klesá se stoupajícím celkovým průtokem plynů [39].

1.2.1.2 Metody kolekční

Základem kolekčních metod je zachycování analytu v části aparatury hydridového generátoru nebo mimo něj. Způsoby záchytu mohou být založeny na tzv. tlakové kolekci kdy je analyt zachytáván např. v pryžovém rezervoáru při probíhající reakci v hydridovém generátoru a poté je hydrid analytu najednou uvolněn do atomizátoru. V poslední době je tato metoda nevyužívaná [40]. Další možností je tzv. záchyt vymrazováním [12, 41, 42], záchyt v absorpčním mediu [43, 44] nebo tzv. „in situ“ záchyt v grafitových atomizátorech [45], na křemenném povrchu [46] a dalších materiálech [47].

Při **záchytu vymrazováním** je hydrid zachycen v U-trubici ponořené do kapalného dusíku [37]. Po proběhnutí reakce v hydridovém generátoru a zachycení veškerého hydridu analytu v kryogenní pasti (krok záchytu) je tato past vyhřáta nad teplotu varu daného hydridu analytu a tím je tento hydrid uvolněn (krok uvolnění) a proudem nosného plynu veden do atomizátoru. Signál má tvar píku. Pro záchyt vymrazováním je často využívána křemenná U-trubice naplněná tělísky (křemenná vata [48], skleněné kuličky [49]) nebo chromatografickou náplní [12, 42].

Vzhledem k využití U-trubice s různými druhy náplní se objevily problémy s ucpáváním pasti vymraženou vodní párou vstupující do pasti ze separátoru fází. Řešení tohoto problému se nabízí ve využití různých druhů sušidel plynné směsi vystupující ze separátoru fází. Z běžně užívaných sušidel jako je např. H_2SO_4 , $Mg(ClO_4)_2$, CaO ,

silikagel, CaCl_2 , apod. [49–51] je jen NaOH vhodný na sušení směsi hydridů arsenu tzn. nedochází ke ztrátám ať už anorganické formy arsenu tak i methylovaných forem arsenu [49].

Příkladem **záchytu v absorpčním médiu** je použití pevného nebo kapalného absorpčního média, na kterém se nejdříve analyt či hydrid analytu nakoncentruje a poté je obsah arsenu v absorpčním médiu stanoven hydridovou nebo jinou technikou spojenou s AAS nebo odlišnými technikami jako je potenciometrie či voltametrie [37].

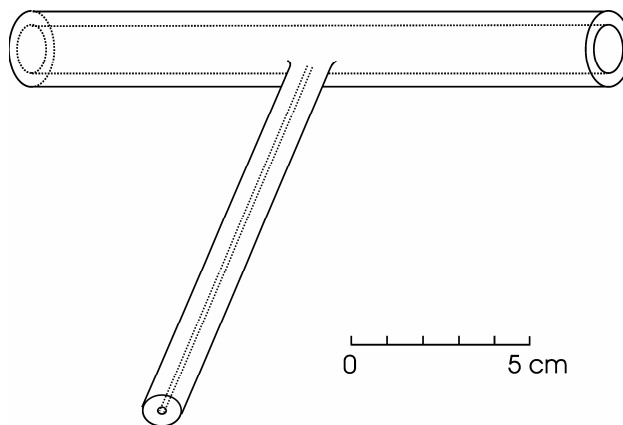
„**In-situ**“ kolekce je využívána hlavně u grafitových atomizátorů, ale lze ji uplatnit i při záchytu na křemenném skle při vysokých teplotách kdy průtokem vodíku křemennou pastí řídíme záchyt i uvolnění analytu do atomizátoru [52, 53].

1.2.2 Atomizace hydridů

Nejčastěji využívanými atomizátory hydridů pro AAS jsou křemenné atomizátory, využitelný je ale i plamen a grafitový atomizátor. Byly testovány i jiné typy atomizátorů jako je wolframový pásek [54] apod. Pro tuto práci byl využíván křemenný atomizátor. Pro spojení s AFS je typický zástupce atomizátorů difuzní plamen [55, 56].

1.2.2.1 Křemenné atomizátory

Elektrotermicky nebo plamenem vyhřívána křemenná trubice (Obr. 1.2-2) je v současnosti nejpoužívanější hydridový atomizátor. Jedná se o křemennou trubici ve tvaru T, s vodorovnou částí umístěnou do optické osy. Hydrid je přiváděn proudem nosného plynu do optické trubice přívodním ramenem. Konce optické trubice jsou otevřené nebo uzavřené křemennými okénky. Teplota vyhřívání křemenného atomizátoru je omezená tepelnou odolností křemene (asi 1100°C) nicméně optimální citlivosti pro hydridy arsenu, bismutu, olova, antimonu, selenu, cínu a telluru se dosahuje mezi $800\text{--}1000^\circ\text{C}$ [40].

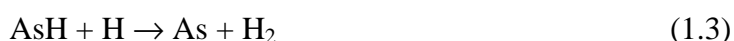


Obr. 1.2-2: konvenční křemenný atomizátor

Nedostatky tohoto typu atomizátoru spočívají v nízké odolnosti vůči atomizačním interferencím a nedostatečné linearitě kalibračních závislostí. Důvodem je přítomnost pouze jednoho centra tvorby vodíkových radikálů, které se nalézá ve styku přívodního ramene a optické trubice [57].

1.2.2.2 Mechanismus atomizace hydridů v křemenných atomizátorech

V oblaku radikálů vzniklého reakcí kyslíku a vodíku v atomizátoru dochází mezi radikálem vodíku a hydridem analytu k reakci (příklad As) dle následujících rovnic [37]:

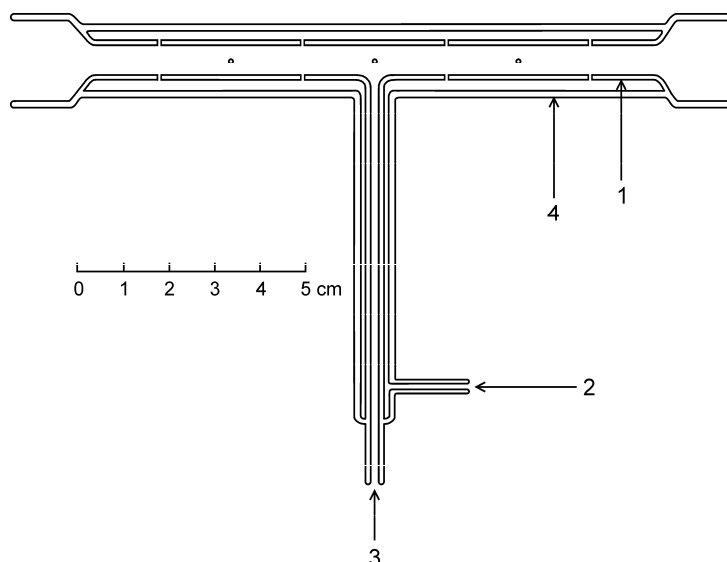


Experimentálně bylo dokázáno, že hydridy nemohou být atomizovány v křemenných atomizátorech bez přítomnosti vodíku [58–62]. Zásobování vodíkem je v metodách přímého přenosu zabezpečeno rozkladem tetrahydroborátu v kyselém prostředí. Pozorování mechanismu atomizace hydridů arsenu dokazují, že poměr kyslíku a vodíku v atomizátoru musí být udržován pod 0,5 [63–65]. Přesné umístění oblaku vodíkových radikálů závisí na tvaru atomizátoru, teplotním profilu, průtoku nosného plynu. Protože pravděpodobnost tvorby volných atomů analytu je úměrná počtu srážek s vodíkovými radikály, atomizační účinnost lze zvýšit zvětšením hustoty vodíkových radikálů. V křemenném atomizátoru vzniká oblak radikálů na začátku vyhřívaného místa atomizátoru reakcí mezi vodíkem a kyslíkem. Jinak je tomu v tzv. multiatomizátoru.

Multiatomizátor je dvouplášťový externě vyhřívaný atomizátor. Jeho funkci objasňuje obr. 1.2-3. Část multiatomizátoru umístěné v optické cestě se skládá ze dvou koncentrických trubic, které jsou externě vyhřívány na teplotu 700 °C až 1100 °C. Vnitřní koncentrická trubice odpovídá optické trubici křemenného atomizátoru. Rozdílem oproti optické trubici křemenného atomizátoru je v otvorech umístěných v celé délce vnitřní optické trubice. Do prostoru mezikruží mezi koncentrickými trubicemi, je přiváděn kyslík (vzduch), odkud otvory v optické trubici vstupuje do jejího vnitřního objemu. K přívodu hydridu z generátoru slouží stejně jako u křemenného atomizátoru kolmé přívodní rameno ve střední části vnitřní optické trubice. Na vstupu kyslíku do optické trubice, tj. v blízkosti každého otvoru, dochází k reakci kyslíku s přítomným vodíkem a tím k tvorbě vodíkových radikálů.

Při optimální velikosti a velkém počtu otvorů by optická trubice měla být rovnoměrně vyplněna vodíkovými radikály. Produkty zániku volných atomů by v takovém případě byly okamžitě znovu atomizovány reakcí s vodíkovými radikály.

Dosavadní způsob provedení multiatomizátoru je na obr. 1.2-3. V optické trubici má čtrnáct rovnoměrně rozložených otvorů o velikosti přibližně 0,5 mm. Použití tohoto multiatomizátoru podstatně snižuje nevýhody běžných jednoplášťových křemenných atomizátorů. Při zachování vynikající citlivosti se podstatně zvýšil toleranční limit k atomizačním interferencím, tj. koncentrace interferentu, která způsobí 10% změnu signálu. Např. toleranční limit k interferenci arsenu při stanovení selenu se zvýšil nejméně o jeden řád. Lineární dynamický rozsah kalibrační závislosti pro selen se rozšířil k dvacetinásobně větším koncentracím.

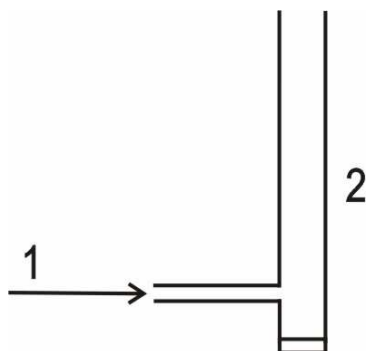


Obr. 1.2-3: multiatomizátor; 1 – vnitřní trubice i.d. 6 mm, 2 – vstup pro vzduch nebo kyslík, 3 – vstup nosného plynu s analytem, 4 – vnější trubice i.d. 8 mm, délka optické trubice i se spojenými zakončeními 16 cm, délka optické trubice bez spojených zakončení 12 cm

Odolnost současného multiatomizátoru vůči atomizačním interferencím je sice o jeden až dva řády vyšší ve srovnání s křemenným atomizátorem, avšak stále o dva řády nižší než atomizátoru typu difuzního plaménku, ve kterém je celý pozorovaný prostor vyplněn vodíkovými radikály. Snížená odolnost vůči atomizačním interferencím multiatomizátoru je pravděpodobně způsobena tím, že vodíkové radikály nevyplní prostor optické trubice zcela. V místech bez výskytu vodíkových radikálů, kam nedosahují obláčky radikálů tvořené v jednotlivých otvorech stěny optické trubice, může docházet k zániku volných atomů analytu, což má za následek interference a zakřivení kalibračních závislostí [66].

1.2.2.3 Difuzní plamen

Tento typ atomizátoru je složen pouze z jednoduché křemenné trubice s přívodním ramenem jímž procházejí plyny nutné pro vznik plamene a zároveň obsahující hydrid analytu/ů vygenerovaný v hydridovém generátoru. Maximální dosažitelná teplota plamene je 1300°C. Typické uspořádání ukazuje obr.1.2-4.

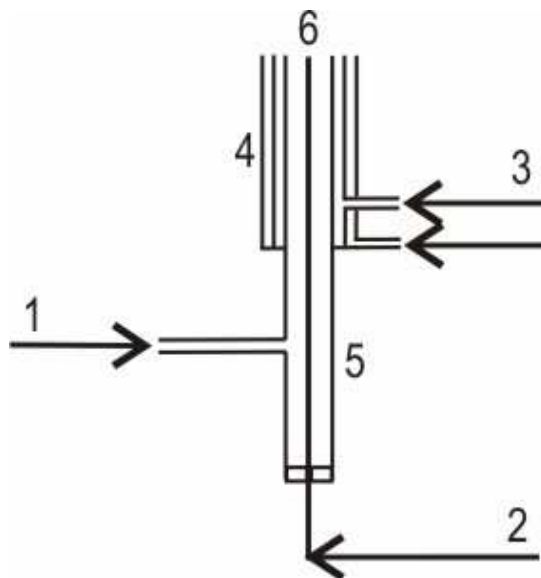


Obr. 1.2-4: uspořádání difuzního plamene; 1 - vstup arsanů s plyny procházejícími kryogenní pastí a argonu a vodíku přidaných za kryogenní past; 2 – vertikální křemenná trubice;

Nevýhodou difuzního plamene je nízká citlivost z důvodu velkého zředění plyny potřebnými pro vznik plamene a oproti jiným atomizátorům používaných k atomizaci hydridů, vysoký šum základní linie. Oba tyto faktory vedou k poměrně špatným detekčním limitům. Proto se tento typ atomizátoru používá pro AAS jen vyjímečně. [37, 67] Podobné uspořádání nazvané miniaturní difúzní plamen se nicméně používá ve spojení s AFS. Rozšířené jsou komerčně dostupné přístroje využívající právě tento typ atomizátoru [68].

1.2.2.4 Flame – in – gas – shield atomizátor

Atomizátorem pro AFS je tzv. flame-in-gas-shield atomizátor (FIGS). Základem je křemenná vertikální trubice používaná pro difuzní plamen do níž je zaváděn vodík a argon. Středem této trubice je vedena křemenná kapilára o vnitřním průměru 0,53 mm sloužící k zavádění malého průtoku kyslíku. Na konci kapiláry tak hoří vodíkový-kyslíkový mikroplamínek ve velkém přebytku vodíku. Pozorovací část nad křemennou trubicí musí být stíněna od okolního prostředí laminárním koncentrickým průtokem argonu vnitřním a vnějším kanálem stínící jednotky [69]. Teplota plamene dosahuje 2800 °C. Konstrukci atomizátoru přibližuje obr.1.2-5.



Obr. 1.2-5: uspořádání flame – in – gas – shield atomizátoru (FIGS); 1 - vstup arsanů s plyny procházejícími kryogenní pastí a argonu a vodíku přidaných za kryogenní past; 2 – vstup kyslíku do kapiláry; 3 – vstup argonu do stínící jednotky; 4 – stínící jednotka; 5 – vertikální křemenná trubice; 6 - kapilára

Průtok kyslíku kapilárou je smysluplný mezi 1,8 až 10 ml min⁻¹ vzhledem k analytické využitelnosti signálu a je řídicím faktorem pro velikost plamene. Oblak vodíkových radikálů vzniká na konci kapiláry díky průtoku kyslíku a průtoku vodíku vertikální trubicí a zasahuje až na hranu vertikální trubice. Distribuce volných atomů je řízena fyzikálními procesy a chemickými reakcemi stejně jako v difuzním plameni. V případě FIGS atomizátoru je možná reakce volných atomů s molekulárním kyslíkem z okolní atmosféry procházejícím plyny ze stínící jednotky (argonem). I malé množství molekulárního kyslíku prošlého z okolní atmosféry dokáže způsobit pokles volných atomů analytu [70]. Hlavním parametrem řídicím citlivost je poměr celkového průtoku argonu ku průtoku vodíku vertikální trubicí. V porovnání s difuzním plamenem oddělení volných atomů od okolní atmosféry není okrajem plamene o vysoké teplotě, ale plyny procházejícími stínící jednotkou, které nezpůsobují naředění volných atomů. V principu je tento parametr zodpovědný za dosažení vyšší citlivosti pro FIGS než pro difuzní plamen.

Odolnost FIGS atomizátoru vůči interferencím je závislá na vzdálenosti mezi zónou atomizace (vznik volných atomů) a detekce (pozorovací výška). K nejvyšší odolnosti vůči interferencím dochází v případě nejkratší vzdálenosti mezi zónou atomizace a zónou detekce [71]. Rozsah interferencí je také nižší v případě vyššího průtoku kyslíku kapilárou [72].

Výhodami oproti difuznímu plameni jsou vyšší citlivost a nižší šum, tudíž pro snížení detekčních limitů arsenových specií je tento typ atomizátoru ideální [73].

1.3 Speciační analýza arsenu pomocí generování hydridů

Speciační analýza je obecně definována jako veškeré analytické aktivity spojené s identifikací a/nebo stanovením množství jedné nebo více chemických specií daného prvku. Veškeré chemické sloučeniny mohou být považovány za odlišnou chemickou specií pokud se liší v izotopovém složení, konformaci, oxidačním stupni, elektronovém stavu nebo v povaze jejich komplexně nebo kovalentně vázaných substituentů [74].

Přístupy ke generování hydridů pro speciační analýzu lze rozdělit do tří skupin:

- Selektivní generování hydridů
- Generování substituovaných hydridů
- Post-kolonové generování hydridů

Post-kolonové generování hydridů spočívá v separaci jednotlivých analytů před vlastním generováním hydridů. Vzhledem k nevyužití tohoto přístupu pro účely této práce nebude dále zmiňován [22].

1.3.1 Selektivní generování hydridů

Proces selektivního generování hydridů popisuje ve zkratce zjednodušující schema:

generování hydridu → atomizace/detekce

Tento přístup je založen na vzniku hydridu jednotlivých forem analytu (specií) za různých podmínek. Obvykle se nejdříve vygeneruje jen hydrid z analytu v nižším oxidačním čísle a poté se z dalšího alikvotu vzorku generuje hydrid z analytu v obou oxidačních číslech. Toho lze dosáhnout vhodnou volbou podmínek generování.

Tohoto přístupu lze využít při generování například antimonu (III a V), arsenu (III a V), selenu (IV a VI), telluru (IV a VI). Pro detekci lze zvolit i jinou metodu než AAS [38].

Při selektivním generování arsenu lze vhodnou volbou pH (koncentrace kyseliny chlorovodíkové, použití pufru) řídit účinnost generování hydridu z analytu v různých

oxidačních číslech. V jednom ze dvou alikvotů se při určitém pH (6) vygeneruje hydrid z oxidačního čísla analytu (III) a poté změnou pH (0) se generuje hydrid z oxidačních čísel analytu (III) i (V) a tím se získá celkový obsah arsenu. Obsah arsenu v oxidačním čísle (V) se dopočítá. [30 , 75]

Místo volby pH lze založit selektivní generování na předredukci (redukce před analýzou) pětímocných forem arsenu na trojmocné vhodným redukčním činidlem jako je L-cystein. Pětímocné formy arsenu ve vzorku jsou redukcí L-cysteinem převedeny na trojmocné a spolu s trojmocnými formami přítomnými ve vzorku před redukcí jsou vygenerovány v podobě arsanu. Tím je získán celkový obsah jednotlivých forem. Z rozdílu celkového obsahu jednotlivých forem a obsahu trojmocných forem je získán obsah pětímocných forem.

Jako redukční činidla na předredukci lze použít i jodid draselný [76 , 77]. Pro možnost předredukce vzorku tzv. „on-line“ bez ztráty času nutného na předredukci vzorku lze využít kyselinu thioglykolovou [78].

1.3.2 Generování substituovaných hydridů

Tento přístup spočívá v generování substituovaných forem arsanu. Popis procesu popisuje následující schema:

generování směsi alkyl substituovaných hydridů → separace → atomizace/detekce.

Speciální analýza založená na generování substituovaných hydridů je použitelná v případech, kdy jednotlivé formy analytu mohou být převedeny na různé alkyl substituované hydridy. Typickou aplikací je speciace iontových alkyl sloučenin typu $R_nA^{+(m-n)}$, kde m je valence analytu A a n je mezi 1 a $m-1$ a R je alkyl substituent. Výsledkem generování je směs alkyl substituovaných hydridů sumárního vzorce $R_nAH_{(m-n)}$ s příslušným binárním hydridem AH_m . Směs hydridů v plynné fázi je separována a nalezené zastoupení jednotlivých hydridů pak udává zastoupení analyzovaných forem analytu. Tento přístup je užitečný pro speciální analýzu methyl substituovaných As forem [42], Sb a Ge forem, methyl a butyl substituovaných Sn forem a methyl, ethyl a butyl substituovaných Pb forem [37].

Vygenerovaná směs hydridů je prekoncentrována vymrazováním. Následně, po ohřevu, jsou zachycené hydridy uvolněny a separovány. Obvykle se používá křemenné

kolony naplněné chromatografickou náplní. Kolona je ve fázi záchytu ponořena do kapalného dusíku a ve fázi uvolnění vyhřívána odporovým drátem. Vzhledem k různému bodu varu studovaných sloučenin v tab.1.1-1 lze uskutečnit i separaci těchto forem s postupně se zvyšující teplotou v kryogenní pasti. Spojením selektivního generování hydridů s generováním substituovaných hydridů je možné získat účinný systém ke speciální arsenových sloučenin uvedených v tab. 1.1-1.

Pro detekci je prakticky výhradně používána AAS, ačkoliv principiálně použitelná je jakákoliv atomově spektrometrická metoda [38]. Pro detekci bez separace a bez rozlišení arsenových specií je využíván, v menší míře než AAS, i AFS detektor [79, 80]. Nicméně je známo i spojení pro speciální analýzu arsenu s využitím kryogenní pasti [81]. Existuje i alternativní možnost separace s využitím předřazené iontové chromatografie před hydridovým generováním [56]. Spojení hydridového generování s kryogenní pastí a detekcí AFS se vyskytuje v literatuře velmi zřídka dané pravděpodobně v mnoha případech dostačujícím spojením s AAS detektorem. Jedním z případů je využití podobného systému se sušením nafionovou membránou kdy bylo dosaženo detekčních limitů pro jednotlivé formy arsenu vyjma $\text{TMA}^{\text{V}}\text{O}$ v rozsahu 4,5 – 18,5 pg [81]. Variantní použití sofistikovaného ICP-MS detektoru v kombinaci s kryogenní pastí se separací arsenových specií pomocí GC dosahuje detekčních limitů v rozsahu 2 – 21 pg pro všechny formy arsenu vyjma iAs , jehož detekční limit 511 pg svědčí o problémech s kontaminací touto formou [82].

1.3.3 Generování hydridů z biologických vzorků

Generování hydridů lze s úspěchem využít pro vzorky různých druhů vod [43, 75, 83–86], ale i pro matrice mnohem složitější například moč, játra, slinivka, uhlí, půdy, sedimenty, aj. [32, 35, 87–91].

Toxikologicky zajímavé sloučeniny arsenu (Tab.1.1-1) jsou vylučovány močí [87, 89, 91], ale jsou schopné se kumulovat v buňkách v různých druzích tkání jako jsou ledviny, játra, mozek apod. [32, 92–94]. Vzorky moči jsou využívány např. pro studium metabolických cest arsenu [55, 56, 95]. Vzhledem ke schopnostem studovaných specií v tab.1.1-1 se kumulovat ve tkáních je třeba získat informace právě z tohoto typu vzorků. Pro stanovení obsahu sloučenin arsenu ve vzorcích tkání lze využít různých metod s předřazenou mineralizací vzorků [93, 94, 96–98]. Pro speciální informaci je ovšem

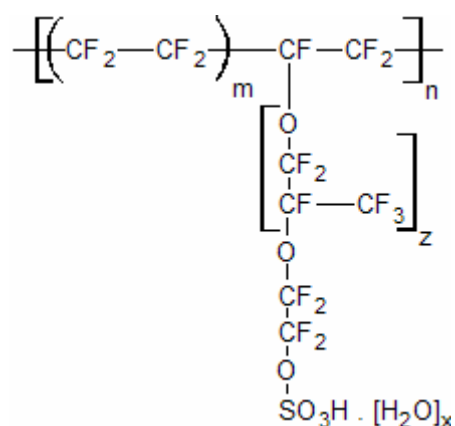
mineralizace vzorků před analýzou nevhodná z důvodu změny zastoupení jednotlivých specií. Proto je ideální mineralizaci vyloučit.

1.4 Sušení plynné směsi obsahující hydridy analytu

Základem technik chemického generování hydridů je reakce mezi tetrahydroboratem sodným a reakčním médiem. Na základě této reakce vznikají plynné produkty hlavně vodík a hydrid/y analytu/ů. Po separaci plynné a kapalné fáze v separátoru fází je plynná směs vedena do atomizátoru (techniky AAS, AFS, atd.) event. lze využít i jiných technik detekce (ICP-MS/OES) [10, 37, 99–102]. Díky bouřlivosti zmíněné reakce je vznik aerosolu a vodní páry nevyhnutelný. Pro techniky využívající vymrazování v kryogenní pasti dochází k zablokování pasti tvorbou ledu, proto je třeba využití sušicího zařízení, které aerosol i vodní páru odstraní z plynné směsi obsahující hydridy. V průběhu let bylo pro spojení hydridových technik a analytické atomové spektroskopie testováno mnoho přístupů. Některé z nich použité v této práci uvádějí následující kapitoly.

1.4.1 Nafionová membrána

Jednoduchou a účinnou možnost sušení plynné směsi poskytuje nafionová membrána. Nafion je kopolymer tetrafluoroethylenu (teflonu) a perfluoro-3,6-dioxa-4-methyl-7-oktan sulfonové kyseliny (viz. Obr.1.4-1). Podobně jako teflon má nafion chemickou odolnost. Oproti teflonu dokáže nafion absorbovat molekuly vody. Na jednu molekulu nafionovu lze absorbovat až 13 molekul vody. Tato absorpce (hydratace) je reakcí prvního řádu a probíhá velice rychle, v řádu milisekund v porovnání s pomalejší difuzí přes membránu. Z tohoto důvodu je nafion účinným sušicím zařízením. Kromě vody je nafion schopen absorbovat i molekuly amoniaku, aminů, alkoholů a dalších polárních sloučenin. Tento relativně nový přístup je využíván od devadesátých let minulého století [79, 81, 103, 104].



Obr. 1.4-1: strukturní vzorec nafionu; $m = 5-13,5$; $n = \text{ca.}1000$; $z = 1,2,3,\dots$; $x = 1-13$

Existují různá uspořádání nafionové membrány mezi něž patří tubulární nebo planární (Perma Pure LLC company, USA; www.permapure.com). Tubulární uspořádání je tvořeno dvěma soustřednými trubicemi z nichž vnitřní trubice je tvořena z nafionu a vnější trubice z jiného materiálu. Vnitřní trubicí je hnána plynná směs, kterou je třeba zbavit molekul vody a prostorem mezi vnitřní a vnější trubicí je hnán sušící plyn obvykle vzduch nebo dusík. Ten má za úkol transport difundovaných molekul vody přes membránu pryč z povrchu membrány. V literatuře bylo tubulární uspořádání využito pro speciální analýzu arsenu nejen s detekcí AAS [105 , 106] ale i ve spojení s AFS [107] .

Po dlouhou dobu nebyly publikovány žádné problémy během využití nafionové membrány. Drobné ztráty volných par rtuti, arsenu a selanu byly zanedbány ve spojení hydridového generování s využitím průtokové injekční analýzy a detekcí v křemenném atomizátoru s AAS detektorem [104]. Pro spojení HG-CT-AAS nebyly pozorovány žádné ztráty [108]. Pozorování nízké citlivosti pro dimethylovanou formu bylo pozorováno pro obdobný systém s AFS detektorem kde byla nafionová membrána součástí komerční verze AFS. Pík pro trimethylovanou formu nebyl pozorován i když autoři měli zájem tuto formu stanovit. Příčina ztrát dimethylované ani trimethylované formy nebyla identifikována [81] .

V literárních zdrojích dosud nebylo zpochybněno používání nafionové membrány pro sušení plynné směsi obsahující hydridy arsenu.

1.4.2 Absorpční média

Absorpční média jako je hydroxid sodný, silikagel, kyselina sírová mají široké použití při potřebě absorbovat vodu z okolního prostředí (exsikátory) či ze směsí plynů

(promývačky plynů). Pro účely eliminace vodních par z plynné směsi pro techniky generování hydridů spojené s vymrazováním hydridů arsenu v kryogenní pasti bylo testováno mnoho absorpčních médií. Oblíbená absorpce vodní páry či aerosolu v kyselině sírové se ukázala jako naprosto nevhodná vzhledem ke ztrátám arsenu i jeho methylovaných forem [49, 109]. Podobně se chovají silikagel nebo chloristan hořečnatý [9, 49]. Literární zdroje uvádí i další testovaná absorpční média jako hydroxid sodný [9, 49, 110], chlorid vápenatý [111] nebo kyselinu trihydrogenfosforečnou [112], apod.

1.4.3 Vymrazování vody za nižších teplot

Způsoby eliminace vodní páry využívající absorpčního média či nafionové membrány uvedené výše doplňuje technika využívající vymrazování vodní páry při teplotách pod 0°C. Pro techniku generování hydridů využívající vymrazování je využito několik přístupů.

Jedním z nich je vymrazování v separátní trubici většinou tvaru U zařazené mezi separátor fází a kryogenní past. Vymrazování vody probíhá při vyšší teplotě než je teplota varu kapalného dusíku, který se používá jako chladicí médium pro kryogenní past. Příkladem vymrazování v separátní trubici je ponoření skleněné trubice do drceného ledu [109] či jeho směsi s chloridem sodným [50] nebo kombinace suchého ledu a isopropylalkoholu (-50°C) [113], apod.

Dalším přístupem k vymrazování je ponechat vstupní část kryogenní pasti v podobě U-trubice bez náplně [9, 114]. Při ponoření do kapalného dusíku v kroku záchytu dochází k vymražení vodní páry event. aerosolu na stěně U-trubice před chromatografickou náplní a nedojde tak k zablokování pasti. Po kroku záchytu následuje krok uvolnění kdy postupným zvyšováním teploty dojde k uvolnění jednotlivých hydridů na základě bodu varu včetně vymražené vodní páry do detektoru. Výhodou tohoto přístupu je absence dodatečné části systému hydridového generátoru. Další výhodou je eliminované nebezpečí částečného záchytu hydridů arsenu v separátní trubici předřazené kryogenní pasti jako je tomu v příkladech v předchozím odstavci. [37, 115].

2 Experimentální část

2.1 Chemikálie

Deionizovaná voda připravená zařízením Ultrapur firmy Watrex, USA

Tetrahydroborat sodný 97%, čistý, Fluka, Germany, pracovní roztok 1% NaBH₄ v 0,1 % KOH

Trizma hydrochlorid® (TRIS·HCl) pufr, (tris(hydroxymethyl)aminomethan hydrochlorid; NH₂C(CH₂OH)₃·HCl), Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany, 0,75 mol/l (upraveno pH = 6 pomocí KOH a HCl)

kyselina chlorovodíková p.a. 37% Merck, Darmstadt, Germany, pracovní koncentrace 1 mol/l

hydroxid draselný chem. čistý, Lach-Ner, s.r.o., Neratovice, ČR (pro přípravu roztoků)

hydroxid sodný; p.a.; perle; Lach-Ner, s.r.o., Neratovice, ČR

hydroxid sodný; chem.čistý.; mikroperle; Lach-Ner, s.r.o., Neratovice, ČR

L-cystein hydrochlorid monohydrát (C₃H₈ClNO₂S·H₂O) Merck, Darmstadt, Germany

1000 mg/l As^{III} připraveno z pevného As₂O₃ FLUKA, Steinheim, Germany, navážené množství bylo rozpuštěno v 2,5 ml 10% NaOH a poté doplněno 1 mol l⁻¹ HNO₃ do 25 ml

1000 mg/l As^V, As₂O₅ v 0,5 mol/l HNO₃, MERCK, Darmstadt, Germany

1000 mg/l MAs^V, rozpuštění 0,0974 g hexahydrátu methylarseničnanu sodného (Na₂CH₃AsO₃ · 6H₂O; Mr = 292; Chem. Service, West Chester, USA) v deionizované vodě a doplnění na 25 ml.

1000 mg/l DMAs^V, rozpuštění 0,0461 g dimethylarseničné kyseliny (C₂H₇AsO₂; Mr = 138; Strem. Chemicals, USA) v deionizované vodě a doplnění na 25 ml.

REJUV-8 (hexamethyldisilazan, N,O-bis (trimethylsilyl) acetamid, n-trimethylsilylimidazol), Supelco, Bellefonte, USA

1000 mg/l TMA^VO, rozpuštění odpovídajícího množství oxidu trimethylarseničného ((CH₃)₃AsO), University of British Columbia, Vancouver, Canada

CHROMOSORB, složení: OV-3 (fáze), Chromosorb WAW-DMCS 45/60 (AW-myté v kyselině, DMCS-dimethyldichlorsilan, 45/60 – 354-250 μm), Supelco, Bellefonte, USA

kyselina fluorovodíková, čistota „pro polovodiče“, Lachema, Brno, ČR

kyselina dusičná 65%, čistá, Lach-Ner, s.r.o., Neratovice, ČR

argon Ar čistoty 99,996 % , SIAD, Praha, ČR

dusík čistoty 99,99 % , SIAD, Praha, ČR

vodík čistoty 99,95 %, SIAD, Praha, ČR

helium čistoty 99,998 %, SIAD, Praha, ČR

kyslík čistoty 99,998 %, SIAD, Praha, ČR

kapalný dusík, technický, SIAD, Praha, ČR

radioindikátor ^{73}As připravený cyklotronovou reakcí $\text{Ge} (p, n)$, pro měření použit s nosičem ^{75}As (neaktivní), Ústav jaderné fyziky AV ČR, v.v.i., Řež u Prahy, ČR. Izolaci a separaci radioizotopů od terčového materiálu provedl Ing. M. Vobecký, CSc. z Ústavu analytické chemie AV ČR, v.v.i.

pH pufr, $4,01 \pm 0,02$, Mettler-Toledo, Greifensee, Švýcarsko

pH pufr, $7,00 \pm 0,02$, Mettler-Toledo, Greifensee, Švýcarsko

Antifoam B emulze, 10% vodná emulze, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

2.2 Přístrojové vybavení

Pro měření metodou AAS:

AAAnalyst 800, Perkin Elmer, s bezelektrodovou výbojkou (Perkin Elmer systém 2); Vlnová délka analytické čáry arsenu 193,7 nm; Nastavení buzení lampy 379 mA; „Solid-state“ detektor; Software: AA winlab 32 ver. 6.5, Perkin Elmer instruments LLC, USA; Nastavení pro měření s křemenným atomizátorem s technikou generování hydridů: Šířka štěrbin 0,7 nm; deuteriová korekce pozadí v kombinaci se systémem peristaltických pump FIAS 400 (Perkin Elmer, Germany); Doba zápisu signálu (doba čtení záznamu) max. 58 s.

Nastavení pro stanovení arsenu metodou přímého dávkování kapalného vzorku do grafitové kyvety: Šířka spektrálního intervalu 0,7 nm; Zeemanovská korekce pozadí. Pro modifikaci povrchu grafitové kyvety byl použit permanentní modifikátor iridium v dávkovaném množství 40 μg

Pro měření metodou AFS:

Laboratorně vyvinutý atomový fluorescenční spektrometr s bezelektrodovou výbojkou (Perkin Elmer systém 2, USA); Vlnová délka analytické čáry arsenu 193,7 nm; Nastavení buzení lampy 340 mA; fotonásobičový detektor typ MH 1922, Perkin Elmer Optoelectronics GmbH, USA, Software AFS 6, Diram s.r.o., Česká republika; Nastavení pro měření s flame-in-gas-shield atomizátorem s technikou generování hydridů: interferenční filtr 193 nm s FWHM 190 nm, CVI Melles Griot, USA; manuálně ovládaný

systém peristaltických pump, Ismatec, Švýcarsko; Doba zápisu signálu (doba čtení záznamu) neomezená.

Instrumentace použitá při radioindikátorových experimentech:

Scintilační gama čítač Minaxi 5000 Packard s NaI (Tl) studnovým detektorem po měření účinnosti záchytu v kryogenní pasti.

Fuji BAS 5000 laser scanner pro metodu „image plate autoradiografie“ tj. bezfilmové radiografie na desce se softwarovým vybavením Aida, Raytest, Německo.

Ostatní použitá zařízení:

Hmotnostní průtokoměry Omega, Stamford, USA

Rotametry, Cole Parmer, USA

Digitální průtokoměr pro kapaliny Digital Calibrator, Humonics, Agilent Technologies, USA

Digitální průtokoměr pro plyny Digi Sense Thermocouple Thermometer model 8528-20, Cole Parmer, USA

Nafionová membrána, 610 mm, MD-070-24F-2, s nafionovou trubicí s 1.52 mm i.d./1.83 mm o.d., Perma Pure inc., Toms River, NJ, USA

Nafionová membrána, 305 mm, MD-110-12FP, s nafionovou trubicí s 2.18 mm i.d./2.74 mm o.d., Perma Pure inc., Toms River, NJ, USA

pH metr, Seven easy pH, Mettler Toledo, Greifensee, Švýcarsko, elektroda InLab[®]413 pH, Mettler Toledo, Greifensee, Švýcarsko

Termočlánek KMTXL-020G-12, Omega, USA

Laboratorní zdroj, EA-PS 3065-10B Elektro-Automatik, Viersen, Německo

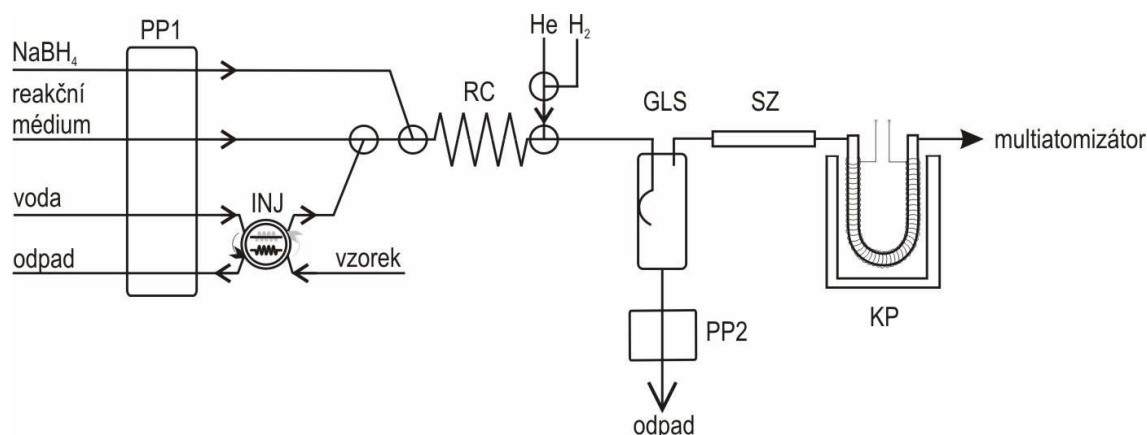
Vymrazovací jednotka tzv. „microcryotrap“ s kontrolerem; Scientific Instrument, USA

Analogový zapisovač TZ4620, Laboratorní přístroje Praha

Peristaltické pumpy REGLO DIG MS-4/12 a MC-MS/CA 8, ISMATEC, Švýcarsko

2.3 Hydridový generátor

Schéma hydridového generátoru obsahující kryogenní past pro spojení HG-CT-AAS pro měření roztoků s vodnou matricí je uvedeno na obr. 2.3-1. Dávkování měřeného roztoku označovaného v této práci jako vzorek (pro standardní roztok, vzorek tkáně i roztok neobsahující analyt=slepé stanovení) bylo provedeno automaticky přes dávkovací smyčku (jednotkou FIAS 400 ovládanou spektrometrem AAnalyst 800) uvedenou v následujícím obrázku. Mezi separátor fází s nuceným odtahem o objemu 50 ml [42] a kryogenní past bylo vloženo, pokud není explicitně uvedeno jinak, sušící zařízení (viz. 2.5 Sušící zařízení). Materiál čerpacích hadiček byl tygon a ostatních hadiček teflon o i.d. 1 mm.



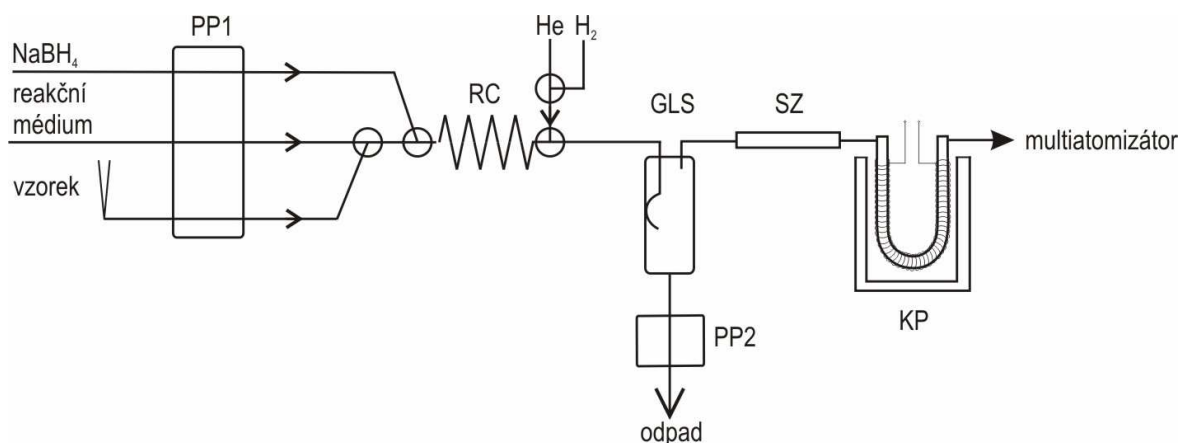
Obr. 2.3-1: schéma generátoru hydridů s kryogenní pastí pro vzorky s vodnou matricí; PP1, PP2 – peristaltické pumpy; RC – reakční cívka; INJ – dávkovací smyčka; GLS – separátor fází; SZ – sušící zařízení; KP – kryogenní past;

Čerpání reakčního média ($\text{TRIS}\cdot\text{HCl}$), nosného média (deionizovaná voda) a redukčního činidla (NaBH_4) a dávkování vzorku do proudu nosného média bylo zabezpečeno peristaltickými pumpami jednotky FIAS 400 připojené ke spektrometru AAnalyst 800. Průtok reagensů byl $1,0 - 2,0 \text{ ml min}^{-1}$. Kanálem pro nosné medium byla čerpána deionizovaná voda směrem do dávkovací smyčky (objem $0,5 \text{ ml}$), kde vytlačovala předem nadávkovaný objem standardu/slepého vzorku do T-spoje kde bylo přimícháváno reakční medium $0,75 \text{ mol/l TRIS}\cdot\text{HCl}$ pufr ($\text{pH}=6$). Dalším T-spojem byl přimíchán 1% tetrahydroborat sodný stabilizovaný 0,1% hydroxidem draselným. Tato reakční směs postupovala reakční cívkou o i.d. 1 mm a délce 1 m do posledního T-spoje, kde byly přimíchávány nosný plyn – helium průtokem 35 až 75 ml min^{-1} , a vodík 15 ml min^{-1}

(vodík nutný pro atomizaci). Řízení průtoku reagentů a dávkování vzorku zabezpečovala jednotka FIAS 400, kterou bylo možno programovat a vytvořit tak metodu pro danou kryogenní past. Naprogramování tzv. FIAS metody popisuje tab. 2.6-1 kde je naznačena fáze záchytu a uvolnění analytu z kryogenní pasti. Doba generování hydridu analytu/ů ze vzorku probíhá v kroku 1 a to 60 s.

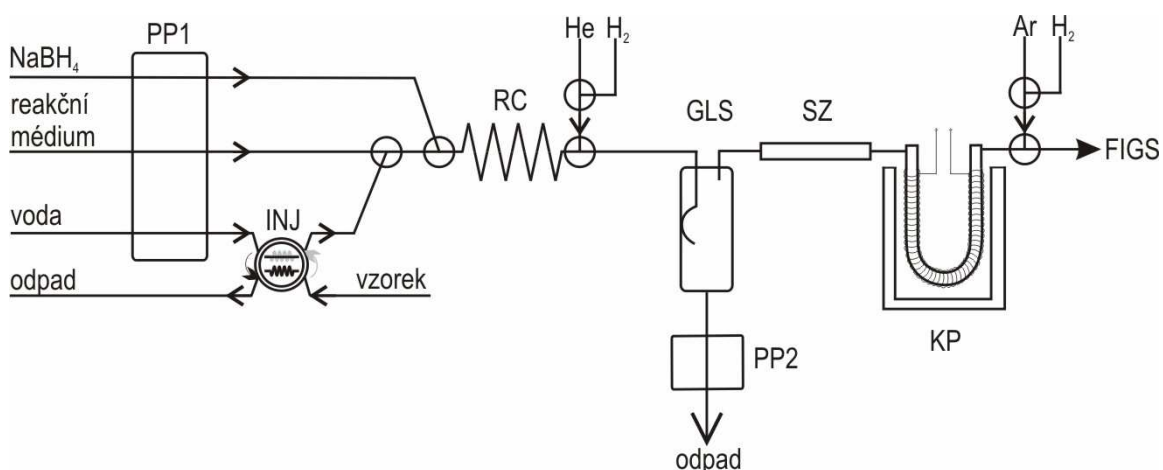
Plynná fáze reakční směsi putující ze soustavy hadiček hydridového generátoru se oddělila v separátoru fází s nuceným odtahem a putovala po oddělení vodních par v sušicím zařízení do kryogenní pasti a dále do atomizátoru.

Pro generování hydridů ze vzorků buněčné suspenze myších jater byl tento generátor modifikován jak demonstruje obr. 2.3-2.



Obr. 2.3-2: hydridový generátor pro buněčné suspenze. PP1 a PP2 – peristaltické pumpy; RC – reakční cívka; GLS – separátor fází; SZ – sušící zařízení; KP – kryogenní past; Vzorek je dávkován pomocí pipety do dávkovací špičky. Kanálem pro vzorek se voda napipetuje až po nadávkování a nasátí vzorku, není nasávána po celý čas generování hydridů (kanál - voda) jak je tomu u obr. 2.3-1.

Bylo využito totožného separátoru fází, jako ve schématu na obr. 2.3-1. Uspořádání hydridového generátoru se lišilo v dávkovací špičce (náhrada za dávkovací cívku). Vzhledem k povaze homogenátů vzniklo nebezpečí zanesení dávkovací cívky a tím bylo ohroženo dávkování vzorku. Proto bylo využito dávkovací špičky do které byl vzorek homogenátu před analýzou napipetován nastavitelnou pipetou. Čerpání reagentů probíhalo rychlostí 2 ml min^{-1} . Reakční médium zde tvořil výhradně TRIS pufr.



Obr. 2.3-3: hydridový generátor pro spojení s AFS. PP1 a PP2 – peristaltické pumpy; RC – reakční cívka; GLS – separátor fází; SZ – sušící zařízení; KP – kryogenní past; INJ - vzorek je nasáván do dávkovací smyčky injekční stříkačkou a poté manuálně dávkován do kanálu pro vodu;

Pro spojení HG-CT-AFS byl rozdíl v hydridovém generátoru v nižší průtokové rychlosti 1 ml min^{-1} pro kanály pro tetrahydroborat sodný, reakční medium a kanál pro deionizovanou vodu či standardní roztok. Vzorek byl dávkován manuálně pomocí šesticestného ventilu s odpovídající dávkovací cívkou. Kromě plynů procházejících hydridovým generátorem byly zajištěny průtoky 300 ml min^{-1} vodíku a 500 ml min^{-1} argonu zařazených za kryogenní past nutných pro FIGS atomizátor (viz. 2.7.3 Flame in gas shield atomizátor). Reakční médium zde tvořila pouze $1 \text{ mol l}^{-1} \text{ HCl}$.

2.4 Přístupy ke speciální analýze arsenu

Pokud není explicitně uvedeno jinak, experimenty diskutované ve výsledkové části této práce využívaly některou ze dvou variant přístupů ke speciální analýze arsenu využívající generování hydridů popsaných níže. Jednotlivé varianty se lišily pouze složením reakčního media a případnou předredukcí vzorku.

Pro oba přístupy ke generování platilo následující: standardní roztoky byly připraveny odpovídajícím naředěním (deionizovanou vodou) zásobních standardních roztoků o koncentraci 1000 mg l^{-1} nebo navážením odpovídajícího množství sloučeniny arsenu (uvedené v kapitole 2.1 Chemikálie) a poté rozpuštěním a naředěním na potřebnou koncentraci. Methylované sloučeniny v pevném skupenství byly rozpuštěny v deionizované vodě, ale trojmocná anorganická forma (iAs^{III}) v pevném skupenství byla rozpouštěna v $2,5 \text{ ml } 10\% \text{ NaOH}$, poté doplněna $1 \text{ mol l}^{-1} \text{ HNO}_3$ do 25 ml a poté teprve

ředěna na příslušnou koncentraci deionizovanou vodou (probublánou 30 min dusíkem z důvodu zamezení oxidace na iAs^V).

V diskuzi výsledků je vždy specifikováno složení měřeného roztoku (v této práci označovaného jako vzorek), zda-li se jedná o vzorek buněčné suspenze, slepého stanovení, jednosložkového standardního roztoku (jen jedna forma arsenu), směsného standardního roztoku (několik forem arsenu).

2.4.1 Selektivní generování hydridů založené na předredukci L-cysteinem

Použití L-cysteinu pro neselektivní generování arsanů z tří i pětímocných forem spočívá v předredukci pětímocných forem v jednom ze dvou alikvotů. Druhý alikvot vstupuje do reakce v hydridovém generátoru bez jakékoliv předúpravy. Pro předredukci L-cysteinem bylo třeba odpovídající množství standardního roztoku nebo vzorku smísit s naváženým množstvím pevného L-cysteinu tak, aby vznikl 2% roztok L-cysteinu. Před započnutím měřicího cyklu je třeba určitá doba nutná k úplné konverzi pětímocných forem (doba předredukce) na třímocné. V této práci činila doba předredukce 60 min. Následovalo generování hydridů z třímocných forem arsenu s udržení dostatečně vysoké hodnoty pH 6. Reakční prostředí tedy bylo pro oba alikvoty zabezpečeno reakčním médiem TRIS HCl pufrům o koncentraci $0,75 \text{ mol l}^{-1}$. Vzhledem k získání informace o zastoupení tří- a pětímocných forem v prvním alikvotu podrobeného předredukci a pouze třímocných forem z alikvotu bez předredukce bylo třeba obsah pětímocných forem kromě $TMA_s^V O$ stanovit dopočtem. $TMA_s^V O$ je stanoven opět v alikvotu bez předredukce L-cysteinem vzhledem k jeho schopnosti tvořit trimethylarsan v hydridovém generátoru při $pH=6$.

Pro přehlednost je v textu označován alikvot vzorku vstupující do reakce v hydridovém generátoru písmeny A, B dle použitého přístupu následovně:

pro alikvot A platí:

alíknot vzorku není předredukován L-cysteinem, do kanálu pro reakční medium je přiváděn $0,75 \text{ mol l}^{-1}$ TRIS·HCl pufr ($pH=6$).

pro alikvot B platí:

alíknot vzorku je předredukován L-cysteinem - standardní roztok forem arsenu (obvykle 20 – 40 ml) je smísen s naváženým množstvím pevného L-cysteinu tak, aby vznikl 2% roztok L-cysteinu. Doba předredukce 60 min. Do kanálu pro reakční medium je přiváděn $0,75 \text{ mol l}^{-1}$ TRIS·HCl pufr ($pH=6$).

Pro dávkování buněčných suspenzí bylo třeba alikvot vzorku B, 2 ml (dávkováno 3krát 0,6 ml do hydridového generátoru), připravit smísením 0,25 ml 10% buněčné suspenze, 0,4 ml roztoku 10% L-cysteinu, a deionizované vody event. směsného standardního roztoku arsenových forem $100 \mu\text{g l}^{-1}$ k dosažení potřebné koncentrace. Pro alikvot vzorku A bylo místo 10 % L-cysteinu dávkováno objemově stejné množství deionizované vody.

2.4.2 Selektivní generování hydridů založené na změně pH

Tento typ generování spočívá v generování všech hydridů arsenu ve všech mocnostvích reakcí s tetrahydroboratem sodným v prostředí 1 mol l^{-1} kyseliny chlorovodíkové v jednom ze dvou alikvotů vzorku. V dalším alikvotu vzorku je použito stejné reakce nicméně generování hydridů probíhá v jiném reakčním médiu a to v TRIS HCl pufru o koncentraci $0,75 \text{ mol l}^{-1}$ s upraveným pH pomocí 10% NaOH na $\text{pH} = 6$. V tomto reakčním médiu je zajištěno generování hydridů pouze z trojmocných forem arsenu a také trimethylarsanu z $\text{TMAAs}^{\text{V}}\text{O}$. Množství pětímocných forem kromě $\text{TMAAs}^{\text{V}}\text{O}$ je stanoveno dopočtem z rozdílu množství anorganické (III a V), methylované (III a V) a dimethylované formy (III a V) získaných generováním z prostředí HCl a třímocné anorganické (iAs^{III}), třímocné methylované (MAAs^{III}) a třímocné dimethylované formy ($\text{DMAAs}^{\text{III}}$) generovaných z prostředí TRIS HCl pufru. Tímto přístupem je možné provádět generování hydridů bez nutnosti přípravy vzorku před analýzou jako v přístupu využívajícího předredukce L-cysteinem. Tento přístup byl z důvodů diskutovaných v odpovídajících kapitolách prakticky využit jen pro spojení HG-CT-AFS.

Pro přehlednost je v textu označován alikvot vzorku vstupující do reakce v hydridovém generátoru písmenem C a platí dle přístupu následující:

alíknot vzorku C je veden do hydridového generátoru bez předúpravy; do kanálu pro reakční medium je přiváděna 1 mol l^{-1} HCl;

alíknot vzorku D je veden do hydridového generátoru bez předúpravy; do kanálu pro reakční medium je přiváděn $0,75 \text{ mol l}^{-1}$ TRIS·HCl pufr ($\text{pH}=6$); V této práci není tento alíknot využit z důvodů uvedených u příslušné kapitoly (3.5 Možnosti AFS detekce pro speciální analýzu arsenu).

2.5 Sušicí zařízení

Pro eliminaci vodní páry a aerosolu ze směsi plynů obsahující hydridy arsenu před vstupem do kryogenní pasti bylo, pokud není explicitně uvedeno jinak, využito několik druhů sušicích zařízení popsaných níže. Ve výsledkové části je vždy uvedeno, které sušicí zařízení bylo využito.

2.5.1 Nafionová membrána

Byla využita nafionová membrána v podobě trubice typ MD-070-24F-2. Průtok sušidla byl nastaven na maximální možný průtok dusíku 2 l min^{-1} . Tato trubice byla využita jen z počátku experimentování. Pro některé experimenty byl využit i druhý typ nafionové membrány MD-110-12FP (popis obou zařízení v 2.2 Přístrojovém vybavení) s průtokem dusíku 2 l min^{-1} .

Pro kvantifikaci množství vody vystupující ze separátoru fází a prošlé nafionovou membránou byla využita skleněná U-trubice se zábrusovými kohouty ponořená v kapalném dusíku. Po 30 minutách zapnutého generátoru byly zábrusové kohouty uzavřeny, trubice ponechána při laboratorní teplotě a po dosažení laboratorní teploty z vnější části osušena a zvážena na analytických vahách. Z rozdílu hmotnosti před a po vymrazování vody byla získána hmotnost zachycené vymražené vodní páry.

2.5.2 Patrona s hydroxidem sodným

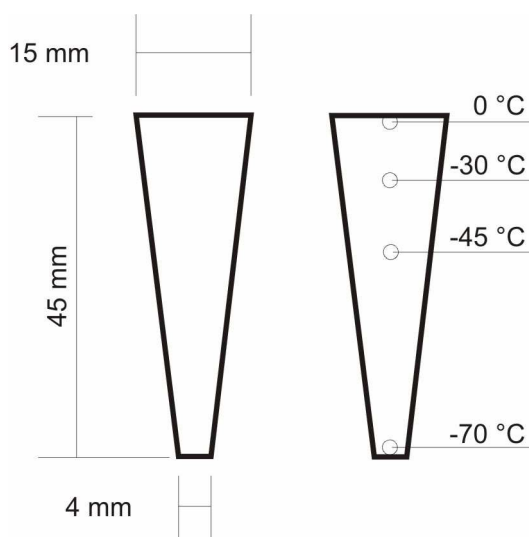
Pro účely minimalizace vodních par vstupujících do kryogenních pastí byla sestavena polypropylenová patrona s odpovídající délkou a množstvím hydroxidu sodného (délka 10 cm; i.d. 1,7 cm, cca 25g hydroxidu).

Pro kvantifikaci ztrát arsenu byly testovány následující formy hydroxidu sodného: hydroxid sodný v podobě perel (NaOH perle; p.a.; Lachner; PP/2009/10595; průměr částic cca 3 mm), mikroperel (NaOH mikroperle; chem.čistý; Lachner; PP/2010/00175; průměr částic mezi 1-2 mm), šupin (NaOH šupiny; chem.čistý; Lachner; PP/2007/04342/0).

Pro některé experimenty byl zvýšen objem sušicí patrony (viz. 3.4.4.2 Sušení plynné směsi pro I-kapiláru) kdy byly za sebou zařazeny 3 patrony každá o délce 20 cm, i.d. 1,7 cm spojené teflonovými spojkami a trubicemi vnitřního průměru 0,5 cm. Celková hmotnost náplně hydroxidu sodného byla přibližně 150 g.

2.5.3 Kónický vymrazovač

Vzhledem k nedostatečnosti sušících zařízení v podobě nafionové membrány a patrony s hydroxidem sodným ve spojení s I-kapilárou v MCT bylo nově vyvinuto dodatečné zařízení pro eliminaci vodní páry vystupující ze separátoru fází založené na postupném snižování teploty pod 0°C . K dokonalému vymrazení vodní páry, které by eliminovalo zablokování I-kapiláry byla testována kombinace hydroxidové patrony a tzv. kónického vymrazovače. Kónický vymrazovač byl tvořen srolovaným měděným plechem (3 vrstvy; obsah 99,9% Cu; tloušťky 0,16 mm) do tvaru komolého kužele s výškou 4,5 cm, s podstavami 15 mm a 4 mm, který byl nasazen na vstupní část MCT s měděnou vložkou s drážkou pro kapiláru (viz. 2.6.5 Křemenná I-kapilára). Díky převodu tepla z měděné vložky na kónický vymrazovač bylo docíleno postupného zvyšování teploty v konusu z -70°C na 0°C . Uspořádání kónického vymrazovače s rozložením teplot v kroku záchytu uvádí obr. 2.5-1.



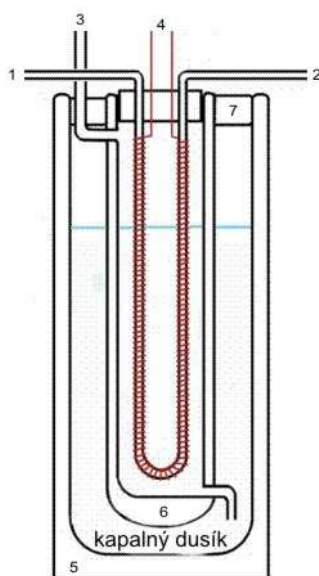
Obr. 2.5-1: uspořádání kónického vymrazovače s rozložením teplot

Vzhledem k vývoji tohoto nového zařízení jsou podrobnosti z testování tohoto zařízení uvedeny v kapitole 3.4.4.2 Sušení plynné směsi pro I-kapiláru.

2.6 Kryogenní pasti

2.6.1 Skleněná U-trubice

Náplň kryogenní pasti tvořil chromosorb (viz. 2.1 Chemikálie), který byl po nasypání do skleněné U-trubice i.d. 2,5 mm silanizován 100 μ l Rejuv-8 nadávkovaného na začátek kolony při průtoku 50 ml/min helia po 5 hodin. Do obou konců U-trubice byla vložena skelná vata (v délce cca 1 cm v U-trubici) k zabránění posouvání nasypaného chromosorbu. Ještě před nasypáním chromosorbu do trubice byla trubice ovinuta odporovým drátem (Ni80-Cr20, průměr 0,6 mm, Omega engineering, inc., Stamford, jehož elektrický odpor činil 15 Ω). Vzdálenost závitů byla maximálně 5 mm a snahou bylo vytvořit závitů ve stejné vzdálenosti po celé délce trubice. Vinutí odporového drátu dosahovalo přibližně 50 mm pod ohyb výstupní/vstupní části U-trubice a bylo asi 5 mm nad náplní kolony. Procházející proud (lineárně s časem) při kroku uvolnění byl 2,2 A což odpovídá napětí 33 V. Pro tento účel byl využit laboratorní zdroj EA-PS 3065-10B uvedený v kapitole 2.2 Přístrojové vybavení.



Obr. 2.6-1: uspořádání kryogenní pasti, 1 – vstup nosného plynu s analytem ze separátoru fází a sušicí trubice, 2 – výstup nosného plynu s/bez analytu k atomizátoru, 3 – výstup par dusíku s vnitřního prostoru skleněné dvouplášťové nádoby počítačově ovládaným solenoidovým ventilem, 4 – elektrické vyhřívání pasti, 5 – dvouplášťová nádoba, 6 – skleněná dvouplášťová nádoba, 7 – izolace pěnového polyethylenu s buňkovou strukturou

Pro měření v automatickém módu byla tato U-trubice byla umístěna ve speciálně vyrobené skleněné dvouplášťové nádobě s možností vstupu kapalného dusíku do prostoru vnitřního pláště a zafixována pomocí silikonu. Tento celek byl umístěn do další

dvouplášťové nádoby ze skla a ochranným pláštěm z plechu (Dewarovy nádoby). Vrchní část (prostor u hrdel obou dvouplášťových nádob) byla izolována pomocí pěnového polyetylenu s uzavřenou buňkovou strukturou. Uspořádání pasti je dobře znatelné na obr. 2.6-1. Pro radioindikátorové experimenty bylo měření prováděno v tzv. manuálním módu tzn. trubice nebyla fixována ve skleněné dvouplášťové nádobě a chlazena automaticky, ale chlazena manuálně ponořením do tekutého dusíku v Dewarově nádobě. Teplotní program byl nicméně totožný s automatickým módem měření s U-trubicí kromě kroku 4 (viz. tab.2.6-1), který byl pro manuální mód vyloučen. Vývoj konstrukce systému kryogenní pasti pro manuální i automatický mód měření byl uskutečněn na našem pracovišti již dříve [37,42].

Před vlastním měřením je třeba past kondicionovat tzn. provést několik měření slepých vzorků a standardů, které nejsou zahrnovány do vyhodnocení. Kondicionace je dosaženo, když jsou signály slepých vzorků a standardů ustálené.

Při vlastním měření se nejdříve nadávkuje vzorek do dávkovací smyčky při „běžícím“ hydridovém generátoru kdy jsou peristaltické pumpy v chodu (PP1 a PP2 na obr.2.3-1) a čerpají odpovídající reagenční činidla. Poté se nadávkuje vzorek do proudu nosného média, následuje míchání s reakčním médiem a tetrahydroboratem sodným a tato směs postupuje až do separátoru fází. Čerpání reagencí peristaltickými pumpami tzn. tetrahydroboratu, reakčního média a vody probíhá rychlostí 2 ml min^{-1} . Během tohoto procesu dochází ke generování hydridu analytu (krok 1 v tab. 2.6-1). Po vypnutí generátoru hydridů nosný plyn spolu s vodíkem z reakční směsi a z tlakové nádoby unášejí hydrid analytu do kryogenní pasti kde dochází k záchytu (krok 2 tab. 2.6-1). Hladina kapalného dusíku dosahuje nejvyšší úrovně (téměř až k poslednímu závitu odporového drátu). Počítačově řízený solenoidový ventil (napojený na výstup par dusíku s vnitřního prostoru skleněné dvouplášťové nádoby, obr.2.6-1) pro ovládání hladiny kapalného dusíku je otevřený. Poté se tento ventil sepne (uzavře) a zapne se také ohřev pasti a dochází k postupnému uvolnění všech forem s mezikrokem, kde se na 7 s vypne ohřev pasti (krok 3 až 5 tab. 2.6-1). Ve fázi uvolnění hydridu analytu je třeba past ohřát postupně až na přibližně $120 \text{ }^\circ\text{C}$ a proto veškerý kapalný dusík musí opustit prostor kolem U-trubice. Toho se dosáhne právě uzavřením počítačově ovládaného ventilu. Při postupném ohřevu pasti dochází k nárůstu objemu zplyněného dusíku a ten vytlačí kapalný dusík do vnější dvouplášťové nádoby. Při kroku 5 tab. 2.6-1 je zapnuta odtahová pumpa (PP2 na obr.2.3-1), která zreagovanou reakční směs ze separátoru převede do odpadu. Na konci programu je ohřev vypnut, ventil pro ovládání hladiny dusíku také a

past se ochladí na původní teplotu záchytu. Empiricky bylo zjištěno, že kompletní zchlazení pasti vyžaduje přibližně 2 minuty.

Teplotní program (část programu v AA winlab 32 ver. 6.5) na ohřev pasti je uveden v tab. 2.6-1 .

Tab. 2.6-1: teplotní program U-trubice

<i>Krok</i>	<i>t (s)</i>	<i>Generování hydridů</i>	<i>Ventil uzavřen</i>	<i>Ohřev zapnut</i>	<i>Popis děje</i>
1	60	X			Záchyt hydridu v pasti
2	90				
3	23		X	X	Uvolnění hydridu z pasti
4	7		X		
5	60		X	X	
6	120				Ochlazení pasti na teplotu záchytu

Pro experimentování bez sušícího zařízení plynné směsi vystupující z hydridového generátoru bylo nutné přerušit po 30 měřících cyklech experimentování z důvodu kondenzace a následném vymrazení vody v U-trubici. Kryogenní past bylo nutné vyjmout z dewarovy nádoby s dusíkem a ponechat 30 min při ohřevu 1 A s průtokem nosného plynu – hélia. Za těchto podmínek byla dosažena teplota přibližně 120°C k zabezpečení vytěsnění zkondenzované vodní páry z kryogenní pasti.

2.6.2 Křemenná U-trubice

Pro experimentování s křemennou U-trubicí plněnou chromosorbem platí stejné podmínky generování hydridů jako pro skleněnou U-trubicí (viz. 2.6.1 Skleněná U-trubice). Rozdílem v podmínkách měření je mírně pozměněný teplotní program této trubice (tab.2.6-2). Jedná se opět o automatický mód měření.

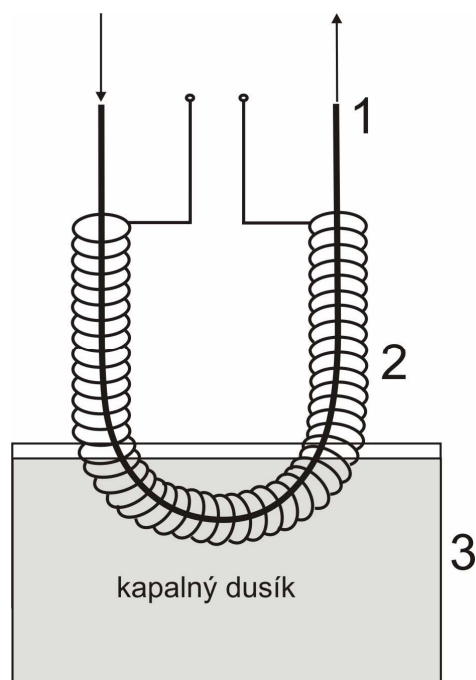
Tab. 2.6-2: teplotní program pro křemenou U-trubicí

<i>Krok</i>	<i>t (s)</i>	<i>Generování hydridů</i>	<i>Ventil uzavřen</i>	<i>Ohřev zapnut</i>	<i>Popis děje</i>
1	60	X			Záchyt hydridu v
2	90				pasti
3	30		X	X	Uvolnění hydridu
4	8		X		z pasti
5	25		X	X	
6	120				Ochlazení pasti na teplotu záchytu

Procházející proud odporovým drátem ohřevu byl optimalizován pro nejvyšší rozlišení píků DMAs^V a TMAs^{VO} v chromatogramu na 1,7 A odpovídající 26 V. Vnitřní průměr i délka trubice jsou shodné se skleněnou U-trubicí. Jediným rozdílem je materiál U-trubice oproti borosilikátovému sklu použitému v předchozím případě (2.6.1 Skleněná U-trubice).

2.6.3 Teflonová U-kapilára

Pro účely testování odlišného materiálu kryogenní pasti byla použita teflonová trubice o vnitřním průměru 1 mm. Délka ponoření v kapalném dusíku činila 4 cm z 20 cm celkové délky trubice. Uložení teflonové U-kapiláry dokládá následující obrázek.



Obr. 2.6-2: uložení teflonové U-kapiláry v nádobě s kapalným dusíkem; 1 – teflonová kapilára; 2 – odporový drát pro ohřev teflonové kapiláry; 3 – Dewarova nádoba s kapalným dusíkem; hladina kapalného dusíku byla udržována přibližně 1 cm pod okraj nádoby; šipky naznačují průchod plynů ze separátoru fází přes teflonovou kapiláru do multiatomizátoru;

Průtoky plynů při kroku záchytu i uvolnění byly stejné jako pro U-trubicí (2.6.1 Skleněná U-trubice). Pro sušení plynné směsi vystupující ze separátoru fází byla využita nafionová membrána MD-070-24F-2 s průtokem dusíku 2 l min^{-1} . Ohřev trubic byl zajištěn pomocí odporového drátu (Ni80-Cr20, průměr 0,6 mm, Omega engineering, inc., Stamford, elektrický odpor $15 \text{ } \Omega$) navinutého přímo na teflonovou U-kapiláru. Procházející proud (lineárně s časem) činil 1,3 A odpovídající 10 V. Teplotní program je uveden v tab.2.6-3. Jednalo se o manuální mód měření (viz. 2.6-1 Skleněná U-trubice).

Tab. 2.6-3: teplotní program pro teflonovou U-kapiláru

<i>Krok</i>	<i>t (s)</i>	<i>Generování hydridů</i>	<i>Ohřev zapnut</i>	<i>Popis děje</i>
1	60	X		Záchyt hydridu v pasti
2	90			
3	60		X	Uvolnění hydridu z pasti
4	45			Ochlazení pasti na teplotu záchytu

Z tab 2.6-3 je patrné, že došlo k vypuštění kroku vypnutí ohřevu na 7 s v průběhu celého ohřevu oproti použití U-trubice. Důvodem je testování kapiláry pro záchyt a uvolnění pouze arsenu. Mezikrok s vypnutím ohřevu pro větší rozlišení trimethylované formy tudíž nebyl nutný.

2.6.4 Křemenná U-kapilára

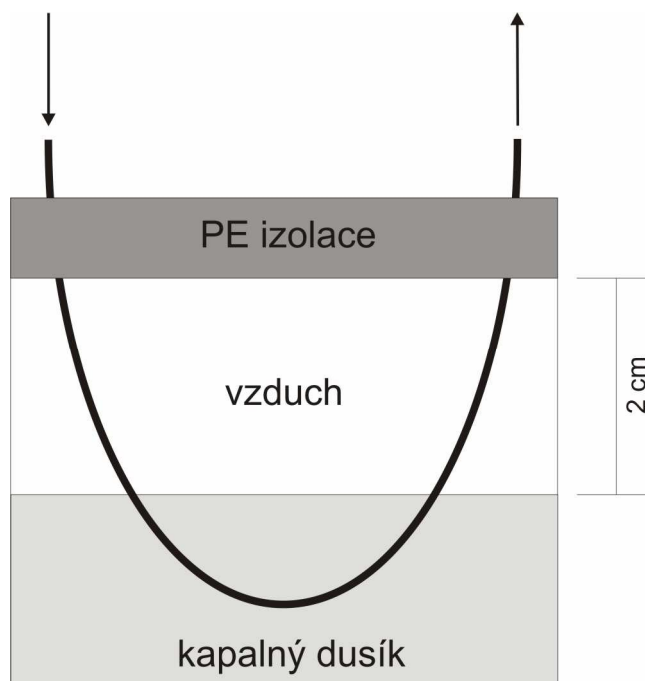
Byla využita komerčně dostupná křemenná kapilára (non-polar fused silica capillary, Supelco, USA) o vnitřním průměru 0,53 mm potažená polyimidem. Přibližně 20 cm této kapiláry bylo vloženo do teflonové trubice o vnitřním průměru 0,75 mm a tvaru U kvůli ochraně proti přetlaku působícím na kapiláru a kvůli tepelnému pnutí po vyjmutí z kapalného dusíku. Takto vytvořená kryogenní past byla připojena k sušicímu zařízení a k multiatomizátoru.

Při kroku záchytu byly 3 cm délky této kapiláry ponořeny do kapalného dusíku a prostor mezi hladinou dusíku a konci kapiláry byl oddělen od okolí pomocí izolace z pěnového polyetylénu s uzavřenou buňkovou strukturou. V této izolaci byl vytvořen eliptický otvor, ve kterém byla umístěna kryogenní past tak, aby se nedotýkala stěn této izolace. Prostor mezi izolací a hladinou dusíku tvořil oblast s postupně se zvyšující teplotou od teploty kapalného dusíku do přibližně 0°C k hraně izolace. Ohřev kapiláry byl nejprve zajištěn stejným typem odporového drátu použitého pro U-trubicu plněnou chromosorbem a stejným typem zdroje napětí. Napětí pro krok uvolnění činilo 17 V s procházejícím proudem (lineárně s časem) 1,0 A. Teplotní program pro U-kapiláru s vinutím odporového drátu je uveden v tab. 2.6-4 a jedná se o manuální mód měření (viz. 2.6-1 Skleněná U-trubice).

Tab. 2.6-4: teplotní program U-kapiláry

<i>Krok</i>	<i>t (s)</i>	<i>Generování hydridů</i>	<i>Ventil uzavřen</i>	<i>Ohřev zapnut</i>	<i>Popis děje</i>
1	120	X			Záchyt hydridu v pasti
2	90				
3	95		X	X	Uvolnění hydridu z pasti
6	45				Ochlazení pasti na teplotu záchytu

Teplotní program pro U-kapiláru postrádá mezikrok pro dostatečné rozdělení trimethylované a dimethylované formy arsenu. Důvodem je pouze studium účinnosti záchytu a uvolnění samotných specií, ne jejich separace pomocí U-kapiláry (viz. 3.4.3 Studium záchytu v křemenné U-kapiláře). Vzhledem k tvaru píku arsanu byl odporový drát odstraněn a dále ohřev zabezpečen pouze okolní laboratorní teplotou. Konečnou verzi uspořádání U-kapiláry dokládá obr.2.6-3.



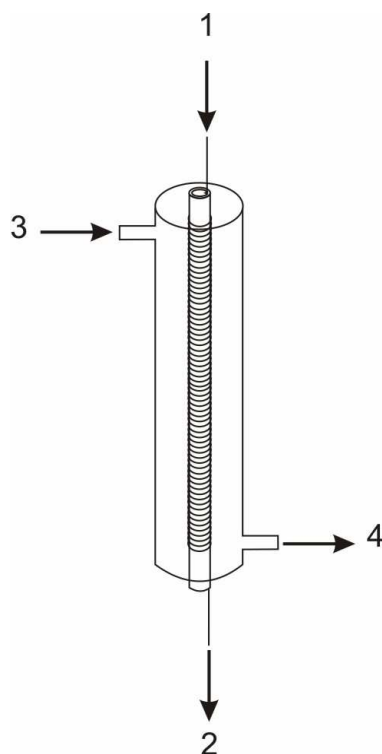
Obr. 2.6-3: uložení U-kapiláry do Dewarovy nádoby s kapalným dusíkem při kroku záchytu, tučná čára představuje kapiláru v teflonové trubici; šipky naznačují směr proudění plynné směsi z hydridového generátoru skrz kapiláru

Pro experimenty se studiem maximální délky ponoření U-kapiláry v kapalném dusíku byla použita křemenná kapilára v délce 44 cm vložená do teflonové kapiláry stejného vnitřního průměru jako výše. Délka ponoření kapiláry v kapalném dusíku se pohybovala od 3 cm do 40 cm. Ohřev byl zajištěn také pouze okolní laboratorní teplotou.

2.6.5 Křemenná I-kapilára

Jednodušším a mechanicky odolnějším designem kapiláry byla tzv. I-kapilára v přímém vedení bez ohybu. Pro testování tohoto designu bylo vybráno komerční zařízení kryogenní pasti zvané výrobcem „Microcryotrap“ (dále jen MCT) s možností přímého vedení křemenné kapiláry. Jednotka MCT se skládala z kryogenní pasti tvořené dvěma soustřednými ocelovými trubkami délky 10 cm (vnější trubice) a 12 cm (vnitřní trubice) s vnitřním průměrem vnitřní trubice 3,3 mm a kontroleru, který zajišťoval ohřev a udržování nastavené teploty. Pro ohřev byla vnitřní trubice MCT vybavena odporovým drátem. Vzhledem k možnému budoucímu rozšíření experimentů se záchytem arsenových specií na skleněné či křemenné trubici s větším průměrem byla vybrána právě varianta s vnitřním průměrem vnitřní trubice MCT 3,3 mm a délkou 12 cm.

Vnější trubice MCT byla opatřena vstupem a výstupem pro kapalný dusík. Regulace vstupu dusíku byla zajištěna solenoidovým ventilem napojeným na kontroler. Rezervoár kapalného dusíku o objemu jednoho litru byl umístěn v blízkosti solenoidového ventilu. Průtok dusíku byl založen na působení gravitace. Uspořádání celého systému MCT uvádí Obr. 2.6-4.



Obr. 2.6-4: microcryotrap: 1 - vstup plynné směsi obsahující specie ze separátoru fází; 2 – výstup směsi směrem do atomizátoru; 3 – vstup kapalného dusíku z rezervoáru o objemu 1 l; 4 – výstup kapalného dusíku; označení spirály představuje odporový drát pro ohřev vnitřní trubice microtrapu s měděnou vložkou s drážkou pro kapiláru

Tato jednotka dle uvedených parametrů výrobcem měla být schopná nastavení teplot při kroku záchytu v rozmezí teplot od $-190\text{ }^{\circ}\text{C}$ do $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ s ohřevem až do $400\text{ }^{\circ}\text{C}$. Teplotní program pro MCT je uveden v tab. 2.6-5.

Tab. 2.6-5: teplotní program microcryotrapu

<i>Krok</i>	<i>t (s)</i>	<i>Generování hydridů</i>	<i>Ventil uzavřen</i>	<i>Ohřev zapnut</i>	<i>Popis děje</i>
1	120	X			Záchyt hydridu v pasti
2	90				
3	270		X	X	Uvolnění hydridu z pasti
6	150				Ochlazení pasti na teplotu záchytu

2.7 Atomizátory

2.7.1 Křemenný multiatomizátor

K atomizaci pro metodu AAS byl používán křemenný multiatomizátor znázorněný na obr. 1.2-3. Vzduch byl vháněn do multiatomizátoru zvláštním přívodem průtokem 35 ml min^{-1} a tento průtok řízen hmotnostním průtokoměrem.

Po určité době docházelo k poklesu citlivosti a proto bylo nutné multiatomizátor vyčistit ve směsi kyseliny fluorovodíkové a dusičné v poměru 7:3 po dobu 10 minut. Poté byl multiatomizátor promyt deionizovanou vodou a usušen proudem plynného dusíku.

2.7.2 Grafitová kyveta

K ověření koncentrace arsenových specií ve standardních roztocích bylo využito stejného spektrometru jako v případě použití křemenného atomizátoru. Bylo využito systému s grafitovým atomizátorem a Zeemanovskou korekcí pozadí. Grafitová kyveta s platformou byla modifikována permanentním modifikátorem iridiem s nadávkováním $40 \mu\text{l}$ o koncentraci $1000 \mu\text{g l}^{-1}$ s $20 \mu\text{l}$ $0,2\%$ HNO_3 . Teplotní program pro modifikaci povrchu grafitové kyvety uvádí následující tabulka.

Tab. 2.7-1: Teplotní program pro modifikaci povrchu grafitové kyvety; t_N – doba nárůstu teploty, t_S – doba setrvání teploty

<i>Krok</i>	<i>T (°C)</i>	<i>t_N (s)</i>	<i>t_S (s)</i>	<i>Průtok chladícího plynu (ml/min)</i>
1	110	1	5	250
2	130	30	5	250
3	1200	20	10	250
4	2000	1	5	250
5	1200	20	30	250
6	2000	1	5	250
7	1200	20	30	250
8	2000	1	5	0
9	2000	2	5	250

Pro experiment bylo dávkováno 10 μl vzorku s 12 μl 0,2% HNO_3 na platformu grafitové kyvety pomocí automatického dávkovače. Koncentrace zásobního roztoku každé specie byla 100 $\mu\text{l l}^{-1}$. Teplotní program kyvety je uveden v tab.2.7-2.

Tab. 2.7-2: Teplotní program grafitové kyvety

<i>Krok</i>	<i>T (°C)</i>	<i>t_N (s)</i>	<i>t (s)</i>	<i>Průtok chladícího plynu (ml/min)</i>	<i>Popis děje</i>
1	110	1	30	250	sušení
2	130	15	30	250	sušení
3	1200	10	20	250	pyrolýza
4	2000	0	5	0	atomizace
5	2200	1	3	250	čištění atomizátoru

2.7.3 Flame in gas shield atomizátor

Atomizátorem pro AFS byl FIGS. Byla provedena optimalizace průtoků plynů do atomizátoru vzhledem k maximální citlivosti a stabilitě signálu. Optimální průtoky 500 ml min^{-1} argonu a 300 ml min^{-1} vodíku byly vedeny T-spojem za kryogenní past do vertikální trubice FIGS atomizátoru. Průtok kyslíku do kapiláry na jejímž konci hoří mikroplamínek byl nastaven na 2,5 ml min^{-1} . Průtok argonu do stínící jednotky byl nastaven na 1,5 l min^{-1} do vnitřního i vnějšího kanálu stínící jednotky. Uspořádání FIGS atomizátoru se vstupy plynů ukazuje obr.1.2-5.

V chromatogramech uvedených v kapitole 3.5 Možnosti AFS detekce pro speciální analýzu arsenu je na ose pro signál uveden absolutní signál (AS) v jednotkách μV . Jedná se o odezvu detektoru reprezentující fluorescenci atomů arsenu.

2.8 Radioindikátorové experimenty

Pro zjištění účinnosti zachytu a uvolnění a distribuce arsenu v kryogenní pasti bylo využito tzv. radiondikátorů (radioaktivních indikátorů) jmenovitě ^{73}As a ^{74}As s poločasy rozpadu 80,3 a 17,8 dní. Tyto indikátory byly připraveny v U 120 M cyklotronu (Ústav jaderné fyziky AV ČR, v.v.i.; Řež u Prahy) bombardováním oxidu germaničitého jako terčového materiálu protony (energie 36MeV, proud 4 μA) dle reakce:



Následovala chemická separace těchto radionuklidů o vysoké specifické aktivitě. Tato separace byla uskutečněna na Ústavu analytické chemie AV ČR, v.v.i.; detašovaném pracovišti – oddělení stopové prvkové analýzy v Praze Krči. Ve směsi radioindikátorů byl přítomen i izotop ${}^{71}\text{As}$ s poločasem rozpadu 2,7 dní. Vzhledem k jeho krátkému poločasu nebyl využit při vyhodnocení. Všechny tři izotopy jsou tzv. gama zářiče. Odpovídající čáry jsou 53 keV pro ${}^{73}\text{As}$ a 596 keV pro izotop ${}^{74}\text{As}$.

Zásobní roztok radioindikátoru byl připraven v kyselině chlorovodíkové o koncentraci 7 mol l^{-1} . Detekce obou radioindikátorů probíhala v intervalech (od 30 do 200 keV a od 30 do 1300 keV) skenovaných pomocí „auto-gamma counting“ systému vybaveného scintilačním NaI (Tl) studnovým detektorem (popsán v části 2.2 Přístrojové vybavení). Tohoto přístroje bylo využito při stanovení účinnosti záchytu a uvolnění ve skleněné U-trubicí plněné chromosorbem i křemenné kapiláře.

Pro distribuci arsanu ve skleněné U-trubicí plněné chromosorbem bylo využito tzv. bezfilmové radiografie na desce (dále jen autoradiografie) (viz. kapitola 2.2 Přístrojové vybavení). U-trubice byla upevněna k jedné ze stěn polyetylenové nádoby tvaru kvádrů s tloušťkou stěny 0,4 cm a objemem přibližně 5 l. Nádoba byla naplněna dusíkem tak, aby U-trubice byla ponořena ve stejné délce jako je tomu v automatickém módu měření. Trubice byla vstupní částí napojena na hydridový generátor a byl proveden krok záchytu stejným způsobem jako je tomu v automatickém módu měření s AAS. Po záchytu byla U-trubice odpojována od hydridového generátoru a na vstupní i výstupní části umístěny malé zdvojené kolony tvořené silikonovou hadicí vnitřního průměru 3 mm s přepážkou z molitanu mezi dvěma náplněmi aktivního uhlí s velikostí částic cca 2 mm (cca 1+1 g v jedné dvojité koloně). Na opačnou stranu stěny nádoby s připevněnou U-trubicí byla připevněna radiografická deska a ponechána 5 hodin pro ozáření radioindikátorem zachyceným v U-trubicí. Poté byla radiografická deska vyvolána díky Fuji BAS 5000 laser scanneru a získaný 2D obrázek ve formátu jpg vizuálně posouzen.

Pro stanovení účinnosti záchytu a uvolnění arsanu v kryogenních pastech bylo stanoveno množství zachyceného a prošlého radioindikátoru v kroku záchytu stejně tak množství zadrženého a uvolněného radioindikátoru při kroku uvolnění. Tímto způsobem byl měřen tzv. průnikový signál nebo-li množství radioindikátoru prošlé během záchytu a následně během uvolnění, zadržené v obou případech na dvojkolonách s aktivním uhlím

s 2g aktivního uhlí zapojených na výstupu kryogenní pasti. Tyto kolony byly po skončení kroku záchytu (1. sada dvojkolon) a uvolnění (2. sada dvojkolon) proměřeny s pomocí scintilačního čítače (viz. 2.2 Přístrojové vybavení) a stanovena tak aktivita ve formě počtu pulzů za minutu (cpm – counts per minutes). Pro měření byla každá zdvojená kolona rozpůlena a měřena pouze jedna její část.

Pro každý experiment bylo provedeno pět měření. Od získaných hodnot bylo odečteno pozadí (hodnota aktivity pro prázdnou nádobu na vzorek), proměřené pro osm opakování s prázdnou nádobou pro vzorek.

Vztažná hodnota pro radioindikátor nebo-li signál pro 100% obsah radioindikátoru, byla získána ze sedmi měření standardního roztoku radioindikátoru s aktivitou přibližně 3,1 kBq. K této hodnotě po odečtení pozadí byly vztahovány získané hodnoty aktivity z proměřování dvojkolon s aktivním uhlím. Ke stoprocentnímu záchytu radioindikátoru docházelo v první polovině zdvojené kolony s aktivním uhlím. Druhá část sloužila jako rezerva v případě nefunkčnosti první poloviny. Tímto způsobem byla získána účinnost záchytu a uvolnění arsanu z kryogenní pasti. Množství zachyceného radioindikátoru v kolonách s aktivním uhlím bylo vyhodnoceno pomocí scintilačního gama čítače Minaxi 5000. Před měřením scintilačním gamačítačem byla zdvojená kolona rozpůlena na dvě části (každá 1 g aktivního uhlí) a každá část proměřená zvlášť.

Typická aktivita vzorku využitého při jednom replikátu analýzy byla 5 kBq. Protože tento radioindikátor měl vysokou specifickou aktivitu, bylo nutné využít neradioaktivní arsenové formy jako tzv. nosiče. Neradioaktivní forma arsenu (iAs^V) byla vůči radioaktivní formě ve velkém přebytku tzn. na 1 ng zachycené anorganické formy arsenu připadalo pouze 10^{-3} ng radioindikátoru, proto pro příspěvek k celkovému množství neradioaktivní anorganické arsenové formy byl zanedbán. Podařilo se tudíž zajistit stejné podmínky vzhledem k množství analytu jako je tomu v experimentech s AAS.

Pro vyhodnocení účinnosti záchytu i uvolnění byl proměřen vzorek s radioindikátorem před analýzou a tím byla získána hodnota aktivity odpovídající 100 % obsahu radioindikátoru ve vzorku (A_{vstup}). Pro určení množství hydridu, které bylo vygenerováno bylo nutno změřit kapalný odpad po generování (A_{odpad}). Tedy frakce radioindikátoru, která nebyla vygenerována lze tedy definovat jako „účinnost“ E_{neg} rovnicí:

$$E_{neg} = A_{odpad}/A_{vstup} \quad (2.2)$$

E_{neg} byla pro všechny experimenty menší než 10 %.

Aktivita radioindikátoru převedeného do plynné fáze (vygenerovaného) označeného A_{gen} lze definovat vztahem:

$$A_{gen} = A_{vstup} - A_{odpad} \quad (2.3)$$

Tato hodnota pro určení účinnosti záchytu a uvolnění byla nastavena jako 100 % odezva aktivity a k této hodnotě byly poté vztahovány aktivity kolon naplněných aktivním uhlím využitých při kroku záchytu a uvolnění.

Frakce radioindikátoru zadrženého celým systémem hydridového generátoru včetně kryogenní pasti a kolonek naplněných aktivním uhlím ($E_{aparatury}$) byla definována jako aktivita jakékoliv části aparatury ($A_{aparatury}$) po experimentu k aktivitě radioindikátoru převedeného do plynné fáze (A_{gen}) a tedy definované následující rovnicí:

$$E_{aparatury} = A_{aparatury} / A_{gen} \quad (2.4)$$

Bylo ověřeno při měření se scintilačním gama čítačem Minaxi 5000, že geometrie měřených částí aparatury nemá signifikantní vliv na citlivost a přesnost měření.

2.9 Buněčné suspenze – slurry sampling

Výchozí vzorky suspenze myších jater byly získány ze spolupracujícího pracoviště (Department of Nutrition, University of North Carolina at Chapel Hill, USA). Tyto vzorky obsahovaly dostatečné množství studovaných forem arsenu. Jednalo o naředěné 10% buněčné suspenze.

Příprava vzorku buněčné suspenze spočívala v navážení odpovídajícího množství jater („mokrý váha“), přidání odpovídajícího množství deionizované vody, zhomogenizování pomocí skleněného homogenizátoru s teflonovým tloučkem. Homogenizátor skládající se z rotujícího teflonového tloučku a skleněného hmoždíře dovoluje připravit buněčnou suspenzi s rozdělením na jednotlivé buňky a zároveň minimálním porušením buněk. Pro zachování speciální informace byl vzorek myších jater při homogenizaci chlazen ledem, aby nedošlo k velkému zvýšení teploty vzorku. Po homogenizaci byl vzorek zamražen při teplotě -80°C [32].

Pro optimalizační studie bylo nutné tyto vzorky naředit vzhledem k potřebě velkého množství vzorku pro měření. Většinou tedy bylo použito 1% buněčné suspenze v každém replikátu. Před každou studií byla získána kalibrační přímka metodou standardního přídatku a její směrnice porovnána s kalibrační přímkou vodných standardních roztoků. Pro měření metodou standardního přídatku bylo nejprve do vialky napipetováno příslušné množství vody poté buněčné suspenze dále standardního roztoku arsenové formy. Nakonec bylo přidáno množství 10% roztoku L-cysteinu hydrochloridu tak, aby vznikl 2% roztok, který je nutný pro správnou předredukcí všech arsenových specií před analýzou. Z každého takto připraveného vzorku byly, po uplynutí minimálně 60 minut nutných na redukcí arsenových specií, proměřeny tři replikáty. Schéma hydridového generátoru s kryogenní pastí pro tento druh vzorků uvádí obr.2.3-2. Při dávkování do pipetovací špičky spojené s generátorem hydridů byl brán vzorek o objemu mezi 250 – 600 μl . Po nasátí do systému hydridového generátoru bylo přidáno 500 μl deionizované vody na proplach kanálu pro vzorek. Po skončení experimentování byl celý systém hydridového generátoru vymyt 1 mol l^{-1} kyselinou chlorovodíkovou a poté deionizovanou vodou.

Kvůli zabránění pění reakční směsi během generování hydridů byl proveden přídatok 250 μl 10% antifoam emulze do 50 ml 1% roztoku tetrahydroboratu.

2.10 Konvence a zpracování naměřených dat

Pro experimentální účely byla vybrána plocha píku (P) jako vyhodnocovací parametr. Ostatní parametry jako výška píku (v), retenční čas (t_R) a šířka píku v polovině výšky (dále jen FWHM) byly sledovány a použity pro porovnání uspořádání pro různé podmínky.

V případě redukčního činidla je použita jeho koncentrace označovaná jako w nebo jednotkou %. Pro w platí, že např. v případě koncentrace 1 % tetrahydroboratu je navážen 1 g tohoto redukčního činidla a doplněn do 100 ml odpovídajícím rozpouštědlem v tomto případě deionizovanou vodou.

Pro účely této práce je často označován objem standardního roztoku formy nebo forem arsenu braný do měřicího cyklu (rozumí se jeden replikát) jako vzorek. Nicméně jako vzorek je označován i vzorek buněčné suspenze nebo i slepé stanovení. Dávkování vzorku probíhalo kanálem pro vzorek v obr. 2.3-1.

Pro přehlednost jsou při popisu píků v chromatogramech používány zkratky výchozích forem arsenu vstupující do hydridového generátoru.

2.10.1 Software

K naměření, zpracování a vyhodnocení dat byl používán následující software: AA winlab 32 ver. 6.5, (Perkin Elmer instruments LLC, USA); Microsoft® Word a Microsoft® Excel 2000 (Microsoft Corporation, USA); Microcal™ Origin® 7.5 (Microcal Software, USA);

2.10.2 Vyhodnocení naměřených dat

Pro generování substituovaných hydridů s kryogenní pastí byl získán chromatogram ze softwaru AA winlab 6.1 atomového absorpčního spektrometru a následně exportován jako txt soubor pro další vyhodnocení. Software AA winlab 6.1 totiž nedokázal vypočítat plochu samostatného píku (P), ale pouze plochu celého chromatogramu. Získaný záznam v txt formátu bylo nutno vyhodnotit pomocí Microsoft® Excel 2000 a Microcal™ Origin® 7.5.

Pomocí Microsoft® Excelu 2000 byl vytvořen pracovní list, do kterého byly importovány data (pro jeden chromatogram byly tři sloupce – čas, signál AA, signál DBC). Signál AA obsahoval data chromatogramu a z něj bylo provedeno vyhodnocení formou integrace od nastavených časových intervalů. Interval pro daný pík začíná v čase t_z a končí v čase t_k . Protože spektrometr má vzorkovací frekvenci 50 Hz, počet změřených hodnot, n , absorbance je:

$$n = 50 \cdot (t_k - t_z) + 1 \quad (2.5)$$

Nejdříve byla provedena integrace píku od nulové absorbance dle následujícího vztahu kde I_0 je integrál :

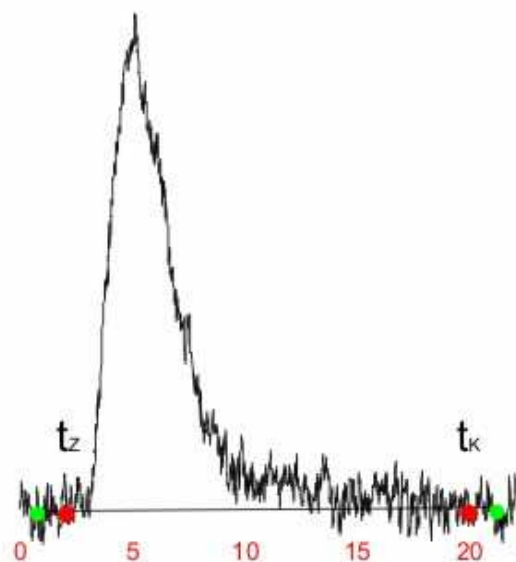
$$I_0 = (1/n) (t_k - t_z) \cdot \sum_{i=1}^n A_i \quad (2.6)$$

kde A_i je i -tá hodnota absorbance, $i=1$ platí pro čas t_z (začátek intervalu), $i=n$ platí pro čas t_k (konec intervalu). Dále byl vypočten integrál základní linie a hodnota tohoto integrálu odečtena od I_0 . Tímto byl vypočten integrál tzv. korigovaný na základní linii I_K dle následujícího vztahu.

$$I_k = I_0 - \frac{(t_k - t_z) \cdot (A_z + A_k)}{2} \quad (2.7)$$

Kde A_z je průměr z 50 čtení absorbance (1 s) od času $t_z - 1$ do času t_z a A_k je průměr z 50 čtení absorbance (1 s) od času t_k do času $t_k + 1$.

Nastavení integračních mezí ukazuje následující obrázek.



Obr. 2.10-1: ukázka nastavení integračních mezí pro pík arsanu slepého stanovení; jednosekundový interval pro nastavení základní linie je vzdálenost mezi zeleným a červeným bodem; v časovém intervalu mezi červenými body t_z a t_k je provedena integrace píku od nulové absorbance;

Pro zjištění plochy slepého stanovení byl používán stejný přístup. V případě, že v chromatogramu nebyla viditelná kontaminace v místě pro danou formu byly pro integraci brány stejné intervaly jako pro pík dané arsenové formy pro danou koncentraci ve standardním roztoku ($2 \mu\text{g l}^{-1}$). Pro porovnávání a ověřování vypočtené plochy píků byl využíván i Microcal™ Origin® 7.5 kde lze nastavit základní linii, od které je

uskutečňována integrace. Mimo plochy píku (P) byly z tohoto programu získány retenční čas (t_R), šířka v polovině výšky píku (dále jen FWHM) a výška jednotlivých píků (v).

V případě stanovení detekčních limitů pro uvedené přístupy bylo naměřeno deset slepých pokusů a pět pokusů se směsným standardem obsahujícím iAs^V , MAs^V , $DMAs^V$ event. standardním roztokem s $TMAOs^V$. Vyhodnocení spočívalo v určení standardní odchylky plochy píků (s) pro slepý pokus násobené třemi a její vztažení k ploše píků pro jednotlivé formy arsenu ve standardních roztocích o koncentraci každé specie $2 \mu g l^{-1}$ (IUPAC [116]).

2.10.3 Statistické zpracování výsledků

Z výsledků opakovaného měření byla odhadnuta správná hodnota pomocí aritmetického průměru a zároveň určena i standardní odchylka dle vztahu:

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \quad (2.8)$$

kde n představuje počet provedených paralelních měření sledované veličiny a x_i naměřenou hodnotu sledované veličiny pro i -té měření a \bar{x} aritmetický průměr. V případě potřeby byla vyhodnocena i relativní směrodatná odchylka, jenž je vyjádřena vztahem:

$$s_r = \frac{s}{\bar{x}} \quad (2.9)$$

Výsledky byly testovány podle Grubbsova T-testu na odlehlost dle vztahu:

$$T = \frac{|x_i - \bar{x}|}{s} \sqrt{\frac{n}{n-1}}; \quad (i) = 1, n \quad (2.10)$$

kde x_i je testovaná hodnota, \bar{x} je aritmetický průměr, T porovnáváme s kritickou hodnotou $T(\alpha, n)$ (viz. [117]), s je směrodatná odchylka ze všech výsledků, n je počet výsledků.

Pokud není explicitně uvedeno jinak výsledky jsou uváděny jako aritmetický průměr \pm směrodatná odchylka. V některých případech je uvedena místo směrodatné odchylky kombinovaná nejistota u_c dle vztahu 2.11.

$$u_c(X) = \sqrt{u_A^2(X) + u_B^2(X)} \quad (2.11)$$

kde u_A a u_B jsou nejistoty vyjádřené ve většině případů směrodatnou odchylkou eventuálně relativní směrodatnou odchylkou stanovení.

3 Výsledky a diskuze

Výsledky a diskuze jsou rozděleny do pěti kapitol. První kapitola se zabývá vývojem a optimalizací metody pro speciální analýzu arsenu založenou na selektivním generování substituovaných arsanů. Obsahem je posouzení a výběr vhodného přístupu selektivního generování, následuje diskuze stability jednotlivých forem arsenu, popis problémů spojených s využitím daného přístupu selektivního generování hydridů pro uspořádání HG-CT-AAS a možnosti eliminace těchto problémů.

Další kapitola je zaměřena na aplikaci vyvinuté metody selektivního generování substituovaných hydridů na vzorky biologických tkání s přístupem dávkování buněčné suspenze do hydridového generátoru bez mineralizace vzorku před analýzou.

Samotná kryogenní past je složitý systém na obsluhu i samotné sestavení. Proto se další dvě kapitoly zabývají dalším vývojem tohoto systému pro zlepšení parametrů chromatogramu ať už drobnými nebo razantními změnami vedoucími k miniaturizaci tohoto systému.

Detekční limity jsou důležitou součástí této práce. Proto je tomuto tématu věnována náležitá pozornost. S tímto tématem souvisí i poslední kapitola studující potenciál AFS jako detektoru pro dosažení významně nižších detekčních limitů důležitých pro analýzu biologických materiálů.

3.1 Vývoj systému HG-CT-AAS pro speciální analýzu arsenu

Cílem této části práce byl vývoj metody pro stanovení substituovaných hydridů arsenu. Vývoj byl zaměřen na uspořádání hydridového generátoru s kryogenní pastí pro zlepšení parametrů chromatogramu jednotlivých forem arsenu a schopnost aplikovat toto uspořádání na speciální analýzu arsenu v biologických materiálech.

Vhodný výběr přístupu selektivního generování hydridů s rozlišením tří- a pětimocných forem je důležitou součástí vývoji metody. Nutnost rozlišovat tří a pětimocné formy arsenu je dána jejich rozdílnou toxicitou (viz. 1.1 Sloučeniny arsenu a jejich toxicita). Ideálním případem je metoda, při které lze vygenerovat všechny hydridy arsenu se stejnou citlivostí. V tomto případě lze využít jednu formu arsenu jako standardu pro ověření funkce pasti i pro porovnání s citlivostí ostatních forem.

Pro použité spojení HG-CT-AAS je nutné eliminovat vodní páru a aerosol vstupující do kryogenní pasti způsobující její zablokování a znemožnění pokračování analýzy. Tento

problém je odstraněn umístěním odpovídajícího sušícího zařízení před vstup do kryogenní pasti. Pokud není sušícím zařízením účinně absorbována vodní pára a aerosol, v chromatogramu je pozorovatelná nespecifická absorpce. Nespecifická absorpce vzniká i při použití L-cysteinu na předredukci vzorků. Důvodem je pravděpodobně sulfan, produkt z rozkladu L-cysteinu. Ideálním případem je zařízení, jenž je schopné eliminovat vodní páru s vysokou účinností i rozkladné produkty L-cysteinu, aby nedocházelo k vzniku nespecifické absorpce a tím zkreslení chromatogramu arsenových forem.

Nízké detekční limity pro aplikaci vyvinuté metody na biologické typy vzorků jsou důležitou podmínkou. Proto je v této práci věnována detekčním limitům náležitá pozornost. Biologické vzorky zejména vzorky tkání jsou často dostupné v omezeném množství. Při nutnosti opakovat analýzu takového vzorku je nutné použít ředění na dostatečný objem. Snížení koncentrace arsenových forem je tudíž nevyhnutelné. Proto pro speciální analýzu arsenu je nutné využít metodu dosahující nízké detekční limity.

3.1.1 Selektivní generování substituovaných hydridů arsenu

Ideálním případem selektivního generování substituovaných hydridů by byla možnost generovat hydridy třímocných forem v alikvotu vzorku (aliquot A) a po změně podmínek generovat hydridy pětímocných forem v dalším alikvotu vzorku (aliquot B). Ve skutečnosti neexistuje způsob generování arsenu selektivně pouze z pětímocných forem. Procedura proto využívá generování hydridů z třímocných forem (lze zajistit vhodnou volbou podmínek generování) v alikvotu (aliquot A) a generování hydridů z obou forem (lze zajistit např. předredukci pětímocných forem) v dalším alikvotu (aliquot B). Zastoupení pětímocných forem je stanoveno rozdílem obou alikvotů. V optimálním případě jsou citlivosti třímocných i pětímocných forem v alikvotu B i citlivosti třímocných forem v alikvotu A stejné. V tomto případě lze použít vztažení všech forem k jedné specii, tzn. postačuje změřit signál standardního roztoku jen jedné formy v jednom alikvotu (pětímocné formy v alikvotu B, nebo třímocné formy v alikvotu A či B). Tímto je usnadněna situace, protože není třeba pracovat se standardními roztoky (často) nestabilních forem [69].

Následující podkapitoly v této kapitole 3.1.1 se zabývají optimálními podmínkami generování hydridů a výběrem vhodného přístupu k selektivnímu generování substituovaných hydridů s ohledem na stabilitu toxikologicky zajímavých arsenových forem použitých v této práci.

3.1.1.1 Selektivní generování hydridů založené na změně pH

Selektivního generování iAs^{III} a iAs^V lze dosáhnout změnou pH prostředí [12]. Popsaný přístup v uvedeném literárním zdroji využívá dávkového uspořádání hydridového generátoru. Selektivní generování pouze třímocných forem je uskutečňováno z prostředí TRIS pufru a tří- s pětimocnými formami arsenu v prostředí 1 mol l^{-1} HCl (viz. 2.4.2 Selektivní generování hydridů založené na změně pH). Citlivosti pro iAs^{III} a iAs^V byly shodné [12]. Nicméně v konvenčním kontinuálním uspořádání hydridového generátoru (popis viz.[42]) byla zjištěna nižší citlivost pro iAs^V . Ani s koncentrací kyseliny chlorovodíkové (10 mol l^{-1}) nemá arsan vygenerovaný z iAs^V stejnou citlivost jako arsan vygenerovaný z iAs^{III} . Na základě tohoto zjištění byl prodloužen reakční čas nutný k vygenerování arsanu z iAs^V pomocí prodloužení reakční cívky. S využitím dostatečně velké reakční cívky s objemem až 15 ml (původní 0,8 ml) odpovídající době setrvání reakční směsi cca 40 s bylo dosaženo stejné citlivosti pro iAs^{III} i iAs^V . [42]

Selektivní generování založené na změně pH tedy dosahuje případu stejných citlivostí pro obě arsenové specie jen za enormního prodloužení reakční cívky a při použití vysoké koncentrace HCl. Toto značně komplikuje provedení analýzy. Hlavní nevýhodou je však neúnosné zvýšení nebezpečí interferencí v kapalně fázi [37]. Z rozdílných citlivostí pro pětimocné a třímocné formy arsenu v obvyklém uspořádání tedy vyplývá nemožnost využití jedné arsenové formy jako „referenční“ pro ostatní formy arsenu. Proto nebylo tohoto přístupu ve spojení s AAS nadále využito.

3.1.1.2 Selektivní generování hydridů založené na předredukci L-cysteinem

Alternativou k problematickému selektivnímu generování hydridů založeném na změně pH je použití L-cysteinu pro neselektivní generování arsanů z tří i pětimocných forem v alikvotu B a selektivní generování pouze třímocných forem arsenu v alikvotu A (viz. 2.4.1 Selektivní generování hydridů založené na předredukci L-cysteinem) zajištěné udržení dostatečně vysoké hodnoty pH 6 při redukci tak, aby docházelo ke generování pouze třímocných forem arsenu. Nejúčinnějším a nejjednodušším způsobem je použití odpovídajícího pufru. Ideálním případem je TRIS HCl pufr, který vykazuje maximální pufrovací kapacitu v mírně bazické oblasti. Díky tomuto reakčnímu médiu lze udržet stabilní podmínky pro generování. Kromě konverze třímocných forem arsenu na příslušné

hydridy dochází v alikvotu A také ke konverzi $\text{TMAAs}^{\text{V}}\text{O}$ na trimethylarsan. Trimethylarsan z $\text{TMAAs}^{\text{V}}\text{O}$ lze generovat již za reakce s tetrahydroboratem. Pro tuto formu tedy není nutná předredukce L-cysteinem. Po proběhnutí reakce v hydridovém generátoru s dávkováním alikvotu A se pH pohybuje blízko hodnoty 6,5. Bez přítomnosti TRIS HCl pufru v hydridovém generátoru se hodnota pH pohybuje v širším rozmezí mezi 6 až 8.

Alikvot B je podroben předredukci L-cysteinem před analýzou (viz. 2.4.1 Selektivní generování hydridů založené na předredukci L-cysteinem). Pětímocné formy jsou převedeny na třímocné. Výjimkou je $\text{TMAAs}^{\text{V}}\text{O}$, který reaguje s L-cysteinem za vzniku těkavého trimethylarsanu, který následně částečně vytěká, takže jeho stanovení v alikvotu B je nemožné. Vzhledem k tomu, že dochází k účinnému generování hydridů z prostředí L-cysteinu ve velmi úzkém rozmezí pH [42], je nutné pracovat v prostředí se stabilní hodnotou pH kolem 6. Řešením je opět použití TRIS HCl pufru. Pokud je standardní roztok iAs^{V} v deionizované vodě podroben předredukci L-cysteinem, je pH 1,5 a po smísení s TRIS HCl puftrem 1,9. Po zreagování s tetrahydroboratem v hydridovém generátoru se pH roztoku po reakci pohybuje mezi hodnotami 6,8 až 7,4. V přítomnosti TRIS HCl pufru je tedy pH pro generování hydridů stabilnější.

Citlivosti pro formy arsenu iAs^{III} a iAs^{V} , MAAs^{V} , DMAAs^{V} a $\text{TMAAs}^{\text{V}}\text{O}$ z alikvotu A i B jsou za přítomnosti TRIS pufru stejné. Prostředí TRIS pufru dokáže zabezpečit selektivní generování třímocných forem bez generování pětímocných forem arsenu [42]. Opakovatelnost ploch píků pro všechny použité specie byla za těchto podmínek pod 5 %. Z toho vyplývá, že zde popsaný přístup ke speciální analýze založené na selektivním generování substituovaných hydridů s předredukci L-cysteinem splňuje požadavek stejné citlivosti pro všechny arsenové formy.

3.1.1.3 Stabilita forem arsenu

Výše uvedený přístup předredukce L-cysteinem ke speciální analýze arsenu založený na selektivním generování substituovaných hydridů (popsaných v 2.4) umožňuje využít jedinou formu pro získání referenční plochy píku, ke které jsou plochy píku ostatních forem vztahovány a ověřována tak správná funkce celého systému i stabilita ostatních forem. Jako nejvhodnější forma byla zvolena z důvodu nejvyšší stability a nejjednodušší přípravy standardního roztoku oproti ostatním formám iAs^{V} . U methylovaných pětímocných a iAs^{III} docházelo k částečné redukci či oxidaci. V případě DMAAs^{V} a $\text{TMAAs}^{\text{V}}\text{O}$ docházelo k značným ztrátám s použitím nafionové membrány (viz.

3.1.2.3 Sušení nafionovou membránou). Proto bylo nutné ztráty ostatních forem eliminovat. Jednotlivé měřené standardní roztoky byly připravovány vždy čerstvé a pro experimentování bylo voleno uspořádání bez nafionové membrány nebo s jiným druhem sušicího zařízení kdy nedocházelo ke ztrátám. Vzhledem k nestabilitě použitých forem arsenu byl kladen důraz na jejich skladování a postup přípravy. Veškeré použité standardní roztoky s koncentrací 100 ng l^{-1} a vyšší byly uchovávány při teplotě $5 \text{ }^\circ\text{C}$ a před měřením byly vytemperovány pouze stáním za laboratorní teploty. Pro přípravu standardního roztoku 100 ng l^{-1} iAs^{III} byla použita deionizovaná voda zbavená kyslíku probubláním plynným dusíkem po 30 min [118]. Pro standardní roztoky pětimocných forem byla použita pouze deionizovaná voda. U takto připravených standardních roztoků jednotlivých forem o koncentraci 100 ng l^{-1} každé formy nebyla pozorována změna mocnosti ani obsahu dané formy po několik měsíců.

3.1.2 Vývoj systému HG-CT

Cílem této kapitoly bylo optimalizovat parametry kryogenní pasti. Podmínky záchytu a uvolnění v systému kryogenní pasti ve spojení s AAS detekcí byly optimalizovány pro dosažení dostatečné citlivosti a rozlišení píků hydridů jednotlivých forem arsenu v chromatogramu s ohledem na omezenou dobu načítání chromatogramu spektrometrem (58 s). Důležitou roli hraje precizní nastavení teplotního programu kryogenní pasti v podobě U-trubice, které má vliv jak na tvar píků jednotlivých forem, tak na jejich rozlišení. Dalším parametrem jsou průtoky plynů v kroku záchytu i v kroku uvolnění.

Důležitou částí systému HG-CT-AAS zařazenou mezi hydridový generátor a kryogenní past je sušicí zařízení, které zabraňuje vstupu vodní páry a aerosolu ze separátoru fází do kryogenní pasti. Vymrazováním vodní páry a aerosolu docházelo k zablokování U-trubice přibližně po 30 měřících cyklech. Následkem zablokování byl přetlak v systému HG-CT s nebezpečím poškození. Rozmražení vytvořené ledové zábrany vyžadovalo odpojení kryogenní pasti, napojení pouze na průtok helia (90 ml min^{-1}) a ohřev pro dosažení více jak 100°C přibližně po 30 min.

Další nevýhodou přítomnosti vodní páry byl její postup do multiatomizátoru kde docházelo ke vzniku nespecifické absorpce v retenčních časech MAs a DMAs v chromatogramu. Sušením omezené a konstantní množství vodní páry způsobující nespecifickou absorpci vstupující do multiatomizátoru lze kompenzovat použitím DBC.

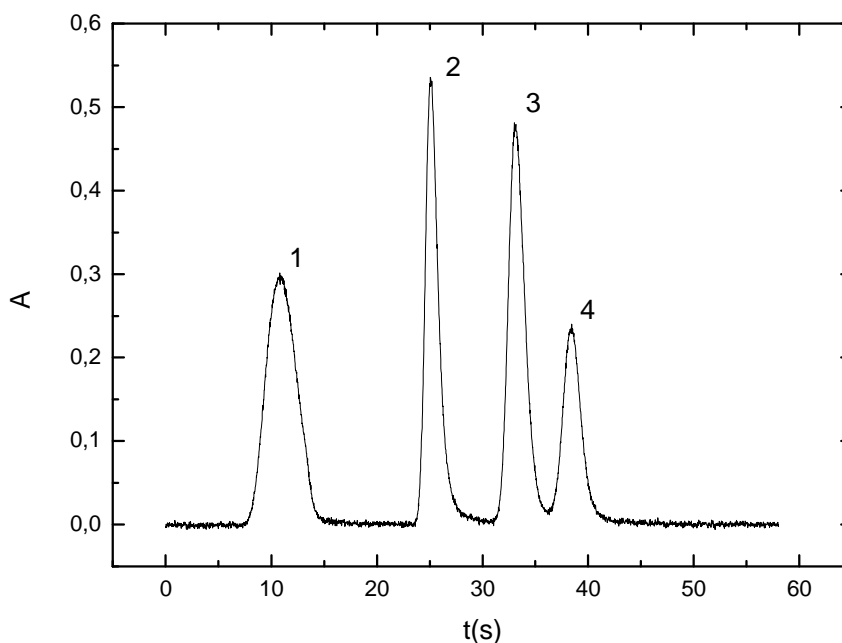
Použitím DBC nicméně dochází ke zvýšení šumu základní linie což zvyšuje detekční limity pro jednotlivé specie (dále viz. 3.1.3 Detekční limity).

Nutností bylo vyvinout sušící zařízení schopné dostatečně eliminovat vodní páru a aerosol a zároveň nezpůsobovat ztráty analytu/ů během transportu do kryogenní pasti. Při odstranění těchto interferentů by bylo možné pracovat bez DBC a tím dosáhnout nižších detekčních limitů.

3.1.2.1 Optimalizace U-trubice

Kritickými parametry ovlivňující chromatogram jsou pro uspořádání kryogenní pasti v podobě U-trubice teplotní program a průtoky plynů. Průtoky plynů v krocích zachytu a uvolnění byly optimalizovány. Výchozími hodnotami pro optimalizace byly průtoky používané před zahájením této práce. Pro zachyt i uvolnění se stoprocentní účinností byly nalezeny optimální průtoky helia 75 ml min^{-1} a vodíku 15 ml min^{-1} . Změnou průtoku helia v rozmezí $30 - 200 \text{ ml min}^{-1}$ dochází k snížení plochy píku forem arsenu. Šířka v polovině výšky píku (FWHM) není změnou průtoku helia významně ovlivněna. Pro průtoky helia pod 75 ml min^{-1} dochází k významnému rozmytí píků. Průtok 75 ml min^{-1} byl nastaven jako optimální bez významného zhoršení rozlišení píků arsenových forem.

Způsob ohřevu kryogenní pasti v kroku uvolnění hydridů arsenu z U-trubice (kryogenní pasti) ovlivňuje retenční čas a tvar píků hydridů arsenu. Se zvyšující se rychlostí ohřevu dochází ke snížení retenčních časů píků hydridů arsenu, ale zároveň dochází i ke zhoršení rozlišení. Vzhledem k omezené době načítání chromatogramu spektrometrem (viz. 2.2 Přístrojové vybavení) bylo nutné optimalizovat retenční časy hydridů arsenu tak, aby píky byly v rozmezí doby načítání chromatogramu s maximálně dosažitelným rozlišením. K dostatečnému rozlišení TMA^{VO} formy již nestačilo snížení rychlosti ohřevu, ale bylo nutné vložit do teplotního programu kryogenní pasti mezikrok s přerušením ohřevu na několik sekund jak ukazuje tab. 2.6-1. Pečlivé nastavení tohoto mezikroku bylo nutné k dostatečnému rozlišení mezi DMA^{V} a TMA^{VO} . Typický chromatogram pro směsný standardní roztok obsahující čtyři arsenové formy pro optimalizovaný teplotní program je uveden na obr. 3.1-1.



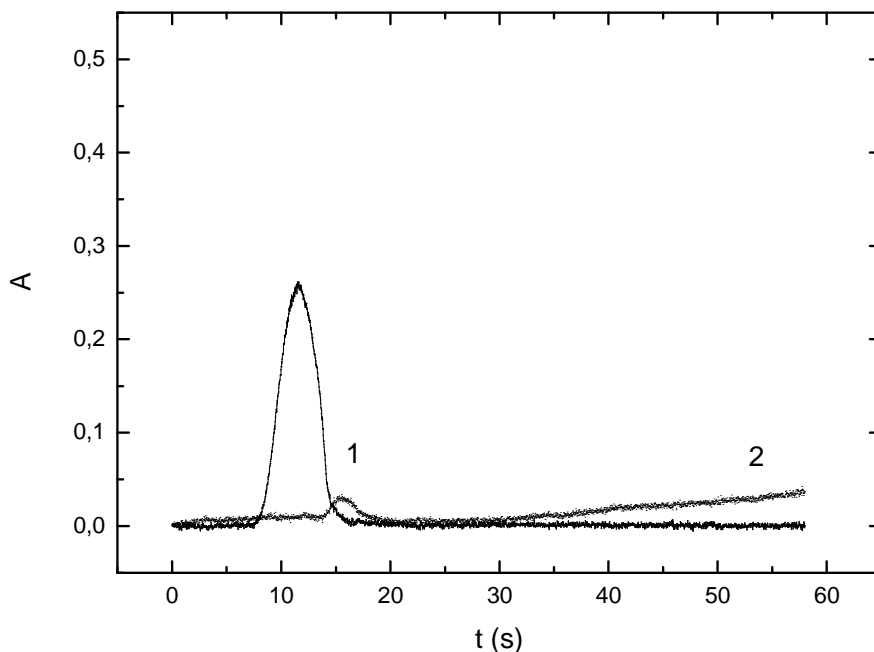
Obr. 3.1-1: chromatogram pro 1- iAs^V , 2- MAs^V , 3 – $DMAs^V$, 4 – TMA_s^VO (aliquot B); bez použití sušícího zařízení, s DBC; koncentrace každé formy $2 \mu g l^{-1}$;

Plochy píků iAs^V , MAs^V , $DMAs^V$ (aliquot B) se obvykle pohybovaly kolem 1 s na 1 ng arsenu s relativní směrodatnou odchylkou pod 5 %. TMA_s^VO forma byla vyhodnocována z aliquotu A. Z chromatogramu na obr.3.1-1 aliquotu podrobeného předredukci je pozorovatelný pík této formy, jehož plocha se s časem snižovala (viz. 2.4.1 Selektivní generování založené na předredukci L-cysteinem). FWHM pro iAs^V a MAs^V se pohybovala v rozmezí 2,0 – 3,0 s; pro $DMAs^V$ a TMA_s^VO v rozmezí 2,5 – 3,5 s. Výšky píků nabývaly hodnot absorbance pod 0,6 pro koncentraci $2 \mu g l^{-1}$ pro každou formu arsenu s relativní směrodatnou odchylkou v některých případech i přes 10 % stejně jako u FWHM. Směrodatná odchylka retenčních časů byla nižší než 0,5 s pro všechny studované specie.

Po výměně chromatografické náplně, výměně vinutí odporového drátu U-trubice nebo výměně celé U-trubice docházelo k změně retenčních časů, FWHM a tvaru píků. Nicméně rozlišení píků bylo po těchto změnách a optimalizaci teplotního programu porovnatelné s původním stavem U-trubice. Změna retenčních časů se pohybovala okolo 2 s, změna FWHM mezi 2 a 3 sekundami pro iAs^V , pro MAs^V okolo 1,5 s a pro $DMAs^V$ a TMA_s^VO mezi 2 až 3,5 s.

3.1.2.2 Nespecifická absorpce

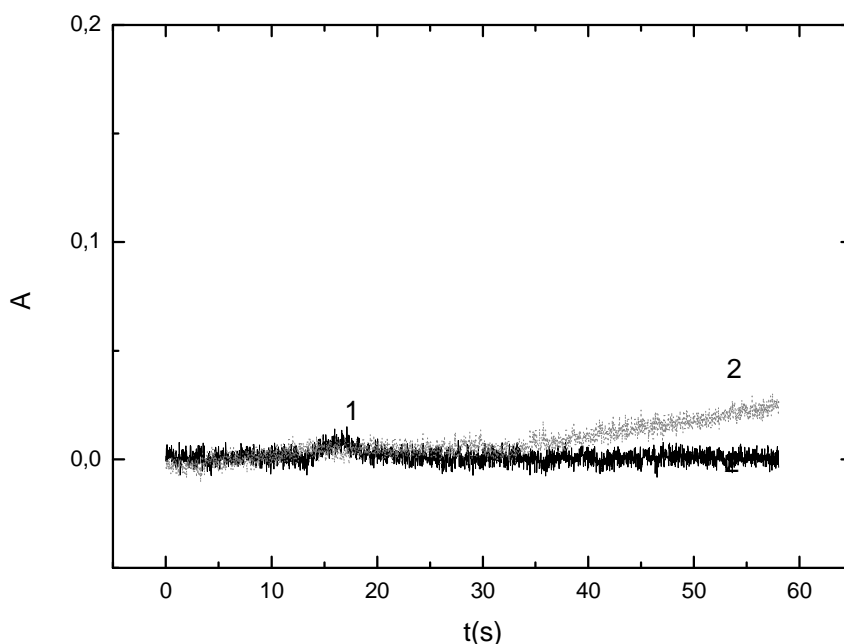
V chromatogramu vzorku podrobeného předredukci L-cysteinem (aliquot B) byla pozorována nespecifická absorpce přibližně v blízkosti retenčního času píku iAs (o 3 s později). Výška pozorované nespecifické absorpce byla přibližně 0,01 s plochou píku odpovídající 0,06 ng As. Jako zdroj této nespecifické absorpce byl určen produkt rozkladu L-cysteinu (aliquot B) jelikož bez tohoto redukčního činidla nebyla tato nespecifická absorpce v chromatogramu pozorována. Teplota varu tohoto produktu bude podobná teplotě varu arsanu (-55°C). Pravděpodobným produktem rozkladu by mohl být sulfan či jeho derivát dle čichového vjemu při kroku uvolnění kdy je registrován charakteristický zápach. Linie pro signál DBC v obr.3.1-2 jasně vypovídá o vlivu sulfanu či jeho derivátu způsobující nespecifickou absorpci blízko retenčního času arsanu.



Obr. 3.1-2: chromatogram pro $2 \mu\text{g l}^{-1}$ iAs^V (aliquot B); při zapnuté DBC, tlustá čára – korigovaný signál arsenové lampy - pík anorganické formy arsenu; tenká čára – signál DBC - 1 – nespecifická absorpce z rozkladných produktů L-cysteinu; 2 – drift základní linie způsobený vodní párou ze separátoru fází;

Vodní pára také způsobuje nespecifickou absorpci projevující se růstem základní linie v retenčních časech nad 30 s, tedy zahrnující retenční časy methylovaných forem arsanu. Tento druh nespecifické absorpce je pozorován s i bez předredukce L-cysteinem (aliquot A i B). Chromatogram slepého stanovení pouze s deionizovanou vodou bez

přídavku L-cysteinu ukazuje nescifickou absorpci vody na obr.3.1-3 pokrývající oblast retenčních časů metylovaných forem arsenu.



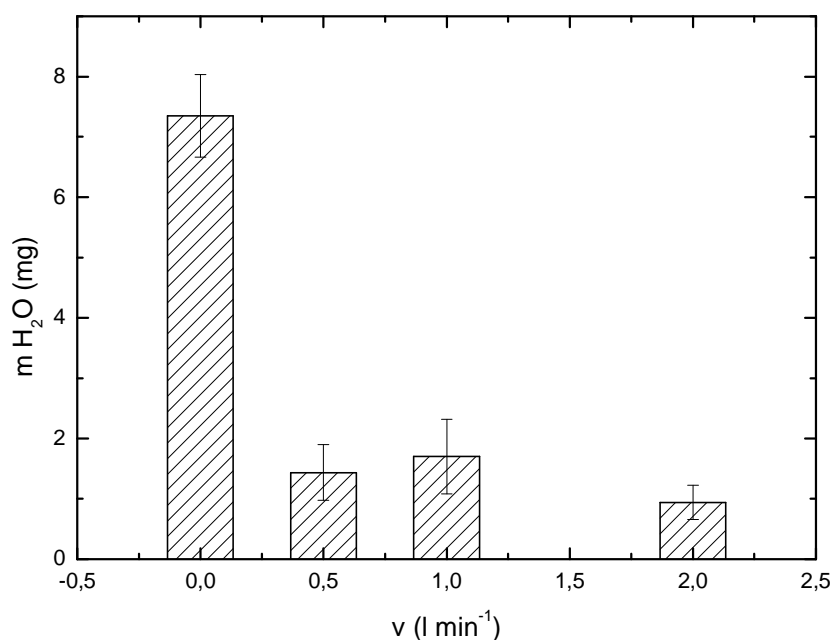
Obr. 3.1-3: chromatogram pro slepý pokus při zapnuté DBC (aliquot A), černá linie – korigovaný signál arsenové lampy; šedá linie – signál DBC; 1 – kontaminace iAs^{III} ; 2 – drift základní linie způsobený vodní párou ze separátoru fází; (aliquot A);

Tato nescifická absorpce způsobovala pozitivní interferenci bez zapnuté DBC. Absorpce záření při vlnové délce arsenu (193,7 nm) molekulami vody byla podrobně studována. Důvodem je molekulová absorpce tříatomové molekuly vody odpovídající jejím rotačním, vibračním stavům a přechodům elektronů [119]. Použitím DBC lze tyto nescifické absorpce eliminovat. Nicméně DBC zvyšuje šum základní linie a tím i dochází ke zhoršení detekčních limitů (viz. 3.1.3 Detekční limity).

3.1.2.3 Sušení nafionovou membránou

Pro sušení plynné směsi vystupující ze separátoru fází obsahující analyt společně s vodní párou a aerosolem byla využívána nafionová membrána specifikovaná v kapitole 2.5.1 Nafionová membrána. Pro kvantifikaci vstupu vodní páry do systému kryogenní pasti byl uskutečněn experiment s vymrazováním vodní páry a prošlého aerosolu nafionovou membránou kdy místo kryogenní pasti byla zařazena skleněná trubice ponořená v kapalném dusíku (viz. 2.5.1 Nafionová membrána). Po určité době generování

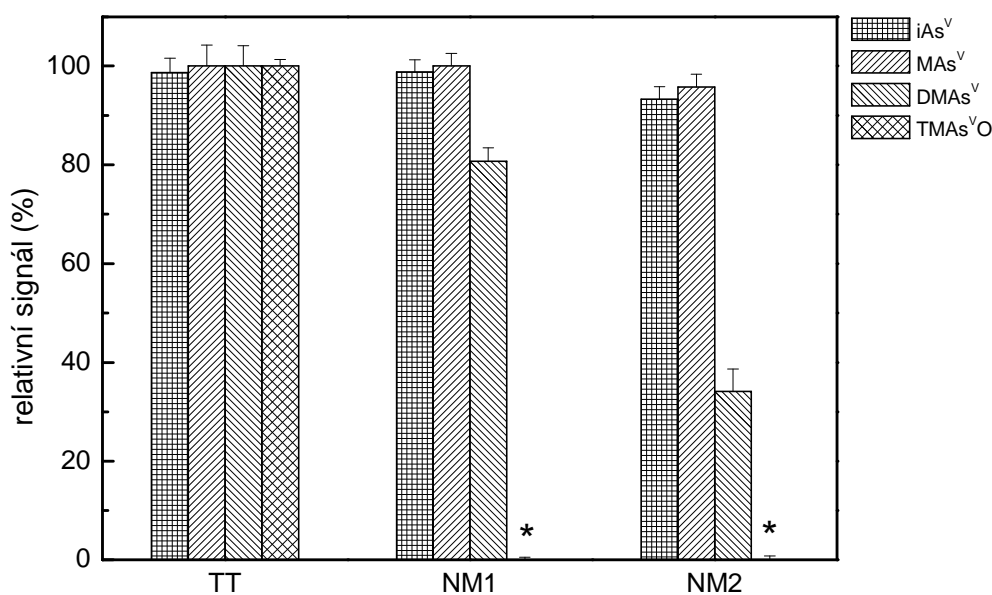
byla vymrazená vodní pára zvážena. Byla sledována závislost hmotnosti vymrazené vody na průtoku sušícího dusíku nafionovou membránou. Závislost dokládá obr.3.1-4.



Obr. 3.1-4: závislost hmotnosti vymrazené vodní páry a aerosolu (m_{H_2O}) na průtoku sušícího dusíku nafionovou membránou (v); doba hydridového generování 30 min; $n = 3$

Maximální snížení množství vstupující vodní páry a aerosolu do kryogenní pasti lze dosáhnout při průtoku sušícího dusíku 2 l min^{-1} nafionovou membránou. Nicméně množství vodní páry nelze snížit s použitím nafionové membrány pod $0,9 \text{ mg}$ za 30 minut zapnutého hydridového generátoru. Eliminace vodní páry a aerosolu vystupující ze separátoru fází nafionovou membránou je sice významná nicméně k bezproblémovému provozu U-trubice je nedostačující. Po určité době měření odpovídající 50 měřícím cyklům docházelo k zablokování U-trubice vymrazenou vodní párou.

Kritickou nevýhodou použití nafionové membrány byly ztráty dimethylované a trimethylované formy arsanu z plynné směsi během sušení jak ukazuje obr.3.1-5.



Obr. 3.1-5: porovnání relativního signálu (R_s), pro každou specii koncentrace $2 \mu\text{g l}^{-1}$ (aliquot A pro TMAso, B pro ostatní formy), pro sušidla v podobě nafionové membrány a patrony s NaOH (perly); TT-uspořádání s teflonovou trubicí (referenční signál); NM1-uspořádání s nafionovou membránou MD-110-12FP; NM2-uspořádání s nafionovou membránou MD-070-24F-2; NaOH-patrona s hydroxidem sodným v podobě perel; hvězdička označuje relativní signál pro TMAso; $n = 3$; kombinované nejistoty; [115]

Z obr. 3.1-5 jsou patrné významné ztráty dimethylované a stoprocentní ztráty trimethylované formy arsenu pro dva typy nafionových membrán označených jako NM1 a NM2. Typ NM2 má dvojnásobnou délku vnitřní nafionové trubice a menší vnitřní průměr než typ označený v NM1.

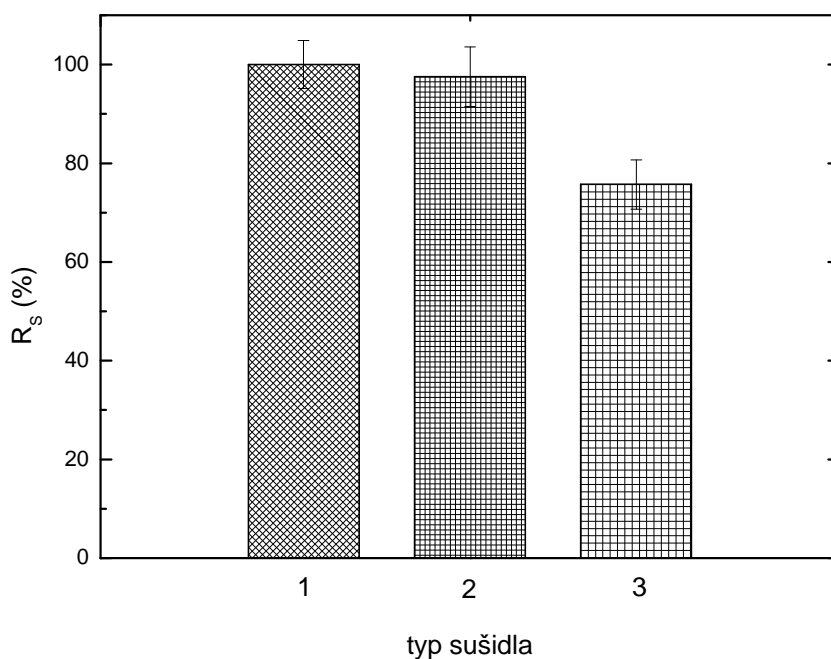
Způsob uvedeného sušení plynné směsi vystupující ze separátoru fází je tedy nedostatečný z důvodu nízké účinnosti eliminace vodní páry a aerosolu. Podstatným zjištěním, vylučující nafionovou membránu z dalšího experimentování, jsou významné ztráty methylovaných arsanů. Proto bylo nutné nalézt jinou metodu sušení plynné směsi, kterou popisuje následující kapitola.

3.1.2.4 Sušení patronou s hydroxidem sodným

Z výše diskutovaných pozorování vyplynula nutnost výměny nafionové membrány za jiný druh sušicího zařízení. Z literárních zdrojů se hydroxid sodný jevil jako

nejvhodnější možnost (viz. 1.4.2 Absorpční média). Uspořádání patrony s hydroxidem sodným je uvedeno v kapitole 2.5.2 Patrona s hydroxidem sodným.

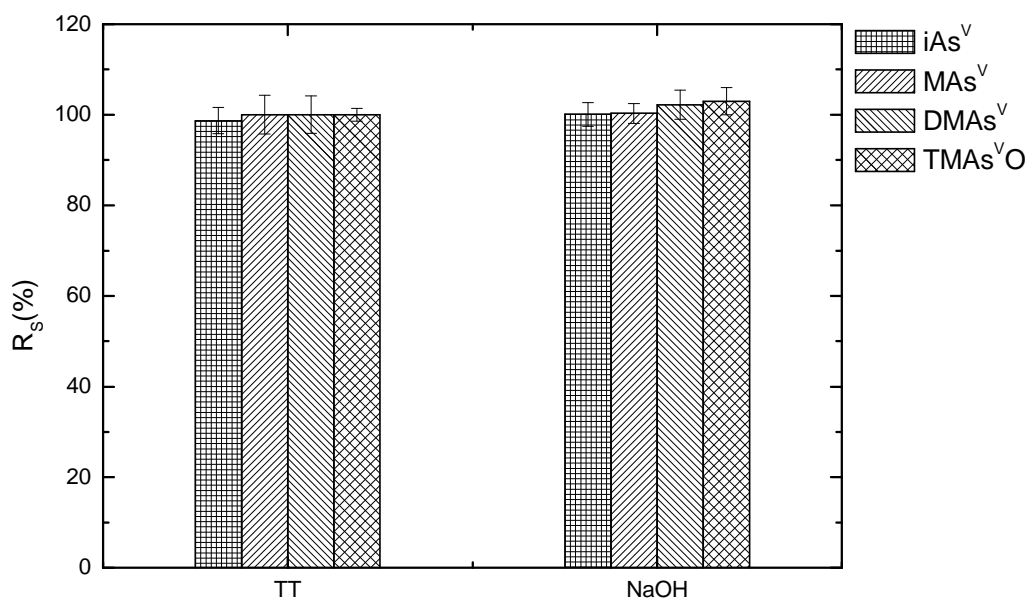
Pro účel sušení plynné směsi bylo testováno několik typů hydroxidu sodného s různou velikostí částic. Byl použit hydroxid sodný v podobě perel, mikroperel, šupin. Šupiny hydroxidu sodného kladly příliš velký odpor proudu plynů ze separátoru fází a proto byly vyloučeny. Pro zbývající dva typy hydroxidu byly provedeny experimenty zaměřené na sledování ztrát arsanu jak dokumentuje obr. 3.1-6.



Obr. 3.1-6: porovnání sušidel v podobě hydroxidu sodného; relativní signál (R_s) pro $2 \mu\text{g l}^{-1} \text{iAs}^{\text{V}}$ (aliquot B); 1 – bez sušidla; 2 – se sušidlem NaOH perle; 3 – se sušidlem NaOH mikroperle; $n = 5$; kombinované nejistoty

Hydroxid sodný v podobě perel nezpůsobil žádné ztráty arsanu na rozdíl od hydroxidu sodného v podobě mikroperel. Pravděpodobným důvodem ztrát arsanu pro hydroxid sodný v podobě mikroperel byl menší průměr částic a tím větší povrch, na kterém došlo k zachycení. Řešením pro sušení plynné směsi proudící ze separátoru fází je tudíž využití hydroxidu sodného s průměrem přibližně 3 mm, ne menším.

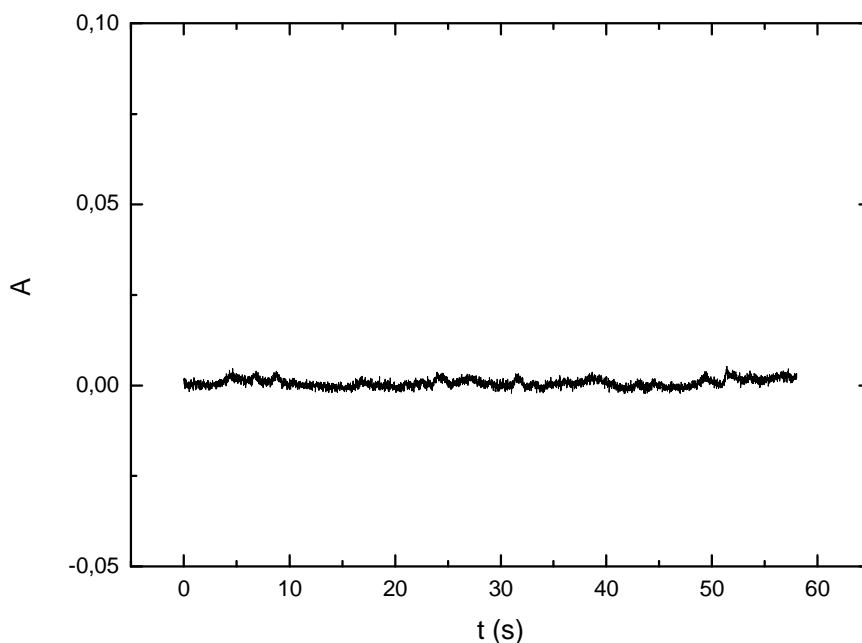
Pro použití hydroxidu sodného v podobě perel pro sušení plynné směsi obsahující methylované arsany bylo přistoupeno k sledování ztrát pro tyto sloučeniny jak ukazuje obr.3.1-7.



Obr. 3.1-7: porovnání relativního signálu (R_s), pro každou specii koncentrace $2 \mu\text{g l}^{-1}$ (aliquot A pro TMA^VO, B pro ostatní formy), pro sušidla v podobě patrony s NaOH (perly); TT-uspořádání s teflonovou trubicí (referenční signál); NaOH-patrona s hydroxidem sodným v podobě perel; hvězdička označuje relativní signál pro TMA^VO; $n = 6$; kombinované nejistoty;

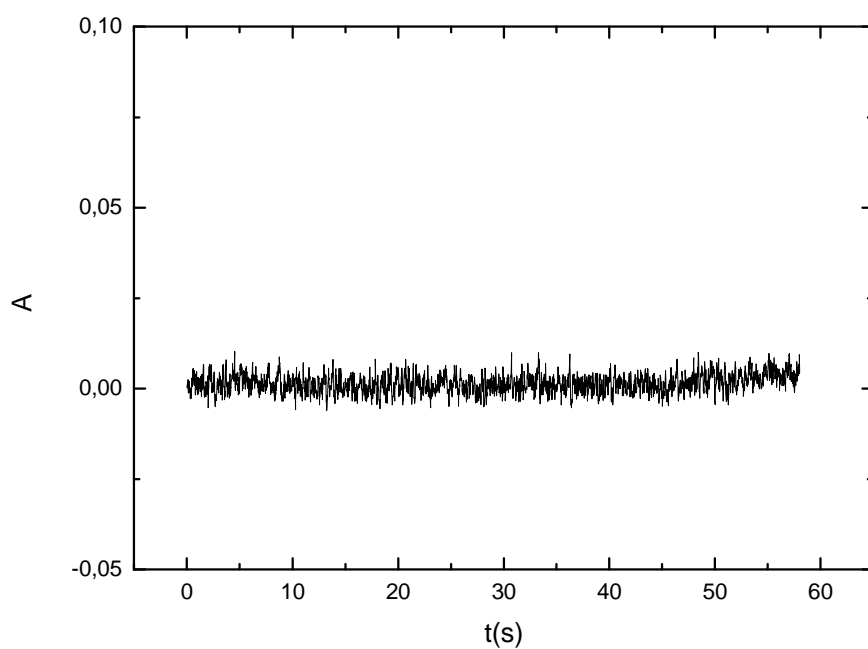
Z obr.3.1-7 je patrné, že hydroxid sodný v podobě perel nezpůsobuje oproti nafionové membráně ztráty žádné ze studovaných specií arsenu. Proto tato forma sušícího zařízení nahradila nafionovou membránu. Zařazením této sušící patrony byla účinně eliminována vodní pára a aerosol. K blokování U-trubice vymrazenou vodou nedocházelo ani po 100 měřících cyklech. Po 200 měřících cyklech došlo k snížení účinnosti sušení pozorovatelné na zvyšování pozadí v retenčních časech methylovaných forem arsenu (stejně jako v obr.3.1-2). Bylo nutné částice pevného hydroxidu spojené vlivem absorbované vody vyměnit. Část takto „slepeného“ hydroxidu činila obvykle jednu třetinu náplně celé patrony. Takto spojené částice hydroxidu sodného způsobovaly přetlak v systému HG-CT odpovídající zablokované kryogenní pasti. Po výměně těchto částí byla obnovena účinnost sušení patrony.

Další podstatná výhoda patrony s hydroxidem sodným spočívala v eliminaci nespecifické absorpce viditelné v blízkosti retenčního času pro arsan i methylovaných forem arsenu (viz. 3.1.2.2 Nespecifická absorpce). Srovnání obr. 3.1-8 a 3.1-2 to jasně prokazuje.



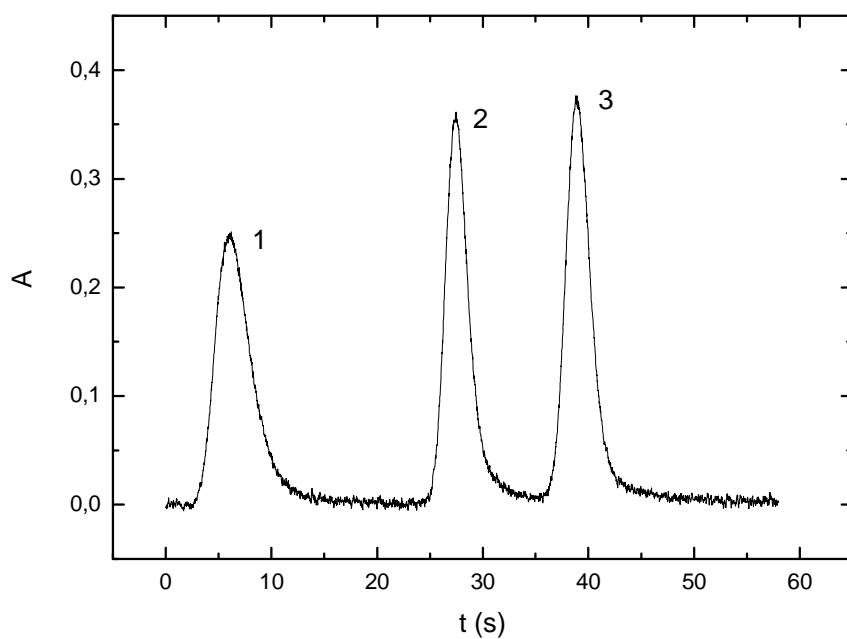
Obr. 3.1-8: chromatogram slepého stanovení získaný se zařazenou sušicí patronou s NaOH a bez DBC; (aliquot B);

V místě píků pro anorganické ani pro methylované formy nevykazuje slepý pokus žádný pozorovatelný pík ani drift. To dokazuje, že pro dosažení správných výsledků není třeba pracovat s DBC. Vzhledem k tomu, že DBC zvyšuje šum základní linie a tím negativně ovlivňuje detekční limity využitých specií, má patrona plněná pevným NaOH významný potenciál pro zlepšení detekčních limitů. Tento potenciál je ilustrován srovnáním obr. 3.1-8 s analogickým chromatogramem získaným se zapnutou DBC – viz. obr.3.1-9.

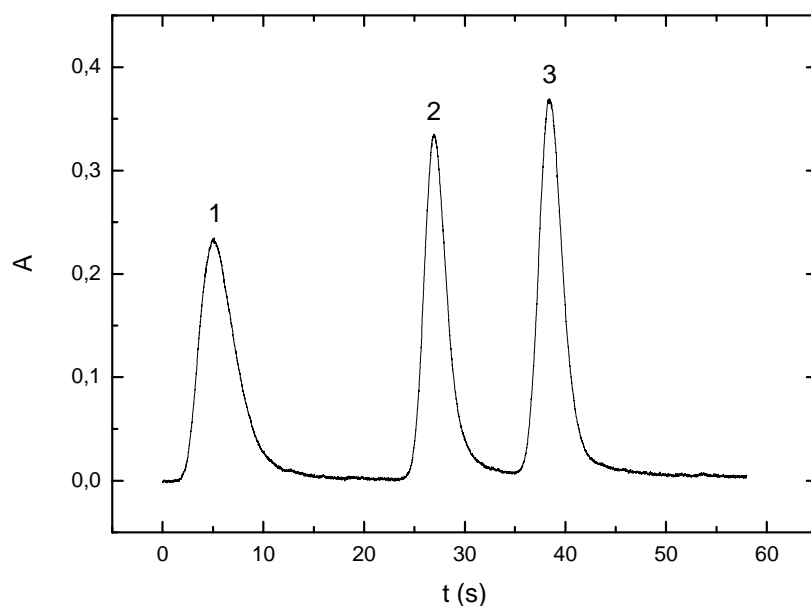


Obr. 3.1-9: chromatogram slepého stanovení získaný se zařazenou sušicí patronou s NaOH a s DBC; (alíkvot B);

Viditelné snížení šumu bez DBC je zřejmé i z porovnání chromatogramů směsných standardních roztoků (obr.3.1-10 a obr.3.1-11).



Obr. 3.1-10: chromatogram získaný se zařazenou sušicí patronou s NaOH s DBC; $2 \mu\text{g l}^{-1}$ každé formy; 1- iAs^{V} , 2- MAs^{V} , 3 - DMAs^{V} (alíkvot B)



Obr. 3.1-11: chromatogram získaný se zařazenou sušicí patronou s NaOH a bez DBC; $2 \mu\text{g l}^{-1}$ každé formy; 1- iAs^{V} , 2- MAs^{V} , 3 - DMAs^{V} (aliquot B)

Plochy píků pro jednotlivé studované arsenové specie uvádí tab.3.1-1, která ukazuje opakovatelnost záchytu a uvolnění arsenových specií.

Tab. 3.1-1: plocha (P), FWHM a výška píků (ν) jednotlivých forem; měřeno bez DBC, (aliquot A pro $\text{TMAAs}^{\text{V}}\text{O,B}$ pro ostatní formy); $n = 6$;

specie	P (s)	FWHM (s)	ν
iAs^{V}	$1,042 \pm 0,019$	$3,93 \pm 0,11$	$0,273 \pm 0,003$
MAs^{V}	$0,978 \pm 0,021$	$2,49 \pm 0,12$	$0,332 \pm 0,018$
DMAs^{V}	$1,093 \pm 0,017$	$2,67 \pm 0,17$	$0,360 \pm 0,011$
$\text{TMAAs}^{\text{V}}\text{O}$	$0,876 \pm 0,017$	$2,68 \pm 0,02$	$0,296 \pm 0,004$

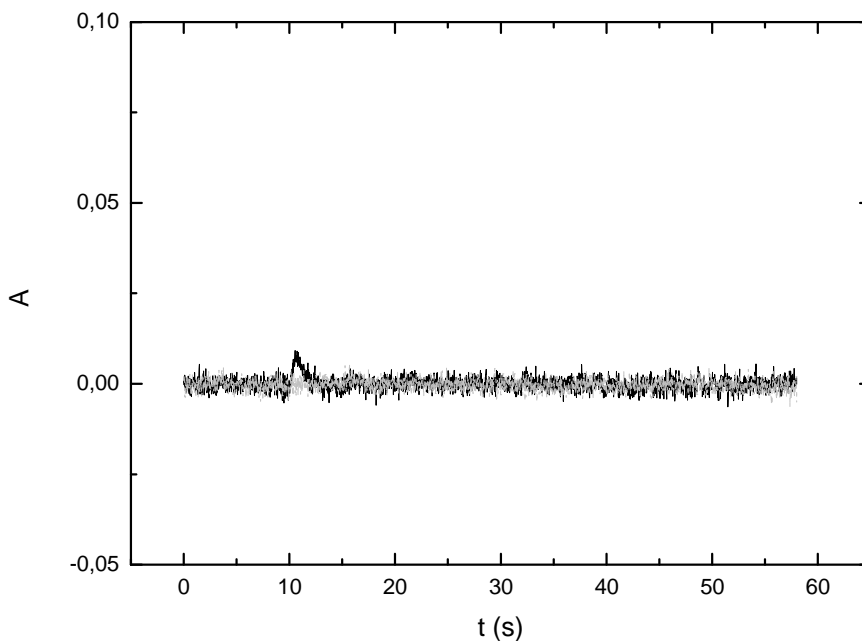
Využitím sušicí patrony s hydroxidem sodným lze tedy nejen eliminovat problémy s vymrazováním vodní páry a aerosolu v kryogenní pasti, ale také absorbovat rozkladné produkty L-cysteinu, které způsobují nespécifickou absorpci v chromatogramu.

3.1.3 Detekční limity

Určení detekčních limitů pro jednotlivé formy arsenu bylo provedeno se zařazenou sušicí patronou s hydroxidem sodným. Nespécifická absorpce v retenčním čase arsenu

pocházející z rozkladných produktů L-cysteinu a vodní páry byla eliminována uvedenou patronou (viz. 3.1.2.4 Sušení s patronou s hydroxidem sodným).

Vzhledem k uspořádání hydridového generátoru dochází ke smísení TRIS pufru a slepého vzorku s L-cysteinem před reakční cívkou. Tím, že L-cystein nestihne zredukovat veškerý iAs^V obsažený v TRIS pufru za dobu než reakční směs dosáhne separátoru fází je pozorována kontaminace v chromatogramu způsobená pouze iAs^{III} obsaženém v TRIS pufru. Opakovaným používáním zásobních lahví ke skladování tohoto pufru se hodnota slepého pokusu zvyšovala. V důsledku tohoto zjištění bylo přistoupeno k použití nové zásobní láhve při každé přípravě zásobního roztoku TRIS pufru. Tímto byla hodnota slepého pokusu významně snížena. V retenčním čase arsanu nebyla nadále pozorována významná kontaminace viz. obr.3.1-12.



Obr. 3.1-12: porovnání slepých pokusů; s kontaminací (černá čára), po odstranění kontaminace (šedá čára); složení měřeného roztoku pro slepý pokus: 2% roztok L-cysteinu-HCl v deionizované vodě; s DBC, (aliquot B)

Díky odstranění kontaminace iAs a vyloučení DBC způsobující zhoršení detekčních limitů pro jednotlivé formy bylo možné dosažení ničím neovlivňované základní linie chromatogramu slepého stanovení jak dokládá obr.3.1-8 a tím i snížení detekčních limitů jak dokládá následující tab.3.1-2 pro sloupec bez DBC.

Tab. 3.1-2: porovnání LOD pro studované specie bez a s DBC; (n=6); pro sušení plynné směsi patronou s NaOH; (aliquot A pro TMA^VO, B pro ostatní formy)

forma	LOD s DBC (pg)	LOD bez DBC (pg)
iAs ^V	29	23
MAs ^V	23	19
DMA ^V s	28	21
TMA ^V O	38	35

Z tab.3.1-2 vyplývá snížení detekčních limitů pro jednotlivé formy arsenu o jednotky pg s měřením bez DBC v porovnáním s detekčními limity s DBC. V případě zařazení patrony s NaOH (viz. 3.1.2.4 Sušení patronou s hydroxidem sodným) lze tedy měřit bez DBC a tím lze snížit šum základní line, která má vliv právě na detekční limity pro jednotlivé arsenové formy.

Získané detekční limity znamenají výrazné zlepšení oproti dosaženým detekčním limitům v literatuře pro podobná uspořádání HG-CT-AAS 0,2 – 0,6 ng [41], 0,2 – 0,4 ng [12] 0,5 – 0,9 ng [120], 0,2 – 0,5 ng [108]. Velký podíl na dosažení takto nízkých detekčních limitů má použití multiatomizátoru díky malému poměru signálu k šumu základní linie. Pro alternativní často využívané přístupy bez generování hydridů jako je spojení HPLC-ICP MS byly stanoveny detekční limity mezi 0,4 – 1,0 ng [121] nebo 0,3 – 1,1 ng [98] pro všechny formy kromě TMA^VO. Ve srovnání s literaturou jsou naši dosažené detekční limity mimořádně nízké nadto s poměrně levnou instrumentací ve srovnání s citovanou.

3.2 Speciační analýza arsenu v buněčných suspenzích pomocí HG-CT-AAS

Metoda záchytu vymrazováním s chromosorbem plněnou skleněnou U-trubicí byla využita pro studium generování hydridů arsenu z buněčných suspenzí myších jater bez mineralizace vzorku před analýzou. Důvodem studia dávkování buněčné suspenze (tzv. slurry sampling) do generátoru hydridů byla potřeba zachování speciační informace. Další výhodou byla zjednodušená úprava vzorku před analýzou a tím i urychlení analýzy.

Buněčné suspenze myších jater byly získány z myší vystavených 50 mg l⁻¹ iAs^{III} v pitné vodě. Pro potřeby studia generování hydridů ze suspenzí biologických vzorků byl třeba vzorek obsahující jednotlivé arsenové specie v dostatečné koncentraci. Díky

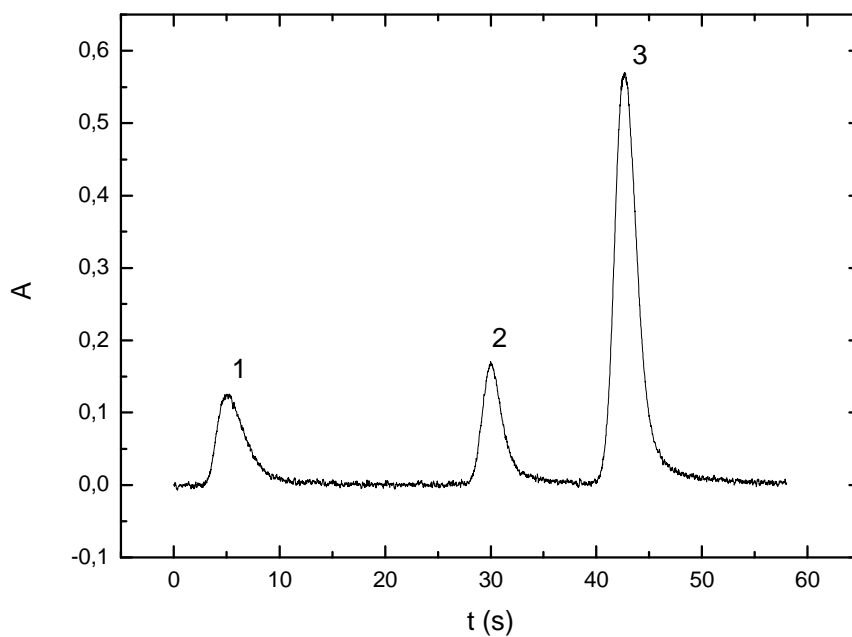
spolupracujícímu pracovišti Dr. Stýbla (viz. 2.9 Buněčné suspenze – slurry sampling) byly získány odpovídající vzorky. Tyto vzorky byl uchovávány při teplotě -80°C. Skladováním při vyšších teplotách byly zjištěny přeměny arsenových specií nejvíce DMAs^{III} na DMAs^V již po jednodenním skladování [118].

Pro analýzu standardních roztoků připravených v deionizované vodě či vzorky různých druhů vod byl systém hydridového generátoru i přístup předredukce vzorku L-cysteinem již optimalizován (viz. 3.1 Vývoj systému HG-CT-AAS pro speciální analýzu arsenu) a prokázal schopnost dosahovat velmi nízkých detekčních limitů (viz. 3.1.3 Detekční limity), které jsou pro vzorky tkání vzhledem k dostupnému množství kritickým parametrem. Pro zamýšlenou analýzu buněčných suspenzí bylo nutné experimentální parametry metody HG-CT-AAS optimalizovat. Přístup generování hydridů byl založen na předredukci vzorku L-cysteinem (viz. 2.4.1 Selektivní generování hydridů založené na předredukci L-cysteinem).

3.2.1 Dávkování buněčných suspenzí

Uspořádání generátoru hydridů pro jednoduché vodné matrice je uvedené na obr. 2.3-1. Pro dávkování buněčných suspenzí bylo nutné toto uspořádání modifikovat. Rozdíl mezi generátorem hydridů použitým pro vzorky vod a generátorem hydridů použitým pro dávkování buněčných suspenzí spočíval v technice dávkování vzorku. Schéma na obr. 2.3-2 představuje modifikované uspořádání hydridového generátoru. Dávkovací smyčka jednotky FIAS 400, která se vzorky buněčných suspenzí zanášela byla nahrazena pipetovací špičkou napojenou na kanál pro vzorek. Tímto způsobem bylo usnadněno i čištění eventuálně celá výměna systému po adsorpci zbytků buněk na stěnách hadiček.

Typický chromatogram reflektující obvyklý obsah celkový arsenových specií v použitých vzorcích buněčných suspenzí ukazuje obr.3.2-1.

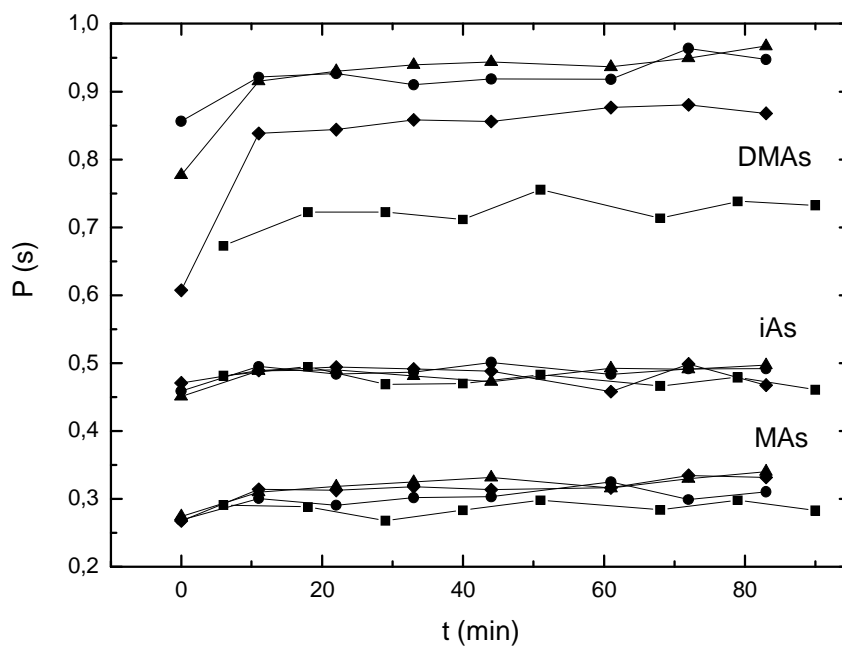


Obr. 3.2-1: typické zastoupení jednotlivých forem arsenu ve vzorku buněčné suspenze; 1- iAs, 2- MAs, 3 – DMAs (aliquot B)

Zastoupení DMAs bylo ve všech použitých vzorcích buněčné suspenze v této práci vyšší než ostatní formy arsenu.

3.2.2 Optimalizace předredukce vzorku

Pro ověření předredukce vzorku redukčním činidlem L-cysteinem před analýzou byla studována doba předredukce vzorku a koncentrace L-cysteinu. Následující závislost demonstruje vlivy doby předredukce a koncentrace L-cysteinu na plochy píků jednotlivých specií arsenu ve vzorku.



Obr. 3.2-2: závislost plochy píku (P) na době předredukce vzorku (t) s různými koncentracemi redukčního činidla - L-cysteinu; -■- 0,5 % L-cystein, -◆- 1 % L-cystein, -●- 2 % L-cystein, -▲- 4 % L-cystein; n = 1;

Z obr.3.2-2 je patrná dostačující doba předredukce vzorku L-cysteinem. Po 20 minutách předredukce vzorku L-cysteinem dochází k ustálení signálů a to jak pro všechny formy arsenu tak pro všechny sledované koncentrace L-cysteinu. V případě koncentrací 2 a 4 % L-cysteinu jsou pro všechny arsenové formy plochy píků po minimální potřebné době redukce vzorku 20 minut ustálené. Pro koncentraci L-cysteinu 0,5 a 1 % je signál pro DMAs nižší. Toto je pravděpodobně způsobeno nedostatečnou redukcí DMAs^V na DMAs^{III} v důsledku nedostatečné koncentrace redukčního činidla. Z tohoto důvodu byl pro předredukci vzorků buněčných suspenzí použit 2% L-cystein.

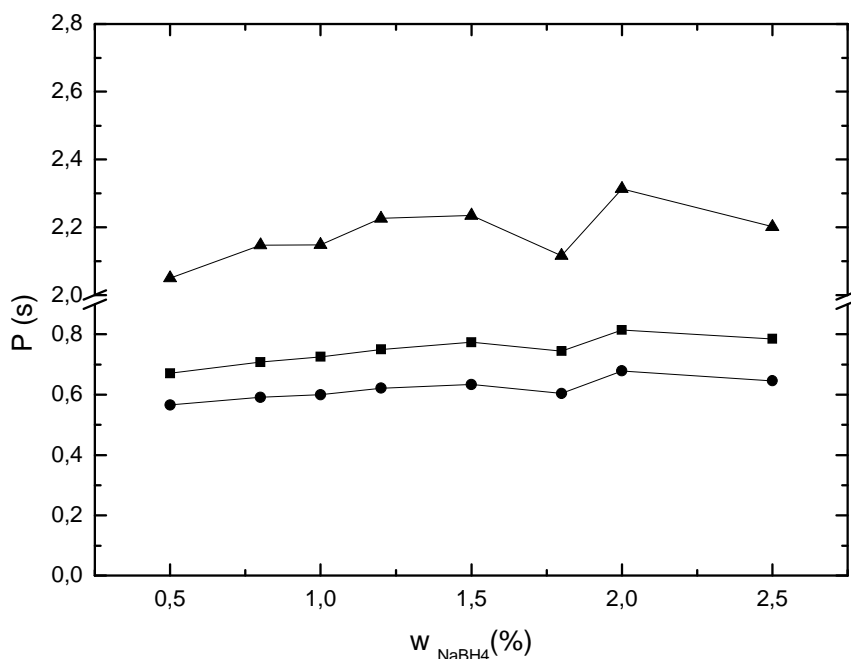
Podstatná část anorganické a methylované formy arsenu v jaterní tkáni je ve formě třímocných sloučenin (opakovaný experiment s bodem bez přídavku L-cysteinu, uskutečněný na spolupracujícím pracovišti Department of Nutrition, University of North Carolina at Chapel Hill, USA). Pro DMAs byla pozorována shoda plochy píku bez předredukce i s předredukcí tudíž téměř veškerý obsah DMAs je v třímocné formě. Toto také potvrzuje účinnou formu skladování vzorků obsahující DMAs^{III}.

Pro další experimentování s buněčnou suspenzí byla zvolena optimální doba předredukce 60 minut z důvodu jistoty redukce všech pětímocných forem na třímocné stejně jak je tomu u vodné matrice (viz. 3.1.1.2 Selektivní generování hydridů založené na

předredukci L-cysteinem). V případě vzorku buněčné suspenze s vyšším obsahem pětimocných forem arsenu než trojmocných by vzhledem k matici 20 minut na předredukci nemuselo být dostačující. Proto byl využit postup předredukce pro alikvot B (2.4.1 Selektivní generování hydridů založené na předredukci L-cysteinem).

3.2.3 Optimalizace koncentrace tetrahydroborátu sodného

Pro nalezení optimálních podmínek generování byla studována koncentrace tetrahydroborátu sodného. Následující obr. 3.2-3 demonstruje závislost plochy píku na koncentraci tetrahydroborátu.

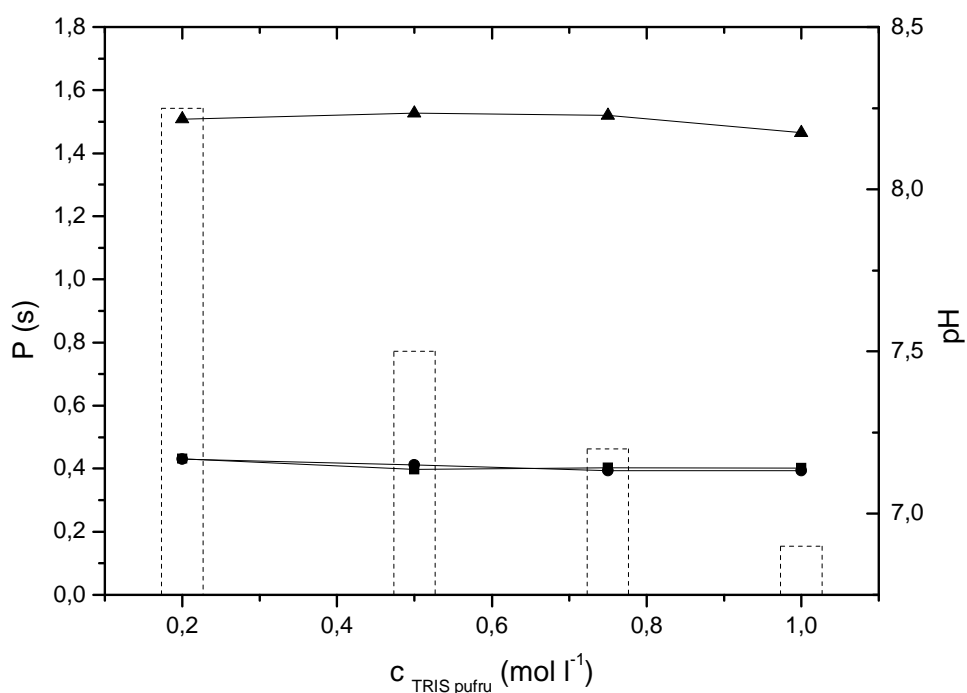


Obr. 3.2-3: závislost plochy píku (P) jednotlivých forem na koncentraci tetrahydroborátu (w); -■- $i\text{As}^{\text{V}}$, -●- MAs^{V} , -▲- DMAs^{V} (aliquot B); RSD $\leq 1,5\%$; n = 3;

Závislost dokazuje malý vliv koncentrace tetrahydroborátu sodného na plochu píku jednotlivých forem. Důkazem robustnosti přístupu je porovnatelná citlivost v širokém rozpětí koncentrace tetrahydroborátu. Tudíž pro generování hydridů pro uvedený typ vzorků byl nadále používán 1% tetrahydroborat sodný v 0,1% KOH. Kvůli zabránění pění reakční směsi bylo přidáno 250 μl 10% antifoam emulze na 50 ml 1% roztoku tetrahydroborátu.

3.2.4 Optimalizace koncentrace TRIS pufru

Další nutnou optimalizací pro generování hydridů arsenu z buněčných suspenzí byla koncentrace TRIS pufru. S buněčnou suspenzí byla sledována závislost plochy píku pro uvedené specie na koncentraci TRIS pufru v rozmezí 0,2–1,0 mol l⁻¹. Popsanou závislost ukazuje obr. 3.2-4.



Obr. 3.2-4: vliv koncentrace TRIS pufru na plochu píku (P) pro jednotlivé formy arsenu; -■- $i\text{As}^{\text{V}}$, -●- MAs^{V} , -▲- DMAs^{V} (aliquot B); sloupcový graf představuje hodnoty pH reakční směsi po skončení analýzy; RSD $\leq 1,5\%$; n = 3

Z Obr. 3.2-4 vyplývá, že se změnou koncentrace TRIS pufru se významně nemění plocha píků jednotlivých forem i v případě velkého rozpětí pH reakčního prostředí od 6,9 do 8,3. Jedná se o další důkaz robustnosti tohoto přístupu generování hydridů pro tento typ vzorků.

3.2.5 Detekční limity pro buněčné suspenze s AAS

Metoda přidavku standardu byla použita pro získání rovnice kalibrační přímky pro měření s buněčnou suspenzí. Paralelně byla získána rovnice kalibrační přímky vodných standardů a obě směrnice porovnány jak dokládá následující tabulka.

Tab. 3.2-1: směrnice ($s \mu\text{g}^{-1} \text{l}$) \pm směrodatná odchylka pro jednotlivé arsenové formy v buněčné suspenzi a vodných standardních roztocích, $n = 3$, (alíknot B)

forma arsenu	vodné roztoky	buněčné suspenze
iAs ^V	0,585 \pm 0,006	0,591 \pm 0,003
MAs ^V	0,553 \pm 0,022	0,593 \pm 0,019
DMA ^V	0,600 \pm 0,006	0,584 \pm 0,003

Porovnáváním směrnic pro dávkování buněčných suspenzí a pro vodné standardní roztoky byla studována možnost využití externí kalibrace vodnými standardními roztoky pro účely měření buněčných suspenzí. Tab.3.2-1 dokazuje velmi dobrou shodu směrnic pro oba typy kalibrace tudíž externí kalibraci lze využít. Detekční limity pro jednotlivé formy arsenu ukazuje následující tabulka.

Tab. 3.2-2: detekční limity pro buněčné suspenze získány z kalibrační přímky metody přidavku standardu; $n = 3$; (alíknot B); s DBC

forma arsenu	buněčné suspenze (pg)	buněčné suspenze (ng g ⁻¹ tkáně)
iAs ^V	21	8,5
MAs ^V	15	6,0
DMA ^V	47	17

Obsahy jednotlivých arsenových forem v původní 10% buněčné suspenzi byly 99,2 ng iAs, 60,0 ng MAs a 191,7 ng DMA^V na jeden gram tkáně (mokrý váhy) pro vzorky využití při studiu předredukce L-cysteinem. U všech použitých vzorků buněčných suspenzí převažoval dvojnásobně až trojnásobně obsah DMA^V nad ostatními formami. Obsah trimocných methylovaných forem dominoval nad ostatními formami arsenu. DMA^V nebyla v žádném ze vzorků detekována. Detekční limity jsou v porovnání s detekčními limity pro vodné standardní roztoky v tab.3.1-2. srovnatelné. Popsaná metodika byla úspěšně použita pro stanovení jednotlivých forem arsenu i v moči a lyzátech buněk odloučených ze stěny močového měchýře (izolovaných z moči centrifugací) [118].

Na základě uvedených experimentů byl získán přístup ke speciaci arsenu ve vzorcích tkání a buněk získaných v populačních studiích. Vyvinutá metoda dávkování buněčné suspenze přímo do systému hydridového generátoru je unikátní a vytváří předpoklady pro významný pokrok v oboru toxikologie arsenu. Alternativní přístupy založené na metodách kapalinové chromatografie jsou pro přímou analýzu tkání nepoužitelné. Pro využití HPLC je nutné arsenové formy extrahovat různými rozpouštědly či jejich směsí závisící na typu vzorku [122]. Existují i speciální nové druhy extrakce arsenových forem polypropylénovými dutými vlákny například z kuřecí tkáně bez následného generování hydridů ve spojení s HPLC-ICP MS. Detekční limity pro citované spojení s velmi drahou instrumentací a časově náročnou extrakcí jsou 1,1-6,5 ng g⁻¹ kuřecí tkáně bez rozlišení mocností jednotlivých forem [123] a jsou porovnatelné s dosaženými detekčními limity v této práci. Dalším porovnatelným přístupem je extrakce pomocí mikrovlnného záření a s generováním hydridů ve spojení s AAS s atomizací v grafitové kyvetě. S tímto přístupem byly dosaženy detekční limity 3,5 – 5,4 ng g⁻¹ jednotlivých forem v rybí tkáni bez rozlišení mocností jednotlivých forem [124]. Nicméně přístup s generováním hydridů arsenu přímo ze vzorků tkáně bez mineralizace či extrakce dosud neexistoval. Neocenitelnou výhodou vyvinutého přístupu jsou tedy nízké detekční limity. Další, neméně podstatnou výhodou, je analýza malého množství vzorku, což je často zásadní v případě toxikologických aplikací, například u zmíněných buněk z močového měchýře [118]. Avšak hlavní předností vyvinutého přístupu je poskytnutí informace o toxických a zároveň velmi nestabilních MAs^{III} a DMAs^{III}, což s metodami založenými na rozkladu vzorku před analýzou nelze uskutečnit.

3.3 Vývoj kryogenní pasti

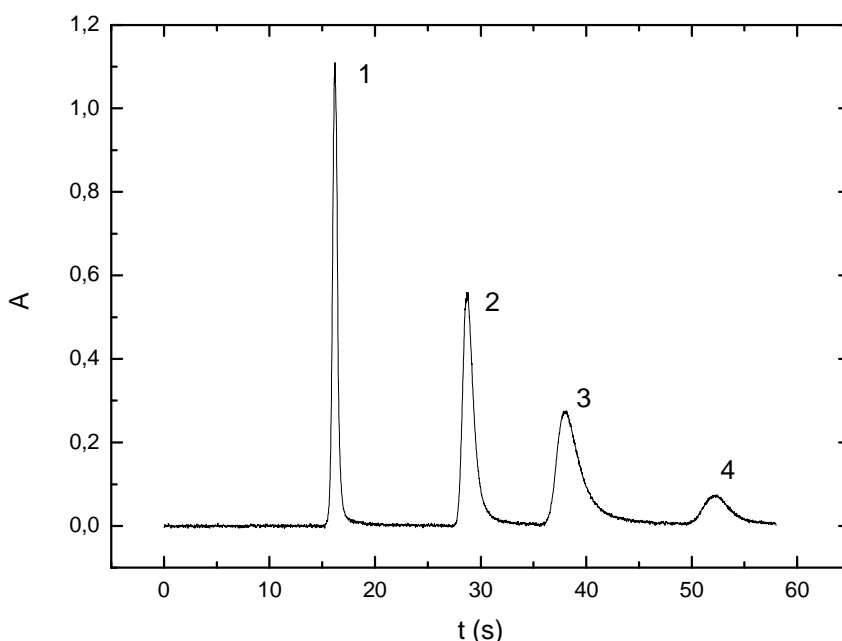
Důležitým parametrem chromatogramu je rozlišení. Pro zvýšení rozlišení byl studován odlišný materiál kryogenní pasti - křemenné sklo. Tento materiál je oproti dosavadnímu použitému borosilikátovému sklu tepelně vodivější a mechanicky odolnější [125]. Vyšší tepelná vodivost křemenného skla slibuje nižší „setrvačnost“ ohřevu U-trubice a rovnoměrnější ohřev v celé délce U-trubice. Použití křemenného skla, nového materiálu U-trubice, jeho výhody a nevýhody jsou diskutovány.

Pro další vylepšení systému kryogenní pasti bylo nutné ověřit stoprocentní účinnost záchytu i uvolnění z kryogenní pasti v podobě U-trubice. Pro tyto účely byl využit

radionuklid $^{73,74}\text{As}$ dále uváděný jako radioindikátor. Studium účinnosti záchytu a uvolnění i distribuce radionuklidu v U-trubici jsou uvedeny v druhé části této kapitoly.

3.3.1 Využití křemenné U-trubice

Křemen má vyšší tepelnou vodivost než sklo použité pro U-trubici tudíž se jedná o vhodnější materiál U-trubice pro rychlejší a rovnoměrnější ohřev. Důkazem jsou užší a vyšší píky při použití křemenné U-trubice než skleněné U-trubice jak ukazuje následující obrázek.



Obr. 3.3-1: chromatogram s křemennou U-trubicí při optimalizaci teplotního programu pasti; 1- iAs^{V} , 2- MAs^{V} , 3 – DMAs^{V} , 4 – $\text{TMA}^{\text{V}}\text{O}$; koncentrace každé formy $2 \mu\text{g l}^{-1}$ (aliquot B)

Vzhledem ke změně materiálu bylo třeba optimalizovat teplotní program U-trubice jak ukazuje tab.2.6-2. Chromatogram na obr.3.3-1 obsahuje i $\text{TMA}^{\text{V}}\text{O}$ z důvodu optimalizace teplotního programu (viz. krok 4 tab.2.6-2). Při kroku 4 v teplotním programu pasti je ohřev vypnut a tím dojde k vyššímu rozlišení $\text{TMA}^{\text{V}}\text{O}$ než bez vypnutí ohřevu. Viditelné je značné zúžení píků hlavně pro iAs^{V} . FWHM iAs^{V} je nejnižší ze všech ostatních forem v chromatogramu (porovnej s Obr.3.1-1). Souvisejícím parametrem, který doznal zlepšení u iAs^{V} je výška píku. Následující tab.3.3-1 uvádí porovnání výšek a FWHM pro jednotlivé formy pro křemennou a skleněnou U-trubici.

Tab. 3.3-1: porovnání FWHM a výšek píku (v) jednotlivých forem pro skleněnou a křemennou U-trubicí; koncentrace každé formy $2 \mu\text{g l}^{-1}$ (aliquot A pro $\text{TMAAs}^{\text{V}}\text{O}$, B pro ostatní formy), $n = 3$

specie	FWHM	FWHM	v sklo	v křemen
	sklo(s)	křemen(s)		
iAs^{V}	$3,85 \pm 0,11$	$0,50 \pm 0,05$	$0,243 \pm 0,006$	$1,110 \pm 0,021$
MAAs^{V}	$2,41 \pm 0,03$	$1,11 \pm 0,02$	$0,356 \pm 0,004$	$0,559 \pm 0,008$
DMAAs^{V}	$2,55 \pm 0,04$	$2,40 \pm 0,04$	$0,381 \pm 0,008$	$0,276 \pm 0,009$
$\text{TMAAs}^{\text{V}}\text{O}$	$2,70 \pm 0,04$	$2,72 \pm 0,04$	$0,300 \pm 0,006$	$0,074 \pm 0,007$

Při využití skleněné U-trubice bylo časté ulomení přívodních ramen během připojování k hydridovému generátoru a atomizátoru. Křemen má vyšší mechanickou odolnost než borosilikátové sklo (uváděno v textu jen jako sklo). Nahrazení křemenným sklem bylo eliminováno časté poškození U-trubice. Ačkoliv rozlišení mezi iAs^{V} a ostatními formami je dostatečné i v případě použití skleněné U-trubice, použití křemenné U-trubice přináší vyšší rozlišení a zúžení píků bez dramatického zásahu do celého systému kryogenní pasti. Křemenná U-trubice je tedy vhodnou a jednoduchou alternativou z důvodu rychlejšího a rovnoměrnějšího ohřevu U-trubice a vzhledem k vyšší mechanické odolnosti, což je značnou výhodou při časté manipulaci se systémem kryogenní pasti.

3.3.2 Radioindikátorové experimenty – U-trubice

Pro další rozvoj HG-CT systému bylo vysoce žádoucí porozumět procesům probíhajícím při záchytu hydridů v kryogenní pasti. Pro tyto účely byla využita směs izotopů ^{73}As a ^{74}As (dále jen radioindikátor). Použití radioindikátoru skýtá řadu důležitých výhod např. určení účinnosti generování hydridu/ů, možnosti kvantifikace ztrát analytu/ů během celé analýzy od nadávkování do hydridového generátoru až po atomizaci, určení distribuce analytu v kryogenní pasti, atomizátoru apod.

Prvním experimentem uskutečněným s využitím radioindikátoru bylo studium účinnosti záchytu pro generování hydridů arsenu se záchytem v kryogenní pasti (skleněné U-trubici). Na výstupní část kryogenní pasti (U-trubici) byla připojena dvojkolona s aktivním uhlím a sledováno množství zachyceného radioindikátoru (formy $^{73}\text{AsH}_3$ a $^{74}\text{AsH}_3$) v této dvojkoloně pomocí scintilačního čítače. Pozornost byla věnována krokům záchytu i uvolnění v/z kryogenní pasti. Příklad naměřených hodnot scintilačním čítačem pro krok uvolnění ukazuje tab.3.3-2.

Tab. 3.3-2: hodnoty aktivity radioindikátoru (A_t vyjádřené v cpm – počet pulzů za minutu) pro krok uvolnění pro první polovinu zdvojené kolony s aktivním uhlím

měření č.	A_t (cpm)
1	31233
2	30880
3	31297
4	31236
5	31660
\bar{x}	31261
s	248
$s_r(\%)$	0,79

Z tab.3.3-2 vyplývá velice dobrá opakovatelnost pro tuto sadu měření s relativní směrodatnou odchylkou pod 1%. Pro ostatní sady měření byla tato situace obdobná. Naměřená hodnota pozadí tvořila přibližně tisícinu naměřené hodnoty aktivity pro vzorek s radioindikátorem.

Pro porovnání účinností zachytu a uvolnění AsH_3 v/z kryogenní pasti byly průměrné hodnoty průnikového signálu vyjádřeny v procentech a uvedeny do tab.3.3-3.

Tab. 3.3-3: procentuální vyjádření průnikového signálu radioindikátoru pro obě poloviny kolon v kroku zachytu a uvolnění, pro měření s U-trubicí; (n=5)

část kolony	záchyt (%)	uvolnění (%)
1/2	0,14±0,10	100,6±0,8
2/2	0,09±0,05	0,06±0,09

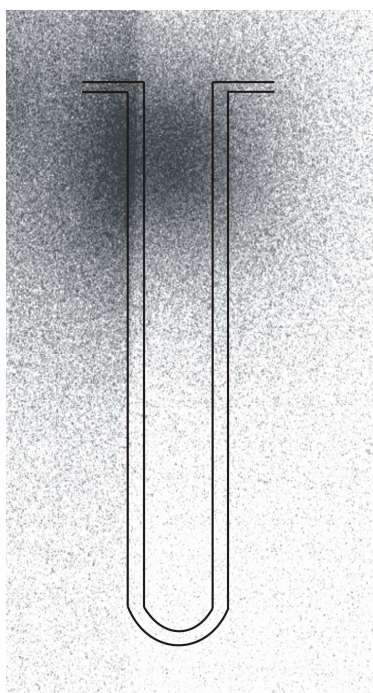
Průnikový signál reprezentuje množství prošlého radioindikátoru přes kryogenní past a následně zachyceného v dvojkolonách s aktivním uhlím. Pro stoprocentní účinnost zachytu v kryogenní pasti se tudíž musí blížit nule. Na druhou stranu pro úplné uvolnění je nutné dosažení sta procent pro průnikový signál. Pokud je v kroku uvolnění dosaženo 100% signálu je ověřeno minimální zadržování radioindikátoru v koloně a zároveň je potvrzeno, že nedochází ke ztrátám analytu během celého procesu analýzy.

Z tab. 3.3-3 jsou zřejmé stoprocentní účinnosti zachytu i uvolnění radioindikátoru v/z v typu kryogenní pasti - U-trubice plněné chromosorbem s nízkými relativními směrodatnými odchylkami. Tímto experimentem je potvrzena funkce U-trubice jako

dokonalého zařízení pro záchyt forem arsenu fungující za optimálních podmínek. Dále je zřejmá funkce dvojkolon s aktivním uhlím. První polovina kolony dokáže se stoprocentní účinností zachytit veškerý radioindikátor prošlý kryogenní pastí a ve druhé polovině tudíž není detekováno žádné množství radioindikátoru.

Využití radioindikátoru poskytuje dokonalý nástroj k určení účinnosti záchytu a uvolnění v/z kryogenní pasti. Při experimentování s tímto radioindikátorem lze proměřit i jednotlivé části aparatury v případě transportních ztrát a určit tak přesně místo kde dochází k významným ztrátám.

V souvislosti s uvedenými výhodami lze tento radioindikátor využít pro sledování distribuce AsH_3 v kryogenní pasti v podobě U-trubice s použitím metody autoradiografie. Pro experiment s U-trubicí byl opět využit výše zmíněný radioindikátor ovšem s vyšší aktivitou 20 kBq. Přiložením U-trubice se zachyceným radioindikátorem k autoradiografické desce a po vyvolání pomocí Fuji Bas Scanneru byl pořízen následující obrázek obr.3.3-2.



Obr. 3.3-2: Distribuce radioindikátoru v U-trubicí (naznačeno černou čarou) v kroku záchytu; obrázek získaný metodou autoradiografie

Tmavší oblast na vstupu U-trubice reprezentuje místo, kde dochází k záchytu většiny $^{73,74}\text{AsH}_3$. Vzhledem k šumu pozadí však nelze vyloučit zachycení menší části arsenu v jiné části U-trubice.

Tento experiment vypovídá i o chování neaktivního arsenu. Vzhledem k 100% účinnosti záchytu pro AsH_3 s bodem varu při -55°C lze předpokládat, že pro methylované formy, které mají vyšší bod varu (viz.Tab.1.1-1) bude docházet k záchytu se stejnou účinností.

3.4 Miniaturizace kryogenní pasti

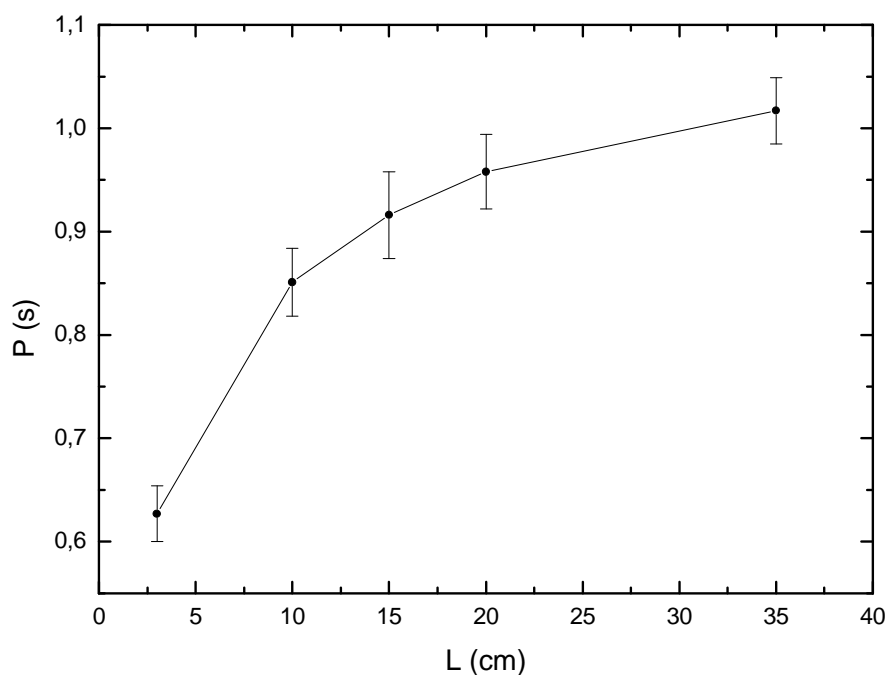
Výše popsané radioindikátorové experimenty dokazují, že arsen je kvantitativně zachycen v U-trubici. Autoradiografický experiment pak naznačuje, že arsen je, alespoň z převážné části, zachycen v malém prostoru již ve vstupní části U-trubice chlazené kapalným dusíkem. To vede k závěru, že doposud užívanou kryogenní past U-trubici lze miniaturizovat ať už zkrácením a/nebo zúžením U-trubice, či úplnou změnou designu pasti.

Miniaturizace doposud užívané kryogenní pasti byla jedním z hlavních cílů této práce. Dosavadní systém U-trubice (viz. obr.2.6-1) je robustní zařízení, u kterého je obtížné řízení teploty. Vlivem tloušťky stěny, vnitřního průměru U-trubice a její náplně dochází k nestejnému ohřevu stěny a středu U-trubice a zároveň dochází k „setrvačnosti ohřevu“ tzn. zpoždění změny teploty vlivem pomalé prostupnosti tepla přes stěnu a náplň U-trubice. Tyto parametry U-trubice mají vliv na rozmývání píků stejně jako délka U-trubice. Z radioindikátorových experimentů je patrné možné snížení délky U-trubice. Snížením délky event. vnitřního průměru a tloušťky stěny U-trubice by bylo možné přesněji kontrolovat teplotu uvnitř pasti a tím kontrolovat výšku, FWHM a retenční čas píků jednotlivých forem arsenu. Ideálním případem by bylo nalezení takového designu kryogenní pasti, aby chlazení a tím i záchyt probíhal na objemově malé části pasti. V případě úplného záchytu a úplného uvolnění analytu/ů na/ze stěny kryogenní pasti by bylo možno uskutečnit připojení k plynovému chromatografu a oddělit tak oba děje nutné pro speciální analýzu arsenu tzn. záchyt v kryogenní pasti a separaci jednotlivých forem. Výhodou je na jedné straně možnost nezávislé optimalizace pro záchyt a uvolnění v/z kryogenní pasti a možnost měnit podmínky pro separaci v plynovém chromatografu na druhé straně. Podmínkou k využití plynového chromatografu je uvolnění analytů z kryogenní pasti ve velmi malém objemu, aby došlo k „rychlému nástřiku“ na kolonu chromatografu. Následující experimenty studují možnosti miniaturizace dosavadní kryogenní pasti - U-trubice a nové designy a materiály pro miniaturizované uspořádání kryogenní pasti. Vzhledem k stabilitě $i\text{As}^V$ a z důvodu nejnižšího bodu varu

vygenerovaného arsanu z této formy byla tato forma použita i pro studium nových designů kryogenních pastí.

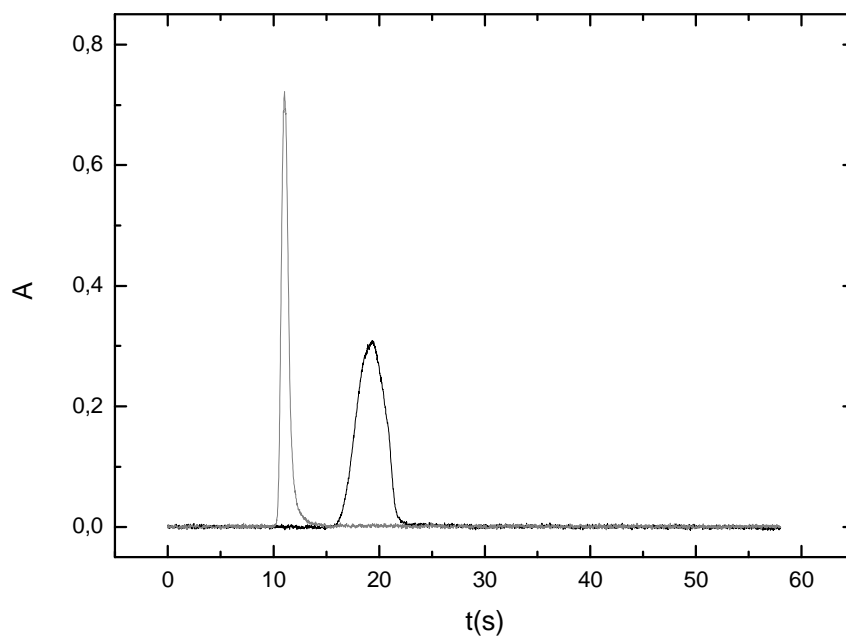
3.4.1 Možnosti miniaturizace U-trubice

Pro potřeby miniaturizace bylo třeba určit nejmenší možnou délku kolony, se kterou není negativně ovlivněna účinnost záchytu eventuálně účinnost uvolnění pro jednotlivé specie. Určená závislost byla získána pomocí ponořování běžně používané U-trubice do kapalného dusíku a po proběhnutí kroku záchytu byl uskutečněn krok uvolnění dle standardního nastavení (viz. 2.6.1 Skleněná U-trubice). Získanou závislost demonstruje obr.3.4-1.



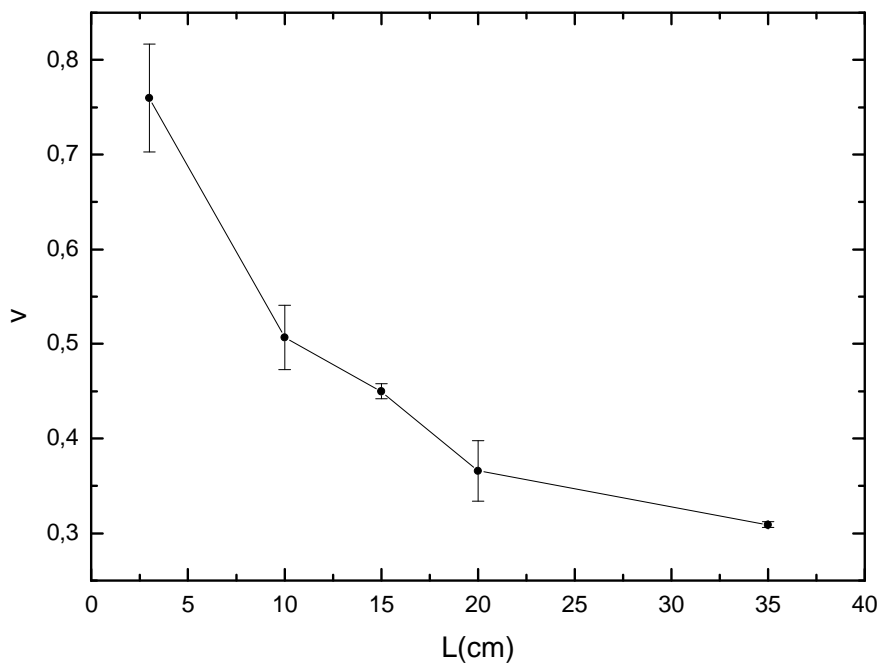
Obr. 3.4-1: vliv délky ponoření U-trubice (L) na plochu píku (P) pro $2 \mu\text{g l}^{-1}$ iAs^V (aliquot B); n = 3;

Délka ponoření U-trubice v obr.3.4-1 je část U-trubice (udávaná jako délka v centimetrech) nalézající se pod hladinou kapalného dusíku. Z tohoto obrázku je zřejmý úplný záchyt arsanu až pro 20 cm délky ponoření U-trubice v kapalném dusíku. Následující obrázek ukazuje změnu tvaru a posun retenčního času píku pro nejvyšší a nejnižší délku ponoření U-trubice.

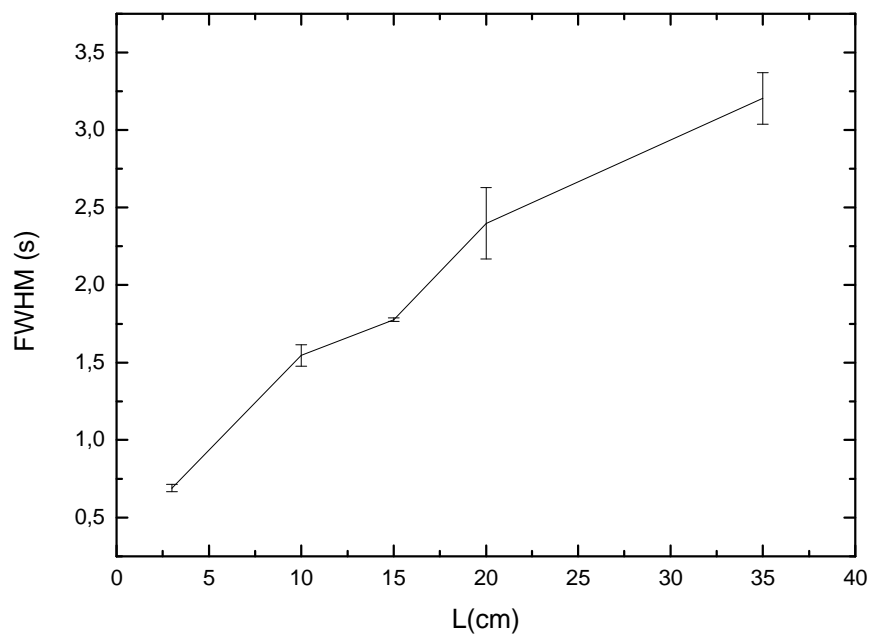


Obr. 3.4-2: porovnání píků $2 \mu\text{g l}^{-1} \text{iAs}^{\text{V}}$ pro různou délku ponoření U-trubice (aliquot B); šedá čára – délka ponoření 3 cm, černá čára – délka ponoření 35 cm

Plocha píku arsanu se mění v souvislosti s nižší účinností záchytu při malé délce ponoření. Pro poloviční délku ponoření U-trubice dochází ke snížení retenčního času arsanu přibližně o 9 s. Navíc se zmenšující se délkou ponoření dochází ke zvýšení výšky píku a s tím spojené snížení FWHM píku arsanu. Pro přehlednost byly výška a FWHM vyneseny v závislosti na délce ponoření jak dokládají následující obrázky.



Obr. 3.4-3: závislost výšky píku (v) iAs^V ($2 \mu g l^{-1}$ alikvot B) na délce ponoření U-trubice (L); $n = 3$



Obr. 3.4-4: závislost FWHM na délce ponoření U-trubice (L) pro $2 \mu g l^{-1}$ iAs^V (aliquot B); $n = 3$

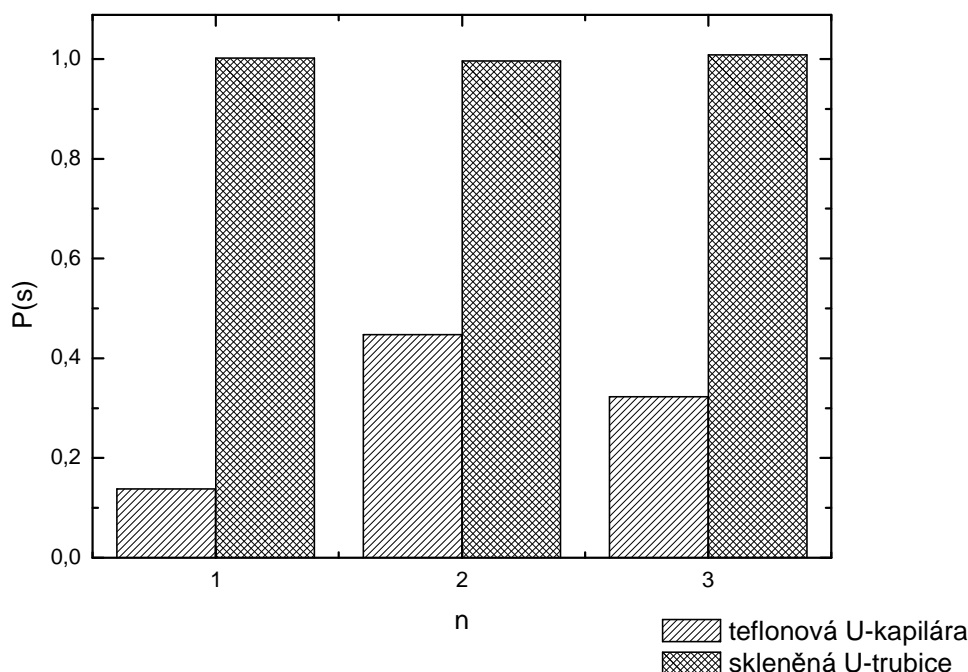
Snížení retenčního času, FWHM a zvýšení výšky píku souvisí s průchodem arsanů kratší částí U-trubice v případě nižší délky ponoření. Arsan byl v tomto případě zachycen blíže výstupní části U-trubice. Uvolnění do multiatomizátoru bylo tedy rychlejší. Tyto poznatky zásadním způsobem vypovídají o dějích odehrávajících se při záchytu hydridu a při jeho uvolnění a podporují úvahy o možných výhodách miniaturizace kryogenní pasti.

Nižší plocha arsanu pro nižší délku ponoření U-trubice nicméně vypovídá o nedokonalém záchytu. Z původní délky ponoření 35 cm U-trubice je třeba minimálně 20 cm pro úplný záchyt analytu. Zkrácení (miniaturizace) U-trubice plněné chromosorbem z 35 cm na 20 cm by tedy bylo neefektivní.

Výše diskutované experimenty dokazují, že doposud užívanou kryogenní past –
- U-trubici nelze efektivně miniaturizovat jejím zkrácením. Proto byly studovány další možnosti miniaturizace pasti změnou designu zahrnující změnu materiálu, snížení vnitřního průměru a vyloučení náplně.

3.4.2 Studium záchytu v teflonové U-kapiláře

Prvním testovaným designem miniaturní kryogenní pasti byla teflonová kapilára o vnitřním průměru 1 mm. Sušení plynné směsi z generátoru hydridů bylo zabezpečeno nafionovou membránou. Teflonová kapilára vykazovala ucpávání vymrazenou vodou po 7 minutách hydridového generování. Záchyt arsanu byl uskutečňován s ponořením 4 cm délky teflonové kapiláry v kapalném dusíku. Ohřev byl zabezpečen vinutím odporového drátu (viz. 2.6.3 Teflonová U-kapilára) shodného typu použitého u U-trubice (viz. 2.6.1 Skleněná U-trubice).



Obr. 3.4-5: porovnání ploch píků (P) jednotlivých měření (n) ; pro $2 \mu\text{g l}^{-1} \text{iAs}^{\text{V}}$ (aliquot B); pro teflonovou U-kapiláru a pro skleněnou U-trubicí plněnou chromosorbem

Z obr.3.4-5 je patrná velmi nízká plocha píku arsanu pro teflonovou U-kapiláru, která se rovná přibližně třetině hodnoty plochy píku arsanu pro skleněnou U-trubicí plněnou chromosorbem.

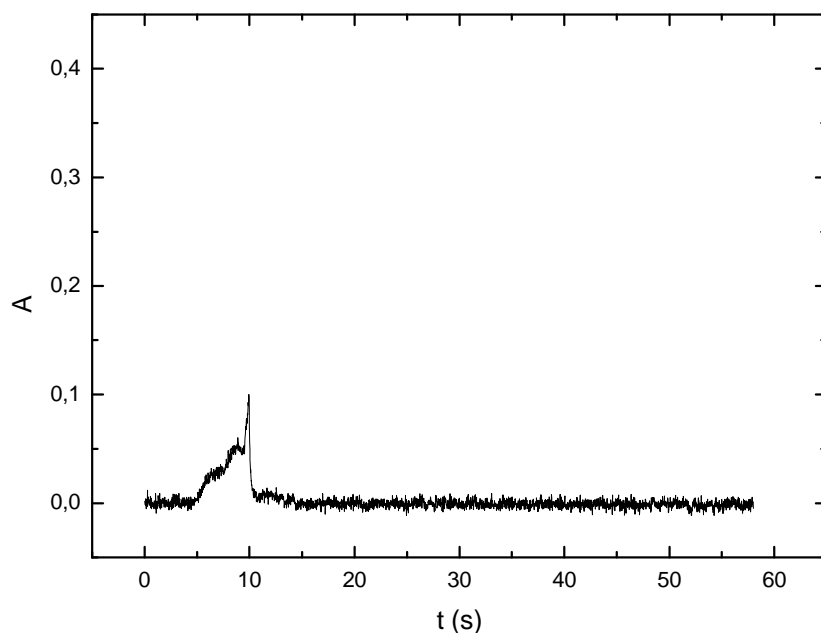
Tab. 3.4-1: plochy píků (P) a výšky píků (v) pro $2 \mu\text{g l}^{-1} \text{iAs}^{\text{V}}$ (aliquot B) pro spojení nafionové membrány a teflonové U-kapiláry (U_t) s porovnáním se skleněnou U-trubicí plněnou chromosorbem (U_s); $n = 3$

n	P (s) U_t	P (s) U_s	v U_t	v U_s
\bar{x}	0,280	1,002	0,107	0,306
s	0,135	0,006	0,009	0,003
$s_r(\%)$	48	0,6	8,9	1,0

Z tab.3.4-1 je viditelná velmi nízká opakovatelnost pro použití teflonové U-kapiláry. Relativní směrodatná odchylka 48 % vypovídá o nepoužitelnosti tohoto přístupu. Pro zajímavost jsou uvedeny v tab.3.4-1 i výšky píků arsanu, které vykazují podstatně nižší relativní směrodatnou odchylku než plochy píků.

Uvedené experimenty naznačují, že roli při zachytu hraje nejen průtok plynů, průměr a délka kryogenní pasti (viz. porovnání s U-kapilárou, 2.6.4 Křemenná

U-kapilára), ale i typ materiálu. Teflon má strukturu odlišnou od křemene či skla. Křemen (SiO_2) ať už čistý (křemenné sklo) nebo v borosilikátovém skle se pravděpodobně podílí na záchytu arsanu vznikem vodíkového můstku tudíž slabé vazby mezi kyslíkem SiO_2 a vodíkem z vygenerovaného AsH_3 či jeho methylovaných forem. Zahříváním kryogenní pasti dojde k rozrušení vodíkových můstků a uvolnění do multiatomizátoru. K záchytu arsanu a jeho methylovaných forem dochází z větší části pravděpodobně vlivem adsorbce na stěnu kryogenní pasti nebo částic chromosorbu. V teflonové U-kapiláře má arsan možnost interakce s povrchem teflonu vytvořením vodíkové vazby s fluorem ($-\text{CF}_2-\text{CF}_2-$), ale tvorba tohoto případu vodíkového můstku je pravděpodobně více energeticky náročná vzhledem k inertnosti teflonu zastávajícího energeticky výhodnou strukturu. Tímto pravděpodobně dochází ke ztrátám arsanu a nízké opakovatelnosti během záchytu arsanu v teflonové U-kapiláře. Chromatogram je uveden na obr.3.4-6.



Obr. 3.4-6: typický chromatogram pro $2 \mu\text{g l}^{-1} \text{iAs}^{\text{V}}$ (aliquot B) po uvolnění z teflonové U-kapiláry ovinuté odporovým drátem; měření s DBC; sušení plynné směsi nafionovou membránou; 4 cm z celkových 20 cm kapiláry pod hladinou kapalného dusíku

Tvar píku arsanu se s opakováním experimentu významně měnil. Plocha píku se náhodně měnila v rozsahu 0,1 do 0,4 s , ale nikdy nedosáhla hodnoty 1 s jako je tomu pro skleněnou U-trubicí.

Výsledek záchytu arsanu v teflonové U-kapiláře ukazuje nevhodnost použití tohoto designu kryogenní pasti. Požadavkem na kryogenní past je úplný záchyt a uvolnění analytu v malém objemu a dostatečnou kontrolu teploty záchytu a uvolnění. Teflonová kapilára ani jednu z těchto podmínek nesplňuje. Tloušťka stěny a materiál teflonové kapiláry způsobují setrvačnost ohřevu i když v menší míře než je tomu u U-trubice plněné chromosorbem.

Pro testování odlišného designu kryogenní pasti je nicméně vhodné vycházet z podmínek provádění záchytu a uvolnění v/z malého objemu jako tomu bylo u teflonové kapiláry. Důvodem je snadnější kontrola teploty v malém objemu. Snížením délky kryogenní pasti ponořené v kapalném dusíku se navíc zmenšuje rozmývání píků jak ukazují experimenty s U-trubicí (viz. 3.4.1 Možnosti miniaturizace U-trubice).

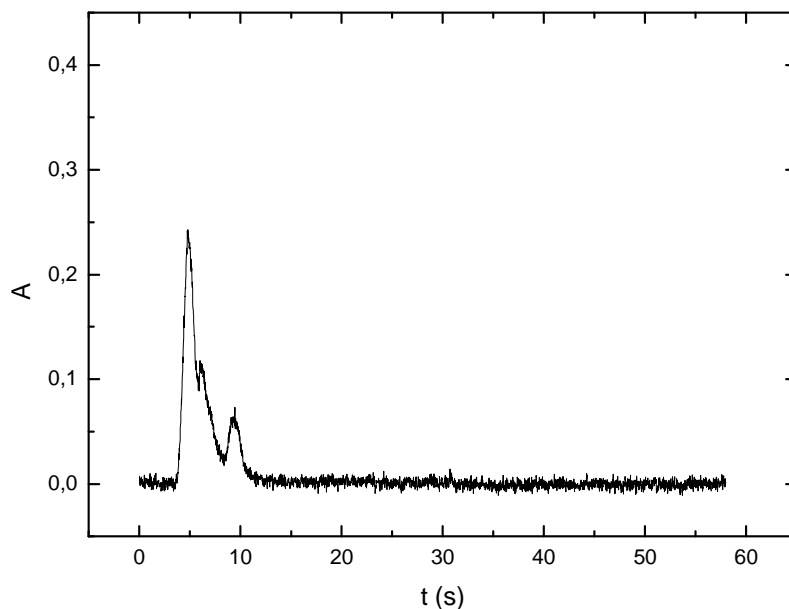
3.4.3 Studium záchytu v křemenné U-kapiláře

3.4.3.1 Vývoj uspořádání U-kapiláry

Výhodou křemenné kapiláry ve srovnání s U-trubicí plněnou chromosorbem je snížení vnitřního průměru event. délky, snížení odporu proti průtoku plynů vlivem absence náplně, tenkostěnnost a tím kratší čas pro ohřev vnitřní stěny křemenné kapiláry. Vzhledem k těmto výhodám by bylo možné lépe kontrolovat teplotu pro uvolnění analytu/ů ze stěny kapiláry a tím i řídit rozlišení píků. Další výhodou by bylo snížení přetlaku v celém systému hydridového generátoru vzhledem k absenci náplně. V souvislosti s vlivem délky ponoření U-trubice v kapalném dusíku na plochu píku (viz. 3.4.1 Možnosti miniaturizace U-trubice) lze předpokládat podobné chování i u křemenné U-kapiláry.

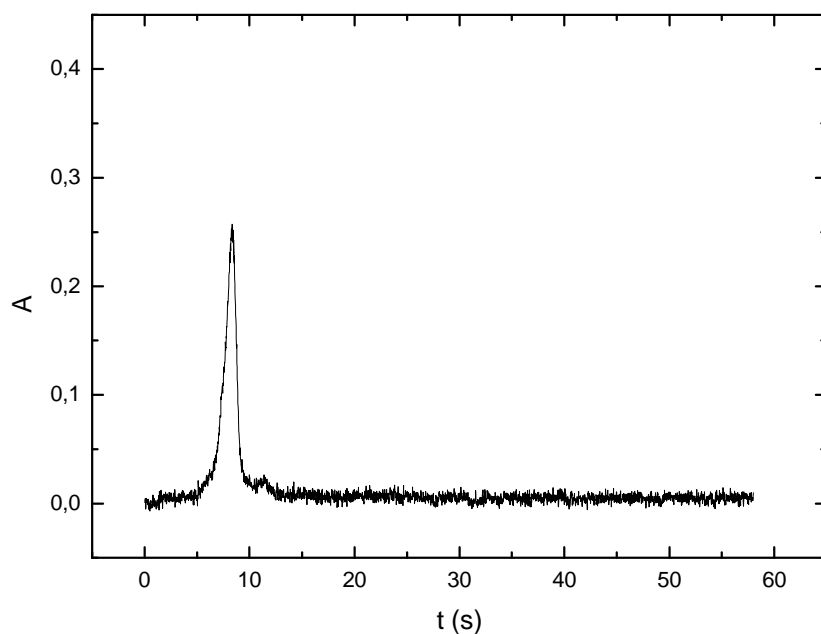
Kvůli snadnému srovnání s U-trubicí plněnou chromosorbem byla křemenná kapilára testována nejprve v podobném uspořádání. První experimenty spočívaly v použití křemenné kapiláry tvaru U vložené do teflonové trubice s vinutím odporového drátu. Sušení plynné směsi vystupující ze separátoru fází bylo zabezpečeno nafionovou membránou v kombinaci se speciálním uložením kapiláry do nádoby s kapalným dusíkem (viz. 2.6.4 Křemenná U-kapilára). Nicméně tento typ sušení nebyl vyhovující pro opakovaná měření. Během několika měření (cca 5 měření) docházelo nakumulování vody v pasti vedoucí k zablokování a znemožnění analýzy. Testování množství zachyceného arsanu probíhalo za podmínek optimalizovaných pro U-trubicí plněnou chromosorbem

(viz. 2.3 Generátor hydridů a 2.6.1 Skleněná U-trubice). Výsledkem byl záchyt s přibližně padesátiprocentní účinností (plocha píku $0,52 \pm 0,03$ s; $n = 3$). Tvar píku ukazuje obr.3.4-7.



Obr. 3.4-7: prvotní experimenty - chromatogram pro $2 \mu\text{g l}^{-1}$ iAs^{V} (aliquot B) po uvolnění z U-kapiláry ovinuté odporovým drátem; měření s DBC; sušení plynné směsi nafionovou membránou; 3 cm z celkových 20 cm kapiláry pod hladinou kapalného dusíku

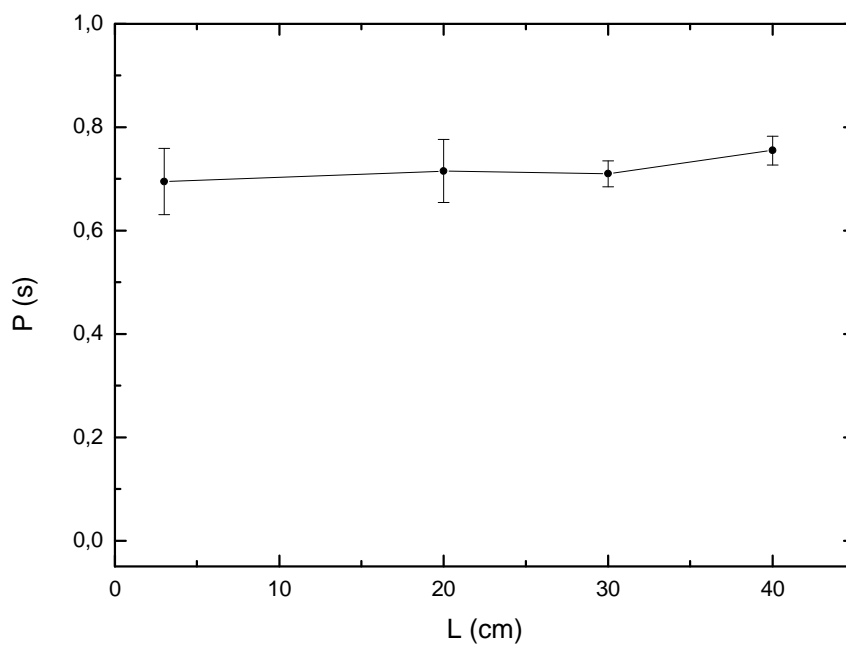
Vzhledem k tvaru píku v obr.3.4-7 bylo přistoupeno k zjednodušení technického řešení ohřevu. Výsledkem bylo použití křemenné kapiláry v teflonové trubici bez vinutí odporového drátu. Ohřev byl zabezpečen po vyjmutí kapiláry z kapalného dusíku pouze okolní laboratorní teplotou. Výsledkem byl chromatogram na obr. 3.4-8.



Obr. 3.4-8: signál pro $2 \mu\text{g l}^{-1} \text{iAs}^{\text{V}}$ (aliquot B) po uvolnění z U-kapiláry bez vinutí odporovým drátem; měření s DBC; sušení plynné směsi nafionovou membránou; 3 cm z celkových 20 cm kapiláry pod hladinou kapalného dusíku;

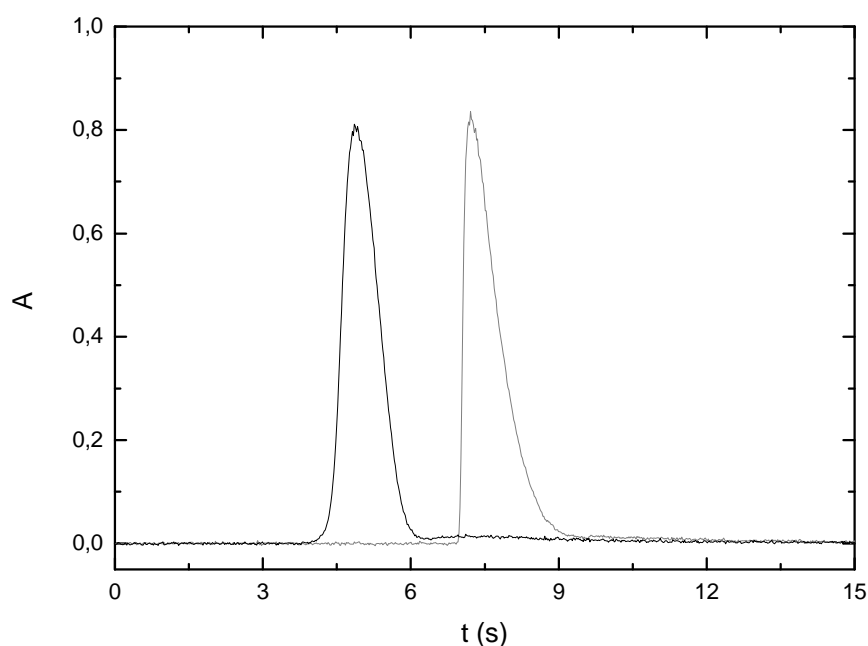
Z porovnání obr.3.4-7 a 3.4-8 je zřejmý vliv rychlosti ohřevu na tvar, výšku a FWHM píku. Z předchozího experimentu s vinutím odporovým drátem docházelo pravděpodobně k delší době ohřevu kapiláry z vnější části ohřevem odporového drátu a rozdílnou rychlostí ohřevu vnitřní stěny kapiláry vlivem průchodu plynů o laboratorní teplotě. Delší čas ohřevu má na svědomí teflonová trubice, na které bylo vinutí odporového drátu a do které byla vložena křemenná kapilára. Tato teflonová trubice tvořila oporu křemenné kapiláře při ohřevu. Po vyjmutí kapiláry tvaru U bez vložení do teflonové trubice z kapalného dusíku docházelo k přelomení z důvodu zkřehnutí kapiláry a vysokého tlaku v systému.

Pro určení nejmenší délky kapiláry ponořené do kapalného dusíku nutné k úplnému záchytu AsH_3 byl proveden analogický experiment jako s U-trubicí (viz. 3.4.1 Možnosti miniaturizace U-trubice). Výsledek ukazuje obr.3.4-9.



Obr. 3.4-9: vliv délky ponoření kapiláry (L) do kapalného dusíku na plochu píku (P) (záchyt AsH_3) pro $2 \mu\text{g l}^{-1}$ iAs^{V} (aliquot B); sušení plynné směsi nafionovou membránou; $n = 5$

Je patrný záchyt arsanu již při ponoření pouhých 3 cm délky kapiláry do kapalného dusíku. Zvětšující se délka ponoření v kapalném dusíku nemá signifikantní vliv na plochu píku tudíž i na účinnost záchytu. Stejně tak nedocházelo významně k ovlivnění výšky či FWHM píku jak ukazuje obr.3.4-10.



Obr. 3.4-10: porovnání tvaru píku pro délku ponoření U-kapiláry 3 cm (černá linie) a 40 cm (šedá linie); pro $2 \mu\text{g l}^{-1} \text{iAs}^{\text{V}}$ (aliquot B)

Posun retenčního času píku arsanu pro větší délku ponoření U-kapiláry je zřetelný na obr.3.4-10 jenž je způsoben průchodem arsanu delší částí kolony. Průběh experimentu je analogický ke stejnému experimentu s U-trubicí a s obr.3.3-2 kde je vidět posun retenčního času arsanu.

Délka ponoření U-kapiláry pro další experimentování 3 cm pod hladinou dusíku byla zvolena jako optimální. Plocha píku arsanu pro uspořádání bez odporového drátu ($0,69 \pm 0,06$ s; $n = 6$) byla v porovnání s plochou píku arsanu uvolněného z U-trubice ($1,03 \pm 0,02$ s; $n = 6$) přibližně o 30 % nižší. Transportní ztráty arsanu mezi U-kapilárou a multiatomizátorem lze vyloučit ze srovnání se systémem s U-trubicí místo U-kapiláry. Nižší plochu píku arsanu lze přičíst pravděpodobně netěsnosti systému a/nebo nedostatečnému způsobu sušení (nafionová membrána). Těsnost celého systému byla kontrolována hmotnostním průtokoměrem s vestavěným tlakovým senzorem. Nanesením roztoku detergentu na sledované místo možného úniku při zvýšení tlaku (cca 20 PSI) bylo využito pro odhalení malých netěsností systému. I přes pečlivou kontrolu celé aparatury nicméně nelze velmi malé úniky vyloučit.

Způsob sušení nafionovou membránou dostatečně neeliminoval vodní páru vystupující ze separátoru fází a tak mohlo docházet k zachycení části arsanu v krystalcích

ledu později v kapalně fázi vody, která byla do multiatomizátoru při ohřevu uvolňována postupně. Postupné uvolnění arsanu z krystalků vody je pozorovatelné v mírném zvýšení základní linie v oblasti za píkem arsanu v chromatogramu v obr. 3.4-10.

3.4.3.2 Radioindikátorové experimenty - křemenná U-kapilára

Pro ověření účinnosti záchytu a uvolnění z U-kapiláry bylo využito stejného přístupu založeného na využití radioindikátoru $^{73,74}\text{As}$ jako tomu bylo v případě plněné U-trubice. Vyhodnocení experimentu s účinností záchytu a uvolnění probíhal analogicky (viz. 3.3.2 Radioindikátorové experimenty –U-trubice). Tab.3.4-2. uvádí výsledky účinnosti záchytu i uvolnění pro U-kapiláru a porovnání s obdobnými výsledky pro U-trubici.

Tab. 3.4-2: porovnání účinnosti záchytu a uvolnění radioindikátoru (aliquot B) pro U-trubici a U-kapiláru; n=3, pro přehlednost uvedena data pro U-trubici z Tab.3.3-3

	U-trubice	U-kapilára
Účinnost záchytu (%)	99,9 ± 0,1	94,3 ± 0,2
Účinnost uvolnění (%)	100,0 ± 0,8	100,0 ± 0,1

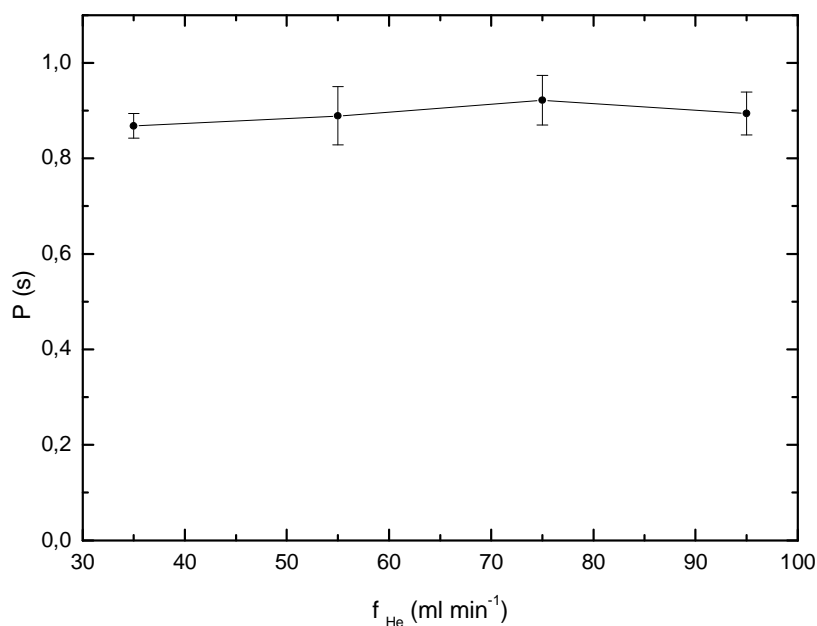
Výsledky měření za neoptimalizovaných podmínek pro U-kapiláru byly získány za podmínek záchytu a uvolnění v U-trubici. I přesto z tab.3.4-2 vyplývá stoprocentní uvolnění radioindikátoru z povrchu kapiláry při ohřevu kapiláry na 25 °C. Bylo provedeno i měření částí aparatury včetně kapiláry pomocí scintilačního gama čítače (2.2 Přístrojové vybavení) čímž bylo ověřeno, že nedochází k permanentnímu záchytu radioindikátoru na stěnu kapiláry. Podmínky v kroku uvolnění hydridu ze stěny kapiláry jsou tedy optimální a stejné pro U-kapiláru i U-trubici.

V případě záchytu radioindikátoru za podmínek pro U-trubici docházelo ke ztrátám. Ztráty hydridu radioindikátoru během záchytu dosahovaly přibližně 6 %. Nicméně fakt, že dochází k záchytu hydridu radioindikátoru z 94% bez optimalizace podmínek poskytuje informaci o robustnosti přístupu. Pozorovaná 6% ztráta byla pravděpodobně způsobena nafionovou sušicí trubicí a/nebo drobnými netěsnostmi systému. U nafionové membrány skládající se ze dvou soustředných trubic s vnitřní trubicí z nafionu nebylo možné ověřit těsnost vnitřní trubice. Případné ztráty arsanu způsobené samotným materiálem nafionu byly vyloučeny (viz. 3.1.2.3 Sušení nafionovou membránou).

Pro studium distribuce radioindikátoru v křemenné U-kapiláře nebyl využit analogický postup jako s U-trubicí vzhledem k pohybující se hladině kapalného dusíku při přenášení kryogenní pasti po kroku záchytu do odpovídajících prostor pro radioaktivní experimenty. Při přenášení nádoby s kapalným dusíkem s fixovanou U-kapilárou docházelo k dramatickému ovlivnění ustavení teplotní rovnováhy uvnitř i vně U-kapiláry. Tím existovalo nebezpečí ovlivnění distribuce radioindikátoru a zkreslení výsledků.

3.4.3.3 Optimalizace nosného plynu pro využití U-kapiláry

Vzhledem ke ztrátám arsanu během záchytu v U-kapiláře bylo nutné optimalizovat průtok plynů kapilárou. Sada experimentů zahrnovala závislost plochy píku arsanu na průtoku nosného plynu – helia.



Obr. 3.4-11: závislost plochy píku $i\text{As}^{\text{V}}$ (P) na průtoku nosného plynu (f_{He}); pro $2 \mu\text{g l}^{-1}$ $i\text{As}^{\text{V}}$ (aliquot B);
 $n = 5$

Z obr.3.4-11 vyplývá, že plocha píku arsanu není závislá na průtoku nosného plynu což tvoří tuto metodu robustní ke změnám průtoku plynů během záchytu i uvolnění. Optimální hodnota průtoku nosného plynu pro další experimentování byla zvolena 35 ml min^{-1} vzhledem k nižší směrodatné odchylce v porovnání s ostatními hodnotami průtoku nosného plynu. Tato závislost vznikla pro uspořádání s nafionovou sušicí trubicí.

Plocha píku pro tento experiment se zvýšila v porovnání s experimenty uskutečněnými před použitím radioindikátorů na $0,92 \pm 0,05$ s což je ve shodě s výsledky obdrženými při použití radioindikátorů (viz. část 3.4.3.2 Radioindikátorové experimenty - křemenná U-kapilára). Nicméně plocha píku arsanu stále nedosahovala požadované hodnoty 1 s jako v případě použití U-trubice.

3.4.3.4 Sušení plynné směsi pro U-kapiláru

Eliminace vstupu vodní páry do křemenné kapiláry v kroku záchytu nebyla dostatečná pro opakovaná měření v případě zařazení nafionové membrány ani patrony s hydroxidem sodným. I přes maximální možný průtok sušícího plynu – dusíku nafionovou membránou docházelo k vymrazování vodní páry a aerosolu v kapiláře a zablokování přibližně po 2,5 minutách generování hydridů. Další zásadní překážkou použití nafionové membrány byly signifikantní ztráty dimethylované a stoprocentní ztráty trimethylované formy arsenu (viz. kapitola 3.1.2.3 Sušení nafionovou membránou). Z uvedených důvodů byla nafionová nahrazena polypropylenovou patronou plněnou pevným hydroxidem sodným. Patrona s hydroxidem sodným nicméně stále nedostatečně eliminovala vodní páru a aerosol vystupující ze separátoru fází ve spojení s U-kapilárou (k ucpání docházelo přibližně po 5 měřících cyklech).

Během experimentování s U-kapilárou byl pozorován vliv způsobu ponoření U-kapiláry do nádoby s kapalným dusíkem na dobu od zapnutí generátoru hydridů po zablokování kapiláry vymrazenou vodní parou (dále jen doba zablokování). S nádobou naplněnou kapalným dusíkem po okraj byla doba zablokování pasti kratší než s totožným experimentem, ale s hladinou kapalného dusíku jeden až dva centimetry pod okraj nádoby. V prvním případě došlo k razantnímu poklesu teploty na malé délce (malé ploše) U-kapiláry v místě rozhraní vzduchu a kapalného dusíku. Za této podmínky došlo k rychlé tvorbě ledové zátky na malé délce U-kapiláry. V druhém případě probíhalo vymrazování vodní páry na větší ploše stěny U-kapiláry z důvodu postupného poklesu teploty přibližně od 0°C do -110°C v mezeře mezi okrajem nádoby a hladinou kapalného dusíku. Pro zabránění ovlivnění ustálené rovnováhy v této mezeře vlivem proudění vzduchu z okolí byla vytvořena izolační zátka na nádobu s kapalným dusíkem. Zvoleným materiálem této zátky byl pěnový polyethylen s eliptickým otvorem pro vkládání U-kapiláry.

Vliv velikosti vzniklé mezery mezi hladinou kapalného dusíku a hranou izolace ve spojení hydridového generátoru a sušící patrony s hydroxidem sodným na dobu

zablokování byl také testován. Optimální velikost mezery 2 cm (testováno v rozmezí 1-4cm) způsobilo vymrazování vodní páry na větší ploše kapiláry. U mezery v délce 1 cm docházelo k rychlejšímu zablokování U-kapiláry než u mezery větší než 2 cm. U mezery 3-4 cm nebyl pozorován významný rozdíl v době zablokování pasti. Vzhledem k tomuto pozorování byla testována i možnost vyloučení sušící patrony s hydroxidem sodným. V tomto případě docházelo opět k brzkému zablokování. Sušící patrona s hydroxidem sodným a způsob vložení kapiláry do mezery mezi zátkou z izolačního materiálu a hladinou kapalného dusíku tvořilo tedy optimální kombinaci.

Vzhledem k použitému způsobu vymrazování bylo třeba U-kapiláru před měřením kondicionovat. Doba 45 s před zapnutím hydridového generátoru postačovala k ustavení postupného gradientu teploty v délce U-kapiláry po vložení do takto upravené nádoby s kapalným dusíkem. Způsob uložení kapiláry uvádí obr. 2.6-2. Díky odstranění tohoto zásadního problému vymrazování vodní páry v U-kapiláře bylo možné testování kapiláry jako nového designu kryogenní pasti.

3.4.3.5 Studium účinnosti záchytu a uvolnění forem arsenu v U-kapiláře

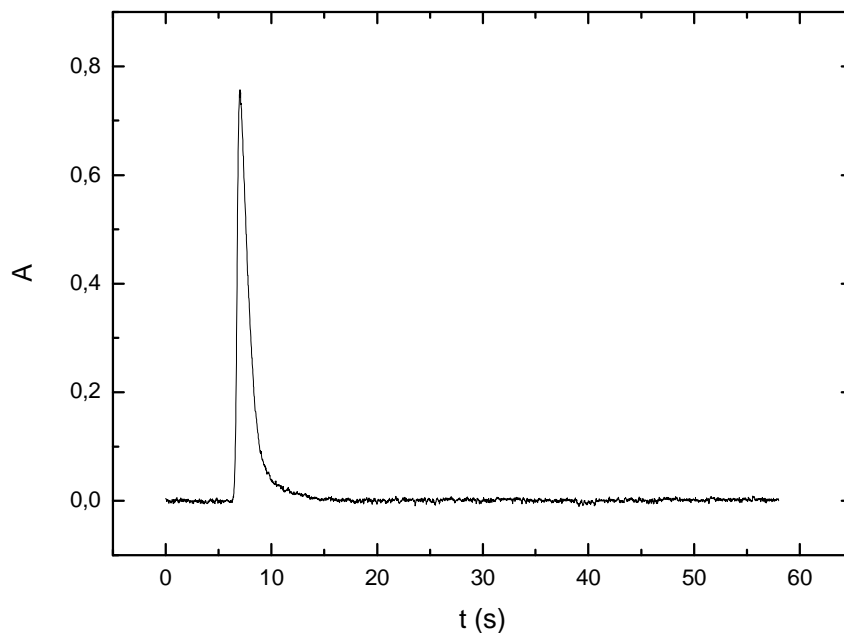
Pro experiment byla volena vždy jedna specie. Plocha píku dané specie pro záchyt v křemenné U-kapiláře byla vždy porovnávána s plochou píku dosaženou s plněnou skleněnou U-trubicí. Díky tomuto porovnání byly získány jednotlivé relativní signály pro každou studovanou specii jenž uvádí tab.3.4-3.

Tab. 3.4-3: relativní signály jednotlivých specií (každá specie 2 µg l⁻¹ alikvot A pro TMA^VO,B pro ostatní formy) pro U-kapiláru; n = 6

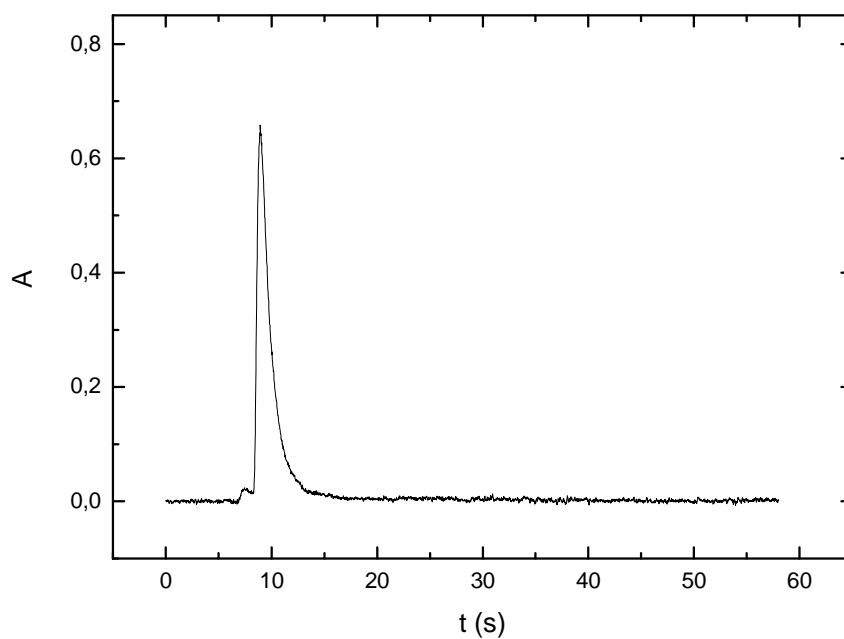
Specie	iAs ^V	MAs ^V	DMAs ^V	TMA ^V O
Relativní signál (%)	101±3	109±3	103±2	98±5

Z tab. 3.4-3 vyplývá stoprocentní účinnost záchytu i uvolnění pro všechny arsenové specie. V kroku záchytu nedochází k významnému uvolňování analytu ze stěny kapiláry a veškerý analyt je tudíž zachycen na stěnu kapiláry. V kroku uvolnění nedochází ke ztrátám analytu vlivem nedokonalého uvolnění ze stěny kapiláry ani ke ztrátám během transportu do atomizátoru. Využitím nového typu sušícího zařízení (patrony s NaOH) bylo dosaženo 100% účinnosti záchytu i uvolnění pro všechny studované formy arsenu. Díky tomu lze křemennou kapiláru považovat za plně funkční miniaturizované uspořádání

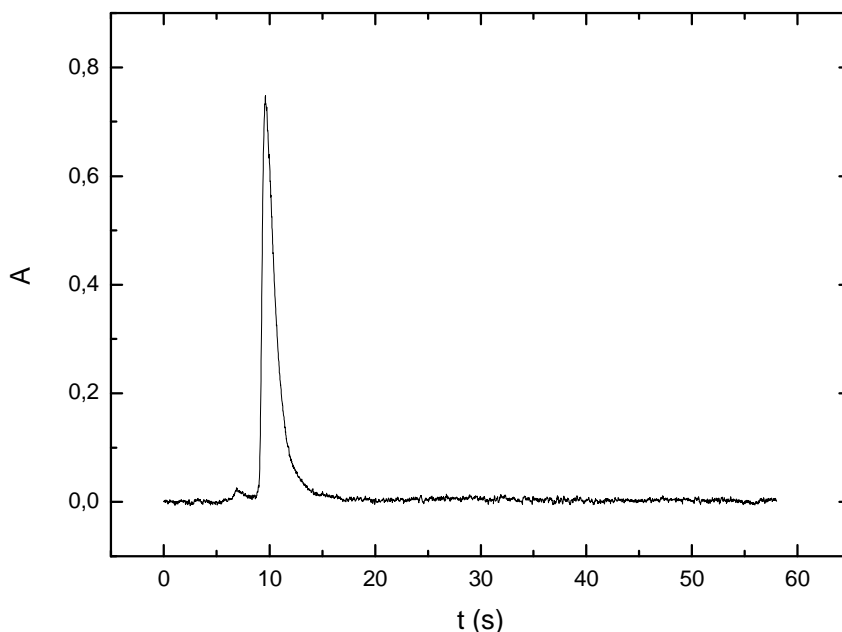
kryogenní pasti. Typické chromatogramy pro iAs^V , MAs^V , $DMAs^V$ pro U-kapiláru ukazují obr. 3.4-12,13,14.



Obr. 3.4-12: pík pro $2 \mu g l^{-1} iAs^V$ (aliquot B) pro křemennou U-kapiláru se sušidlem NaOH perly



Obr. 3.4-13: pík pro $2 \mu g l^{-1} MAs^V$ (aliquot B) pro křemennou U-kapiláru se sušidlem NaOH perly



Obr. 3.4-14: pík pro $2 \mu\text{g l}^{-1}$ DMAs^{V} (alíkvot B) pro křemennou U-kapiláru se sušidlem NaOH perly

Tab. 3.4-4 uvádí porovnání ploch, FWHM a výšek píků, pro jednotlivé formy.

Tab. 3.4-4: porovnání hodnot ploch (P), FWHM a výšek píků (v) pro jednotlivé specíe pro měření s U-kapilárou a sušící trubicí s NaOH (každá specíe $2 \mu\text{g l}^{-1}$ alíkvot A pro $\text{TMAAs}^{\text{V}}\text{O}$, B pro ostatní formy); $n=6$

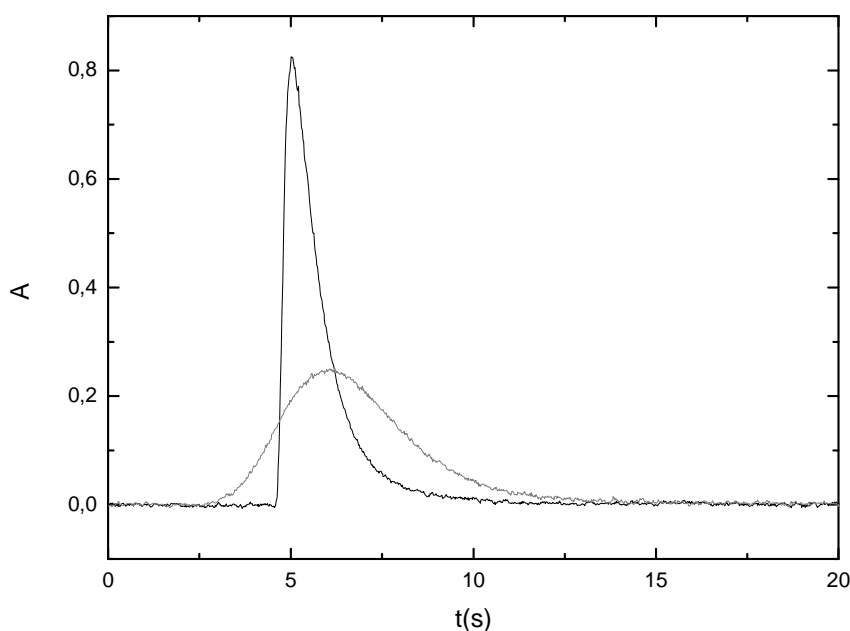
specie	P (s)	FWHM (s)	v
iAs^{V}	$1,065 \pm 0,031$	$1,04 \pm 0,05$	$0,77 \pm 0,04$
MAAs^{V}	$1,085 \pm 0,028$	$1,23 \pm 0,05$	$0,66 \pm 0,04$
DMAs^{V}	$1,184 \pm 0,023$	$1,34 \pm 0,08$	$0,70 \pm 0,04$
$\text{TMAAs}^{\text{V}}\text{O}$	$0,869 \pm 0,040$	$1,33 \pm 0,04$	$0,54 \pm 0,03$

Rozdíl oproti předchozím experimentům s kapilárou (od 3.4.3.1 do 3.4.3.3) je v sušení plynné směsi vystupující ze separátoru fází. Pro tuto sadu experimentů byla použita již patrona s pevným hydroxidem sodným. Těsnost systému byla kontrolována digitálním průtokoměrem, který zobrazoval aktuální tlak v systému hydridového generátoru a roztokem detergentu.

Porovnáním tab.3.1-1 a tab.3.4-4 vyplývá výrazné snížení FWHM píku iAs^{V} téměř čtyřnásobně. Pro methylované formy arsenu došlo ke zmenšení FWHM píku přibližně o polovinu. Změna FWHM pro jednotlivé specíe je pravděpodobně zapříčiněna rapidním

zmenšením vnitřního průměru kryogenní pasti a také faktu, že kapilára je bez náplně. V případě kapiláry mohou zachycené specie rychleji reagovat na změnu teploty a vzhledem k vyšší lineární rychlosti jsou také rychleji uvolněny z pasti.

Souvisejícím parametrem chromatogramu s šířkou píků, který doznal změny, byla výška píků jednotlivých forem. Porovnáním výšek píků z tab.3.1-1, a tab.3.4-4 a následujícího chromatogramu pro U-kapiláru a pro skleněnou U-trubicu obdržíme znatelné zvýšení píku arsanu přibližně trojnásobně. V porovnání s výškou píku arsanu v případě křemenné U-trubice (tab.3.3-1) je naopak znatelný pokles. To je pravděpodobně zapříčiněno využitím ohřevu v případě křemenné U-trubice, kdy je arsan uvolněn rychleji než u U-kapiláry ohřívané pouze laboratorní teplotou.



Obr. 3.4-15: porovnání chromatogramů $2 \mu\text{g l}^{-1} \text{ iAs}^{\text{V}}$ (aliquot B) z křemenné U-kapiláry (černá čára) a U-trubice (šedá čára)

Porovnáním výšek píků MAs^{V} a DMAs^{V} z tab. 3.4-4, tab. 3.1-1 a tab.3.3-1 vyplývá jejich zvýšení pro použití U-kapiláry. Důvodem je pravděpodobně rychlý ohřev u U-kapiláry kdy dochází k uvolnění všech forem v blízkých retenčních časech, kdežto u skleněné U-trubice je zvyšování teploty pomalejší a tím dochází k rozšíření píku společně se snížením jeho výšky. Výška píku společně s šířkou píku mají vliv na vyhodnocení chromatogramu. Zvětšením výšky píků a zároveň snížením FWHM se zkracuje interval

integrace píků a tím je vyhodnocení detekčního limitu pro danou formu méně ovlivněno kolísáním, nárůstem nebo poklesem základní linie.

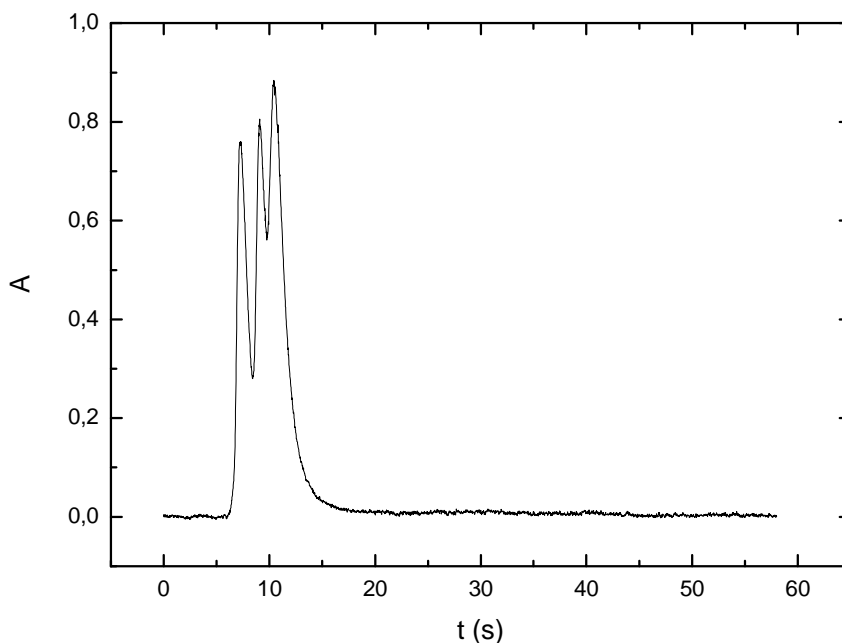
Původním záměrem bylo využít křemenné kapiláry jako kryogenní pasti, bez jejího využití pro separaci jednotlivých forem. Nicméně experimenty popsané v této kapitole naznačují možnost použití kapiláry zároveň jako separačního zařízení. Doba separace je u použitého absorpčního spektrometru limitována maximální možnou délkou záznamu 58 s (2.2 Příkladové vybavení). I přes toto omezení je možné separaci jednotlivých forem arsenu uskutečnit. Použití U-trubice toto dokazuje. Křemenná kapilára má ideální předpoklady pro záchyt, ale i pro eventuální separaci řízenou ohřevem tzn. tenká stěna, nepřítomnost náplně, malý vnitřní objem v porovnání s plněnou U-trubicí.

Tenká stěna kapiláry má výhodu v rychlejším prostupu tepla z vnější části odporově vyhřívané stěny. Díky tomuto faktu lze snadněji kontrolovat aktuální teplotu i na vnitřní stěně kapiláry a ovlivňovat tak dobu uvolnění dané zachycené arsenové formy. V případě U-trubice byla použita skleněná nebo křemenná trubice s tloušťkou stěny 1 mm. Prostup tepla do vnitřního prostoru trubice byl tak zpožděn a tloušťka stěny způsobila určitou „setrvačnost“ ohřevu vnitřní stěny trubice po vypnutí proudu pro odporový ohřev. Nevýhodnou vlastností náplně v U-trubici pro záchyt vymrazováním je setrvačnost a nestejněměrnost ohřevu. V kroku uvolnění dochází k ohřevu části náplně nejbližší u stěny trubice a až poté náplně ve středu trubice. Kapilára na rozdíl od U-trubice má vnitřní část bez náplně tudíž je možné očekávat minimální rozmývání píků a rychlejší reakci na jakýkoliv druh ohřevu. Další výhodou použití kapiláry je i nižší tlak uvnitř systému hydridového generátoru vzhledem k menšímu odporu kapiláry k průchodu plynů. Typicky v U-trubici plněné chromosorbem je v kroku záchytu tlak v systému mezi 1,31-1,37 bar oproti v U-kapiláře 1,10-1,17 bar.

Souvisejícím parametrem s výše uvedenými je délka ponoření kryogenní pasti v kapalném dusíku. Pro U-trubici je minimální délka ponoření pro úplný záchyt 20 cm, ale pro U-kapiláru je třeba pouze 3 cm. Pro menší délku ponoření je pozorováno nižší rozmývání píků jednotlivých forem (viz. 3.4.1 Možnosti miniaturizace U-trubice). Z toho plyne zvýhodnění pro použití křemenné kapiláry. Opět jde o parametr značně ovlivňující vyhodnocení či samotnou možnost měření pro využití spojení atomového absorpčního spektrometru a systému generování se záchytem hydridů arsenu vymrazováním.

U křemenné U-kapiláry ohřívané laboratorní teplotou nebylo možné dostatečně kontrolovat rychlost ohřevu pro účel separace jednotlivých specií. Pro posouzení aktuálního rozdělení jednotlivých specií byl uskutečněn experiment se směsným

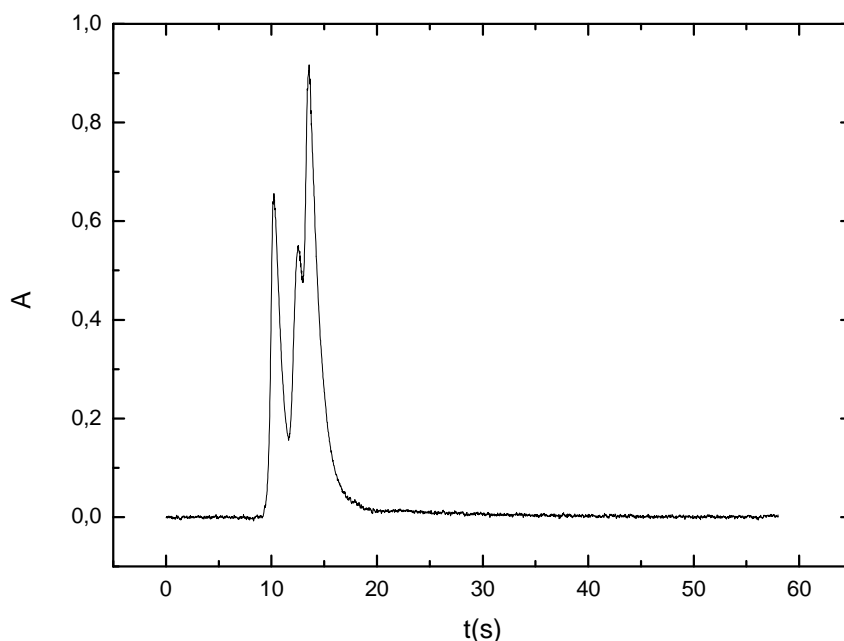
standardem obsahujícím iAs^V , MAs^V a $DMAs^V$. Po předredukci standardu L-cysteinem a proběhnutí analýzy s křemennou U-kapilárou byl získán chromatogram, jenž uvádí obr. 3.4-16.



Obr. 3.4-16: chromatogram získaný analýzou směšného standardu iAs^V , MAs^V a $DMAs^V$ (aliquot B) (každá forma $2 \mu g l^{-1}$); pomocí křemenné U-kapiláry ohříváné laboratorní teplotou

Z obr.3.4-16 je jasně patrné nedostatečné rozlišení jednotlivých specií. Z výsledků plyne nemožnost uskutečnění separace s dostatečným rozlišením jednotlivých arsenových specií s tímto druhem uspořádání a za uvedených podmínek. Na druhou stranu kapilára jako kryogenní past pro všechny zmíněné specie funguje spolehlivě. Dochází ke stoprocentnímu záchytu všech forem a při ohřevu pasti jsou všechny specie uvolněny v malém objemu což byl jeden s požadavků pro spojení s plynovým chromatografem.

Na základě předchozího experimentu vyvstala otázka chromatografického příspěvku křemenné kapiláry k rozlišení jednotlivých forem. Pro určení velikosti příspěvku chromatografického děje na rozlišení píků byla na výstupní část U-kapiláry připojena další křemenná kapilára stejného typu s patnáctinásobkem délky U-kapiláry ponechaná za laboratorní teploty a uskutečněn tentýž experiment se stejným směšným standardním roztokem.



Obr. 3.4-17: chromatogram získaný analýzou směsného standardu iAs^V , MAs^V a $DMAs^V$ (aliquot B) (každá forma $2 \mu g l^{-1}$); pomocí křemenné U-kapiláry ohřívané laboratorní teplotou s prodloužením 3m kapiláry

Výsledkem byl chromatogram uvedený na obr. 3.4-17. Po porovnání chromatogramů s a bez prodloužení kapiláry nebyl pozorován signifikantní příspěvek křemenné kapiláry jakožto chromatografické kolony. Z tab.3.4-5 lze porovnat i plochu signálu a jeho výšku. Z porovnání ploch signálů vyplývá pokles v případě prodloužení kapiláry, což svědčí o pravděpodobných ztrátách specií během transportu. Pravděpodobným důvodem by mohla být částečná sorpce na stěny kapiláry. Dále je také patrný posun signálu v čase (přibližně 3 s) daný prodloužením kapiláry. Tento posun je dán pravděpodobně prodloužením dráhy, kterou musí urazit hydridy arsenu z kryogenní pasti do multiatomizátoru nikoliv vlivem křemenné kapiláry jako chromatografické kolony.

Tab. 3.4-5: porovnání plochy (P) a výšky (v) signálu pro směsný standard iAs^V , MAs^V a $DMAs^V$ (s předredukci L-cysteinem) (každá forma $2 \mu g l^{-1}$); pomocí křemenné U-kapiláry ohřívané laboratorní teplotou bez/s prodloužením 3 m kapiláry; n = 3

	P (s)	v
bez prodloužení	$3,44 \pm 0,13$	$1,01 \pm 0,13$
s prodloužením 3 m	$2,79 \pm 0,07$	$0,916 \pm 0,009$

Na základě tohoto experimentu lze tvrdit, že rozlišení jednotlivých forem pro toto uspořádání a za uvedených podmínek je výhradně řízeno rychlostí ohřevu kapiláry. Případný chromatografický vliv kapiláry na separaci jednotlivých specií má za těchto podmínek nevýznamný vliv.

3.4.4 Studium záchyty v křemenné I- kapiláře ve spojení s AAS

U-kapilára prokázala schopnost dokonalého záchyty a uvolnění jednotlivých specií. Nicméně toto uspořádání pro další měření a řešení kontrolovaného ohřevu obsahovalo několik nevýhod. Jednou z nevýhod U-kapiláry byl její tvar. Vzhledem k tomuto tvaru docházelo bez uložení kapiláry v teflonové trubici k praskání vlivem tlaku plynů na stěnu kapiláry a vnitřnímu pnutí křemenného skla. I když byla kapilára potažena polyimidem pro zajištění vyšší mechanické odolnosti, ponořování v kapalném dusíku a ohyb kapiláry do tvaru U zlepšení mechanických vlastností eliminoval. Řešením pro tyto náročné podmínky měření bylo vložení kapiláry do teflonové trubice, která tvořila oporu a tím bylo praskání stěn kapiláry eliminováno. Možné spojení s plynovým chromatografem (viz. úvod 3.4) vyžaduje v kroku uvolnění soustředit všechny specie do malého objemu. Teflonová trubice způsobovala setrvačnost ohřevu, tzn. došlo k prodloužení doby uvolnění s mírným rozdělením píků jednotlivých forem jak uvádí chromatogram na obr.3.4-16. Přesnost kontroly teploty v kapiláře vyžaduje řešení bez teflonové trubice, aby jakékoliv řešení ohřevu bylo ideálně v kontaktu se stěnou kapiláry a nedocházelo tak k setrvačnosti ohřevu. Proto bylo testováno přímé vedení kapiláry (bez ohybu a bez uložení v teflonové trubici) označené v této práci jako I-kapilára.

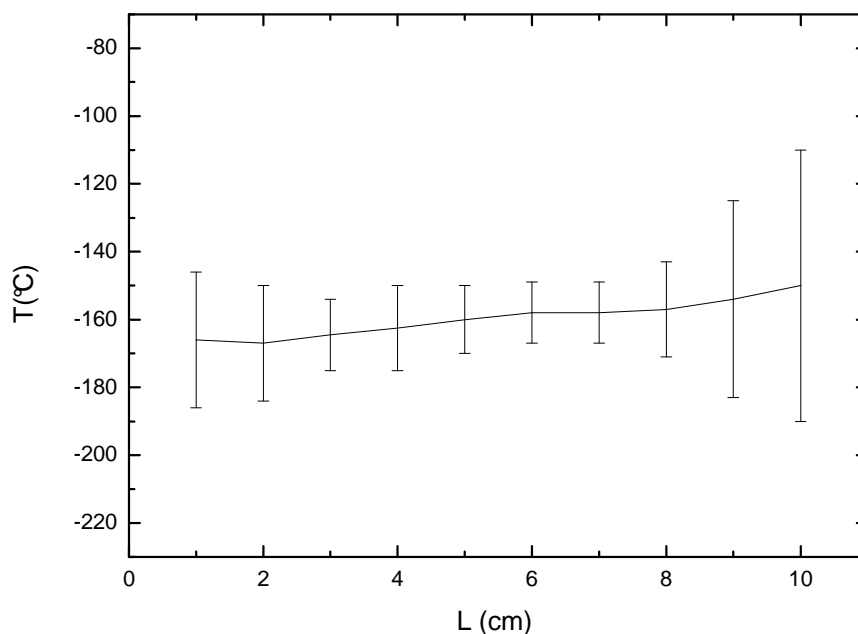
3.4.4.1 Vývoj I-kapiláry

Pro tento typ kryogenní pasti bylo testováno komerčně dostupné zařízení zvané „Microcryotrap“ (dále jen MCT), které zabezpečovalo chlazení i ohřev I-kapiláry (viz. 2.6.5 Křemenná I-kapilára). MCT byl původně navržen pro záchyt těkavých organických sloučenin pro spojení s plynovou chromatografií. Toto zařízení bylo dle specifikací schopné nastavením teploty s přesností $\pm 3^{\circ}\text{C}$ v rozsahu od -180°C do 400°C zajistit záchyt i uvolnění těkavých organických sloučenin. Vzhledem k možnosti přesného nastavení teploty byl záměr studovat optimální teplotu či rozmezí teplot pro záchyt a

uvolnění každé z využitých specií. Toto by poskytlo hodnotné informace vedoucí k optimalizaci parametrů kryogenní pasti.

Vstup kapalného dusíku do MCT byl řešen rezervoárem z nerezového plechu o objemu 1 l tvaru válce izolovaného od okolního prostředí pomocí pěnového polyethylenu tloušťky 2 cm. Výstup z rezervoáru byl vytvořen uprostřed dolní podstavy. Jako kryt horního otvoru pro doplňování kapalného dusíku byla vyrobena zátka z pěnového polyethylenu s otvorem o průměru 5 mm, aby v rezervoáru vlivem odparu kapalného dusíku nedocházelo k přetlaku. Na vývod z rezervoáru byl pomocí měděné trubice o průměru 6 mm připojen solenoidový ventil ovládaný kontrolérem MCT. Solenoidový ventil s rezervoárem byl připojen k MCT opět měděnou trubicí průměru 6 mm. Veškeré vedení a samotný MCT byl izolován od okolí pěnovým polyethylenem tloušťky 1 cm.

Získání teplotního profilu a ověření funkce MCT bylo provedeno měřením teploty na stěně vnitřní trubice MCT v závislosti na délce zasunutí (po 1 cm) externího termočlánku do této trubice (viz. Obr. 2.6-4) v drážce pro kapiláru. Nominální teplota byla -190°C . Výsledek měření (obr.3.4-18) ilustruje nepříjemně široké rozmezí ve kterém, především na obou koncích vnitřní trubice MCT, teplota kolísá.



Obr. 3.4-18: teplotní profil MCT bez použití kovových vložek; závislost teploty na délce zasunutého termočlánku od vstupu MCT; L-délka zasunutí termočlánku od vstupu do MCT; T – teplota; chybové úsečky reprezentují kolísání teploty při nastavení -190°C na kontroléru MCT

Kvůli vysoké nestálosti teploty uvnitř MCT bylo toto zařízení modifikováno tak, aby bylo možné uskutečnit účinný záchyt a uvolnění pro všechny generované hydridy arsenu. Vzhledem k průměru vnitřní trubice MCT bylo nutné vytvořit dostatečně tepelně vodivou vložku zabezpečující převod tepla při chlazení i ohřevu MCT na křemennou I-kapiláru. Pro uložení křemenné kapiláry s vnitřním průměrem pouze 0,53 mm bylo nutné vytvořit kovovou vložku válcového tvaru, průměru 3,0 mm s podélnou drážkou přibližně 0,7 mm. Následovalo testování několika typů vložek z různých materiálů.

Tab. 3.4-6: porovnání teploty ve středu délky MCT s různými typy kovových vložek; měření v délce zasunutí termočláneku 5 cm od vstupu MCT; nastavení -175°C na kontroléru; T_{max} – maximální dosažená teplota; T_{min} – minimální dosažená teplota; T_p – průměrná dosažená teplota

typ kovové vložky	T_{max} ($^{\circ}\text{C}$)	T_{min} ($^{\circ}\text{C}$)	T_p ($^{\circ}\text{C}$)
1. ocelová trubice s podélnou drážkou	-145	-175	-160
2. dvě soustředné ocelové trubice s podélným řezem	-160	-172	-166
3. měděná kulatina s drážkou	-159	-170	-164,5

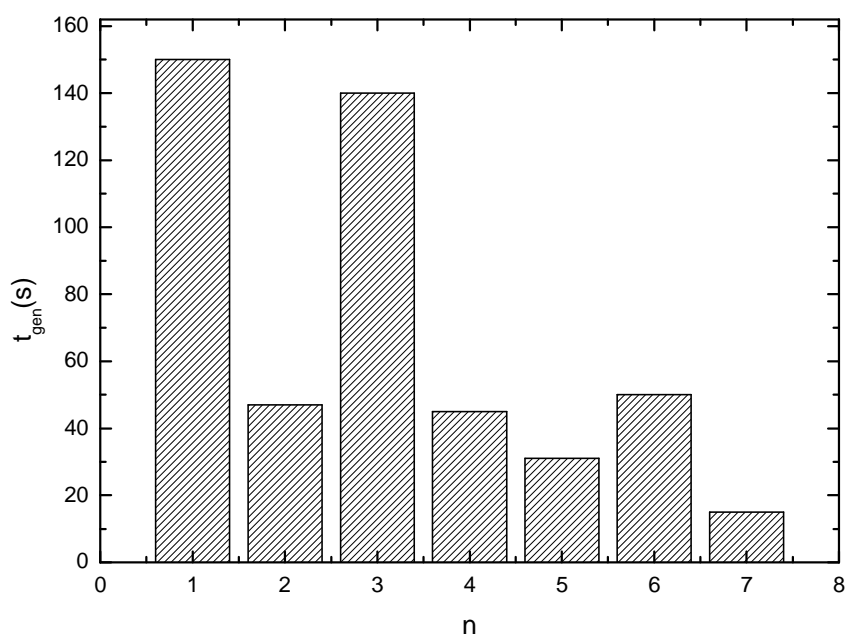
Tab.3.4-6 uvádí teplotu pro různé druhy kovových vložek umístěných ve vnitřní trubici MCT. Pro kovovou vložku 2. typu byla naměřena nejnižší průměrná teplota. Dvě soustředné ocelové trubice kovové vložky 2. typu měly nevýhodu nerovností drážky pro uložení I-kapiláry a tím nebezpečí rozdílného převodu tepla na vloženou kapiláru. Z tohoto důvodu byl zvolen typ 3. - měděná kulatina pro uložení I-kapiláry v MCT. Průměrná teplota byla velmi blízká průměrné teplotě dosažené ve vložce 2. typu a problémy s nerovností povrchu se zde neprojevovaly a neovlivňovaly tak výrobu drážky pro uložení I-kapiláry. Tento typ vložky také umožňoval udržovat teplotu v nejužším rozsahu teploty a snížil tak kolísání teplot uvedených v obr.3.4-18. Vložka tak zabezpečovala převod tepla v celé délce I-kapiláry.

Pro zajištění a udržení dostatečně nízké a stabilní teploty pro záchyt arsenových specií byl odpojen termočlánek registrující teplotu uvnitř MCT, ke kontroléru připojen externí termočlánek a ponechán za laboratorní teploty. Tímto byl v kroku záchytu zajištěn kontinuální průtok kapalného dusíku MCT. Registrováním teploty externím termočlánekem se teplota uvnitř MCT v drážce pro kapiláru po dvou minutách chlazení ustálila na hodnotě $-190^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ v celé délce kovové vložky. Touto modifikací původního uspořádání MCT nebylo možné nastavení stabilní teploty vyšší než -150°C tudíž pro studium teplot záchytu jednotlivých forem arsenu bylo toto uspořádání nevhodné.

Po uvedených modifikacích bylo možné testovat MCT jako systém kryogenní pasti za odpovídajících podmínek.

3.4.4.2 Sušení plynné směsi pro I-kapiláru

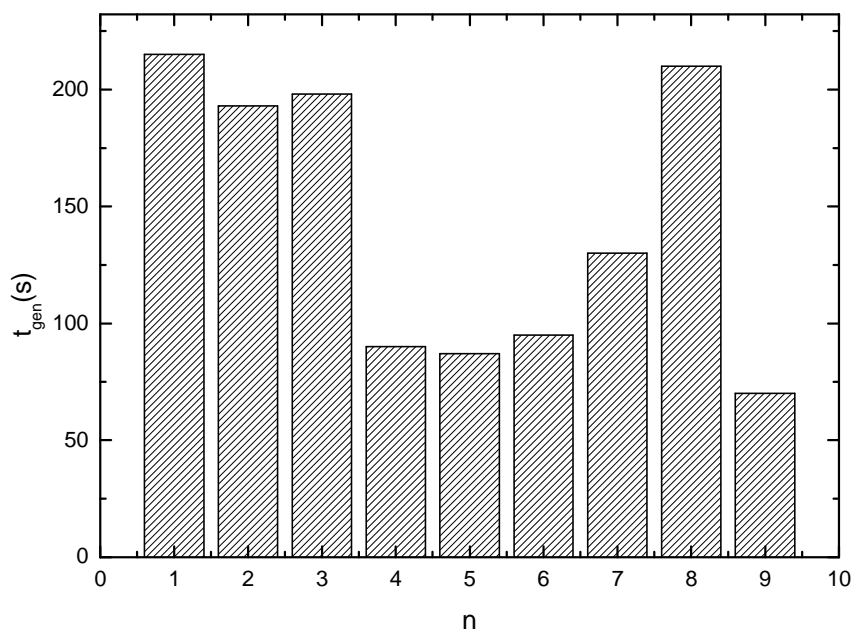
Vymrazování vodní páry a aerosolu vedoucí k zablokování I-kapiláry se opět ukázalo jako zásadní problém. Samotná sušicí patrona s hydroxidem sodným nedostatečně absorbovala vodní páru vstupující do kapiláry. Často docházelo k zablokování na vstupu I-kapiláry díky skokovému snížení teploty (z 25°C na cca -130°C v délce kapiláry cca 5 mm). Obr. 3.4-18 ilustruje tuto situaci. Doba zablokování je zde definována jako doba od spuštění do zastavení hydridového generátoru. Zastavení hydridového generátoru následovalo po dosažení tlaku v aparatuře 1,38 bar což téměř odpovídalo zablokování kapiláry.



Obr. 3.4-19: závislost doby zablokování=doby běhícího generátoru (t_{gen}) na pořadovém čísle měření (n); pro 1 ks sušicí patrony s NaOH – celková hmotnost NaOH 25 g

Z obr.3.4-19 je zřejmé, že již po jednom až třech měřících cyklech (každý cyklus zahrnuje zhruba 120 s generování) klesá sušicí účinnost patrony natolik, že dochází k zablokování pasti zpravidla za dobu generování výrazně kratší než jedna minuta. Proto byl hledán účinnější způsob sušení. Nabízelo se zvětšení objemu sušidla (NaOH, perly).

Hmotnost sušidla NaOH byla zvýšena z užívaných 25 g NaOH na 150 g NaOH v podobě tří za sebou zařazených 20 cm PE patron.



Obr. 3.4-20: závislost doby zablokování=doby od spuštění do zastavení hydridového generátoru (t_{gen}) na pořadovém čísle měření (n); pro 3 ks za sebou zařazených sušících patron s hydroxidem sodným – celková hmotnost NaOH 150 g

Z obr.3.4-20 je znatelné zlepšení sušení nebo-li prodloužení doby zablokování I-kapiláry. Avšak ani toto šestinásobné zvětšení objemu sušidla nevedlo k dostatečnému zvýšení účinnosti sušení. Proto bylo třeba nalézt jiné řešení.

V případě U-kapiláry byla nalezena účinná kombinace patrony s NaOH a využití postupného gradientu teploty (viz. 3.4.3.4 Sušení plynné směsi pro U-kapiláru). Proto byl další přístup založen na využití tohoto efektu postupného vymrazování vodní páry na stěně I-kapiláry. Jako optimální se ukázalo spojení hydroxidové patrony a nově vyvinutého tzv. kónického vymrazovače (specifikace 2.5.3 Kónický vymrazovač), který nebyl v kontaktu s plynnou směsí vstupující do I-kapiláry. Kónický vymrazovač byl tvořen srolovaným měděným plechem do tvaru komolého kužele, který byl nasazen na vstupní část MCT s měděnou vložkou s drážkou pro kapiláru (viz. 2.6.5 Křemenná I-kapilára). Díky převodu tepla z měděné vložky na kónický vymrazovač bylo docíleno postupného zvyšování teploty uprostřed vymrazovače z -70°C na 0°C . Křemenná kapilára prochází středem kónického vymrazovače tak, aby se nedotýkala jeho stěn. Pro ustavení

teplot uvedených na obr.2.5-1 bylo nutné čekat 150 s před vlastní analýzou. Během této doby kontinuálně protékal kapalný dusík MCT pro dosažení stabilní teploty -190°C . Po kroku záchytu arsanů v I-kapiláře byl uskutečněn ohřev vinutím odporového drátu vnitřní trubice MCT. Měděnou vložkou v MCT byl zabezpečen převod tepla i na kónický vymrazovač a tak byla vymrazená voda uvolněna do multiatomizátoru a kónický vymrazovač byl připraven pro další cyklus měření. Z následující tabulky je patrná doba běžícího hydridového generátoru vyšší než 240 s tudíž po tuto dobu nedochází k zablokování kapiláry a znemožnění analýzy.

Tab. 3.4-7: hodnoty doby zablokování=doby běžícího generátoru (t_{gen}) na pořadovém čísle měření (n); pro 1 ks sušící patrony s hydroxidem sodným – celková hmotnost NaOH 25 g; zařazený kónický vymrazovač

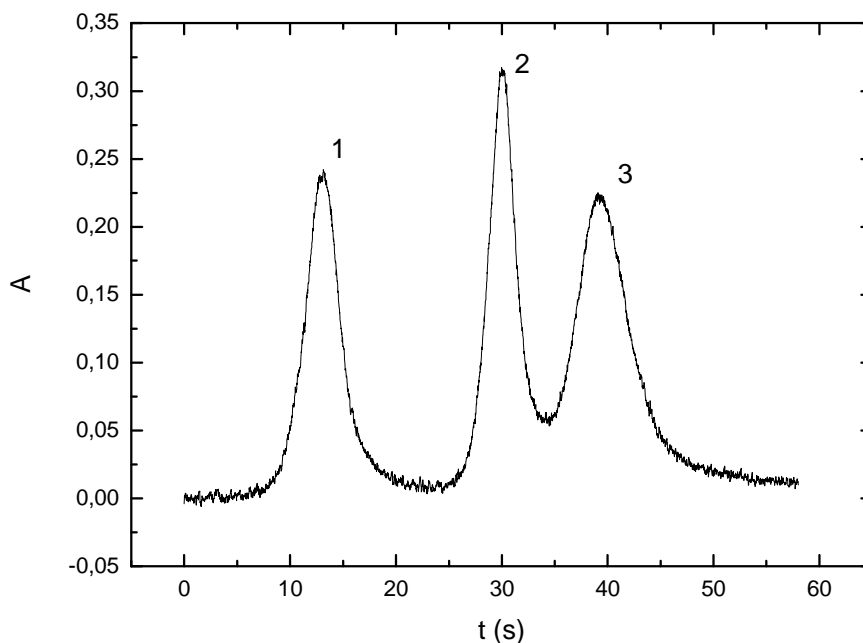
n	t_{gen} (s)
1	> 240
2	> 240
3	> 240
4	> 450
5	> 240
6	> 240

Tlak se ustálil na hodnotě 1,24 barů v kroku záchytu. Tedy k zablokování ani po více než sedmi minutách nedošlo jak dokladuje měření č.4. S jednoduchým zařízením v podobě kónického vymrazovače bylo tedy dosaženo efektu postupného snižování teploty nutného k postupnému vymrazování vodní páry na stěně kapiláry a nedocházelo tak k dalšímu ucpávání I-kapiláry ani po trojnásobném prodloužení nutné doby generování hydridů.

3.4.4.3 Možnosti separace arsenových specií v MCT

Výhodou MCT je možnost ohřevu pomalejšího než je tomu u U-trubice. Automatický systém U-trubice nedovoluje pomalý ohřev, protože při nízké rychlosti ohřevu nedojde k vytlačení veškerého kapalného dusíku z vnitřního prostoru dvouplášťové skleněné nádoby (viz. 2.6.1 Skleněná U-trubice). Tím je U-trubice stále alespoň z části chlazená a nedochází tak k uvolnění zachycených specií se stoprocentní účinností. Naproti tomu u MCT se po uzavření solenoidového ventilu kapalný dusík v prostoru MCT nadále nevyskytuje. Byl uskutečněn experiment se záchytem a uvolněním

hydridů použitých forem arsenu s postupným ohřevem. Chromatogram získaný pro spojení se sušící patrnou s hydroxidem sodným a kónickým vymrazovačem uvádí obr.3.4-21.



Obr. 3.4-21: chromatogram pro uspořádání s kónickým vymrazovačem; 1 – iAs^V , 2 – $MAAs^V$ a 3 – $DMAAs^V$; směsný standard - každá forma $2 \mu g l^{-1}$; alikvot B

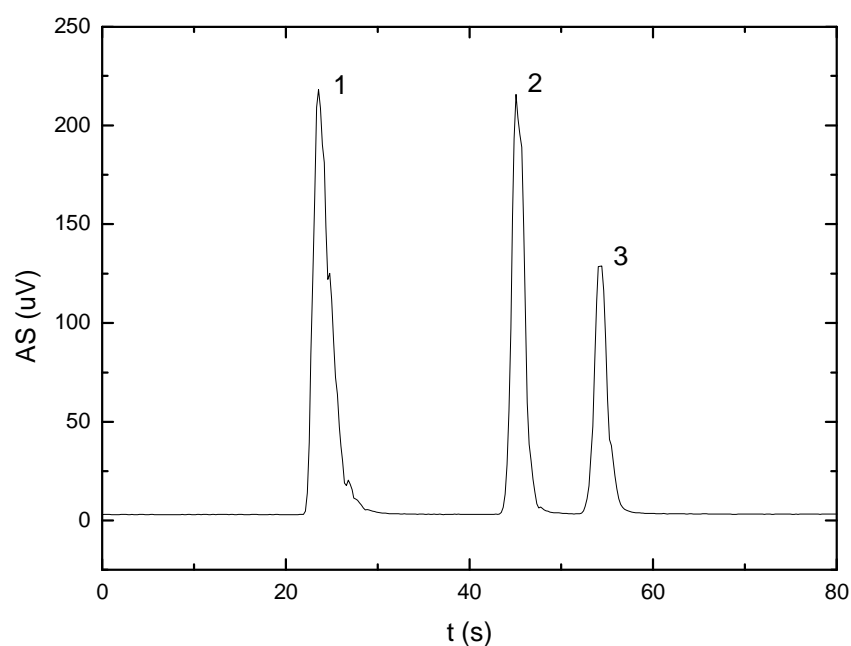
Pro testování byl vybrán směsný standard obsahující iAs^V , $MAAs^V$ a $DMAAs^V$. Pro U-trubicí trvá ohřev z $-190^{\circ}C$ na $120^{\circ}C$ přibližně jednu minutu. Pro modifikované uspořádání MCT lze nastavit dobu ohřevu z $-190^{\circ}C$ na $120^{\circ}C$ na čtyři minuty. Díky pomalému ohřevu MCT, který je ve srovnání s U-trubicí přibližně čtyřnásobně pomalejší je vidět vyšší rozlišení jednotlivých forem arsenu na obr. 3.4-21 než je tomu u U-kapiláry s ohřevem pomocí laboratorní teploty (viz obr.3.4-16). Nicméně pro kvalitní vyhodnocení je třeba dosáhnout vyššího rozlišení snížením FWHM píků. Použitý atomový absorpční spektrometr je limitován dobou záznamu chromatogramu 58 s (viz. 2.2 Přístrojové vybavení). Pro vyhodnocení chromatogramu kde bude vyšší rozlišení píků je nutné docílit uvolnění všech využitých specií během těchto 58 s. V dosavadním uspořádání, tzn. s připojeným kontrolérem MCT, který dovoluje sice pozvolnou, ale neměnnou rychlost ohřevu není možné dosažení většího rozlišení. Pro změnu rychlosti ohřevu MCT je třeba připojení nezávislého zdroje s volitelným nastavením proudu. Změnou teplotního programu bude možno ovlivňovat rozlišení, výšku a FWHM píků.

Po optimalizaci teplotního programu bude možné využívat systém MCT jako separátní kryogenní past s možností připojení k plynovému chromatografu, kde bude možné podmínky separace řídit nezávisle na podmínkách záchytu a uvolnění v MCT. Druhá nabízející se varianta bude spočívat ve využití MCT zároveň jako kryogenní pasti a separačního zařízení v přímém spojení s AAS, AFS či ICP-MS jako tomu je u spojení s U-trubicí plněnou chromosorbem.

3.5 Možnosti AFS detekce pro speciální analýzu arsenu

Spojení hydridového generátoru s kryogenní pastí a AAS detekcí s předredukci vzorku L-cysteinem pro rozlišení jednotlivých specií v různém mocenství je funkční a robustní metodou pro speciální analýzu arsenu s nízkými detekčními limity pro vodné roztoky i složitější biologické vzorky (viz. 3.1.3 Detekční limity a 3.2.5 Detekční limity pro buněčné suspenze). Atomový absorpční spektrometr je v principu málo citlivý detektor. Pro dosažení ještě nižších detekčních limitů se nabízí AFS detektor. Záměrem bylo otestovat možnosti AFS detekce pro speciální analýzu arsenu založenou na generování substituovaných hydridů. Proto bylo testováno spojení generátoru hydridů zahrnujícího kryogenní past s AFS detektorem. Pro atomizaci byl použit FIGS kvůli jeho potenciálu pro dosažení velmi nízkých detekčních limitů (viz. 1.2.2.4 Flame-in-gas-shield atomizátor).

Vzhledem k výše uvedenému záměru otestovat potenciál spojení HG-CT-AFS, byla zvolena nejjednodušší varianta generování substituovaných hydridů, tj. v prostředí 1 mol l^{-1} kyseliny chlorovodíkové (aliquot C viz. 2.4.2 Selektivní generování hydridů založené na změně pH). Chromatogram pro uvedené spojení ukazuje obr.3.5-1.



Obr. 3.5-1: chromatogram pro 1- iAs^{III} , 2- MAs^V , 3 – $DMAs^V$; směsný standardní roztok - každá specie $0,5 \mu g l^{-1}$ (aliquot C); s použitím skleněné U-trubice; sušení pomocí nafionové membrány; AS –signál, t – čas

Srovnáním chromatogramů na obr.3.5-1 a obr.3.1-10 a 3.1-11 pro spojení HG-CT-AAS je patrné podstatné snížení šumu základní linie. Plochy píků pro methylované formy byly nižší ve srovnání s anorganickou formou jak dokládá tab.3.5-1.

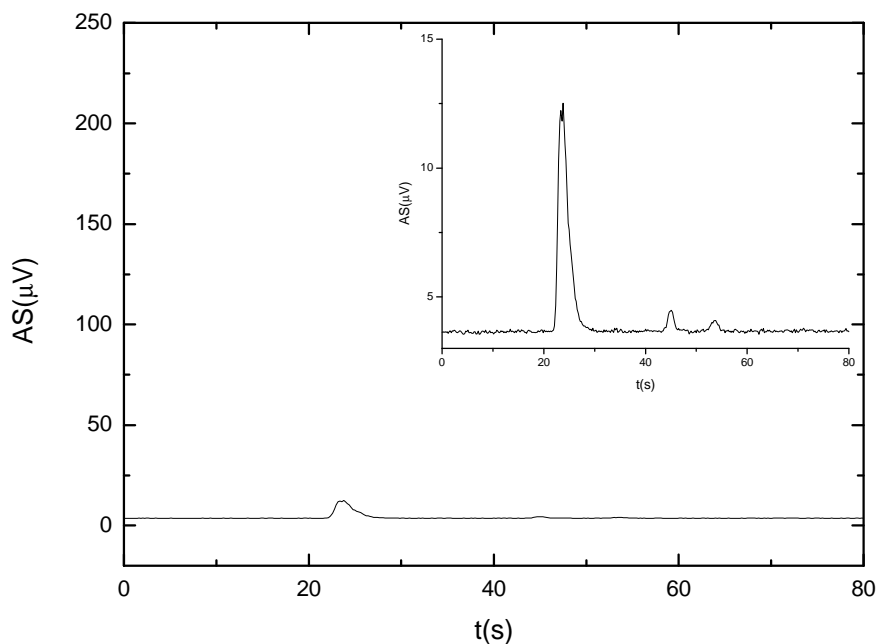
Tab. 3.5-1: plochy píků (P) pro jednotlivé formy arsenu a relativní plocha píku (P_r) vztažená k ploše píku iAs^{III} (aliquot C); n = 6

specie	P ($\mu V s$)	RSD (%)	P_r (%)
iAs^{III}	500	3,4	100
MAs^V	378	4,4	76
$DMAs^V$	227	4,7	45

Důvodem nižších ploch píků methylovaných forem je nedostatečná účinnost generování hydridů z těchto forem za daných podmínek (viz. 3.1.1.1 Selektivní generování hydridů založené na změně pH). Nicméně pro odhad detekčních limitů pro tyto formy jsou nalezené citlivosti dostačující.

Limitujícím faktorem pro stanovení detekčních limitů jednotlivých forem arsenu je šum základní linie v porovnání s velikostí signálu pro standardní roztok analytu - plochy

píku. Z porovnání chromatogramů na obr.3.5-1 pro spojení HG-CT-AFS a obr.3.1-10 i 3.1-11 pro spojení HG-CT-AAS je patrné značné snížení šumu základní linie. Odstup signálu od šumu základní linie je u AFS detekce výrazně vyšší než u metody detekce s AAS. Obr.3.5-2 uvádí potenciál metody AFS pro dosažení nižších detekčních limitů na šumu slepého stanovení.



Obr. 3.5-2: chromatogram pro slepé stanovení s použitím skleněné U-trubice pro detekci AFS (aliquot C) (v pravém rohu snížen rozsah osy y) sušení pomocí nafiionové membrány; AS – absolutní signál, t – čas

Z porovnání slepých stanovení je patrná kontaminace nejvíce pro anorganickou formu arsenu. V případě detekce AAS není kontaminace viditelná (viz. Obr.3.1-8 či Obr.3.1-9), ale při použití citlivější metody detekce AFS je kontaminace patrná, a to i pro methylované formy. Eventuální snížení kontaminace by bylo možné pouze v případě použití chemikálií velmi vysoké čistoty. Pro jednotlivé formy arsenu při generování hydridů v prostředí kyseliny chlorovodíkové jsou v následující tab.3.5-2 uvedeny detekční limity.

Tab. 3.5-2: souhrn detekčních limitů pro jednotlivé arsenové specie pro spojení s AFS; generování v prostředí 1 mol l⁻¹ HCl; n = 6; LOD lit (z literatury) [81] n = 9; LOD teor – dosažitelný detekční limit

specie	LOD lit (pg)	LOD (pg)	LOD teor (pg)
iAs ^{III}	11	3,2	1,1
MAs ^V	12	0,8	0,8
DMAs ^V	18	1,1	1,7

Vzhledem k nízkému šumu základní linie pro AFS detekci bylo možno dosažení tak nízkých detekčních limitů pro jednotlivé formy arsenu. V porovnání s detekčními limity pro AAS detekci (viz. 3.1.3 Detekční limity) se jedná o snížení detekčních limitů pro AFS pro anorganickou formu přibližně desetkrát, pro methylované formy dokonce dvacetkrát. Zlepšení detekčního limitu v případě anorganické formy arsenu je méně výrazné z důvodu nenulového slepého stanovení způsobeného vyšší kontaminací chemikáliemi než u methylovaných forem jak je patrné z obr.3.5-2. Ideálním případem slepého pokusu by byla nepřítomnost kontaminace – základní linie bez pozorovatelných píků. Pro tyto podmínky lze odhadnout nejnížší dosažitelný (teoretický) detekční limit pro jednotlivé formy uvedený ve třetím sloupci tab. 3.5-2. Z porovnání dosažených a teoreticky dosažitelných detekčních limitů vyplývá největší rozdíl pro anorganickou formu arsenu právě díky nejvyšší kontaminaci (viz. obr.3.5-2). Rozdíly detekčních limitů pro methylované formy nejsou tak dramatické.

Použitá metoda detekce vedla k velmi nízkým detekčním limitům i v porovnání s literárními zdroji pro podobná uspořádání (druhý sloupec tab.3.5-2) nebo obdobné uspořádání 2,5 pg iAs^{III}, 3,0 pg MAs^V, 6,5 pg DMAs^V [126] nebo s velmi citlivým typem detektoru ICP-MS 51 pg iAs^{III}, 21 pg MAs^V, 1 pg DMAs^V [82]. Využití FIGS atomizátoru oproti běžně využívanému difuznímu plameni je důvodem dosažení tak nízkých detekčních limitů. S použitím tohoto druhu atomizátoru je možné docílit většího snížení šumu základní linie než lze očekávat s difuzním plamenem, který je použit v literárním zdroji (Tab.3.5-2). Další výhodou FIGS atomizátoru je dosažení vyšší citlivosti pro jednotlivé formy arsenu než u difuzního plamene (viz. 1.2.2.4 Flame-in-gas-shield atomizátor).

Lze konstatovat, že byl prokázán pozoruhodný potenciál spojení HG-CT s detekcí AFS pro speciální analýzu arsenu založenou na generování substituovaných hydridů, především vzhledem k extrémně nízkým detekčním limitům. Spojení HG-CT-AFS nabízí levnější variantu oproti sofistikované stále se rozšiřující a investičně i provozně náročnější

instrumentaci ICP-MS za dosažení nižších nebo porovnatelných detekčních limitů pro jednotlivé formy arsenu. Především pro biologické vzorky obtížně dostupných lidských tkání, ve kterých může být koncentrace arsenových forem velmi nízká, je spojení HG-CT-AFS ideální. Příkladem může být aplikace v oblasti toxikologie, kdy jsou často k dispozici malá množství vzorku [6 , 118 , 127] .

Závěr

Cílem práce byl rozvoj metodiky a instrumentace speciální analýzy arsenu založené na kombinaci selektivního generování substituovaných hydridů s detekcí atomovou absorpční a atomovou fluorescenční spektrometrií. Pro splnění tohoto cíle byla uskutečňována analýza tří- a/nebo pětimocných anorganických a methylovaných forem arsenu. Jako modelové arsenové specie byly kvůli snadné dostupnosti a odpovídající stabilitě zvoleny iAs^{III} , iAs^V , MAs^V , $DMAs^V$ a TMs^VO .

První část práce se zabývá vývojem metodiky a instrumentace speciální analýzy arsenu založené na selektivním generování substituovaných arsanů a využívající záchytu v kryogenní pasti (tj. chromosorbem plněné U-trubicí) s AAS detekcí. S ohledem na tento záměr a na stabilitu toxikologicky zajímavých arsenových forem stanovovaných i v další části této práce byl zvolen přístup k selektivnímu generování substituovaných hydridů založený na předredukci pětimocných forem arsenu L-cysteinem a optimalizovány podmínky tohoto generování. Značná pozornost byla věnována vývoji a optimalizaci experimentálních parametrů provozu kryogenní pasti. Při každé výměně samotné U-trubice nebo výměně chromosorbu či vinutí odporového drátu (sloužícího k ohřevu pasti) bylo třeba optimalizovat teplotní program tak, aby rozlišení, především dimethylované a trimethylované formy, bylo dostatečné. Interference způsobená nespecifickou absorpcí rozkladných produktů L-cysteinu (pravděpodobně sulfanu), pozorovanou v retenčním čase anorganické formy arsenu, byla eliminována deuteriovou korekcí pozadí. Během používání kryogenní pasti bylo třeba řešit její zablokování vymrazenou vodou vystupující ve formě aerosolu a vodní páry ze separátoru fází. Vodní pára uvolněná z kryogenní pasti navíc interferuje nespecifickou absorpcí pozorovanou v retenčních časech methylovaných forem arsenu. Proto byly testovány různé druhy sušicích zařízení. S nafionovou membránou, podle literárních zdrojů nejčastěji používanou, byly pozorovány ztráty methylovaných arsanů a, navíc, eliminace vody byla nedostatečná. Vysokou účinnost sušení bez ztrát analytu prokázala patrona naplněná hydroxidem sodným, která navíc absorbuje rozkladné produkty L-cysteinu způsobující nespecifickou absorpci. Po optimalizaci experimentálních parametrů provozu kryogenní pasti byly stanoveny detekční limity jednotlivých modelových arsenových specií. Díky použití optimálního sušicího zařízení (patrony s hydroxidem sodným) bylo možné pracovat bez DBC, tím snížit šum měření a následně dospět ke snížení detekčních limitů

jednotlivých arsenových specií. Nalezené detekční limity znamenají výrazné zlepšení oproti HG-CT-AAS detekčním limitům udávaným v literatuře, což svědčí o mimořádném potenciálu vyvinuté metodiky a instrumentace HG-CT-AAS pro oblast stopové a ultrastopové analýzy arsenových specií.

Následovala aplikace vyvinuté metodiky a instrumentace HG-CT-AAS pro speciální analýzu arsenu v buněčné suspenzi myších jater. Běžně využívané postupy speciace vyžadují převedení vzorku do roztoku, což je obvykle spojeno s alespoň částečnou mineralizací. Vzhledem k labilitě specií třímocného arsenu přitom neodvratně dochází ke ztrátě speciální informace. Proto byla testována možnost přímého dávkování buněčné suspenze myších jater do hydridového generátoru. Ze získaných výsledků vyplývá uskutečnitelnost tohoto přístupu. Bylo prokázáno, že takto lze správně uskutečnit speciaci arsenu, včetně informace o oxidačním stavu ($iAs^{III,V}$, $MAAs^{III,V}$ a $DMAAs^{III,V}$), ve vzorcích tkání a buněk získaných v populačních studiích. Ukázalo se, že koncentrace $DMAAs^{III,V}$ byla oproti ostatním formám dvoj až trojnásobná. Podstatnou část arsenu v jaterní tkáni obsahují třímocné methylované formy. Oproti tomu $TMAAs^V$ nebyla v těchto typech vzorků vůbec detekována. Vyvinutá metoda dávkování buněčné suspenze přímo do systému hydridového generátoru je unikátní a vytváří předpoklady pro významný pokrok v oboru toxikologie arsenu, protože alternativní přístupy, využívající metody kapalinové chromatografie, jsou pro přímou analýzu tkání nepoužitelné. Významnou výhodou tohoto přístupu je schopnost poskytnout informaci o toxických a zároveň velmi nestabilních $MAAs^{III}$ a $DMAAs^{III}$. Další důležitou výhodou vyvinutého přístupu jsou velmi nízké detekční limity srovnatelné s detekčními limity dosahovanými spojením experimentálně náročných extrakčních postupů s detekcí ICP-MS. Výhoda nízkých detekčních limitů je kritická při analýzách zejména biologického materiálu (tkání) často dostupného v malých množstvích.

V další části práce byl výzkum zaměřen na proces záchytu arsanů v kryogenní pasti. Nový materiál kryogenní pasti – křemen nahradil dosavadní materiál U-trubice – borosilikátové sklo. Křemenná U-trubice vykazovala vyšší mechanickou odolnost, ale hlavně vedla k užším píkům jednotlivých arsanů s vyšším rozlišením. To významně přispělo ke zlepšení parametrů chromatogramu bez dramatického zásahu do celého systému kryogenní pasti. Důležitým parametrem procedur využívajících záchyt v kryogenní pasti je účinnost záchytu a uvolnění arsanů. Proto byla radiometricky stanovena účinnost záchytu i uvolnění arsanu v U-trubici plněné chromosorbem pomocí radioindikátorů ^{73}As a ^{74}As . Byla zjištěná 100% účinnost záchytu i uvolnění arsanu.

Radioindikátory byly využity i ke zjištění distribuce arsanu v U-trubici: k záchytu arsanu dochází již ve vstupní části kryogenní pasti na úrovni hladiny kapalného dusíku.

Tento způsob distribuce arsanu v U-trubici ukazuje potenciál miniaturizace kryogenní pasti, avšak prosté zkrácení U-trubice by nevedlo k dostatečné miniaturizaci, protože pro účinný záchyt arsanu je třeba minimálně 20 cm délky U-trubice ponořené v kapalném dusíku. Proto byly testovány jiné designy pasti. Vhodnou se ukázala křemenná kapilára i.d. 0,53 mm potažená polyimidem využívaná pro plynovou chromatografii. Optimalizací podmínek s pomocí radiometrických i spektrometrických experimentů byla dosažena 100% účinnost záchytu i uvolnění všech studovaných arsanů. Optimalizace byly provedeny s kapilárou tvaru U bez ohřevu odporovým drátem. Po ověření vhodnosti křemenné kapiláry pro záchyt arsanů bylo hledáno, pokud možno komerčně dostupné, zařízení pro postupný ohřev kapiláry, který by umožnil separaci jednotlivých arsanů jejich postupným uvolněním. Komerční zařízení „microcryotrap“ splňovalo nároky na postupný ohřev kapiláry ve tvaru I. Nicméně ke spolehlivé funkci zařízení bylo nutné uskutečnit dodatečné technické úpravy (kovová vložka pro účinný převod tepla na kapiláru a úprava způsobu kontroly ohřevu zařízení). Tento typ kryogenní pasti byl velmi náchylný k zablokování vymrazenou vodou - ani sušení hydroxidem sodným nebylo dostatečně účinné. Testováním různých uspořádání sušicích zařízení byla nalezena kombinace patrony s hydroxidem sodným a nově vyvinutého sušicího zařízení, tzv. kónického vymrazovače, založeného na postupném vymrazování vodní páry na stěně kryogenní pasti. Poté bylo možné křemennou I-kapiláru využívat jako funkční kryogenní past. Dále byly zkoumány možnosti separace arsanů na základě jejich rozdílné teploty varu. Bylo zjištěno, že po optimalizaci teplotního programu má kryogenní past v podobě I-kapiláry potenciál nahradit U-trubici plněnou chromosorbem. Jednou z významných výhod použití křemenné kapiláry jsou užší píky, takže po optimalizaci teplotního programu bude možné mnohem vyšší rozlišení než u U-trubice plněné chromosorbem. Značnou výhodou je také využití komerčně dostupných částí systému této kryogenní pasti a tím jednodušší a rychlejší sestavení, výměna a obsluha. Automatizace celého systému kryogenní pasti se nabízí jako další možnost. Vzhledem k pronikavému zmenšení objemu pasti se nabízí spojení s plynovým chromatografem, kde je nutné provést „nástřík“ směsi arsanů v co nejmenším objemu. Tím lze ovládat separaci efektivněji, plně nezávisle na záchytu. Využití U-trubice stejným způsobem není kvůli pomalému uvolnění z této kryogenní pasti možné. S vyvinutým

systémem kryogenní pasti se tedy ve srovnání s U-trubicí značně rozšiřují možnosti využití.

Pro analýzu vzorků s velmi nízkým obsahem arsenových specií i vzorků, zejména biologických tkání, které jsou dostupné ve velmi malých množstvích je žádoucí další snížení detekčních limitů. Atomový absorpční spektrometr je v principu málo citlivý detektor. Proto bylo testováno spojení hydridového generátoru zahrnujícího kryogenní past s AFS detektorem. Byl prokázán pozoruhodný potenciál spojení HG-CT s detekcí AFS pro speciální analýzu arsenu založenou na generování substituovaných hydridů, především vzhledem k extrémně nízkým detekčním limitům. AFS detektor nabízí levnější variantu oproti investičně i provozně náročnějšímu detektoru ICP-MS a přitom nabízí pro jednotlivé arsenové specie srovnatelné detekční limity.

Závěrem lze konstatovat, že tato práce významně přispěla k rozvoji metodiky a instrumentace speciální analýzy založené na kombinaci selektivního generování substituovaných hydridů s detekcí atomovou absorpční nebo atomovou fluorescenční spektrometrií. Přestože se práce zabývala výhradně těmito dvěma metodami analytické atomové spektrometrie, prakticky všechny získané poznatky lze aplikovat i pro jiné atomové spektrometrické detektory, především pro ICP-MS.

Seznam literatury

- [1] Chen, C. J., Chen, C. W., Wu, M. M., and Kuo, T. L.:
Cancer Potential in Liver, Lung, Bladder and Kidney Due to Ingested Inorganic Arsenic in Drinking-Water.
British Journal of Cancer, 66 (1992) 888-892.
- [2] Rodriguez, V. M., Jimenez-Capdeville, M. E., and Giordano, M.:
The effects of arsenic exposure on the nervous system.
Toxicology Letters, 145 (1-11-2003) 1-18.
- [3] A.H.Smith, M.L.Biggs, L.Moore, R.Haque, C.Steinmaus, J.Chung, A.Hernandez and P.Lopipero,
Cancer Risks from Arsenic in Drinking Water: Implications for Drinking Water Standards
In Arsenic Exposure and Health Effects III;
R.C.Willard, O.A.a.R.Charles, L.C.Rebecca, (Eds.), Elsevier Science Ltd: Oxford, 1999, pp. 191 - 199.
- [4] Carter, D. E., Aposhian, H. V., and Gandolfi, A. J.:
The metabolism of inorganic arsenic oxides, gallium arsenide, and arsine: a toxicochemical review.
Toxicology and Applied Pharmacology, 193 (2003) 309-334.
- [5] Vahter, M.:
Species-Differences in the Metabolism of Arsenic Compounds.
Applied Organometallic Chemistry, 8 (1994) 175-182.
- [6] Styblo, M., Del Razo, L. M., Vega, L., Germolec, D. R., LeCluyse, E. L., Hamilton, G. A., Reed, W., Wang, C., Cullen, W. R., and Thomas, D. J.:
Comparative toxicity of trivalent and pentavalent inorganic and methylated arsenicals in rat and human cells.
Archives of Toxicology, 74 (18-8-2000) 289-299.
- [7] Hughes, M. F.:
Arsenic toxicity and potential mechanisms of action.
Toxicology Letters, 133 (7-7-2002) 1-16.
- [8] Braman, R. S. and Foreback, C. C.:
Methylated Forms of Arsenic in the Enviroment.
Science, 182 (1973) 1247-1249.
- [9] Braman, R. S., Johnson, D. L., Foreback, C. C., Ammons, J. M., and Bricker, J. L.:
Separation and Determination of Nanogram Amounts of Inorganic Arsenic and Methylarsenic Compounds.
Analytical Chemistry, 49 (1977) 621-625.

- [10] Howard, A. G.:
(Boro)Hydride Techniques in Trace Element Speciation.
Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 12 (1997) 267-272.
- [11] Sturgeon, R. E., Guo, X., and Mester, Z.:
Chemical vapor generation: are further advances yet possible?
Analytical and Bioanalytical Chemistry, 382 (7-6-2005) 881-883.
- [12] Devesa, V., Del Razo, L. M., Adair, B., Drobná, Z., Waters, S. B., Hughes, M. F., Styblo, M., and Thomas, D. J.:
Comprehensive analysis of arsenic metabolites by pH-specific hydride generation atomic absorption spectrometry.
Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 19 (2004) 1460-1467.
- [13] Flores, E. M. M., Barcelos, S. Fabiana E., Santos, E. P., Paula, F. R., Barin, J. S., Zanella, R., Dressler, V. L., and Bittencourt, C. F.:
Determination of total arsenic by batch hydride generation atomic absorption spectrometry in injectable drugs containing high levels of Sb(V) as N-methylglucamine antimonate.
Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy, 57 (2-12-2002) 2095-2102.
- [14] Zhang, B., Wang, Y., Wang, X., Chen, X., and Feng, J.:
Determination of antimony, arsenic, bismuth, selenium, tellurium and tin by low pressure atomic absorption spectrometry with a quartz tube furnace atomizer and hydride generation with air addition.
Talanta, 42 (1995) 1095-1098.
- [15] Arbab-Zavar, M. H., Chamsaz, M., Youssefi, A., and Aliakbari, M.:
Mechanistic aspects of electrochemical hydride generation for cadmium.
Analytica Chimica Acta, 576 (25-8-2006) 215-220.
- [16] Červený, V., Rychlovský, P., Netolická, J., and Šíma, J.:
Electrochemical generation of mercury cold vapor and its in-situ trapping in gold-covered graphite tube atomizers.
Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy, 62 (2007) 317-323.
- [17] Sima, J., Rychlovsky, P., and Dedina, J.:
The efficiency of the electrochemical generation of volatile hydrides studied by radiometry and atomic absorption spectrometry.
Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy, 59 (30-1-2004) 125-133.
- [18] Sturgeon, R. E. and Mester, Z.:
Analytical applications of volatile metal derivatives.
Applied Spectroscopy, 56 (2002) 202A-213A.
- [19] Tsalev, D. L., Sperling, M., and Welz, B.:
On-line UV-photooxidation with peroxodisulfate for automated flow injection and for high-performance liquid chromatography coupled to hydride generation atomic absorption spectrometry.
Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy, 55 (28-4-2000) 339-353.

- [20] Yin, Y., Liu, J., and Jiang, G.:
Photo-induced chemical-vapor generation for sample introduction in atomic spectrometry.
Trends in Analytical Chemistry, 30 (2011) 1672-1684.
- [21] D'Ulivo, A.:
Chemical vapor generation by tetrahydroborate(III) and other borane complexes in aqueous media: A critical discussion of fundamental processes and mechanisms involved in reagent decomposition and hydride formation.
Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy, 59 (18-6-2004) 793-825.
- [22] J.Dědina,
Generation of Volatile Compounds for Analytical Atomic Spectroscopy
In *Encyclopedia of Analytical Chemistry* R.A. Meyers (Ed.);
John Wiley and Sons Ltd.: Chichester, 2010, pp. 1 - 39.
- [23] Musil, S., Kratzer, J., Vobecky, M., Hovorka, J., Benada, O., and Matousek, T.:
Chemical vapor generation of silver for atomic absorption spectrometry with the multiatomizer: Radiotracer efficiency study and characterization of silver species.
Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy, 64 (2009) 1240-1247.
- [24] Musil, S., Kratzer, J., Vobecky, M., Benada, O., and Matousek, T.:
Silver chemical vapor generation for atomic absorption spectrometry: minimization of transport losses, interferences and application to water analysis.
Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 25 (2010) 1618-1626.
- [25] Arslan, Y., Matousek, T., Kratzer, J., Musil, S., Benada, O., Vobecky, M., Ataman, O. Y., and Dedina, J.:
Gold volatile compound generation: optimization, efficiency and characterization of the generated form.
Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 26 (2011) 828-837.
- [26] Luna, A. S., Sturgeon, R. E., and de Campos, R. C.:
Chemical vapor generation: Atomic absorption by Ag, Au, Cu, and Zn following reduction of aquo ions with sodium tetrahydroborate(III).
Analytical Chemistry, 72 (2000) 3523-3531.
- [27] Sun, H. W., Suo, R., and Lu, Y. K.:
Determination of zinc in food using atomic fluorescence spectrometry by hydride generation from organized media.
Analytica Chimica Acta, 457 (2002) 305-310.
- [28] Dědina, J.:
Atomization of volatile compounds for atomic absorption and atomic fluorescence spectrometry: On the way towards the ideal atomizer.
Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy, 62 (2007) 846-872.
- [29] Flores, E. M. D., Nunes, A. M., Dressler, V. L., and Dedina, J.:
Multiple microflame quartz tube atomizer: Study and minimization of interferences in quartz tube atomizers in hydride generation atomic absorption spectrometry.
Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy, 64 (2009) 173-178.

- [30] Anthemidis, A. N., Zachariadis, G. A., and Stratis, J. A.:
Determination of arsenic(III) and total inorganic arsenic in water samples using an on-line sequential insertion system and hydride generation atomic absorption spectrometry.
Analytica Chimica Acta, 547 (22-8-2005) 237-242.
- [31] Moreda-Pineiro, J., Moscoso-Perez, C., Lopez-Mahia, P., Muniategui-Lorenzo, S., Fernandez-Fernandez, E., and Prada-Rodriguez, D.:
Comparative study of different permanently-treated graphite tubes for the determination of As, Sb, and Se in natural waters by hydride generation-electrothermal atomic absorption spectrometry.
Analytica Chimica Acta, 431 (2001) 157-165.
- [32] Currier, J. M., Svoboda, M., Matoušek, T., Dědina, J., and Stýblo, M.:
Direct Analysis and Stability of Methylated Trivalent Arsenic Metabolites in Cells and Tissues.
Metallomics, (2011)
- [33] Guo, T., Baasner, J., and Tsalev, D. L.:
Fast automated determination of toxicologically relevant arsenic in urine by flow injection hydride generation atomic absorption spectrometry.
Analytica Chimica Acta, 349 (1997) 313-318.
- [34] Karadjova, Irina B., Petrov, Panayot K., Serafimovski, Ivan, Stafilov, Trajce, and Tsalev, Dimiter L.:
Arsenic in marine tissues - The challenging problems to electrothermal and hydride generation atomic absorption spectrometry.
Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy, 62 (2007) 258-268.
- [35] Vieira, Mariana Antunes, Welz, Bernhard, and Curtius, Adilson Jose:
Determination of arsenic in sediments, coal and fly ash slurries after ultrasonic treatment by hydride generation atomic absorption spectrometry and trapping in an iridium-treated graphite tube.
Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy, 57 (2-12-2002) 2057-2067.
- [36] Ribeiro, A. S., Arruda, M. A. Z., and Cadore, S.:
Determination of bismuth in metallurgical materials using a quartz tube atomizer with tungsten coil and flow injection-hydride-generation atomic absorption spectrometry.
Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy, 57 (2-12-2002) 2113-2120.
- [37] J.Dědina and D.L.Tsalev,
Hydride generation atomic absorption spectrometry.
Wiley, Chichester, 1995.
- [38] Kolektiv autorů,
Kurz atomové absorpční spektrometrie.
Spektroskopická společnost Jana Marka Marci, Praha, 2006.
- [39] J.Pavelka, V.Spěváčková, M.Fara, D.Kolihová, J.Sysalová, V.Kubáň, M.Hoenig, J.Kučera, E.Plško, J.Dědina and T.Černohorský,

Kurz atomové absorpční spektrometrie (pro pokročilé).
Spektroskopická společnost Jana Marci Marci, Praha, 1996.

- [40] J.Dědina, M.Fara, D.Kolihová, J.Korečková, J.Musil, E.Plško and V.Sychra,
Vybrané metody analytické atomové spektrometrie.
Česká spektroskopická společnost, Praha, 1987.
- [41] Burguera, J. L., Burguera, M., Rivas, C., and 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.
- [42] Matoušek, T., Hernández-Zavala, A, Svoboda, M, Langrová, L., Adair, B. M.,
Drobná, Z., Thomas, D. J., Stýblo, M., and Dědina, J.:
Oxidation state specific generation of arsines from methylated arsenicals based on L-
cysteine treatment in buffered media for speciation analysis by hydride generation-
automated cryotrapping-gas chromatography-atomic absorption spectrometry with
the multiatomizer.
Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy, 63 (2008) 396.
- [43] Bortoleto, G. G. and Cadore, S.:
Determination of total inorganic arsenic in water using on-line pre-concentration and
hydride-generation atomic absorption spectrometry.
Talanta, 67 (15-7-2005) 169-174.
- [44] Pozebon, Dirce, Dressler, Valderi L., Gomes Neto, Jose A., and Curtius, Adilson J.:
Determination of arsenic(III) and arsenic(V) by electrothermal atomic absorption
spectrometry after complexation and sorption on a C-18 bonded silica column.
Talanta, 45 (1998) 1167-1175.
- [45] Matusiewicz, H. and Sturgeon, R. E.:
Atomic spectrometric detection of hydride forming elements following in situ
trapping within a graphite furnace.
Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy, 51 (1996) 377-397.
- [46] Kratzer, J. and Dědina, J.:
In situ trapping of stibine in externally heated quartz tube atomizers for atomic
absorption spectrometry.
Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy, 60 (15-7-2005) 859-864.
- [47] Docekal, B., Gucer, S., and Selecka, A.:
Trapping of hydride forming elements within miniature electrothermal devices: part
I. investigation of collection of arsenic and selenium hydrides on a molybdenum foil
strip.
Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy, 59 (30-4-2004) 487-495.
- [48] Arenas, V., Stoepler, M., and Bergerhoff, G.:
Arsenic Determination in the Ultratrace Range by Atomic-Absorption Spectrometry
After Preconcentration of the Hydride.
Fresenius Zeitschrift fur Analytische Chemie, 332 (1988) 447-452.

- [49] Howard, A. G. and Arbab-Zavar, M. H.:
Determination of Inorganic Arsenic(III) and Arsenic(V), Methylarsenic and Dimethylarsenic Species by Selective Hydride Evolution Atomic-Absorption Spectroscopy.
Analyst, 106 (1981) 213-220.
- [50] Ebdon, L., Hill, S., Walton, A. P., and Ward, R. W.:
Coupled Chromatography-Atomic Spectrometry for Arsenic Speciation - A Comparative-Study.
Analyst, 113 (1988) 1159-1165.
- [51] Holak, W. and Specchio, J. J.:
Determination of total As, As(III) and As(V) in foods by AA spectroscopy.
Atomic Spectroscopy, 12 (1991) 105-108.
- [52] Kratzer, J. and Dědina, J.:
Stibine and bismuthine trapping in quartz tube atomizers for atomic absorption spectrometry - Method optimization and analytical applications.
Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy, 63 (2008) 843-849.
- [53] Kratzer, J., Vobecký, M., and Dědina, J.:
Stibine and bismuthine trapping in quartz tube atomizers for atomic absorption spectrometry. Part 2: a radiotracer study.
Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 24 (2009) 1222-1228.
- [54] Krejčí, P., Dočekal, B., and Hrušovská, Z.:
Trapping of hydride forming elements within miniature electrothermal devices. Part 3. Investigation of collection of antimony and bismuth on a molybdenum foil strip following hydride generation.
Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy, In Press, Corrected Proof (1810)
- [55] Brima, E. I., Jenkins, R. O., and Haris, P. I.:
Understanding arsenic metabolism through spectroscopic determination of arsenic in human urine.
Spectroscopy-An International Journal, 20 (2006) 125-151.
- [56] Le, X. C., Ma, M. S., Lu, X. F., Cullen, W. R., Aposhian, H. V., and Zheng, B. S.:
Determination of monomethylarsonous acid, a key arsenic methylation intermediate, in human urine.
Environmental Health Perspectives, 108 (2000) 1015-1018.
- [57] Matoušek, T., Dědina, J., and Selecká, A.:
Multiple microflame quartz tube atomizer -- further development towards the ideal hydride atomizer for atomic absorption spectrometry.
Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy, 57 (15-3-2002) 451-462.
- [58] Agterdenbos, J. and Bax, D.:
Mechanism in hydride generation AAS.
Fresenius Journal of Analytical Chemistry, 323 (1986) 783.
- [59] Bax, D., Peters, F. F., Van Noort, J. P., and Agterdenbos, J.:
Determination of Se with HGAAS-II. The role of Na borohydride and of hydrogen

gas.

Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy, 41 (1986) 275.

- [60] NARSITO, Agterdenbos, J., and Santosa, S. J.:
Study of processes in the hydride generation atomic-absorption spectrometry of antimony, arsenic and selenium.
Analytica Chimica Acta, 237 (1990) 189-199.
- [61] Welz, B. and Melcher, M.:
Investigations on atomisation mechanism of volatile hydride-forming elements in a heated quartz cell. Part 1. Gas-phase and surface effects: decomposition and atomisation of arsine.
Analyst, 108 (1983) 213.
- [62] Welz, B., Schubert-Jacobs, M., Styris, D. L., and Redfield, D. A.:
Investigation of reactions and atomization of arsine in a heated quartz tube using AA and MS.
Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy, 45 (1990) 1235.
- [63] Dědina, J. and Welz, B.:
Quartz tube atomizers for hydride generation atomic absorption spectrometry - mechanism for atomization of arsine - invited lecture.
Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 7 (1992) 307-314.
- [64] Dědina, J. and Welz, B.:
Quartz tube atomizers for hydride generation atomic absorption spectrometry: fate of free arsenic atoms.
Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy, 48 (1993) 301-314.
- [65] NARSITO and Agterdenbos, J.:
A study of arsenic(III) and arsenic(V) reduction and of arsine decomposition in hydride-generation atomic-absorption spectrometry.
Analytica Chimica Acta, 197 (1987) 315-321.
- [66] Rezacova, O. and Dedina, J.:
Modular L-design of hydride atomizers for atomic absorption spectrometry.
Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy, 64 (2009) 717-720.
- [67] B.a.k.Dočekal,
Atomová absorpční spektrometrie, Sborník přednášek z kurzu.
Ing. Václav Helán - 2 THETA, Český Těšín, 2003.
- [68] A.D' Ulivo,
Environmental Analysis using Chromatography Interfaced with Atomic Spectroscopy.
Ellis Horwood, Chichester, 1989.
- [69] J.Dědina,
Atomové absorpční a fluorescenční detektory pro speciální analýzu založenou na generování těkavých sloučenin
In Inovace v atomové absorpční a fluorescenční spektroskopii;
PACI: Praha, 2007, pp. 105 - 126.

- [70] D'Ulivo, A., Dedina, J., Lampugnani, L., and Matousek, T.:
Mechanism of selenium hydride atomization, fate of free atoms and temperature distribution in an argon shielded, highly fuel-rich, hydrogen-oxygen diffusion micro-flame studied by atomic absorption spectrometry.
Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 17 (2002) 253-257.
- [71] D'Ulivo, A. and Dědina, J.:
Interferences in hydride atomization studied by atomic absorption and atomic fluorescence spectrometry.
Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy, 51 (1996) 481-498.
- [72] D'Ulivo, A., Dedina, J., and Lampugnani, L.:
Effect of contamination by oxygen at trace level in miniature flame hydride atomizers.
Journal of Analytical Absorption Spectrometry, 20 (2005) 40-45.
- [73] Dědina, J. and D'Ulivo, A.:
Argon shielded, highly fuel-rich, hydrogen-oxygen diffusion microflame-a new hydride atomizer.
Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy, 52 (10-10-1997) 1737-1746.
- [74] Templeton, D. M., Ariese, F., Cornelis, R., Danielsson, L. G., Muntau, H., van Leeuwen H.P, and Lobinski, R.:
Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects, and methodological approaches (IUPAC Recommendations 2000).
Pure and Applied Chemistry, 78 (2000) 1453-1470.
- [75] Coelho, N. M. M., da Silva, A. Cosmen, and da Silva, C. Moraes:
Determination of As(III) and total inorganic arsenic by flow injection hydride generation atomic absorption spectrometry.
Analytica Chimica Acta, 460 (5-6-2002) 227-233.
- [76] Nielsen, Steffen and Hansen, Elo H.:
Determination of As(III) and As(V) by flow injection-hydride generation-atomic absorption spectrometry via on-line reduction of As(V) by KI.
Analytica Chimica Acta, 343 (12-5-1997) 5-17.
- [77] Yano, Y., Miyama, T., Ito, A., and Yasuda, T.:
Convenient measurements and speciation of arsenic in water by use of simple pretreatments for atomic absorption spectrometry in combination with hydride generation.
Analytical Sciences, 16 (2000) 939-943.
- [78] Musil, S. and 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-Atomic Spectroscopy, 63 (2008) 685-691.

- [79] El-Hadri, F., Morales-Rubio, A., and de la Guardia, M.:
Atomic fluorescence spectrometric determination of trace amounts of arsenic and antimony in drinking water by continuous hydride generation.
Talanta, 52 (2000) 653-662.
- [80] Gomez, M. M., Kovacs, M., Palacios, M. A., Pizarro, I., and Camara, C.:
Effect of the mineralization method on arsenic determination in marine organisms by hydride generation atomic fluorescence spectroscopy.
Microchimica Acta, 150 (2005) 9-14.
- [81] Featherstone, A. M., Butler, E. C. V., O'Grady, B. V., and Michel, P.:
Determination of arsenic species in sea-water by hydride generation atomic fluorescence spectroscopy.
Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 13 (1998) 1355-1360.
- [82] Diaz-Bone, R. A. and Hitzke, M.:
Multi-element organometal(loid) speciation by hydride generation-GC-ICP-MS: overcoming the problem of species-specific optima by using a pH-gradient during derivatisation.
Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 23 (2008) 861-870.
- [83] Amouroux, D., Tessier, E., Pecheyran, C., and Donard, O. F. X.:
Sampling and probing volatile metal(loid) species in natural waters by in-situ purge and cryogenic trapping followed by gas chromatography and inductively coupled plasma mass spectrometry (P-CT-GC-ICP/MS).
Analytica Chimica Acta, 377 (31-12-1998) 241-254.
- [84] Bermejo-Barrera, Pilar, Moreda-Pineiro, Jorge, Moreda-Pineiro, Antonio, and Bermejo-Barrera, Adela:
Selective medium reactions for the arsenic(III), arsenic(V), dimethylarsinic acid and monomethylarsinic acid determination in waters by hydride generation on-line electrothermal atomic absorption spectrometry with in situ preconcentration on Zr-coated graphite tubes.
Analytica Chimica Acta, 374 (23-11-1998) 231-240.
- [85] Brindle, I. D., Alarabi, H., Karshman, S., Le, X. C., Zheng, S. G., and Chen, H. W.:
Combined Generator/Separator for Continuous Hydride Generation - Application to Online Pre-Reduction of Arsenic(V) and Determination of Arsenic in Water by Atomic Emission-Spectrometry.
Analyst, 117 (1992) 407-411.
- [86] Karthikeyan, S., Prasada Rao, T., and Iyer, C. S. P.:
Determination of arsenic in sea water by sorbent extraction with hydride generation atomic absorption spectrometry.
Talanta, 49 (1999) 523-530.
- [87] Centineo, G., Bayon, M. M., and Sanz-Medel, A.:
Flow injection analysis with inductively coupled plasma time-of-flight mass spectrometry for the simultaneous determination of elements forming hydrides and its application to urine.
Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 15 (2000) 1357-1362.

- [88] Matusiewicz, H. and Slachcinski, M.:
Simultaneous determination of hydride forming elements (As, Sb, Se, Sn) and Hg in sonicate slurries of biological and environmental reference materials by hydride generation microwave induced plasma optical emission spectrometry (SS-HG-MIP-OES).
Microchemical Journal, 82 (2006) 78-85.
- [89] Palacios, M. A., Gomez, M., Cımar, C., and Lopez, M. A.:
Stability studies of arsenate, monomethylarsonate, dimethylarsinate, arsenobetaine and arsenocholine in deionized water, urine and clean-up dry residue from urine samples and determination by liquid chromatography with microwave-assisted oxidation-hydride generation atomic absorption spectrometric detection.
Analytica Chimica Acta, 340 (20-3-1997) 209-220.
- [90] Petit de Pena, Y., Vielma, O., Burguera, J. L., Burguera, M., Rondon, C., and Carrero, P.:
On-line determination of antimony(III) and antimony(V) in liver tissue and whole blood by flow injection GÇô hydride generation GÇô atomic absorption spectrometry.
Talanta, 55 (31-10-2001) 743-754.
- [91] Petrov, Panayot K., Serafimovski, Ivan, Stafilov, Trajce, and Tsalev, Dimiter L.:
Flow injection hydride generation electrothermal atomic absorption spectrometric determination of toxicologically relevant arsenic in urine.
Talanta, 69 (15-7-2006) 1112-1117.
- [92] Kubota, R., Kunito, T., and Tanabe, S.:
Occurrence of several arsenic compounds in the liver of birds, cetaceans, pinnipeds, and sea turtles.
Environmental Toxicology and Chemistry, 22 (2003) 1200-1207.
- [93] Shah, A. Q., Kazi, T. G., Arain, M. B., Jamali, M. K., Afridi, H. L., Jalbani, N., Baig, J. A., and Kandhro, G. A.:
Accumulation of arsenic in different fresh water fish species - potential contribution to high arsenic intakes.
Food Chemistry, 112 (2009) 520-524.
- [94] Shah, A. Q., Kazi, T. G., Arain, M. B., Jamali, M. K., Afridi, H. I., Jalbani, N., Kandhro, G. A., Baig, J. A., Sarfraz, R. A., and Ansari, R.:
Comparison of electrothermal and hydride generation atomic absorption spectrometry for the determination of total arsenic in broiler chicken.
Food Chemistry, 113 (2009) 1351-1355.
- [95] Alauddin, M., Alauddin, S. T., Bhattacharjee, M., Sultana, S., Chowdhury, D., Bibi, H., and Rabbani, G. H.:
Speciation of arsenic metabolite intermediates in human urine by ion-exchange chromatography and flow injection hydride generation atomic absorption spectrometry.
Journal of Environmental Science and Health Part A-Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering, 38 (2003) 115-128.

- [96] Frank, Jutta, Krachler, Michael, and Shotyk, William:
Direct determination of arsenic in acid digests of plant and peat samples using HG-AAS and ICP-SF-MS.
Analytica Chimica Acta, 530 (14-2-2005) 307-316.
- [97] Horng, Ching Jyi and Lin, Shinne Ren:
Determination of urinary trace elements (As, Hg, Zn, Pb, Se) in patients with Blackfoot disease.
Talanta, 45 (12-12-1997) 75-83.
- [98] Villa-Lojo, M. C.,onso-Rodriguez, E., Lopez-Mahia, P., Muniategui-Lorenzo, S., and Prada-Rodriguez, D.:
Coupled high performance liquid chromatography-microwave digestion-hydride generation-atomic absorption spectrometry for inorganic and organic arsenic speciation in fish tissue.
Talanta, 57 (10-6-2002) 741-750.
- [99] Terlecka, E:
Arsenic speciation analysis in water samples: a review of the hyphenated techniques.
Environmental Monitoring and Assessment, 107 (2005) 259-284.
- [100] Kevin A.Francesconi and Doris Kuehnelt:
Determination of arsenic species: A critical review of methods and applications, 2000-2003.
Analyst, 129 (2004) 373-395.
- [101] R.Cornelis, J.Caruso, H.Crews and K.Heumann,
Handbook of Elemental Speciation II, Species in the Environment, Food, Medicine and Occupational Health.
Wiley, Chichester, England, 2005.
- [102] Kumar, A. R. and Riyazuddin, P.:
Non-chromatographic hydride generation atomic spectrometric techniques for the speciation analysis of arsenic, antimony, selenium, and tellurium in water samples - a review.
International Journal of Environmental Analytical Chemistry, 87 (2007) 469-500.
- [103] Corns, W. T., Ebdon, L., Hill, S. J., and Stockwell, P. B.:
Effects of Moisture on the Cold Vapor Determination of Mercury and Its Removal by Use of Membrane Dryer Tubes.
Analyst, 117 (1992) 717-719.
- [104] Sundin, N. G., Tyson, J. F., Hanna, C. P., and McIntosh, S. A.:
The Use of Nafion Dryer Tubes for Moisture Removal in Flow-Injection Chemical-Vapor Generation Atomic-Absorption Spectrometry.
Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy, 50 (1995) 369-375.
- [105] Wasik, A., Pereiro, R. I., Dietz, Ch., Szpunar, J., and Lobinski, R.:
Speciation of mercury by ICP-MS after on-line capillary cryofocusing and ambient temperature multicapillary gas chromatography.
Analytical Communications, 35 (1998) 331-335.

- [106] Wasik, A., Lobinski, R., and Namiesnik, J.:
An automated speciation analyser of organometallic compound content.
Instrumentation science and technology, 29 (2001) 393-405.
- [107] Corns, W. T., Stockwell, P. B., Ebdon, L., and Hill, S. J.:
Development of An Atomic Fluorescence Spectrometer for the Hydride-Forming
Elements.
Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 8 (1993) 71-77.
- [108] Van Elteren, J. T., Das, H. A., DeLigny, C. L., Agterdenbos, J., and Bax, D.:
Arsenic speciation in aqueous samples using a selective AsIII/AsV preconcentration
in combination with an automatable cryotrapping hydride generation procedure for
monomethylarsonic acid and dimethylarsinic acid.
Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry, 179 (22-11-1994) 211-219.
- [109] Masscheleyn, P. H., Delaune, R. D., and Patrick, W. H.:
A Hydride Generation Atomic-Absorption Technique for Arsenic Speciation.
Journal of Environmental Quality, 20 (1991) 96-100.
- [110] Welz, B. and Schubertjacob, M.:
Investigations on Atomization Mechanisms in Hydride-Generation Atomic-
Absorption Spectrometry.
Fresenius Zeitschrift fur Analytische Chemie, 324 (1986) 832-838.
- [111] Holak, W.:
Gas-Sampling Technique for Arsenic Determination by Atomic Absorption
Spectrophotometry.
Analytical Chemistry, 41 (1969) 1712-&.
- [112] Feldman, C.:
Improvements in the Arsine Accumulation Helium Glow Detector Procedure for
Determining Traces of Arsenic.
Analytical Chemistry, 51 (1979) 664-669.
- [113] Andrae, M. O.:
Determination of Arsenic Species in Natural Waters.
Analytical Chemistry, 49 (1977) 820-823.
- [114] Mukai, H. and Ambe, Y.:
Determination of Methylarsenic Compounds in Airborne Particulate Matter by Gas-
Chromatography with Atomic-Absorption Spectrometry.
Analytica Chimica Acta, 193 (1987) 219-229.
- [115] Taurkova, P., Svoboda, M., Musil, S., and Matousek, T.:
Loss of di- and trimethylarsine on Nafion membrane dryers following hydride
generation.
Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 26 (2011) 220-223.
- [116] CITAC and EURACHEM,
Guide to Quality in Analytical Chemistry, An Aid to Accreditation.
CITAC and EURACHEM, 2002.

- [117] K.Eckschlager,
Chemometrie I, II.
Katedra anorganické chemie PřF UK Praha, Praha, 1994.
- [118] Currier, J. M., Svoboda, M., Matousek, T., Dedina, J., and Styblo, M.:
Direct analysis and stability of methylated trivalent arsenic metabolites in cells and tissues.
Metallomics, 3 (2011) 1347-1354.
- [119] Kratzer, J., Dočekal, B., Heitmann, U., and Dědina, J.:
Spectral interferences of oxygen and water molecules in hydride generation atomic absorption spectrometry with quartz atomizers: Comparison of preconcentration and on-line atomization modes for As and Se determination.
Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 26 (2011) 2230-2237.
- [120] Tung-Ming, H. and Jing-Ming, W:
Cryogenic trapping with a packed cold finger trap for the determination and speciation of arsenic by flow injection/hydride generation/ atomic absorption spectrometry.
Journal of Analytical Absorption Spectrometry, 19 (16-6-2004) 923-928.
- [121] Coelho, N. M. M., Coelho, L. M., Lima, E. S., Pastor, A., and Guardia, M. de la:
Determination of arsenic compounds in beverages by high-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry.
Talanta, 66 (15-5-2005) 818-822.
- [122] McSheehy, S., Szpunar, J., Morabito, R., and Quevauviller, P.:
The speciation of arsenic in biological tissues and the certification of reference materials for quality control.
Trends in Analytical Chemistry, 22 (2003) 191-209.
- [123] Mao, X. J., Chen, B. B., Huang, C. Z., He, M., and Hu, B.:
Titania immobilized polypropylene hollow fiber as a disposable coating for stir bar sorptive extraction-high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry speciation of arsenic in chicken tissues.
Journal of Chromatography A, 1218 (2011) 1-9.
- [124] Serafimovski, I., Karadjova, I. B., Stafilov, T., and Tsalev, D. L.:
Determination of total arsenic and toxicologically relevant arsenic species in fish by using electrothermal and hydride generation atomic absorption spectrometry.
Microchemical Journal, 83 (2006) 55-60.
- [125] I.a.k.Fanderlik,
Křemenné sklo a jeho využití v praxi.
SNTL, Praha, 1985.
- [126] Yuan, C. G., Zhang, K. G., Wang, Z. H., and Jiang, G. B.:
Rapid analysis of volatile arsenic species released from lake sediment by a packed cotton column coupled with atomic fluorescence spectrometry.
Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 25 (2010) 1605-1611.

- [127] Currier, J. M., Svoboda, M., de Moraes, D. P., Matousek, T., Dedina, J., and Styblo, M.:
Direct Analysis of Methylated Trivalent Arsenicals in Mouse Liver by Hydride
Generation-Cryotrapping-Atomic Absorption Spectrometry.
Chemical Research in Toxicology, 24 (2011) 478-480.