

**UNIVERZITA KARLOVA**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Analytická chemie



Mgr. Eliška Nováková

**UV-FOTOCHEMICKÉ GENEROVÁNÍ TĚKAVÝCH SLOUČENIN  
SELENU A TELURU**

**UV-photochemical generation of volatile compounds of selenium and  
tellurium**

Disertační práce

Vedoucí disertační práce: RNDr. Jakub Hraníček, Ph.D.

Konzultant: prof. RNDr. Jiří Dědina, Csc., DSc.

Praha 2017

Tato disertační práce byla vypracována v laboratoři atomové spektrometrie skupiny spektrometrických metod katedry analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy.

Disertační práce byla finančně podporována Univerzitou Karlovou (projekty GA UK č. 28214 a č. 28621) a grantovou agenturou České republiky (projekt GA ČR č.14-23532).

### **Prohlášení**

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

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

V Praze dne .....

.....  
podpis

### **Prohlášení o autorství**

Jako zástupce spoluautorů prohlašuji, že se Mgr. Eliška Nováková podílela na níže uvedených publikovaných pracích mírou uvedenou v závorkách:

**Nováková, E.**, Rychlovský, P., Resslerová, T., Hraníček, J. and Červený, V.: Electrochemical generation of volatile form of cadmium and its in situ trapping in a graphite furnace, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 2016, Volume 117, Pages 42–48, doi:10.1016/j.sab.2016.01.003, IF: 3,289, [80 %]

Linhart O., Smolejová J., Červený V., Hraníček J., **Nováková E.**, Resslerová T., Rychlovský P.: Determination of As by UV-photochemical generation of its volatile species with AAS detection, *Monatshefte für Chemie*, 2016, Volume 147, Pages 1447–1454, 10.1007/s00706-016–1808-5, IF: 1,131, [5 %]

**E. Nováková**, O. Linhart, V. Červený, P. Rychlovský and J. Hraníček: Flow Injection Determination of Se in Dietary Supplements Using TiO<sub>2</sub> Mediated UV-photochemical Volatile Species Generation, *Spectrochim. Acta B*, 2017, Volume 134, Pages 98-104, doi:10.1016/j.sab.2017.06.007, IF: 3,241, [80 %]

**E. Nováková**, M. Rybínová, J. Hraníček, P. Rychlovský, V. Červený: Comparison of interference in selenium volatile species generation methods with QF-AAS detection, *J. Anal. At. Spectrom.*, *v recenzním řízení*, [50 %]

.....  
RNDr. Václav Červený, Ph.D.

.....  
RNDr. Jakub Hraníček, Ph.D

## **Předmětová hesla**

Analytická chemie, atomová spektrometrie

## **Klíčová slova**

Atomová absorpční spektrometrie, atomová fluorescenční spektrometrie, speciální analýza, UV-fotochemické generování, těkavá specie, selen, telur, interference

## **Subject words**

Analytical chemistry, atomic spectrometry

## **Key words**

Atomic absorption spectrometry, atomic fluorescence spectrometry, speciation analysis, UV-photochemical generation, volatile species, selenium, tellurium, interferences

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala všem, kteří se podíleli na vzniku této práce. Za prvé RNDr. Jakubovi Hraníčkoví Ph.D. za to, že se ujal vedení rozpracované práce a dovedl ji do zdárného konce. Za věcné rady a konzultace bych ráda poděkovala i prof. RNDr. Jiřímu Dědinovi, DSc., který se ujal funkce konzultanta. Jejich konstruktivní kritika pomohla zvýšit kvalitu práce. RNDr. Václavu Červenému, Ph.D. bych chtěla poděkovat především za výpomoc s různými technickými problémy. V neposlední řadě bych chtěla na tomto místě vzpomenout na svého původního školitele doc RNDr. Petra Rychlovského, CSc. a vyjádřit svou vděčnost za odborné vedení.

Za druhé bych chtěla poděkovat svým přátelům a rodině. V první řadě mé matce za trpělivost, se kterou mne podporovala po celou dobu mých studií. Kolegům Mgr. Tině Položijové, Mgr. Marcele Rybínové, Ph.D., Mgr. Ondřeji Linhartovi a Bc. Janě Smolejové náleží poděkování za spolupráci a vytvoření příjemného pracovního prostředí, Mgr. Zuzaně Böhmové a Mgr. Miroslavu Položijovi za podnětné diskuze v poledních pauzách.

## Abstrakt

Předkládaná disertační práce se zabývá studiem UV-fotochemického generování těkavých sloučenin Se a Te z různých specií s cílem rozšířit dosavadní poznatky o problematice UV-fotochemického generování o možnost využití fotokatalytické redukce vyšších oxidačních stavů pro speciální analýzu.

V první fázi byla sestavena aparatura pro UV-fotochemické generování s využitím přídatku suspenze  $\text{TiO}_2$ . Volba materiálu reaktoru a konstrukce aparatury proběhla na základě literární rešerše a poznatků získaných již dříve v rámci výzkumné skupiny. Pozornost byla věnována optimalizaci reakčních podmínek, přičemž jako modelové prvky byly zvoleny Se a Te. Selen byl zkoumán, protože je nejčastějším prvkem, na kterém je UV-fotochemické generování zkoumáno. Naopak Te byl vybrán jako modelový zástupce těžších prvků tvořících méně stabilní těkavé sloučeniny.

Ve druhé fázi experimentů byly zkoumány možnosti aplikace vyvinuté metody. UV-fotochemické generování těkavé sloučeniny Se katalyzované  $\text{TiO}_2$  bylo úspěšně aplikováno pro stanovení obsahu Se ve vodných matricích včetně certifikovaných referenčních materiálů a v různých vzorcích potravinových doplňků. Metoda byla dále úspěšně modifikována pro použití ve spojení s atomově fluorescenční detekcí jako derivatizační technika pro speciální analýzu založenou na chromatografické separaci.

Ve třetí fázi disertační práce byly provedeny experimenty zkoumající vliv matrice na chemické, elektrochemické a UV-fotochemické generování těkavých sloučenin opět se Se jako modelovým prvkem a tyto tři metody byly na základě interferencí porovnány. Bylo zjištěno, že při UV-fotochemickém a elektrochemickém generování by bylo možno dále zvýšit citlivost stanovení pomocí reakčních modifikátorů. V odolnosti vůči vlivu interferentů alternativní techniky generování těkavých sloučenin významně zaostávají za chemickým generováním především kvůli vlivu anorganických kyselin a solí.

## **Abstract**

The presented thesis deals with UV-photochemical generation of volatile compounds of Se and Te from various species. The aim of the project was to expand the current state of knowledge by the application of photocatalytic reduction of higher oxidation states of Se and Te for the speciation analysis based on UV-photochemical generation of volatile compounds.

The first step of the study was the assembly of the apparatus for the photocatalysed UV-photochemical generation of volatile compounds. The material of reactor and the whole experimental set-up were based on literature survey and previous research done in our research group. Experiments were directed towards finding the optimum conditions for generation of volatile compounds of selected model elements Se and Te. Se was studied as the element most commonly determined by the UV-photochemical generation of volatile compounds. Conversely, Te was selected as a model analyte representing elements forming less stable volatile compounds.

The second part was the application of the optimised method of photocatalysed UV-photochemical generation of volatile Se compound to the determination of Se in water matrices, liquid certified reference materials and also samples of dietary supplements. TiO<sub>2</sub>/UV-photochemical generation was also successfully modified to be used with atomic fluorescence spectrometry as a derivatisation step following speciation analysis based on liquid chromatography separation of inorganic and organic selenium species.

The third part of this thesis studied the influence of the sample matrix on the chemical, electrochemical and UV-photochemical generation of volatile Se compounds. It was found out that the sensitivity of Se determination by the electrochemical and UV-photochemical generation of volatile compounds can be notably improved by the use of reaction modifiers. However, these alternative methods have been found more likely to give incorrect results than chemical generation, particularly due to their susceptibility to the presence of inorganic acids and their salts, which are common matrix components.

## Seznam použitých zkratk a symbolů:

A	plocha píku
$A_\lambda$	absorbance při dané vlnové délce
$A^-$	anion pufru v mobilní fázi
AAS	atomová absorpční spektrometrie
AFS	atomová fluorescenční spektrometrie
$c(\text{CH}_3\text{COOH})$	koncentrace kyseliny octové
$c(\text{TiO}_2)$	koncentrace oxidu titaničitého
CFA	kontinuální průtoková analýza
CVG	chemické generování těkavých sloučenin
EcVG	elektrochemické generování těkavých sloučenin
EDXRF	energiově disperzní rentgenová fluorescenční spektrometrie
ETAAS	atomová absorpční spektrometrie s elektrotermickou atomizací
FIA	průtoková injekční analýza
FIGS	flame-in-gas-shield, typ miniaturizovaného plamenového atomizátoru vyznačující se odstíněním přístupu $\text{O}_2$ z okolní atmosféry inertním plynem
$Fr$	průtoková rychlost
$Fr(\text{Ar})$	průtoková rychlost nosného plynu
$Fr(\text{H}_2)$	průtoková rychlost vodíku
$Fr(vz)$	průtoková rychlost vzorku
$Fr(\text{TiO}_2)$	průtoková rychlost suspenze oxidu titaničitého (suspendovaného v organické kyselině)
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
$I$	intenzita fluorescence
$IE$	intenzita emise
ICP-MS	hmotnostní spektrometrie s ionizací indukčně vázaným plazmatem
ICP-OES	optická emisní spektrometrie s excitací vzorku indukčně vázaným plazmatem
iSe	anorganické specie Se
LDR	lineární dynamický rozsah
LOD	limit detekce metody ( $3\sigma$ )

LOQ	limit stanovitelnosti metody ( $10 \sigma$ )
MF	mobilní fáze
n	počet teoretických pater při separaci kapalinovou chromatografií
orgSe	organické specie Se
pHBA	p-aminobenzoová kyselina
QF	křemenný atomizátor
R	koeficient korelace
$R_{1,2}$	rozlišení píků
RSD	relativní směrodatná odchylka měření
RSR	relativní odezva Se v přítomnosti interferentu
$\sigma$	směrodatná odchylka šumu základní linie zjištěná opakovaným měřením vzorku o velice nízké koncentraci
SEM	skenovací elektronová mikroskopie
$T_{at}$	teplota atomizace
TRIS	tris(hydroxymethyl)aminomethan
UV	ultrafialové záření
UV-PVG	UV-fotochemické generování těkavých sloučenin
$V(vz)$	dávkovaný objem vzorku



## Obsah

1. Úvod.....	12
1.1. Cíle práce .....	13
2. Teoretická část.....	14
2.1. Technika generování těkavých sloučenin pro potřeby atomových spektrálních metod .....	14
2.1.1. Úvod do problematiky generování těkavých sloučenin .....	14
2.1.2. Chemické generování těkavých sloučenin .....	15
2.1.3. Elektrochemické generování těkavých sloučenin.....	16
2.1.4. UV-fotochemické generování těkavých sloučenin.....	18
2.1.5. Reakční mechanismus v různých metodách generování těkavých sloučenin .....	19
2.1.6. Interference v technice generování těkavých sloučenin .....	25
2.2. Detekce těkavých sloučenin atomově spektrometrickými metodami.....	26
2.3. Speciační analýza.....	26
2.3.1. Selektivní generování těkavých sloučenin .....	27
2.3.2. Speciační analýza založená na HPLC separaci a postkolonové derivatizaci analyzovaných složek technikou TIO <sub>2</sub> /UV-PVG.....	28
2.4. Výskyt a význam Se a Te.....	29
2.5. Biologický význam a toxicita Se pro člověka.....	29
3. Materiál a metody.....	31
3.1. Chemikálie .....	31
3.1.1. Chemikálie používané při UV-fotochemickém generování těkavých sloučenin Se a Te .....	31
3.1.2. Certifikované referenční materiály .....	32
3.1.3. Praktické vzorky .....	32
3.1.4. Chemikálie používané při interferenční studii.....	33
3.2. Instrumentace .....	33
3.3. Atomizační a detekční podmínky .....	34
3.4. Experimentální uspořádání .....	35
3.4.1. UV-fotochemický generátor .....	35
3.4.2. Použité aparatury pro UV-fotochemické generování, postupy měření ....	37
3.4.3. Aparatura a instrumentace pro srovnávací studii interferencí v metodách chemického, elektrochemického a fotochemického generování.....	39
4. Výsledky a diskuze.....	42
4.1. Stanovení Se(IV) a Se(VI) v módu průtokové injekční analýzy .....	42

4.1.1.	Teoretické pozadí problematiky využití TiO <sub>2</sub> pro on-line redukci Se(VI)	42
4.1.2.	Volba fotochemického činidla	42
4.1.3.	Vliv průtokové rychlosti vzorku	43
4.1.4.	Vliv koncentrace suspenze TiO <sub>2</sub>	44
4.1.5.	Vliv doby strávené v reaktoru a postupu zkracování délky reaktoru	47
4.1.6.	Vliv průtokové rychlosti nosného plynu	48
4.1.7.	Vliv místa zavádění a průtokové rychlosti H <sub>2</sub>	49
4.1.8.	Vliv dávkovaného objemu	49
4.1.9.	Základní charakteristiky stanovení Se(IV) a Se(VI) při použití kyseliny octové jako reakčního činidla	50
4.1.10.	Porovnání základních charakteristik v různých organických kyselinách	51
4.2.	UV-fotochemické generování těkavých sloučenin Se za použití fotokatalyzátoru TiO <sub>2</sub> , kontinuální průtoková analýza	52
4.2.1.	Volba reakčního média a optimalizace jeho koncentrace	52
4.2.2.	Vliv přítomnosti TiO <sub>2</sub> v reaktoru na signál Se(IV) a Se(VI)	53
4.2.3.	Optimalizace délky reakční cívky	54
4.2.4.	Vliv průtokové rychlosti vzorku	55
4.2.5.	Optimalizace průtokových rychlostí plynů	56
4.2.6.	Základní charakteristiky stanovení	57
4.3.	Aplikace metody fotokatalyzovaného UV-fotochemického generování na reálné vzorky	59
4.3.1.	Stanovení Se(IV) a Se(VI) ve vodných vzorcích	59
4.3.2.	Stanovení Se(IV) a Se(VI) v reálných vzorcích potravinových doplňků	60
4.4.	Speciální analýza kombinovanou metodou HPLC-UV/TiO <sub>2</sub> -AFS	64
4.4.1.	Modifikace podmínek UV-fotochemického generování těkavých sloučenin pro stanovení organických specií	64
4.4.2.	Vliv koncentrace kyseliny octové a suspenze oxidu titaničitého při zapojení nosného plynu za reaktor	65
4.4.3.	Složení mobilní fáze	67
4.4.4.	Optimalizace separační metody	69
4.4.5.	Základní charakteristiky stanovení	75
4.4.6.	Kvalitativní analýza vzorku potravinového doplňku metodou HPLC-TiO <sub>2</sub> /UV-PVG-AFS	77
4.5.	TiO <sub>2</sub> asistované UV-fotochemické generování těkavých sloučenin Te	78

4.5.1.	Optimalizace atomizačních podmínek.....	79
4.5.2.	Volba kyseliny a její koncentrace.....	80
4.5.3.	Vliv koncentrace TiO <sub>2</sub> .....	82
4.5.4.	Vliv průtokové rychlosti vzorku reaktorem.....	82
4.5.5.	Vliv délky reakční cívky.....	83
4.5.6.	Vliv průtokové rychlosti Ar.....	84
4.5.7.	Vliv dávkovaného objemu.....	86
4.5.8.	Základní charakteristiky stanovení Te pomocí katalyzovaného UV- fotochemického generování .....	87
4.6.	Porovnání interferencí v různých metodách generování těkavých sloučenin Se..	88
4.6.1.	Porovnání interferencí hydridotvorných prvků .....	91
4.6.2.	Porovnání interferencí přechodných kovů.....	92
4.6.3.	Porovnání interferencí elektrolytů .....	96
5.	Závěry.....	100

## 1. Úvod

Technika generování těkavých sloučenin se uplatňuje především v laboratořích zaměřených na environmentální analýzu nebo kvalitu zemědělských produktů či potravin pro stanovení prvků 14–16 skupiny periodické soustavy. Tyto prvky ochotně tvoří těkavé hydridy případně i těkavé sloučeniny organického charakteru. Nejčastěji využívaná technika generování těkavých sloučenin je založena na redukci analytu tetrahydridoboritanem sodným nebo draselným. Kromě ní jsou hledány další možnosti generování těkavých sloučenin, které by toto činidlo mohly v rutinních stanoveních nahradit. Jednou z možných variant je využití fotochemických reakcí schopných převádět mnohé kovové a polokovové prvky na jejich těkavé deriváty.

Předkládaná disertační práce navazuje na předchozí výzkum UV-fotochemického generování těkavých sloučenin zavedený v laboratoři spektrometrických metod katedry analytické chemie Univerzity Karlovy v roce 2012. Cílem výzkumu shrnutého v této práci bylo rozšířit metodu UV-fotochemického generování Se o možnost práce s vyšším oxidačním stavem Se a zavést ji pro stanovení stopových koncentrací tohoto prvku nejen v jednoduchých vodných vzorcích, ale také v komplikovanějších maticích. Tohoto záměru bylo dosaženo spojením generování těkavé sloučeniny vlivem UV záření s fotoredukci na katalyzátoru  $\text{TiO}_2$ . Záměr byl završen validací přesnosti metody a dále její úspěšnou aplikací pro stanovení obsahu Se(IV) a Se(VI) ve vzorcích doplňků stravy. Metoda byla následně modifikována za účelem využití pro derivatizaci anorganických i organických specií Se pro jejich stanovení atomovými spektrometrickými metodami po HPLC separaci.

Druhým zkoumaným prvkem byl telur, s nímž byly optimalizovány reakční podmínky UV-fotochemického generování jeho těkavé sloučeniny, jak v klasickém provedení bez fotoredukce tak za účasti fotokatalyzátoru.

Samostatnou kapitolou této disertační práce je interferenční studie porovnávající vliv různých vybraných složek matrice (hydridotvorné prvky, přechodné kovy, elektrolyty) na chemické, elektrochemické a UV-fotochemické generování těkavých sloučenin. Cílem této kapitoly bylo vyhodnotit velikost interferencí vyskytujících se u dvou alternativních technik generování těkavých sloučenin Se, protože interference představují nejvýznamnější překážku zavádění těchto technik pro rutinní aplikace. Ve vybraných případech jsou diskutovány i zdroje těchto interferencí.

## 1.1. Cíle práce

Tato práce sestává ze tří propojených témat. V rámci prvního tématu byly optimalizovány podmínky pro UV-fotochemické generování Se s využitím  $\text{TiO}_2$  a dále byly testovány možnosti jeho aplikace. Toto téma souviselo s řešením projektu GA UK 28214. Cílem tématu byl vývoj metody UV-fotochemického generování těkavé sloučeniny Se s využitím fotokatalýzy  $\text{TiO}_2$ . Metoda měla umožňovat generování těkavých sloučenin z  $\text{NaSeO}_3$ ,  $\text{NaSeO}_4$  a organických sloučenin Se. V návaznosti byla plánována aplikace metody na stanovení obsahu Se v reálných vzorcích. Vzhledem k popularitě antioxidantů ve stravě a narůstajícím tlaku na kontrolu doplňků stravy byl vývoj metody orientován na stanovení Se ve vzorcích doplňků stravy. Metoda byla ovšem validována také pro vodné matrice. Za druhé byla zkoumána možnost UV-fotochemického generování těkavé sloučeniny Te (v souvislosti s výše uvedeným projektem GA UK a projektem GA UK 28621). Záměrem bylo zjistit, za jakých podmínek je možné fotochemicky generovat těkavou sloučeninu Te a zda lze provádět jeho fotoredukci na  $\text{TiO}_2$ . Fotoredukce  $\text{Te(VI)}$  spojená s UV fotochemickým generováním těkavé sloučeniny ještě nebyly publikovány. Za třetí byla provedena interferenční studie se Se jako modelovým prvkem porovnávající chemické, elektrochemické a UV-fotochemické generování těkavých sloučenin (v rámci projektu GAČR 14-23532). Jednotlivé cíle práce byly následující:

- a) Optimalizovat podmínky UV-fotochemického generování těkavé sloučeniny Se s využitím fotokatalyzátoru  $\text{TiO}_2$
- b) Porovnat dosažené základní charakteristiky s chemickým generováním těkavé sloučeniny Se a zjistit účinnost generování
- c) Aplikovat vyvinutou metodu na stanovení Se v reálných vzorcích
- d) Vyvinout chromatografickou metodu pro stanovení sloučenin Se ve směsi s atomově spektrometrickou detekcí s derivatizací prostřednictvím UV-fotochemického generování.
- e) Zoptimalizovat podmínky UV-fotochemického generování Te a zjistit jeho základní charakteristiky
- f) Porovnat UV-fotochemické, elektrochemické a chemické generování na základě vlivu potenciálních interferentů z matrice. Cílem bylo zjistit, jak výrazně jsou jednotlivé techniky ovlivněny různými složkami matrice, aby bylo možno rozhodnout o tom, pro jaké matrice jsou zkoumané metody nevhodné nebo jaké postupy předúpravy vzorku by měly předcházet analýze.

## 2. Teoretická část

### 2.1. Technika generování těkavých sloučenin pro potřeby atomových spektrálních metod

#### 2.1.1. Úvod do problematiky generování těkavých sloučenin

Generování těkavých sloučenin je využíváno ve spojení s atomovými spektrálními metodami za účelem snížení limitů detekce a zmírnění spektrálních interferencí především při stanovování prvků 14. – 16. (potažmo IV.A –VI.A.) skupiny tvořících stabilní těkavé hydridy. Až do nedávna se tedy tato technika uplatňovala především při stanovení As, Sb, Se, Te, Bi, Pb, Sn a také Cd a Hg. [1] Poslední dva jmenované prvky tvoří těkavé hydridy ale jiné těkavé sloučeniny. V případě rtuti se jedná o tzv. studené páry, protože Hg má dostatečnou tenzi atomárních par nad roztokem. V případě těkavé formy Cd se pozorování různých autorů rozcházejí; převládá názor, že se jedná buď o atomární páry nebo nanočástice.

V poslední době se ukázalo, že při zvolení vhodných podmínek je možné generovat také těkavé sloučeniny přechodných a vzácných kovů. [2] Obzvláště díky vývoji UV-fotochemického generování lze do budoucna očekávat rozšíření spektra prvků stanovovaných technikou generování těkavých sloučenin na některé zástupce d-prvků. Uvést lze např. Ni a Co, které tvoří při reakci s kyselinou mravenčí stabilní karbonyly vhodné svými vlastnostmi pro rutinní stanovení. [3–6]

Metody generování těkavých sloučenin se v zásadě dělí na tři základní techniky umožňující stanovení širšího spektra prvků a dále na postupy umožňující generování jen vybraných prvků. Prvním a dosud nejrozšířenějším postupem je chemické generování využívající reakce s redukčními činidly schopnými vytvořit těkavé hydridy, chloridy, cheláty nebo atomové páry. Nejčastěji používaným reakčním činidlem používaným v chemickém generování je tetrahydridboritan sodný nebo draselný použitelný pro generování těkavých sloučenin klasických hydridotvorných prvků, přechodných a vzácných kovů i prvků tvořících studené páry. Pro generování studených par rtuti lze dále využít i redukci a generování mírnějšími redukčními činidly jako je tetraaminoboritan sodný nebo chlorid cínatý. [7] První vyvinutou alternativní technikou bylo elektrochemické generování těkavých sloučenin využívající k redukci prvku a vygenerování jeho těkavé sloučeniny průchod elektrického proudu. Reakce generující těkavý produkt probíhá na katodě elektrochemické cely. Třetí technika UV-

fotochemického generování je založena na ozáření roztoku obsahujícího stanovovaný prvek zářením o vlnových délkách z UV spektra v prostředí fotochemicky štěpitelného reagentu a případně také fotokatalyzátoru. Dále existují také postupy založené na využití tepelné energie (mikrovlnné generování) nebo ultrazvuku [8] (sonochemické generování).

Technika generování těkavých sloučenin pro atomovou spektrometrii má dlouhou historii, i když v současném pojetí je využívána od 70. let 20. století. Úplné počátky generování těkavých sloučenin lze zařadit již na přelom 18. a 19. století. James Marsh publikoval svou zkoušku na As v roce 1836 před Londýnskou Královskou společností. [9] Použitý postup generování  $\text{AsH}_3$  za pomoci Zn a  $\text{H}_2\text{SO}_4$  byl popsán již Scheelem v roce 1775 a Marsh ze Scheeleho práce prokazatelně vycházel. Marshova zkouška byla vyvinuta pro účely soudního lékařství jako alternativa ke kolorimetrické sulfidové zkoušce. Během soudních procesů s traviči byly velice rychle zdokumentovány také její slabiny a možné interference – například falešně pozitivní důkazy způsobené přítomností ostatních hydridotvorných prvků. Nejznámějším případem, který zároveň znamenal uznání Marshovy zkoušky i mimo území Velké Británie byl francouzský případ Mme LaFarge obviněné a usvědčené roku 1840 z vraždy manžela oxidem arsenitým. [10] Novodobou modifikací Marshova postupu, kterou lze považovat za počátek chemického generování těkavých sloučenin pro potřeby atomových spektrálních metod byla práce W. Holaka z roku 1969. [11]

### 2.1.2. Chemické generování těkavých sloučenin

Jak už bylo zmíněno výše, chemické generování využívající reakce analytu s tetrahydridoboritanem v kyselém prostředí je využíváno především pro stanovení klasických hydridotvorných prvků. Jeho teorii a aplikacím je věnována především rozsáhlá monografie Dědiny a Tsaleva. [1]

Kyselé prostředí v reakčním médiu je nezbytné pro postupný rozklad tetrahydridoboritanu, ze kterého jsou vícekrokovým reakčním mechanismem předávány atomy vodíku analytu za vzniku jeho hydridu. [12–14] Mechanismus chemického generování těkavých sloučenin je rozebrán v kapitole 2.1.5.1. Z výše uvedeného vyplývají také omezení této techniky generování. Tetrahydridoboritan není příliš stálým činidlem, samovolně se rozkládá na kyselinu boritou v kyselém až neutrálním prostředí a je tudíž nutno jeho roztok připravovat pravidelně čerstvý nebo zmražený. Zvýšit jeho

stabilitu lze např. zvýšením pH přidávkem alkalického hydroxidu. Vysoká redukční schopnost tetrahydridoboritanu projevující se reakcí se širokým spektrem prvků zároveň znamená riziko kompetitivní interference. Zároveň čistota použitého tetrahydridoboritanu většinou omezuje limit detekce chemického generování. Zásadní nevýhodou je nutnost předredukce vyšších oxidačních čísel některých analytů konkrétně např. As (V), Sb (V), Se(VI), Te (VI), i když i toto omezení už se daří v některých případech překonat. [15]

V současnosti je redukce  $\text{NaBH}_4$  uplatňována i pro generování těkavých sloučenin vybraných přechodných kovů. [2,16] Tato tematika byla započata publikací na generování těkavé formy Cu v roce 1996 Sturgeonem et al. [17] a od té doby se značně rozšířilo spektrum prvků stanovitelných touto technikou. Shrnutí stavu k roku 2007 lze nalézt např. práci P. Pohla a B. Prusisze [18], kde jsou rozebírány i otázky účinnosti generování a transportu těkavých forem přechodných a vzácných kovů stejně jako hypotézy týkající se povahy jejich těkavých sloučenin. Obecně lze říci, že celkové účinnosti generování těkavých sloučenin přechodných kovů jsou nižší než jak je tomu v případě hydridotvorných prvků, kde lze očekávat úplnou konverzi. [19,1]

### 2.1.3. Elektrochemické generování těkavých sloučenin

První alternativní technikou generování těkavých specií hydridotvorných prvků bylo elektrochemické generování, k němuž byly průkopnické práce publikovány v letech 1992–1993 Linem et al. [20] a Brockmannem et al. [21] Základní inspirací bylo použití elektrolytického vývoje  $\text{AsH}_3$  pro řízenou modifikaci polovodičových materiálů pro elektroniku. [22]

Základní koncept cely se u různých autorů výrazně neliší, jedná se o konstrukci s jedním nebo dvěma oddělenými elektrodovými prostory. V prvním případě bezmembránové cely dochází k vyšší difúzi roztoků a je možno používat vyšší napětí a generační proudy, ale účinnost generování těkavé sloučeniny je snížena oxidačními produkty vznikajícími na anodě. Ve druhém případě jsou katoda a anoda odděleny iontově výměnnou membránou (nejčastěji Nafion) nebo skleněnou fritou bránící difúzi produktů z anodového do katodového prostoru. Použitý materiál membrány (obzvláště iontově výměnné polymery) může limitovat reakční podmínky, znemožňuje např. použití kyseliny dusičné nebo vyšších generačních proudů. Z hlediska



konstrukčního upořádání může být zcela tubulární [23], tenkovrstvá (typ Lin-Brockmann) [20] a nebo např. kombinovaná s membránovým separátorem fází. [24]

K redukci analytu a generování jeho těkavé sloučeniny dochází na povrchu katody elektrolytické cely. Kromě kationtu kovu jsou ke katodě přitahovány i protony, je-li katolytem kyselina, a zároveň s redukcí kovu dochází k vývoji vodíku. Účinnost generování, množství vygenerovaného vodíku a tudíž i účinnost atomizace úzce souvisí s materiálem katody. Je udáváno, že účinnost generování klesá v řadě materiálů dle klesajícího přepětí vodíku konkrétně např.  $\text{Pb} > \text{Hg-Ag} > \text{Cd} > \text{C} > \text{Ag} > \text{Au} > \text{Pt}$ . S rostoucí účinností generování roste i vliv interferentů a naopak, tudíž volba materiálu katody silně podléhá konkrétní aplikaci. Při použití katodových materiálů s vysokým přepětím vodíku (Pb, amalgamované Ag) je možné provádět s vysokou účinností generování těkavé sloučeniny i z vyšších oxidačních čísel, čímž odpadá nutnost chemické redukce na vhodný oxidační stav. Speciační analýzu tak lze provádět výměnou katody bez změny reakčních podmínek. Nejčastěji používanými elektrodami jsou Pt (vysoká odolnost vůči interferencím a inertnost vůči elektrolytu), C v různých formách (kompromis mezi účinností generování a interferencemi, nedokáže zajistit redukci z vyšších oxidačních čísel) a Pb (díky vysokému přepětí vodíku umožňuje redukci vyšších oxidačních čísel, ale je nutno vzít v úvahu riziko interferencí). [22] Nejčastěji používanými elektrolyty jsou roztoky minerálních kyselin (sírová, chlorovodíková) nebo soli, použita byla i kyselina mravenčí. [25] Pro generování As a Sb je jako vhodnější uváděna kyselina sírová, pro Se je elektrolytem první volby kyselina chlorovodíková. [22,26,27]

Hlavní výhodou elektrochemického generování těkavých sloučenin je práce v prostředí vysoce čistých minerálních kyselin nebo solí, tudíž odpadá riziko kontaminace z činidel. Na druhou stranu je nutno uvést, že sorpce interferentů z matrice vzorku na povrch katody bývá trvalá a tato depozice interferentu na katodě může vést k nezanedbatelným paměťovým efektům skrze změnu složení povrchu katody. [28,29]

Účinnost elektrochemického generování vybraných hydridotvorných prvků (Se(IV), As(III), Sb(III)) za použití Pb katody byla zjištěna jako maximálně 90 % ( $\text{SeH}_2$ ), 57 % ( $\text{AsH}_3$ ) a 92 % ( $\text{SbH}_3$ ). [30] Zmíněné účinnosti byly odhadnuty ze stanovení nezreagovaného analytu v odpadu po generování a nezahrnují ztráty rozpuštěného analytu a jeho hydridu během generačního kroku a transportu do atomizátoru. V té samé práci bylo publikováno i stanovení účinnosti generování  $\text{SeH}_2$

za pomoci radioaktivního izotopu  $^{75}\text{Se}$ . Touto metodou byla zjištěna účinnost generování odpovídající  $72 \pm 2 \%$ , která zohledňuje zmíněné ztráty.

#### 2.1.4. UV-fotochemické generování těkavých sloučenin

Původ myšlenky fotochemického generování lze hledat v procesech používaných při čištění odpadních vod, kde je ozařování UV zářením využíváno k rozkladu organických látek. [31] Ovšem děje založené na principu alkylace Hg uvolněné ze sedimentu probíhají vlivem slunečního záření pravděpodobně i v přírodním prostředí. [32,33]

Použití UV-fotochemického generování pro analytické účely zavedli jako první Guo et al. [34,35] V analytickém uspořádání je UV-fotochemické generování založeno na ozařování roztoku nízkomolekulárních organických kyselin vlnovými délkami v oblasti UV záření. V současné době jsou nejčastěji používanými fotochemickými činidly kyseliny mravenčí, octová, propionová a zdrojem záření nízkotlaká nebo střednětlaká rtuťová výbojka. V analytické chemii se uplatňuje výzkum UV-fotochemického generování těkavých sloučenin z prostředí nízkomolekulárních organických kyselin bez nebo s použitím fotochemických katalyzátorů ( $\text{TiO}_2$ ,  $\text{ZrO}_2$ ).

Mezi nezanedbatelné výhody fotochemického generování patří zjednodušení aparatury v porovnání s elektrochemickým generováním a používání méně toxických a finančně nákladných činidel ve srovnání s chemickým generováním. Dále je možné generovat těkavé sloučeniny ze širšího spektra prvků než případě elektrochemického generování. V případě používání plazmových zdrojů při atomizaci je velkou výhodou, že při UV-fotochemickém generování nedochází k významné produkci  $\text{H}_2$ , který jinak způsobuje nestabilitu až zhášení plazmatu. [36]

Do současné doby byly fotochemicky generovány těkavé formy Hg [37–50], Se [51,37,34,52,35,53–59], As [37,60,55,61–64], Sb [65,37,60], Bi [37,60,55], Te [6,37,60], Pb [66], Sn [60,55],  $\text{I}_2$  [37,67–69],  $\text{Br}_2$  [70], Os [71], Cu [72,73], Fe [74,75,3], Ni [36,76,6,5,3,37,77,78], Co [4,6,79,37,80,78] a Cd [60,81,78]. Přehled prvků, schopných produkovat těkavé sloučeniny při ozařování UV zářením se nachází také na obr. 2.1

The image shows a standard periodic table of elements. Each element cell contains its atomic number, symbol, name, and atomic mass. The table is organized into groups (IA to VIIIA) and periods (1 to 7). The Lanthanide and Actinide series are shown as separate rows at the bottom, labeled 'Lanthanide Series' and 'Actinide Series' respectively. A legend box in the upper middle part of the table defines the symbols used: Atomic Number, Symbol, Name, and Atomic Mass.

Obr. 2.1: Prvky, jejichž těkavé specie byly UV-fotochemicky generovány pro účely analytické chemie, upraveno dle [7]

Kromě aplikace UV-PVG pro zvýšení citlivosti stanovení vybraných prvků lze tuto poměrně čistou a neagresivní metodu použít i pro neanalytické aplikace, například za účelem čištění katalyzátorů od prvků tvořících za daných podmínek těkavé sloučeniny – konkrétně například od Ni. [76]

UV-PVG využívající fotokatalýzu  $\text{TiO}_2$  nebo jiným pevnými fotokatalyzátory bylo zatím využito jen při stanovení Hg [82,42], Se [83–90] a v jednom případě Te [60].

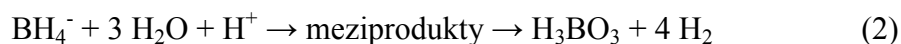
### 2.1.5. Reakční mechanismus v různých metodách generování těkavých sloučenin

#### 2.1.5.1. Chemické generování

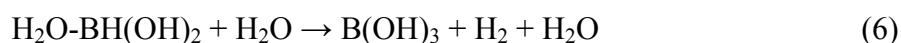
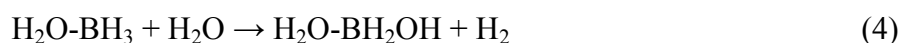
Dříve byla dlouhodobě uznávaným mechanismem vzniku hydridu v chemickém generování tzv. teorie nascentního vodíku [91], která je již v současnosti překonaná. Tato teorie předpokládala přeměnu  $\text{NaBH}_4$  na  $\text{H}_3\text{BO}_3$  a uvolnění vodíkových radikálů, reakci lze popsat souhrnnou rovnicí [92]:



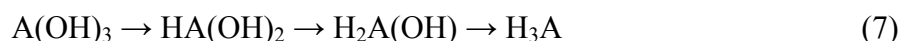
Tato hypotéza byla v rozporu s poznatky o hydrolýze tetrahydridoboritanu sodného známými z organické chemie. Jeho rozklad v kyselém prostředí je ve skutečnosti vícekrokovou reakcí, kterou lze souhrnně zapsat:



Jednotlivé kroky hydrolýzy  $\text{NaBH}_4$  na meziprodukty lze rozepsat následovně:



Hydrolýza  $\text{NaBH}_4$  je v rozmezí pH 3,8 – 14 reakcí druhého řádu přičemž nejpomalejším krokem je ztráta prvního vodíku (reakce 3). Ve výrazně kyselějších pH používaných při generování těkavých sloučenin pro potřeby atomově spektrometrických metod (pH < 2) je udávána celkově nižší rychlost hydrolýzy způsobená tvorbou stabilních meziproduktů, ale k dosažení rovnováhy v prvním kroku (reakce 3) postačuje několik milisekund. [13,93] Interakci s analytem může podstupovat libovolný z meziproduktů hydrolýzy, který má k dispozici alespoň jednu vazbu B-H, tedy produkty reakcí 3-5. Mechanismus přenosu atomů vodíku na analyt probíhá postupně a je možné ho vyjádřit schématem:



Kde A zastupuje atom hydridotvorného prvku ( $\text{As}^{\text{III}}$ ,  $\text{Sb}^{\text{III}}$ ,  $\text{Se}^{\text{IV}}$ ,  $\text{Te}^{\text{IV}}$ ,  $\text{Bi}^{\text{III}}$ ). [12,13,14,94–96]

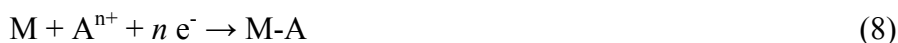
Mechanismus chemického generování přechodných kovů je pravděpodobně složitější. Mechanismus reakce probíhající v roztoku HCl předpokládá jako těkavé meziprodukty sloučeniny typu  $\text{L}_n\text{MH}_x$ , kde L je jeden ze skupiny ligandů  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{OH}^-$ ,  $\text{Cl}^-$  nebo  $\text{H}_2$ , M je přechodný kov,  $n$  koordinační číslo přechodného kovu v původním rozpuštěném komplexu  $\text{ML}_n$ ,  $x$  je počet vodíků ve vznikajícím komplexním polyhydridu. Z teorie ligandového pole vyplývá, že ligandy typu  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{OH}^-$ ,  $\text{X}^-$  tvoří

nestabilní komplexy. Pokud není krok separace fází a transportu plynné fáze do atomizátoru dostatečně rychlý, je možné pozorovat pouze výsledné stabilní produkty: volné atomy nebo kovové nanočástice a jejich shluky. [93]

#### 2.1.5.2. Elektrochemické generování

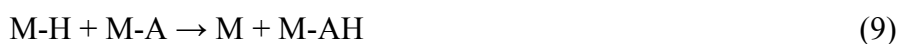
V případě elektrochemického generování dochází k tvorbě těkavé sloučeniny na povrchu katody elektrolytické cely. Generování probíhá ve vodných roztocích, takže na katodě dochází kromě redukce analytu také k redukci oxoniových iontů na vodík a na anodě dochází k oxidaci vody na kyslík potažmo k vývoji jiného oxidujícího plynu pocházejícího z roztoku kyseliny (např.  $\text{Cl}_2$ ). Je předpokládáno, že děje na katodě vedoucí ke vzniku těkavé sloučeniny probíhají ve třech krocích. V prvním kroku dojde k depozici analytu na povrchu katody a jeho redukci, ve druhém kroku k reakci vedoucí ke vzniku hydridu nebo jiné těkavé formy prvku a ve třetím kroku k desorpci těkavé sloučeniny z povrchu katody. V závislosti na volbě katodového materiálu jsou pro druhý krok generování možné dva mechanismy: elektrokatalytický (materiály s nízkým přepětím vodíku) a elektrochemický (materiály s vyšším přepětím vodíku).

První krok generování je shodný pro oba mechanismy a lze ho zapsat reakcí:

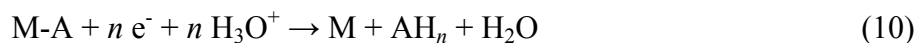


Kde M je kovový povrch katody a A analyt.

Při elektrokatalytickém mechanismu dochází na povrchu katody k rekombinaci adsorbovaného hydridotvorného prvku s atomy vodíku, přičemž tento krok probíhá opakovaně až do vzniku výsledného binárního hydridu, který je uvolněn. Mechanismus nevyžaduje po úvodní sorpci další přenos náboje.



Při elektrochemickém mechanismu se uplatňuje přenos náboje při reakci s oxoniovými kationty z roztoku kyseliny, které poskytnou při rekombinaci nábojů hydridotvornému prvku vodík.

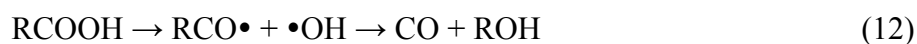
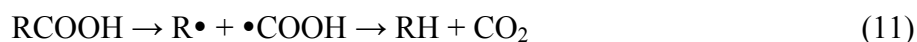


Pokud je použit katodový materiál se středními hodnotami přepětí vodíku, mohou se uplatňovat oba mechanismy. [22,29]

### 2.1.5.3. UV-fotochemické generování

V případě UV-fotochemického generování jsou předpokládány dva možné mechanismy generování v závislosti na přítomnosti nebo nepřítomnosti fotochemického katalyzátoru. Prvním je nekatalyzovaný radikálový reakční mechanismus založený na štěpení nízkomolekulárních organických kyselin vlivem UV záření na radikálové produkty schopné přeměňovat hydridotvorné prvky na jejich těkavé sloučeniny. Tento mechanismus byl navržen na základě identifikace vznikajících těkavých produktů. Guo et al. [34,35] zjistili, že při použití různých nízkomolekulárních kyselin vznikají různé těkavé sloučeniny Se. V případě kyseliny mravenčí byla produktem směs  $SeH_2$  a  $SeCO$ , v případě kyseliny octové a malonové byl produktem  $(CH_3)_2Se$  a v případě kyseliny propionové byl detekován  $(C_2H_5)_2Se$ . Dále se ukázalo, že přidavek dusičnanového aniontu ke kyselině mravenčí vede ke vzniku pouze  $SeCO$ . [52,35] Diskuze problematiky mechanismu tvorby zmíněných těkavých sloučenin je stále otevřená kvůli značné složitosti radikálových reakcí, které se mohou generování účastnit. [97,98,31]

Jeden z možných mechanismů UV fotolýzy organické kyseliny byl navržen Guo et al. [34] na základě identifikace vznikajících těkavých specií a lze ho shrnout následovně. Ke štěpení karboxylové skupiny může dojít dvěma způsoby za vzniku uhlovodíku a  $CO_2$  nebo za vzniku alkoholu a  $CO$ . Všechny reakce předpokládají ozařování UV zářením.



Kde R je alkylový řetězec  $C_nH_{2n-1}$ ,  $n = 0, 1, 2$

Se(IV) je pak redukován vznikajícími reaktivními radikály s redukčními schopnostmi. Odpovídající reakce s účastí Se(IV) by pak mohly být zapsány následovně:



Vyšší pravděpodobnost průběhu reakce 11 nad reakcí 12 je v souladu s pozorováním Guo et al., že při použití kyseliny mravenčí jako fotochemického činidla bylo ve směsi produktů nalezeno přibližně 60 – 70 %  $\text{SeH}_2$  a 30 – 40 %  $\text{SeCO}$ . Pravděpodobnost reakce 12 a tedy i 14 klesá s rostoucí délkou alkylového řetězce a při použití kyseliny octové a propionové vznikají pouze alkylované produkty. [34]

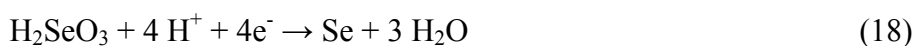
Další navrženou možností je redukce prostřednictvím reaktivních meziproduktů s karbonylovou skupinou – ketenů  $\text{RC}=\text{CO}$ . [47] UV fotolýza kyseliny mravenčí a octové by pak mohla probíhat následovně.



Dle teoretické studie Takatani et al. by tato reakční cesta měla být energeticky výhodnější. [99] Keteny jsou dostatečně stabilní při vysokých teplotách a v plynné fázi, ovšem je otázkou, zda jsou tyto reakční meziprodukty dostatečně stabilní ve vodném prostředí, aby mohla úspěšně proběhnout reakce s analytem. [97]

V případě použití fotochemického katalyzátoru (např.  $\text{TiO}_2$  nebo  $\text{ZrO}_2$ ) jsou navrhovány mechanismy založené na vlastnostech polovodičů. Šířka zakázaného pásu  $\text{TiO}_2$  odpovídá energii 3,2 eV, což znamená, že pro přechod  $e^-$  do vodivostního pásu je potřeba ozáření vlnovými délkami kratšími než 380 nm. V tom případě se  $\text{TiO}_2$  stává vodivým v důsledku vzniku párů volných  $e^-$  a kladně nabitých děr  $h^+$  a může fungovat jako oxidační nebo redukční činidlo. Není-li v systému přítomna látka schopná fungovat jako lapač (scavenger) kladných nebo záporných nábojů dochází k jejich rychlé rekombinaci. [86] V případě používání  $\text{TiO}_2$  pro redukci  $\text{Se(VI)}$  a generování těkavých specií ze sloučenin Se je tímto lapačem nízkomolekulární organická kyselina např. kys. mravenčí [91,92], octová [51] nebo propionová [88].

Kikuchi a Sakamoto [102] elektrochemicky monitorovali děje probíhající v roztoku kys. mravenčí v přítomnosti Se(VI) a TiO<sub>2</sub> při ozařování UV zářením a zároveň sledovali vývoj těžké sloučeniny prostřednictvím ICP-MS. Kombinací experimentů a teoretických modelování dospěli k závěru, že redukce Se(VI) probíhá na Se(0) a dále na SeH<sub>2</sub>. Nejproblematictější je krok zapsaný v rovnici 19, protože energie potřebná pro redukci Se(0) na SeH<sub>2</sub> je vyšší než šířka zakázaného pásu TiO<sub>2</sub> a tudíž by reakce neměla probíhat. Tato diskrepance je vysvětlována hypotézou, že dokud jsou odebírány kladné náboje, dochází ke kumulaci e<sup>-</sup> na povrchu částic TiO<sub>2</sub> dokud není dosaženo dostatečného potenciálu pro redukci Se<sup>0</sup> na SeH<sub>2</sub>.



Při použití fotokatalyzátorů s větší šířkou zakázaného pásu např. TiO<sub>2</sub> dopovaného ušlechtilým kovem (Ag, Au, Pt) nebo ZrO<sub>2</sub> je vysvětlení mechanismu jednodušší, protože problematická hypotéza odpadá. [103,104]

Jako organický lapač elektronů je nejčastěji používána kyselina mravenčí, ovšem jak prokázala práce Amal et al. [100], tuto funkci může plnit i řada dalších látek např. kyselina octová, methanol a ethanol. Experimenty se sorpcí vybraných organických látek na TiO<sub>2</sub> ukázaly, že všechny zkoumané látky byly adsorbovány na povrch TiO<sub>2</sub>, přičemž schopnost se sorbovat klesala v pořadí kys. mravenčí > kys. octová > kys. salicylová > methanol ≥ ethanol ≥ sacharóza. S výjimkou kys. salicylové, která se fotolyticky nerozkládala, klesala v tomto pořadí také vlastní schopnost organických látek se rozkládat vlivem UV a tvořit redukující radikály. Pouze kyselina mravenčí byla sorbována v přítomnosti Se. Fotoredukce byly pozorovány pouze v přítomnosti kys. mravenčí, methanolu a ethanolu a ve stejném pořadí klesala i rychlost fotoredukce Se. Vysokou účinnost kyseliny mravenčí při fotochemické redukci Se(IV) a Se(VI) autoři vysvětlují její schopností soutěžit se Se o aktivní místa na povrchu TiO<sub>2</sub>.

Celková rychlost katalyzovaného fotochemického procesu závisí na mnoha faktorech: rychlosti sorpce a desorpce substrátu na katalyzátoru, reaktivitě



meziproduktů, intenzitě záření, množství katalyzátoru. [100] Pro účely UV-fotochemického generování ovšem není rozhodující jen rychlost a účinnost fotochemické redukce, ale také stabilita vznikající těkavé sloučeniny.

Přítomnost lapače nábojů dokáže zpomalit rekombinaci nábojů až na časový interval v ns, který postačuje pro oxidaci nebo redukci látek sorbovaných na povrchu. Výše uvedené teorie pomíjejí fakt, že při mnohonásobném nadbytku molekul vody nad solí analytu ve vodných roztocích by měly být přednostně sorbovány a přeměňovány na povrchu katalyzátoru molekuly vody nikoliv adsorbované specíe Se či jiného analytu. [105]

#### 2.1.6. Interference v technice generování těkavých sloučenin

K interference v technice generování těkavých sloučenin se mohou vyskytovat v kapalně v plynné fázi. V prvním případě se jedná především o děje probíhající během vzniku těkavé sloučeniny a jejího následného uvolňování do plynné fáze. Ve druhém případě jde o transportní ztráty a atomizační interference, které se liší dle použité detekční techniky. Nejčastěji se interferenty dělí na oxidační činidla, přechodné kovy a ostatní hydridotvorné prvky. V případě alternativních technik generování je nutno vzít v potaz i vliv kyselin a jejich solí bez oxidačních vlastností. [106,29]

Přítomnost oxidačních činidel může zapříčinit změnu oxidačního stavu analytu, přičemž generování těkavé sloučeniny analytu bývá omezeno pouze na některé jeho specíe případně se může účinnost generování pro různé specíe významně lišit. Přítomnost oxidačního činidla v matrici vzorku tak může vést k chybnému určení koncentrace analytu, protože bude v jiném oxidačním stavu než standard použitý ke konstrukci kalibrační závislosti. Tento typ interference je platný pro všechny metody generování těkavých sloučenin; typickými zástupci skupiny oxidačních činidel jsou kyseliny s oxidačními vlastnostmi, např. kyselina dusičná používaná ke stabilizaci vzorků.

Přechodné kovy tvoří při chemickém generování nerozpustné boridy schopné sorbovat a rozkládat vznikající těkavé sloučeniny hydridotvorných prvků. [107,108] Dle alternativního názoru Henden et al. by speciemi sorbovanými na nerozpustné boridy mohly být i rozpuštěné ionty analytu. [109] Vliv interferentu lze do jisté míry ovlivnit reakčními podmínkami např. zvýšení koncentrace HCl může stabilizovat interferent ve formě rozpustných chlorokomplexů. Při elektrochemickém generování

dochází naopak k interferenci vlivem redukce interferentu na katodě a modifikaci povrchu katody. V metodě UV-fotochemického generování zatím ještě mechanismus vlivu přechodných kovů úspěšně vysvětlen nebyl.

K interferenci může docházet i při transportu – po uvolnění těkavé sloučeniny analytu do nosného plynu. Zde může dojít ke zpomalení nástupu signálu nebo k jeho poklesu v důsledku ztrát analytu v transportním vedení. V některých případech může dojít také ke strhávání nanočástic interferujících přechodných kovů a jejich vnosu do atomizátoru; tyto částice mohou také sorbovat nebo rozkládat těkavý analyt. Zvýšené riziko tohoto děje existuje především při intenzivním zahřívání roztoků např. při elektrochemickém generování vlivem procházejícího elektrického proudu.

Posledním typem jsou atomizační interference typické především pro ostatní hydridotvorné prvky. [110] Při spojení techniky generování těkavých sloučenin s QFAAS nebo AFS se uplatňují dva jevy. Jednak vygenerovaná těkavá sloučenina interferentu soutěží s těkavou sloučeninou analytu o vodíkové radikály v radikálovém oblaku, kde dochází k atomizaci. V nízkých koncentracích interferentu se převážně uplatňuje pokles koncentrace volných atomů analytu v základním stavu. [111] Atomizační interference lze omezit volbou atomizátoru např. použitím tzv. multiatomizátoru v QFAAS nebo FIGS atomizátoru v AFS. [112,113]

## 2.2. Detekce těkavých sloučenin atomově spektrometrickými metodami

Techniku generování těkavých sloučenin lze spojit s libovolnou atomově spektrometrickou metodou umožňující dávkování plynné fáze, tedy je možné použít např. AAS, ICP-OES, AFS, ICP-MS. Z uspořádání atomově absorpčních technik připadá v úvahu především atomizace v křemenném atomizátoru (QFAAS) nebo zavádění vzorku do grafitového atomizátoru a jeho *in-situ* záchyt (*in-situ* ETAAS). V případě metody AFS se jedná většinou o zavádění těkavé sloučeniny do miniaturizovaného plamenového atomizátoru, v případě ICP-OES a ICP-MS probíhá zavádění plynné fáze do nebulizátoru předcházejícího plazmovému atomizátoru resp. zdroji iontů.

V této práci byla použita detekce QFAAS a detekce AFS s atomizací v miniaturizovaném difúzním plamenovém atomizátoru.

## 2.3. Speciační analýza

Speciační analýzu lze s využitím generování těkavých sloučenin provádět několika způsoby. Jednou z možností je selektivní generování těkavé sloučeniny z vybraných specií, protože volbou podmínek lze zabránit přeměně některých specií na těkavé sloučeniny. [88,51,114,115] Další variantou je speciační analýza založená na separaci specií, která buď předchází, a nebo následuje po generování těkavých sloučenin. V takovém případě je nejčastějším přístupem separace prostřednictvím vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) a generování těkavých sloučenin je pak použito jako derivatizační metoda umožňující zavádění plynné fáze do atomové spektrometrického detektoru. [116,117,87,118,119,103] Méně častým přístupem je vygenerování těkavých sloučenin a jejich následná separace plynovou chromatografií (GC) nebo jejich kolekce vymrazením a následná separace a identifikace [120]. Kolekci vymrazením lze samozřejmě využít pro snížení limitu detekce metody i v případě, že není prováděna identifikace těkavých specií. [121–123] Poslední zmíněné separace (bylo by možné je označit jako postgenerační) se analyticky běžně nevyužívají. Mají ovšem nezanedbatelné místo při určování identity vznikajících těkavých sloučenin.

### 2.3.1. Selektivní generování těkavých sloučenin

Metody speciační analýzy prvků založené na selektivním generování těkavých sloučenin jsou vhodné především pro stanovení obsahu prvku vyskytujícím se ve vzorku v různých oxidačních stavech. Jako příklad lze uvést rozlišení Se(IV) a Se(VI), Te(IV) a Te(VI), As(III) a As(V), Sb(III) a Sb(V). Selektivní generování je pak založeno na výběru podmínek, při kterých dochází ke tvorbě těkavé sloučeniny pouze z nižšího oxidačního stavu, a na zapojení předredukčního kroku, který převede inertní oxidační stav na nižší vhodný stav. As(V) a Sb(V) lze předredukovat např. přidávkem L-cysteinu [124] nebo za účasti jodidu draselného [125] případně thiomocoviny a kyseliny askorbové [123]. V případě Se(VI) je využívána předredukce varem v 5-6M HCl po dobu 30-60 min nebo přidávek thiomocoviny [126]. V případě As lze techniku selektivního generování těkavých sloučenin využít také pro rozlišení anorganických a organických specií, protože anorganické specie arsenu vykazují vyšší toxicitu než mnoho sloučenin obsahujících organicky vázaný As (např. arsenobetain, arsenocholin nebo arsenosacharidy). [114]

### 2.3.2. Speciační analýza založená na HPLC separaci a postkolonové derivatizaci analyzovaných složek technikou TIO<sub>2</sub>/UV-PVG

V této práci byla využita separace anorganických a organických sloučenin Se kapalinovou chromatografií na aniontově výměnné koloně. V literatuře jsou nejčastějšími uváděnými přístupy kapalinová chromatografie na reverzních fázích a iontově výměnná chromatografie, přičemž volba separačního módu závisí na tom, zda autor považuje za důležitější separaci organických nebo anorganických specií. Technika vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) může být prováděna ve spojení s různými atomově spektrálními detekčními metodami. Běžné je spojení HPLC-MS, které nevyžaduje derivatizační krok mezi separací a detekcí, ale detekce omezuje výběr mobilních fází pouze na organická rozpouštědla a těkavé soli. Spojení s atomově fluorescenčním detektorem vyžaduje zavádění plynné fáze do AFS a tato metoda detekce je tudíž využívána ve spojení s technikami generování těkavých sloučenin. Volba této kombinované techniky méně omezuje výběr mobilní fáze, která nesmí významně snižovat účinnost generování těkavé sloučeniny. V této práci je použita separace na aniontově výměnné koloně; v tab. 2.1 jsou uvedeny základní informace o použití různých pufrů při speciační analýze Se na aniontově výměnných kolonách.

Tab. 2.1.: Mobilní fáze použité pro separaci specií Se ve spojení s aniontově výměnnými kolonami

Mobilní fáze	Použitelné rozmezí pH, vlastnosti	Literární zdroje
Octanový pufr	octan amonný, gradient. eluce, MS	[127] [128]
	octan sodný, Se(IV) a Se(VI), detekce AFS	[129]
Uhličitanový pufr	50mM NH <sub>4</sub> CO <sub>3</sub> , pH = 8,0, separace Se(IV) a Se(VI), reakce CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> s organickou kyselinou generuje CO <sub>2</sub>	[87]
Fosfátový pufr	rozmezí pH dle stanovovaných specií: 4,6 – 7,0	[130,119,117,131,116]
pHBA	gradientová eluce, rozmezí pH 8,0 – 9,0	[132]

#### 2.4. Výskyt a význam Se a Te

Telur byl objeven roku 1784 Franz-Josefem von Reichensteinem ve zlatých rudách z oblasti Transylvánie, a byl svým objevitelem původně omylem považován za antimon nebo jeho sloučeninu. Pojmenován byl M. Klaprothem až roku 1798 na základě latinského výrazu pro zemi „*tellus*“. [133,134] Selen byl objeven a popsán J.J Berzeliiem a J.G.Gahnem roku 1818 a byl pojmenován na základě podobnosti s telurem podle řeckého výrazu pro Měsíc – „*selene*“. [133]

Telur i Se jsou polovodiče, kromě elektroniky jsou oba prvky využívány ve sklářském průmyslu pro barvení skla. V metalurgii je Te používán jako přísada do oceli a mědi usnadňující obrábění. Průmysl je spolu se spalováním uhlí a přirozeným uvolňováním z rudných ložisek také hlavním zdrojem znečištění povrchových vod. V přírodě se oba prvky vyskytují v některých sulfidových rudných horninách jako selenidy a teluridy dalších kovů. Na českém území se vyskytuje telur např. jako hessit ( $\text{AgTe}_2$ ) na historickém ložisku polymetalických rud v Roztokách u Ústí nad Labem [135] a selen je předpokládán v měděných rudách na ložisku Zlaté Hory v Moravsko-slezském kraji [136].

#### 2.5. Biologický význam a toxicita Se pro člověka

Všechny specie Se je možné považovat za alespoň potenciálně toxické, přičemž nejvyšší toxicitu vykazuje těkavý  $\text{SeH}_2$ . [137] Ovšem názory na toxicitu Se pro lidský organismus se během jeho zkoumání značně proměnily. Do objevu Se-aminokyselin v roce 1966 byl považován za toxické a karcinogenní xenobiotikum, dnes je na něj nahlíženo jako na esenciální stopový prvek s velice úzkým terapeutickým rozmezím. [138] Bylo prokázáno, že je nezbytný pro syntézu některých enzymů a má i další biologické funkce. Ve vodných prostředích se nejčastěji vyskytuje ve dvou anorganických formách: jako seleničitanový anion a jeho protonované formy a selenanový anion. V organických sloučeninách Se často nahrazuje lehčí prvky ze VI.A skupiny – kyslík a především síru. Z hlediska příjmu pro člověka je Se v podobě jeho organických specií (např. Se-methioninu) výrazně biodostupnější než z jeho anorganických forem.

Se se v lidském organismu vyskytuje v proteinech s širokým spektrem účinků. Jeho kanceroprotektivní schopnost je přičítána enzymu glutathion peroxidáze snižujícímu oxidativní stres, kde se Se aktivně účastní redoxních reakcí. [139] Na druhou stranu vysoké dávky Se mohou způsobit akutní toxické účinky skrze buněčnou apoptózu

vyvolanou produkcí reaktivních forem kyslíku (ROS), tedy opačným efektem. [140] Dále hraje Se významnou roli v syntéze testosteronu, produkci thyroïdních hormonů a je spojován s normální funkcí imunitního systému. [141,142] Chronická intoxikace Se se projevuje vypadáváním vlasů, lámavostí nehtů, česnekovým zápachem dechu, gastrointestinálními obtížemi a narušením funkce nervového systému. [143] Pravděpodobně především kanceroprotektivní účinky Se vedly k jeho rozšířenému přidávání do potravinových doplňků i v oblastech, kde obyvatelstvo netrpí akutním nedostatkem tohoto mikronutrientu. [144] Jeho obsah a biodostupnost v půdách se ve světě značně liší. Mezi oblasti s vysokým obsahem Se v půdách patří velké pláne na území USA a Kanady, část Irska, Kolumbie, Venezuela a některé provincie Číny. Naopak např. čínská provincie Keshan, větší část Evropy a Ruska a Nový Zéland patří mezi oblasti selenodeficientních půd. [137,145]

Základním zdrojem selenu pro organismus je příjem z potravy a pitné vody. V evropské kontinentální stravě je přirozeně zastoupen skrze rostliny z čeledi brukvovitých (*Brassicaceae*) a česnekovitých (*Alliaceae*). [146–148] Dle doporučení Světové zdravotnické organizace (WHO) by maximální bezpečný obsah Se v pitné vodě neměl překračovat  $40 \mu\text{g dm}^{-3}$ , limity v EU jsou ještě přísnější a obsah Se v pitné vodě by neměl překročit  $10 \mu\text{g dm}^{-3}$ . [149] Rozmezí bezpečného příjmu z potravy bylo stanoveno na 55 – 400  $\mu\text{g}$  na den pro dospělého člověka. [150] Od těchto hodnot je odvozen také limit pro obsah Se v doplňcích stravy. Legislativa České republiky stanovuje obsah Se v těchto přípravcích na maximálně 55  $\mu\text{g}$ , schválenými zdroji jsou pouze seleničitan sodný a selenan sodný. [151]

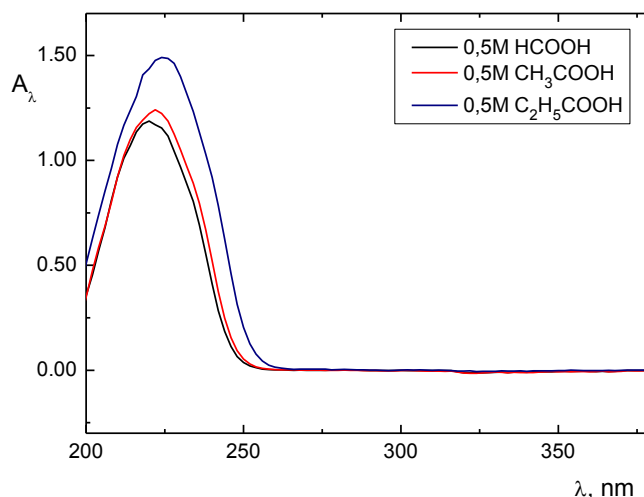
### 3. Materiál a metody

#### 3.1. Chemikálie

##### 3.1.1. Chemikálie používané při UV-fotochemickém generování těkavých sloučenin Se a Te

Není-li uvedeno jinak, byla při experimentech používána voda vyrobená zařízením MiliQ<sub>PLUS</sub> a chemikálie používané při experimentech byly čistoty p.a. nebo vyšší. Standardy specií Se a Te o koncentraci prvku  $100 \text{ mg dm}^{-3}$  byly připraveny navážením z pevných solí a rozpuštěny v deionizované vodě. Použitými pevnými standardy anorganických specií byly pentahydrát seleničitanu sodného, dekahydrát selenanu sodného, teluričitan sodný a kyselina telurová (vše Sigma-Aldrich, USA). Standardy organických specií Se byly připraveny ze selenomethioninu a (Se)-methylselenocystein hydrochloridu (obojí Sigma-Aldrich, USA). Roztoky anorganických specií Se a Te nebyly stabilizovány, byly uchovávány v lednici a používány vždy nejdéle tři měsíce, přestože nebyly pozorovány žádné známky rozkladu vzorků. Standardy organických specií a standardy Te byly používány maximálně jeden měsíc. Při pokusech o zvýšení citlivosti generování těkavé sloučeniny Se z organických specií byla využita také následující oxidační činidla:  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ ,  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{NaNO}_2$  (vše Lachner, ČR). PuMobilní fáze pro chromatografickou separaci byla připravena z pevného tris(hydroxymethyl)aminomethanu (Merck, Německo).

Fotokatalyzátor  $\text{TiO}_2$  byl pořízen nanokrystalický (velikost částic  $< 2 \text{ nm}$ , čistota 99,5 %, Sigma-Aldrich, USA). Nejčastěji používanými fotochemickými činidly při UV-fotochemickém generování jsou nízkomolekulární organické kyseliny, které vykazují absorpční pás v UV oblasti (obr. 3.1). Při UV-fotochemickém generování byly použity kyselina mravenčí, octová a propionová (Sigma-Aldrich, USA). Byla změřena absorpční spektra  $0,5 \text{ mol dm}^{-3}$  roztoků kyseliny mravenčí, octové a propionové a byly ověřeno, že jejich absorpční pásy se významně nepřekrývají s žádnou z čar použité nízkotlaké rtuťové výbojky (viz. obr. 3.3). Používanými plyny byly Ar (99,998 %) a  $\text{H}_2$  (99,0 %, obojí Linde, ČR).



Obr. 3.1.: Absorpční spektra roztoků kyseliny mravenčí, octové a propionové v UV oblasti,  $c = 0,5 \text{ mol dm}^{-3}$ , délka absorpčního prostředí 10,0 mm.

### 3.1.2. Certifikované referenční materiály

Byly analyzovány dva vodné referenční materiály pro ověření přesnosti metody TiO<sub>2</sub>-UV-fotochemického generování a jeden pro validaci stanovení selenu ve vzorcích potravinových doplňků. Jednalo se o certifikované referenční materiály simulující složení sladkovodní matrice NIST SRM 1643e a NIST SRM 1640a. Tyto referenční materiály jsou semi-syntetickými vzorky sladké vody s certifikovaným obsahem 29 prvků, přičemž 22 z nich bylo cíleně přidáno. Referenční materiál je stabilizovaný kyselinou dusičnou o obsahu přibližně 2 % (V/V). Z toho důvodu byly před analýzou odpařeny téměř do sucha a znovu rozpuštěny v deionizované vodě. Certifikovaným referenčním materiálem pro ověření přesnosti stanovení selenu v doplňcích stravy byl NIST SRM 3280. Jedná se o multivitaminový a multiminerální přípravek s certifikovaným obsahem 27 různých prvků a 17 vitamínů. Certifikát neobsahuje informaci o povaze obsažené specíe Se.

### 3.1.3. Praktické vzorky

Všechny vzorky doplňků stravy byly zakoupeny v běžné obchodní síti a v době analýzy nebyla překročena doporučená doba jejich spotřeby. Reálné vzorky doplňků stravy, ve kterých byl stanovován obsah Se(IV) a Se(VI) byly ve formě tablet. Pro účely analýzy byly tyto vzorky označeny písmeny A-F, přičemž vzorky A a E obsahovaly Se ve formě seleničitanu sodného a vzorky B, C, D, F ve formě selenanu sodného. Vzorky



A a B obsahovaly pouze několik složek, zatímco vzorky C-F zastupovaly multivitaminové a multiminerální přípravky s komplikovanou matricí. Tyto vzorky byly před analýzou rozetřeny v třecí misce a Se z nich byl louhován za asistence sonikace po dobu 30 min při teplotě 35 °C. Detailnější informace o postupu extrakce jsou uvedeny v kapitole 4.3.2.

Doplňky stravy použité při speciální analýze měly obsahovat organicky vázaný Se. Ve vzorku A bylo složení obsahu deklarováno jako „kvasnice obohacené selenem, selen ze zdroje na přírodní bázi“. Ve vzorku B jako „kvasnice obohacené selenem, organický a dobře vstřebatelný selen“. Postup analýzy je uveden v kapitole 4.4.6.

#### 3.1.4. Chemikálie používané při interferenční studii

Pro vyhodnocení vlivu různých potenciálních interferentů na stanovení Se při interferenční studii byly použity standardní roztoky As(III), Sb(III), Pb(II), Cd(II), Ni(II), Fe(III), Mn(II), Co(II), Cr(III), Cu(II), Ag(I) (všechny připravené v kyselině dusičné, Analytika, ČR). Pro přípravu zředěných roztoků kyselin byly použity koncentrované kyseliny HNO<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a HCl a H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (Merck, Německo). Roztoky solí byly připraveny z NaNO<sub>3</sub>, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (vše Lachner, ČR) a NaCl (Merck, Německo). Není-li uvedeno jinak, byly všechny chemikálie analytické čistoty. Roztok Se byl připraven z pevného pentahydrátu seleničitanu sodného. Dále byly používány následující reagenty: HCl (37%, Merck, Německo), H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (95-97 %, Merck, Německo), NaBH<sub>4</sub> (≥99% Sigma-Aldrich, USA), H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (85 %) NaCl (Merck, Německo), NaOH, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (vše Lachner, ČR).

#### 3.2. Instrumentace

Detektorem byl ve většině experimentů s generováním těžké sloučeniny Se z organických a anorganických specií Se atomový absorpční spektrometr Unicam 939 (Unicam, UK). Optimalizace reakčních podmínek a zjištění kalibračních závislostí UV-fotochemického generování těžké sloučeniny Te byla provedena s detekcí atomovým absorpčním spektrometrem GBC Avanta (GBC, Austrálie) na pracovišti Envilab katedry chemie Univerzity Mateja Bela v Banské Bystrici.

Při spojení HPLC-AFS bylo měření prováděno na kapalinovém chromatografu UHPLC Dionex Ultimate 3000 s detekcí atomovým fluorescenčním spektrometrem PSA Millennium Excalibur (PSA, UK). Separace specií selenu byla provedena

na aniontově výměnné koloně Hamilton PRP-X100 o velikosti částic 5  $\mu\text{m}$ , i.d. kolony 2,1 mm, délka kolony 250 mm. Kolona je silným měničem aniontů díky trimethylamoniovým funkčním skupinám; je vhodná pro použití v širokém rozmezí pH (1 - 13 při  $T < 30\text{ }^\circ\text{C}$ ), pro vodné roztoky (do konc. 500  $\text{mmol dm}^{-3}$ ) i polární organické modifikátory (0 – 100%).

Regulace průtokových rychlostí kapalných činidel byla zajišťována peristaltickou pumpou MasterFlex (Cole-Parmer, USA), k odtahu odpadu ze separátoru fází sloužilo druhé peristaltické čerpadlo VD ČSAV (ČR). Průtokové rychlosti plynů přidávaných do aparatury byly regulovány digitálními průtokoměry mass flow controller (Cole-Parmer, USA). Pro konstrukci aparatur byly používány především teflonové kapiláry o vnitřním průměru 0,8 mm (o.d. 1,58 mm, Sigma-Aldrich, USA), a tygonové čerpací hadičky různých průměrů (Cole-Parmer, USA). Separátor fází byl skleněný o vnitřním objemu 6 ml (viz obr. 3.2). Spojovací prvky byly z polypropylenu.

Studium vnitřních povrchů teflonových kapilár reaktoru bylo provedeno na pracovišti katedry geologie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy na skenovacím elektronovém mikroskopu JSM-6380LV (JEOL, USA) vybaveném sondou pro EDXRF.

Absorpční spektra organických kyselin v UV oblasti uvedená na obr. 3.1 byla změřena na UV-Vis spektrofotometru HP 8453 (Hewlett Packard, USA) a emisní spektra rtuťových výbojek přenosným spektrometrem vybaveným optickým vláknem (Ocean Optics HR 4000, i.d. vlákna 600  $\mu\text{m}$ , Ocean Optics, USA).

Referenční stanovení obsahu Se ve vzorcích potravinových doplňků bylo provedeno na atomovém absorpčním spektrometru ContrAA 700 vybaveném elektrotermickou atomizací v příčně vyhřívaných grafitových kyvetách s platformou (Analytik Jena, Německo). Vzorky byly převedeny do roztoku mikrovlnným rozkladem na přístroji CEM MDS 2000 (CEM, USA) v koncentrované kyselině dusičné.

### 3.3. Atomizační a detekční podmínky

V případě QFAAS detekce atomizace probíhala v externě vyhřívaném křemenném atomizátoru (RMI, Česká republika). Ne-li uvedeno jinak, byla používána teplota atomizace 950  $^\circ\text{C}$ . Vzhled a rozměry atomizátoru jsou uvedeny pod obr. 3.2. Na vstupu do atomizátoru byl přidáván  $\text{H}_2$ . Detekce Se probíhala na analytické čáře 196,0 nm a detekce Te na analytické čáře 214,3 nm, šíře spektrálního

intervalu byla vždy 0,5 nm. Výbojka s dutou katodou pro Se byla napájena proudem 12 mA a pro Te 7 mA.

Při speciální analýze spojené s atomově fluorescenční detekcí byl atomizačním prostředím miniaturizovaný argon-vodíkový difúzní plamen, použitý atomizátor a separátor fázi byly typy vlastní AFS přístroji Millenium Excalibur (PSA, U.K.). Vnitřní objem separátoru fázi byl 29 ml.



Obr. 3.2: Atomizátor a separátor fázi používaný ve spojení s QFAAS

Rozměry atomizátoru: délka v optické dráze 125 mm, vnitřní průměr v atomizační oblasti 7,5 mm, vnitřní průměr v okrajových částech 14 mm, délka přívodního ramene 75 mm

Vnitřní objem separátoru fázi 6 ml

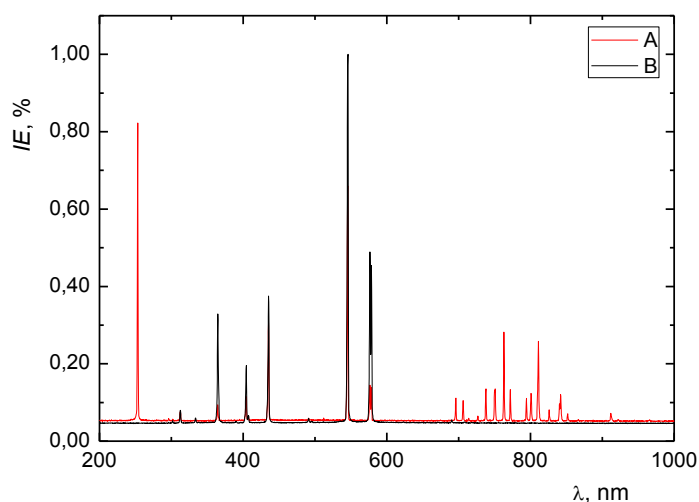
### 3.4. Experimentální uspořádání

#### 3.4.1. UV-fotochemický generátor

Během experimentální práce na vývoji metod UV-fotochemického generování těkavých sloučenin Se a Te byly použity různé varianty aparatury pro UV-fotochemické generování těkavých sloučenin (viz obr. 3.4 – 3.6) Ve všech případech byl použit v laboratoři zkonstruovaný níže popsáný UV-fotochemický reaktor. UV-fotochemický reaktor sestával z nízkotlaké rtuťové výbojky (610 x 152 x 108 mm, 20 W, USHIO, Japonsko) těsně omotané PTFE kapilárou (i.d. 0,8 mm, o.d. 1,58 mm), kterou při měření protékal roztok vzorku. UV generátor byl osazen ve zdroji s reflexními stěnami a svrhu zakryt krytem z pevného kartonu potaženého hliníkovou fólií. Tento způsob izolace zajišťoval bezpečí analytika před UV zářením a zároveň konstantní teplotu reaktoru.

Bylo zjištěno, že teplota na povrchu UV výbojky při dlouhodobém provozu dosahuje přibližně 55 °C. Nízkotlaká rtuťová výbojka byla zvolena, protože střednětlaká výbojka by nemusela poskytovat dostatečnou energii pro zamýšlenou redukci Se(VI). TiO<sub>2</sub> je schopen absorpce záření pouze v UV spektru; šířka zakázaného pásu v nemodifikovaném TiO<sub>2</sub> je 3,5 eV, což odpovídá energii záření o vlnové délce přibližně 350 nm. [152] Hlavní emitovaná čára nízkotlaké rtuťové výbojky leží na vlnové délce 253,7 nm, u střednětlaké rtuťové výbojky dochází vlivem samoabsorpce k vymizení této vlnové délky a nejintenzivnější čarou v UV oblasti tak je vlnová délka 365,0 nm. [153] Srovnání naměřených spekter těchto výbojek je zobrazeno na obr. 3.3.

Během experimentální práce bylo zjištěno, že při použití TiO<sub>2</sub> je možné za podmínek uvedených v kapitole 4.1.9 provádět fotochemickou redukci Se(VI) a generování těkavé sloučeniny Se i při ozařování UV zářením o nižší energii. Při použití střednětlaké výbojky<sup>a</sup> bylo dosaženo odezev 87 % pro Se(IV) a 57 % pro Se(VI) v porovnání s nízkotlakou rtuťovou výbojkou. Generování těkavé sloučeniny by tedy bylo možné ale s nižší citlivostí. Nadále bylo pracováno pouze s nízkotlakou rtuťovou výbojkou.



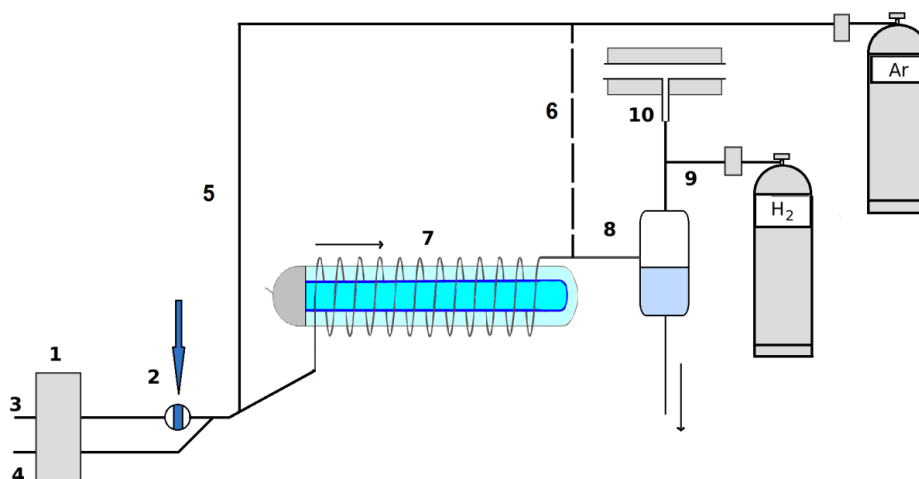
Obr. 3.3 : Spektra Hg výbojek používaných při UV-fotochemickém generování  
 A – nízkotlaká rtuťová výbojka ( $\lambda_{\max} = 253,7$  nm), B – střednětlaká rtuťová výbojka  
 ( $\lambda_{\max} = 365,0$  nm, dále intenzivní čáry ve viditelném spektru)

<sup>a</sup> Výsledky získané s těmito dvěma výbojkami nejsou plně srovnatelné z důvodu odlišné konstrukce a odlišné produkce tepla při provozu.

### 3.4.2. Použité aparatury pro UV-fotochemické generování, postupy měření

#### 3.4.2.1. Základní aparatura pro TiO<sub>2</sub>/UV-fotochemické generování

Níže zobrazená aparatura (obr. 3.4) byla využita pro generování těkavé sloučeniny Se i Te v módu FIA včetně stanovení obsahu Se v reálných vzorcích. UV reaktor byl používán kontinuálně, tedy po celou dobu měření ozařoval protékající roztok. Vzorek připravený v deionizované vodě popřípadě jiném roztoku (reálné vzorky doplňků stravy) byl dávkován přes nízkotlaký dávkovací ventil do proudu roztoku nízkomolekulární kyseliny. Za dávkovacím ventilem byla kontinuálně přidávána suspenze TiO<sub>2</sub> a vzorek byl následně unášen do UV reaktoru. Nosný plyn mohl být přidáván před nebo až za vstup do reaktoru. Vygenerovaná těkavá sloučenina byla strhávána nosným plynem a oddělena od kapalně odpadní fáze v separátoru fází odkud spolu s přidávaným H<sub>2</sub> pokračovala do atomizátoru.



Obr. 3.4: Aparatura pro UV-PVG v módu FIA, v případě měření bez přídavku TiO<sub>2</sub> (viz UV-fotochemické generování těkavé sloučeniny Te) byl příslušný kanál (4) odpojen a příslušný T konektor byl nahrazen přímou spojkou  
1 – peristaltické čerpadlo, 2 – dávkování vzorku, 3 – fotochemické činidlo, 4 – suspenze TiO<sub>2</sub>, 5 – přívod Ar, 6 – alternativní pozice pro přívod Ar (organické specie Se), 7 – UV-fotochemický reaktor, 8 – separátor fází, 9 – přívod H<sub>2</sub>, 10 – atomizace v externě vyhřívaném křemenném atomizátoru

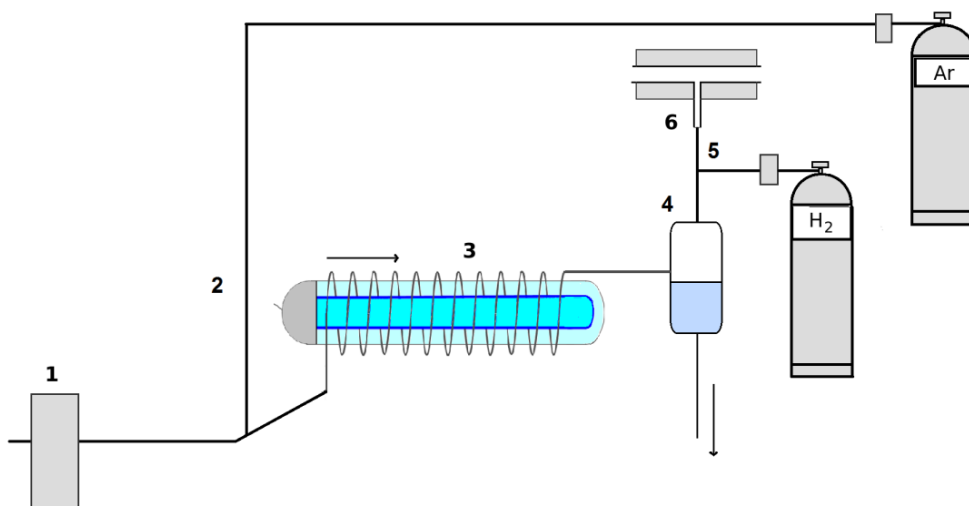
Vzdálenost od výstupu z UV reaktoru po separátor fází měřila v případě generování těkavé sloučeniny Se 15 cm, v případě Te byla zkrácena na 7 cm. Vzdálenost od výstupu ze separátoru fází po atomizační prostředí (včetně přívodního

raménka atomizátoru) měřila vždy 15 cm. Poměr i.d. tygonových hadiček v kanálech 3 a 4 byl konstantní a poměr průtokových rychlostí kapalin v obou kanálech byl zachován v poměru přibližně 3:1.

V uspořádání FIA byla vyhodnocována výška píku; naměřená hodnota absorbance tedy odpovídá rozdílu hodnoty absorbance v maximu píku a průměrné hodnoty základní linie před začátkem píku.

#### 3.4.2.2. Aparatura pro měření v módu CFA

V módu kontinuální průtokové analýzy byla požadovaná koncentrace Se připravena v roztoku nízkomolekulární organické kyseliny a nasávána do reaktoru po dobu potřebnou do ustálení signálu; vyjma vybraných experimentů nebyla přidávána suspenze  $\text{TiO}_2$ . Nosný plyn byl vždy přidáván před vstupem vzorku do reaktoru. Schéma aparatury je na obr. 3.5. Chemické generování těkavé sloučeniny Se za účelem porovnání účinností generování bylo vyjma generátoru provedeno ve stejné aparatuře. Kanálem 1 byla čerpána kyselina chlorovodíková resp. roztok Se v kyselině chlorovodíkové, místo UV reaktoru (3) byla použita reakční cívka z PTFE a před přívodem Ar byl zapojen také kanál přivádějící redukční činidlo  $\text{NaBH}_4$ .

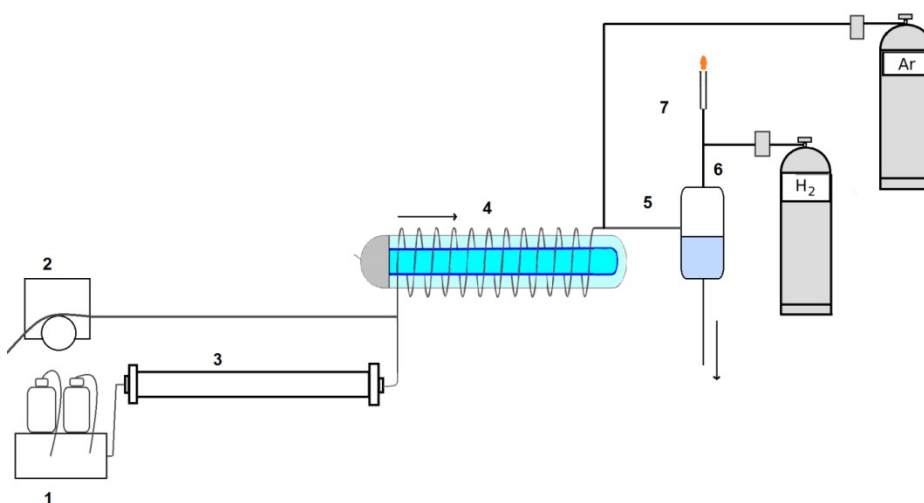


Obr. 3.5: Aparatura pro generování těkavých sloučenin v uspořádání CFA

1 – peristaltické čerpadlo, přívod vzorku, 2 – přívod Ar, 3 – UV-fotochemický reaktor, 4 – separátor fází, 5 – přívod H<sub>2</sub>, 6 – atomizace v externě vyhřívaném křemenném atomizátoru

### 3.4.2.3. Aparatura pro speciální analýzu Se metodou HPLC –TiO<sub>2</sub>/UV-PVG – AFS

Za účelem separace a stanovení anorganických a organických specií Se ve směsi byla vyvinutá metoda UV-fotochemického generování těkavých sloučenin modifikována a využita jako derivatizační metoda pro spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie s atomově fluorescenční detekcí. Pro tento účel byla aparatura upravena do podoby zobrazené na obr. 3.6. Při speciální analýze Se metodou HPLC - TiO<sub>2</sub>/UV-PVG – AFS byla peristaltickým čerpadlem neustále přidávána suspenze TiO<sub>2</sub> v kyselině octové k mobilní fázi opouštějící chromatografickou kolonu. Sběr a vyhodnocení dat probíhal pomocí software kapalinového chromatografu.



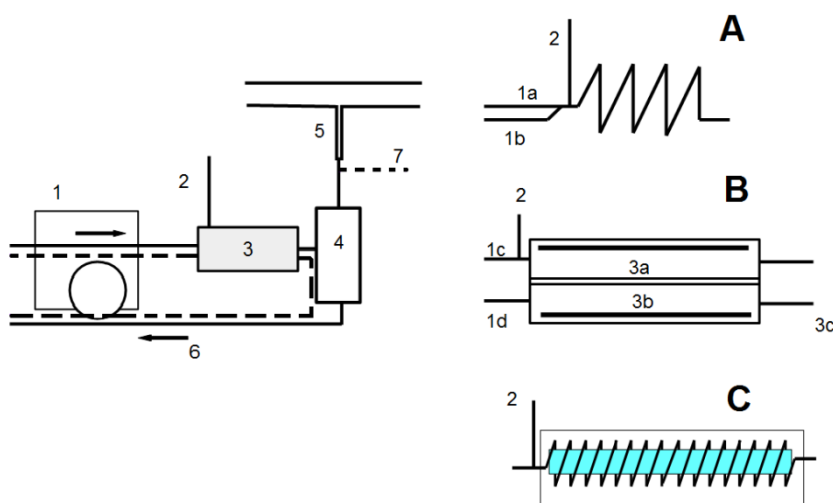
Obr. 3.6: Aparatura pro speciální analýzu Se metodou HPLC –TiO<sub>2</sub>/UV-PVG – AFS  
1 – zásobník mobilní fáze, vysokotlaké čerpadlo, 2 – peristaltická pumpa, čerpání derivatizačního činidla, 3 – kolona, 4 – UV-fotochemický reaktor, 5 – přívod nosného plynu, 6 - separátor fází, 7 – atomizace v miniaturizovaném plamenovém atomizátoru a detekce AFS

### 3.4.3. Aparatura a instrumentace pro srovnávací studii interferencí v metodách chemického, elektrochemického a fotochemického generování

Byl zkoumán vliv různých doprovodných prvků z matrice na stanovení Se UV-fotochemickým generováním těkavých sloučenin. Pro porovnání vlivu interferencí v různých technikách generování těkavých sloučenin byla zkonstruována aparatura pro kontinuální průtokové generování, ve které bylo možné snadno provést záměnu reaktoru, při zachování jinak stejných podmínek měření. Zmíněná aparatura a použité

reaktory jsou schematicky zobrazeny na obr. 3.7. Při měření interferenční studie byl vzorek připravený v reakčním činidle příslušejícím dané metodě generování nasáván kontinuálně do generátoru, dokud nebylo dosaženo stabilní hodnoty signálu. Potřebná doba byla pro různé metody generování a různé interferenty různě dlouhá. Pak byl vzorek zaměněn za blank, dokud nedošlo k návratu a ustálení signálu na základní linii.

Reaktorem pro chemické generování těkavých sloučenin byla teflonová hadička o vnitřním průměru 1,0 mm (o.d. = 2,0 mm, Sigma-Aldrich, USA). Elektrochemické generování bylo prováděno v elektrolytické cele sestavené v laboratoři sestávající ze dvou polocel oddělených membránou (Nafion 117, Sigma-Aldrich, USA). Každá polocela měla vnitřní objem 900  $\mu\text{l}$ . Použitá katoda byla olověná (99,99 % Pb, Sigma-Aldrich,  $S = 820 \text{ mm}^2$ ), plíšková anoda byla z Pt (99,99 %, Safina, ČR,  $S = 350 \text{ mm}^2$ ). Pro udržování konstantního proudu byl použit laboratorní zdroj LPS 303 (American Reliance, Taiwan). Reaktorem pro UV-fotochemické generování těkavých sloučenin byla nízkotlaká rtuťová UV výbojka (20 W, USHIO, Japonsko) omotaná teflonovou kapilárou o vnitřním průměru 1,0 mm (o.d. 1,4 mm).



Obr. 3.7: Schéma aparatury pro porovnání interferencí v různých technikách generování těkavých sloučenin

1 – peristaltické čerpadlo, 2 – přívod Ar, 3 – reaktor (A – CVG, B – EcVG, C – UV-PVG), 4 – separátor fází, 5 – externě vyhřívaný křemenný atomizátor, 6 – odpad, 1a – přívod HCl a vzorku, 1b – přívod  $\text{NaBH}_4$ , 1c – přívod katolytu a vzorku, 1d – přívod anolytu, odpovídá přerušované čáře v celkovém schématu, 3a – katodový prostor cely, 3b – anodový prostor cely, 3c – odvod anolytu, 7 – atomizační plyn ( $\text{H}_2$ , pouze UV-PVG)



Během interferenční studie byly s vybranými prvky (As, Sb, Pb, Cu, Ni) prováděny experimenty zjišťující, zda k interferenci/modifikaci reakce dochází v kapalně nebo plynné fázi. Při těchto experimentech byla zvláště generována potenciálně vznikající těkavá sloučenina zkoumaného prvku ve druhém totožném reaktoru. Kanály s těkavou sloučeninou Se a těkavou sloučeninou zkoumaného prvku byly spojeny před vstupem do atomizátoru. Použit byl také pár stejných separátorů fází. Podmínky generování byly v obou kanálech totožné s optimálními podmínkami pro generování těkavé sloučeniny Se danou metodou, pouze průtok nosného plynu byl v každém kanálu poloviční oproti optimální průtokové rychlosti. Rozdělení průtokové rychlosti nosného plynu bylo provedeno za účelem zachování atomizačních podmínek.

## 4. Výsledky a diskuze

### 4.1. Stanovení Se(IV) a Se(VI) v módu průtokové injekční analýzy

#### 4.1.1. Teoretické pozadí problematiky využití TiO<sub>2</sub> pro on-line redukci Se(VI)

Obecné informace o mechanismu UV-fotochemického generování probíhajícího v přítomnosti katalyzátoru TiO<sub>2</sub> jsou uvedeny v kapitole 2.1.5.3. Zde jsou rozebrány konkrétní aspekty předpokládané interakce Se(IV) a Se(VI) se zmíněným fotokatalyzátorem. Adsorpce seleničitanu a selenanu na TiO<sub>2</sub> probíhá nejlépe v kyselém pH (pH=1-4). Interakce obou aniontů s TiO<sub>2</sub> ovšem není totožná; předpokládá se, že mírně rychlejší kinetiku sorpce vykazuje selenan. [83]

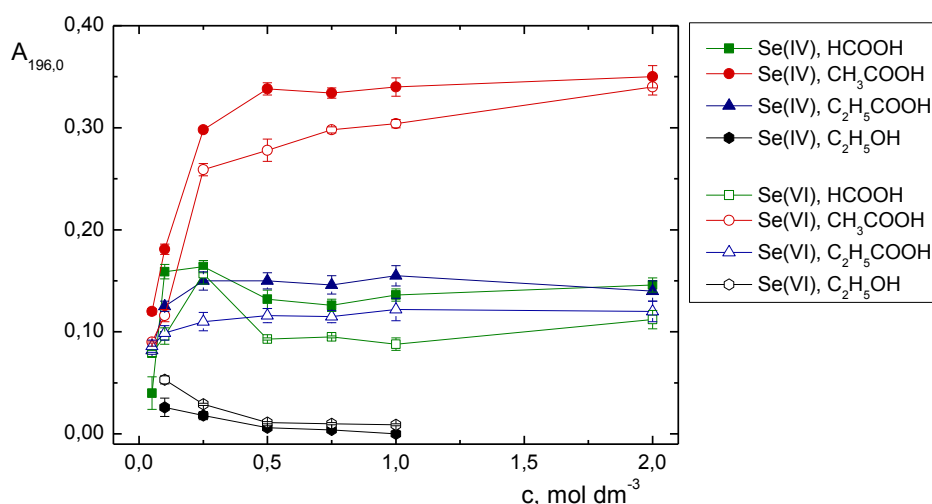
Sorpce Se(VI) v kapalině na povrch TiO<sub>2</sub> probíhá nejúčinněji v kyselé oblasti (pK<sub>a2</sub> = 2,0), konkrétně při pH = 3,5 byla zjištěna účinnost sorpce 70 %. S rostoucím pH klesá sorpce až k zanedbatelným hodnotám při pH > 6. [154] Toto chování souvisí s elektrostatickými interakcemi. V uvedeném rozmezí je jedinou specií Se(VI) ve vodných roztocích SeO<sub>4</sub><sup>2-</sup> a povrch TiO<sub>2</sub> je nabit kladně (převažují skupiny Ti<sub>2</sub>=OH a TiOH<sub>2</sub><sup>+</sup>) díky čemuž elektrostatické přitahování zajišťuje ochotnou interakci mezi Se a fotokatalyzátorem. Analogické chování lze očekávat u Se(IV), který má hodnoty pK<sub>a1</sub> = 2,5 a pK<sub>a2</sub> = 7,3 [155] a ve vodných roztocích při pH < 6 se tudíž vyskytuje ve formě HSeO<sub>3</sub><sup>-</sup>. K dosažení mírně kyselých hodnot pH postačuje používání nízkomolekulárních organických kyselin.

#### 4.1.2. Volba fotochemického činidla

Mód průtokové injekční analýzy byl zvolen z důvodu sorpčních schopností fotokatalyzátoru TiO<sub>2</sub> přidávaného do reakční směsi. Při dávkování omezené zóny analytu je jednodušší regulovat podmínky ovlivňující interakci Se s TiO<sub>2</sub>.

Při volbě nejvhodnějšího fotochemického činidla pro generování těkavé formy Se ze seleničitanového a selenanového aniontu v módu průtokové injekční analýzy byla na základě literatury testována kyselina mravenčí, octová a propionová v rozmezí koncentrací 0,1 -2,0 mol dm<sup>-3</sup> a dále ethanol v rozmezí koncentrací do 1,0 mol dm<sup>-3</sup>. V rozporu s většinou publikací doporučujících použití kyseliny mravenčí byla nejvyšší citlivost pozorována s kyselinou octovou. Naměřené závislosti jsou prezentovány na obr. 4.1. Signály získané s ethanolem jako fotolytickým činidlem byly výrazně nižší,

ovšem při velice nízkých koncentracích ethanolu bylo přeci jen možno těkavou sloučeninu s nízkou účinností generovat. Toto pozorování je v souladu s teorií, že pro účinnou sorpci specií Se na  $\text{TiO}_2$  je nutné kyselé reakční prostředí. Zároveň závislosti naznačují, že pro generování těkavé sloučeniny Se není rozhodující délka uhlíkaté kostry kyseliny, ale spíše pH roztoku. Obecně byly závislosti pro každou kyselinu vždy stejného tvaru pro obě specie selenu. V případě kyselin mravenčí a propionové bylo konstantního signálu dosaženo již v  $0,25 \text{ mol dm}^{-3}$  roztoku kyseliny, v případě kyseliny octové signál narůstal až do hodnoty  $1,0 \text{ mol dm}^{-3}$  a při nízkých koncentracích kyseliny octové (do  $0,25 \text{ mol dm}^{-3}$ ) byla pozorována dvě maxima. Příčiny tohoto jevu nebyly zkoumány. Vysoké koncentrace kyselin používané v pracích jiných autorů [35,52,34,53] nebyly testovány, z důvodu obav z jejich vlivu na materiály injekčního ventilu. Následně byly optimalizovány reakční podmínky s  $0,5 \text{ mol dm}^{-3} \text{ CH}_3\text{COOH}$ .



Obr. 4.1.: Vliv použitého fotochemického činidla

$Fr(vz) = 3,8 \text{ ml min}^{-1}$ ,  $Fr(Ar) = 20 \text{ ml min}^{-1}$ ,  $Fr(H_2) = 2 \text{ ml min}^{-1}$ ,  $L_{RC} = 350 \text{ cm}$ ,

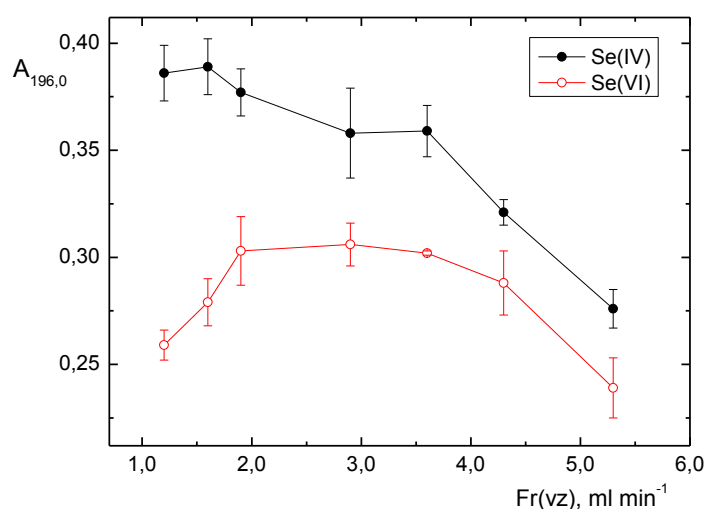
$V(vz) = 100 \text{ } \mu\text{l}$ ,  $c(\text{TiO}_2) = 0,005\% \text{ (m/V)}$ ,  $c(\text{Se}) = 200 \text{ } \mu\text{g dm}^{-3}$

#### 4.1.3. Vliv průtokové rychlosti vzorku

Průtoková rychlost roztoku vzorku reaktorem se spolupodílí na délce doby, kdy je zóna vzorku vystavena UV záření a mohou probíhat fotochemické reakce. Vzhledem k použití uspořádání FIA se průtoková rychlost vzorku podílí i na disperzi vzorku v roztoku organické kyseliny a následně na tvaru výsledného píku. Vliv objemové průtokové rychlosti vzorku na analytický signál byl zkoumán v intervalu

1,2 – 5,3 ml min<sup>-1</sup> a závislost je zobrazena na obr. 4.2. Je nutno zdůraznit, že tato průtoková rychlost roztoků je vztažena k průchodu reaktorem, je tedy sumou průtokových rychlostí v kanálu procházejícím dávkovacím ventilem a kanálu, kterým je přidávána suspenze TiO<sub>2</sub>. Poměr průtokových rychlostí kapalin v obou kanálech byl zachován konstantní v poměru přibližně 3:1. V případě Se(VI) závislost vykazuje oblé maximum, pro Se(IV) je závislost klesající. Získané závislosti mají podobný průběh při vysokých průtokových rychlostech vzorku, kdy klesá disperze vzorku v reakčním činidle a zkracuje se reakční doba. Oba jevy mohou snižovat účinnost generování těkavé sloučeniny. Závislosti se významně se liší při nízkých průtokových rychlostech, které odpovídají delším reakčním časům. Závislost pro Se(VI) by bylo možné vysvětlit prostřednictvím velké disperze vzorku v reakčním činidle při nízkých průtokových rychlostech. Toto zdůvodnění ovšem nedokáže vysvětlit závislost na průtokové rychlosti vzorku pro Se(IV).

Optimum bylo zvoleno při hodnotě 3,0 ml min<sup>-1</sup> (2,3 ml min<sup>-1</sup> pro tok procházející dávkovacím ventilem, průtoková rychlost suspenze TiO<sub>2</sub> 0,7 ml min<sup>-1</sup>).



Obr. 4.2.: Vliv průtokové rychlosti vzorku

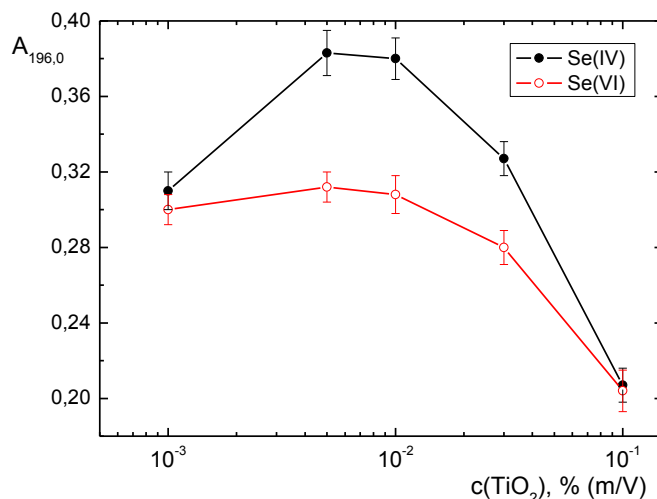
$c(\text{CH}_3\text{COOH}) = 0,5 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $Fr(\text{Ar}) = 20 \text{ ml min}^{-1}$ ,  $Fr(\text{H}_2) = 2 \text{ ml min}^{-1}$ ,

$L_{RC} = 350 \text{ cm}$ ,  $V(\text{vz}) = 100 \text{ }\mu\text{l}$ ,  $c(\text{TiO}_2) = 0,005\% \text{ (m/V)}$ ,  $c(\text{Se}) = 200 \text{ }\mu\text{g dm}^{-3}$

#### 4.1.4. Vliv koncentrace suspenze TiO<sub>2</sub>

Probíhá-li generování těkavé sloučeniny v souladu s mechanismem uvedeným v kapitole 2.1.5.3, pak koncentrace TiO<sub>2</sub> rozhoduje o rychlosti a účinnosti přeměny Se(IV) a Se(VI) na Se<sup>0</sup>. Pokud je finálním produktem SeH<sub>2</sub>, pak dle výše uvedené teorie o konverzi Se<sup>0</sup> na SeH<sub>2</sub> rozhoduje koncentrace TiO<sub>2</sub> ve spolupráci s koncentrací

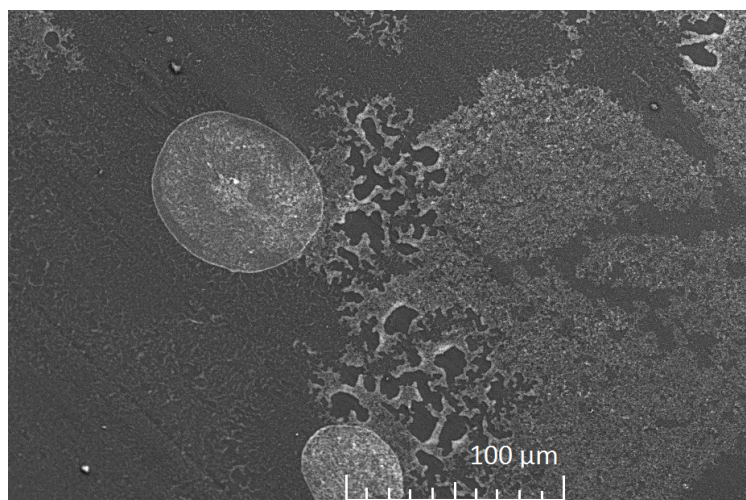
organické kyseliny odebírající polovodiči kladné náboje. Je ovšem nutné upozornit, že reakční mechanismus je založen na použití kyseliny mravenčí jako organického lapače kladných nábojů. Koncentrace suspenze  $\text{TiO}_2$  byla studována v rozsahu dvou řádů koncentrace do 0,1 % obsahu  $\text{TiO}_2$ , přičemž suspenze byla připravená v  $0,5 \text{ mol dm}^{-3}$  kyselině octové. Bylo zjištěno, že reprodukovatelnost signálu obou specií závisí na modifikaci vnitřního povrchu průtokového reaktoru zachyceným  $\text{TiO}_2$ , tento proces lze považovat za formu aktivace reaktoru. Měření závislosti tedy proběhlo v aktivovaném reaktoru, přesto měla koncentrace přídatku suspenze  $\text{TiO}_2$  vliv na generování těkavé sloučeniny z obou specií. Nalezené maximum závislosti na obr. 4.3 odpovídá nejen nejvyšší citlivosti ale i nejlepšímu výslednému tvaru píků. Pro obě specie byly nalezeny podobné závislosti s maximem při hodnotě  $5 \cdot 10^{-3} \%$  (m/V). Poloha maxima závislosti může být ovlivněna také zvýšeným rozptylem záření při vyšších koncentracích suspenze  $\text{TiO}_2$ , kdy ho nepronikne dostatečné množství docelého vnitřního objemu průtokového reaktoru a dojde ke snížení konverze rozpuštěných specií Se na jejich těkavé sloučeniny. Tato hypotéza je ovšem v rozporu s pozorováním učiněným při UV-fotochemickém generování těkavé sloučeniny Te (kapitola 4.5.3), kdy byly používány koncentrace suspenze  $\text{TiO}_2$  ještě o jeden řád vyšší.



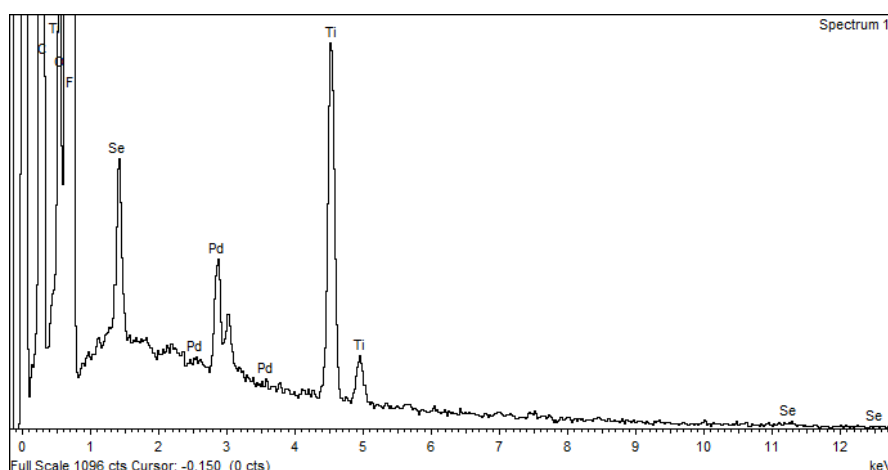
Obr. 4.3.: Vliv koncentrace suspenze  $\text{TiO}_2$

$c(\text{CH}_3\text{COOH}) = 0,5 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $Fr(\text{vz}) = 3,0 \text{ ml min}^{-1}$ ,  $Fr(\text{Ar}) = 20 \text{ ml min}^{-1}$ ,  
 $Fr(\text{H}_2) = 2 \text{ ml min}^{-1}$ ,  $L_{RC} = 350 \text{ cm}$ ,  $V(\text{vz}) = 100 \text{ } \mu\text{l}$ ,  $c(\text{Se}) = 200 \text{ } \mu\text{g dm}^{-3}$

V rámci zjišťování vlivu  $\text{TiO}_2$  na UV-fotochemické generování bylo provedeno snímkování vnitřních povrchů kapilár pomocí skenovací elektronové mikroskopie. Závěrem experimentů bylo zjištění, že  $\text{TiO}_2$  se na teflonových kapilárách ukládá lokálně v podobě vrstev uspořádaných do různě tvarovaných oblastí od kruhových útvarů po komplikované tvary připomínající lišejníky (viz obr. 4.4). Nebylo zkoumáno, zda povlaky  $\text{TiO}_2$  tohoto vzhledu vznikají i při dávkování nosného plynu až za reaktor nebo jen v případě přidávání Ar před reaktor. Obr. 4.5 ukazuje EDXRF spektrum částice  $\text{TiO}_2$  s nalezenými stopami Se. Ze získaných spekter zároveň vyplynulo, že na některých kapilárách se nacházely nečistoty, konkrétně byly na nepoužitých kapilárách nalezeny stopy Pb a Pd. Zdroje kontaminace se nepodařilo vypátrat, v případě Pd se může jednat o nečistotu z výroby samotných kapilár nebo použitých chemikálií. Zatímco stopy Pd byly nalezeny opakovaně, Pb bylo nalezeno v jenom vzorku a nelze tedy vyloučit náhodnou kontaminaci při přípravě vzorků pro SEM. V levé části obr. 4.4 je možné pod tenkou vrstvou  $\text{TiO}_2$  vidět paralelně probíhající linie, jedná se o nerovnosti na povrchu teflonové trubičky.



Obr. 4.4: SEM snímek struktury tvořené povlakem  $\text{TiO}_2$  na vnitřním povrchu kapiláry UV-fotochemického reaktoru

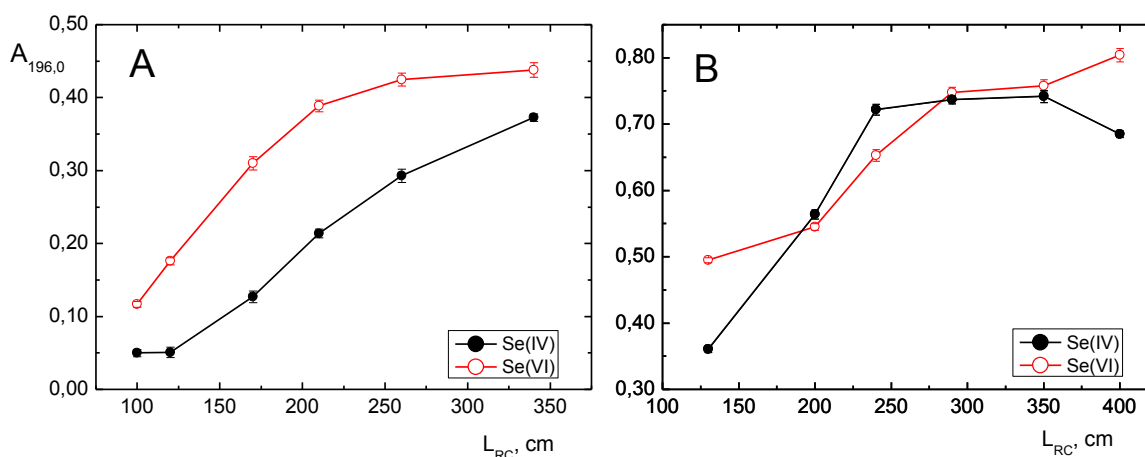


Obr. 4.5: EDXRF spektrum  $\text{TiO}_2$  sorbovaného na použité PTFE kapiláře prokazující kromě Se a Ti také přítomnost stop Pd

#### 4.1.5. Vliv doby strávené v reaktoru a postupu zkracování délky reaktoru

Délka reakční cívky spolu s průtokovou rychlostí vzorku rozhodují o době vystavení analytu UV záření a tedy reakční době. Je nezbytné, aby při dané průtokové rychlosti délka reaktoru zajišťovala maximální konverzi rozpuštěné specíe selenu na těkavou sloučeninu, ale nesmí docházet k rozkladu těkavé sloučeniny v plynné fázi vlivem UV záření. Vliv délky PTFE kapiláry vystavené UV záření na analytický signál byl zkoumán dvěma postupy v rozsahu 100 – 350 cm resp. 130 – 400 cm. Za prvé (postup A) byla používána cívka o délce 350 cm, která byla ve směru od vzdálenějšího konce namotána na UV výbojku. Cívka byla zkracována odmotáváním z přední části z reaktoru. Vzorek tedy pokaždé protékal stejnou délkou cívky, ale ozařování v reaktoru byly různě dlouhé úseky. Ve druhém případě (postup B) byla cívka o původní délce 400 cm vždy zkrácena odštížením určitého úseku; celá délka cívky tedy byla vystavena UV záření. Při změně délky reakční cívky jejím odmotáváním před vstupem do reaktoru (viz obr. 4.6.A) byla zjištěna jiná závislost než při jejím zkracováním odštíháváním (viz obr. 4.6.B). V prvním případě se od sebe signály pro Se(IV) a Se(VI) se zkracující se délkou cívky vzdalovaly a klesaly, nedošlo nikdy k dosažení stejných citlivostí. Při měření postupem odštíhávání úseků hadičky citlivosti měření obou specií také klesaly se zkracující se dobou vystavení UV záření, ovšem v určitém rozmezí délek reaktoru byly dosaženy stejné hodnoty absorbance. Pro Se(IV) bylo nalezeno maximum závislosti při přibližně 230 – 350 cm. V případě Se(VI) bylo možné dosáhnout vyšší účinnosti generování, pokud by byla použita delší reakční cívka. Jako optimum byla zvolena délka reaktoru 340 cm, poskytující stejné odezvy

pro generování ze Se(IV) a Se(VI). Zvolená délka odpovídá vnitřnímu objemu reaktoru 1,7 ml.

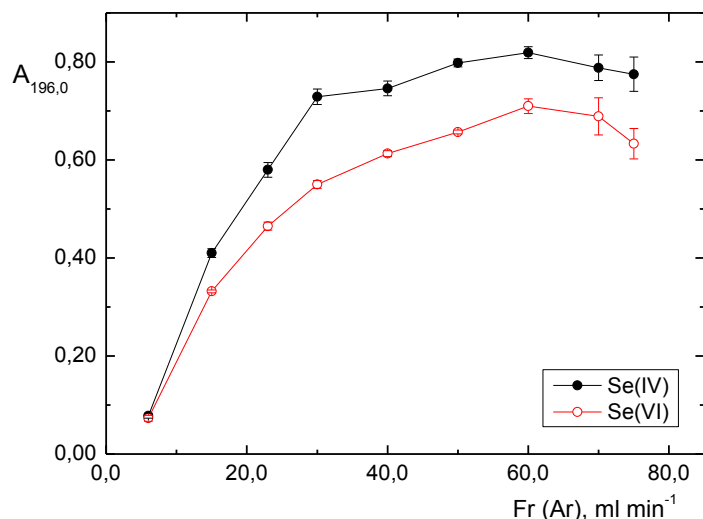


Obr. 4.6.: Vliv délky reakční cívky a metody její optimalizace, A – zkracování cívky odmotáváním před vstupem do reaktoru, B – zkracování cívky odstřiháváním  
 $c(\text{CH}_3\text{COOH}) = 0,5 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $Fr(\text{vz}) = 3,0 \text{ ml min}^{-1}$ ,  $Fr(\text{Ar}) = 20 \text{ ml min}^{-1}$ ,  
 $Fr(\text{H}_2) = 2 \text{ ml min}^{-1}$ ,  $V(\text{vz}) = 100 \text{ } \mu\text{l}$ ,  $c(\text{TiO}_2) = 0,005\% \text{ (m/V)}$ ,  $c(\text{Se}) = 200 \text{ } \mu\text{g dm}^{-3}$

#### 4.1.6. Vliv průtokové rychlosti nosného plynu

Nosný plyn zajišťuje odnos vzniklé těkavé sloučeniny z reaktoru do detektoru, aby nedošlo k jejímu opětovnému rozpuštění v kapalně fázi nebo rozkladu UV zářením. Závislost analytického signálu na průtokové rychlosti Ar byla zkoumána do hodnoty  $75 \text{ ml min}^{-1}$  přičemž Ar byl zaváděn před reakční cívku. Naměřená závislost je vynesena na obr. 4.7. Při nejvyšších průtokových rychlostech již signál obou specií nevzrůstal, ovšem výrazně narůstala směrodatná odchylka měření. Důvodem bylo pronikání kapiček kapaliny stržených plynem do vstupního ramene atomizátoru. Jako optimální byla zvolena průtoková rychlost nosného plynu  $55 \text{ ml min}^{-1}$ , kdy ještě zmíněný efekt nebyl příliš výrazný.





Obr. 4.7.: Vliv průtokové rychlosti nosného plynu

$c(\text{CH}_3\text{COOH}) = 0,5 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $Fr(\text{vz}) = 3,0 \text{ ml min}^{-1}$ ,  $L_{RC} = 340 \text{ cm}$ ,

$Fr(\text{H}_2) = 2 \text{ ml min}^{-1}$ ,  $V(\text{vz}) = 100 \text{ } \mu\text{l}$ ,  $c(\text{TiO}_2) = 0,005\% \text{ (m/V)}$ ,  $c(\text{Se}) = 200 \text{ } \mu\text{g dm}^{-3}$

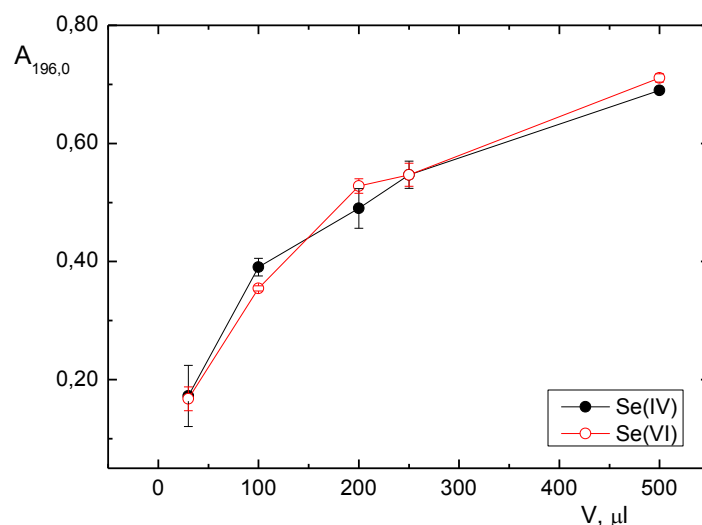
#### 4.1.7. Vliv místa zavádění a průtokové rychlosti $\text{H}_2$

Při UV-fotochemickém generování je nezbytné pro úspěšnou atomizaci těkavé sloučeniny přidávat vodík. Byl zkoumán také místa zavádění vodíku konkrétně zavádění vodíku před generátor hydridů vs. zavádění do křemenného atomizátoru. Nebylo zjištěno, že by vodík napomáhal generování těkavé sloučeniny selenu při zavádění před reaktor. Z tohoto důvodu a také kvůli bezpečnosti byl následně vodík používán pouze jako pomocný atomizační plyn a byl zaváděn do atomizátoru. Vliv průtokové rychlosti  $\text{H}_2$  na analytický signál byl změřen v rozsahu  $2\text{--}10 \text{ ml min}^{-1}$  a byla získána konstantní závislost. Nadále pak byla používána průtoková rychlost  $4,5 \text{ ml min}^{-1}$ .

#### 4.1.8. Vliv dávkovaného objemu

Závislost na dávkovaném objemu byla změřena v intervalu  $30\text{--}500 \text{ } \mu\text{l}$ , přičemž závislost získaná z výšek píku nebyla lineární. Pro další optimalizace a určení základních charakteristik stanovení byl dále dávkován objem vzorku  $100 \text{ } \mu\text{l}$  (viz obr. 4.8). Při stanovení obsahu Se(IV) a Se(VI) v reálných vzorcích doplňků stravy (viz kapitola 4.3.2) byl použit dávkovaný objem  $200 \text{ } \mu\text{l}$  poskytující vyšší citlivost stanovení. Tento postup bylo možné použít, protože vyhodnocení analytických signálů bylo

prováděno výhradně z ploch, pro které byla pozorována lineární závislost na dávkovaném objemu v celém rozsahu měřené optimalizace.



Obr. 4.8.: Vliv dávkovaného objemu

$c(\text{CH}_3\text{COOH}) = 0,5 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $Fr(\text{vz}) = 3,0 \text{ ml min}^{-1}$ ,  $L_{RC} = 340 \text{ cm}$ ,  $Fr(\text{Ar}) = 55 \text{ ml min}^{-1}$ ,  $Fr(\text{H}_2) = 4,5 \text{ ml min}^{-1}$ ,  $V(\text{vz}) = 100 \text{ μl}$ ,  $c(\text{TiO}_2) = 0,005\% \text{ (m/V)}$ ,  $c(\text{Se}) = 200 \text{ μg dm}^{-3}$

#### 4.1.9. Základní charakteristiky stanovení Se(IV) a Se(VI) při použití kyseliny octové jako reakčního činidla

Za podmínek uvedených v tab. 4.1 byly nalezeny základní charakteristiky stanovení uvedené v tab. 4.2.

Tab. 4.1: Optimální podmínky stanovení Se(IV) a Se(VI) při použití kyseliny octové jako reakčního činidla

Parametr	
koncentrace suspenze $\text{TiO}_2$ , % (m/v)	0,005
koncentrace $\text{CH}_3\text{COOH}$ , $\text{mol dm}^{-3}$	0,5
$Fr(\text{vz})$ , $\text{ml min}^{-1}$	3,0
$Fr(\text{H}_2)$ , $\text{ml min}^{-1}$	4,5
$Fr(\text{Ar})$ , $\text{ml min}^{-1}$	55
délka reakční cívky, cm	340
objem reaktoru, ml	1,7
$V(\text{vz})$ , $\text{μl}$	100

Při výše uvedených podmínkách byly změřeny základní charakteristiky stanovení selenu UV-fotochemickým generováním jeho těkavé sloučeniny v médiu kyseliny octové za účasti fotokatalýzy TiO<sub>2</sub>. Výsledky jsou uvedeny v tab. 4.2. Odchylna směrnice kalibračních přímk činila méně než 10 %, což naznačuje, že generování těkavé sloučeniny z obou oxidačních stavů by mohlo probíhat stejným mechanismem.

Tab. 4.2.: Základní charakteristiky stanovení Se(IV) a Se(VI) při použití kyseliny octové jako reakčního činidla

	Se(IV)	Se(VI)
LOD, $\mu\text{g dm}^{-3}$	1,8	1,6
LOQ, $\mu\text{g dm}^{-3}$	6,0	5,5
citlivost, $\text{dm}^3 \mu\text{g}^{-1}$	$26 \cdot 10^{-4}$	$24 \cdot 10^{-4}$
RSD, %, ( $100 \mu\text{g dm}^{-3}$ )	3,5	5,2
LDR, $\mu\text{g dm}^{-3}$	LOQ - 200	LOQ - 200
R	0,9973	0,9997

#### 4.1.10. Porovnání základních charakteristik v různých organických kyselinách

Kromě kyseliny octové byly změřeny základní charakteristiky stanovení také v  $0,5 \text{ mol dm}^{-3}$  kyselině mravenčí a propionové (viz tab. 4.3). V obou kyselinách byla nejprve optimalizována průtoková rychlost nosného plynu Ar pro případ, že by vznikaly různé těkavé specie s rozdílnou stabilitou a kinetikou uvolování do plynné fáze; ostatní podmínky byly zachovány. Závislost byla měřena s oběma kyselinami do hodnoty průtokové rychlosti  $80 \text{ ml min}^{-1}$ . Jako optimální průtokové rychlosti Ar byly zvoleny hodnoty  $60 \text{ ml min}^{-1}$  pro kyselinu mravenčí a  $50 \text{ ml min}^{-1}$  pro kyselinu propionovou. Optimální hodnoty tedy byly velice blízké optimu nalezenému s kyselinou octovou. Toto pozorování naznačuje velice podobnou stabilitu vznikající těkavé sloučeniny, případně by ve všech zkoumaných kyselinách mohla vznikat stejná těkavá sloučenina. Tuto hypotézu ovšem bude nutné ještě ověřit. Nalezené dvojnásobné citlivosti při použití kyseliny octové odpovídají pozorování učiněnému během optimalizace volby fotochemického činidla (kapitola 4.1.2). Interakce seleničitanu a selenanu s TiO<sub>2</sub> se v prostředí různých kyselin pozorovatelně liší; v kyselině mravenčí byla zjištěna vyšší

citlivost stanovení Se(VI), v kyselině octové a propionové probíhalo generování s vyšší citlivostí ze Se(IV).

Tab. 4.3.: Základní charakteristiky stanovení Se(IV) a Se(VI) při použití kyseliny mravenčí a propionové jako reakčního činidla

	Kyselina mravenčí		Kyselina propionová	
	Se(IV)	Se(VI)	Se(IV)	Se(VI)
LOD, $\mu\text{g dm}^{-3}$	5,7	4,2	3,3	3,5
LOQ, $\mu\text{g dm}^{-3}$	19	14	11	12
citlivost, $\text{dm}^3 \mu\text{g}^{-1}$	$12 \cdot 10^{-4}$	$17 \cdot 10^{-4}$	$14 \cdot 10^{-4}$	$12 \cdot 10^{-4}$
RSD, %, (100 $\mu\text{g dm}^{-3}$ )	4,4	3,3	5,9	3,5
LDR, $\mu\text{g dm}^{-3}$	LOQ - 200	LOQ - 200	LOQ - 500	LOQ - 500
R	0,9979	0,9985	0,9995	0,9994

#### 4.2. UV-fotochemické generování těkavých sloučenin Se za použití fotokatalyzátoru $\text{TiO}_2$ , kontinuální průtoková analýza

Cílem níže popsaných experimentů bylo porovnat limity detekce a citlivosti dosažitelné UV-fotochemickým generováním těkavé sloučeniny Se s využitím  $\text{TiO}_2$  s UV fotochemickým generováním bez využití fotokatalyzátoru vyvinutým Mgr. Marcelou Rybínovou [156] a se základními charakteristikami dosažitelnými chemickým generováním těkavých sloučenin.

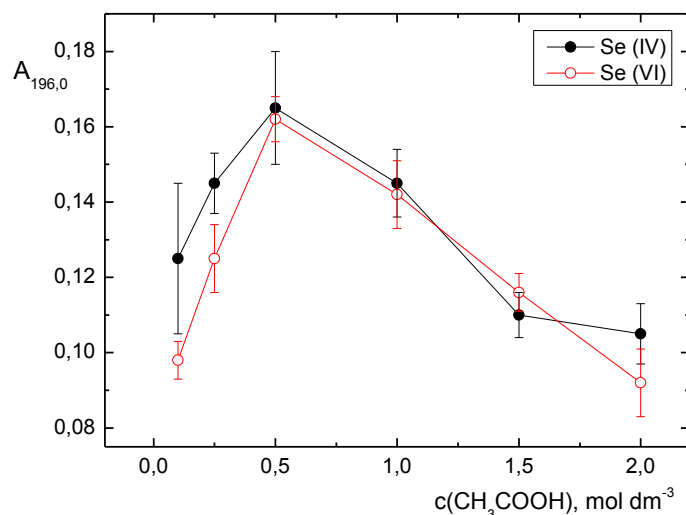
##### 4.2.1. Volba reakčního média a optimalizace jeho koncentrace

Při průtoku  $\text{Ar}$   $40 \text{ ml min}^{-1}$  a průtoku vzorku  $2,1 \text{ ml min}^{-1}$  bylo zjištěno, že v aktivované hadičce (pokryté vrstvou  $\text{TiO}_2$ ) je stejně jako v případě FIA módu nejvhodnější kyselinou pro redukci Se(VI) a generování jeho těkavé sloučeniny kyselina octová viz Tab. 4.4

Tab. 4.4: Odezva na různé nízkomolekulární organické kyseliny,  $10 \mu\text{g dm}^{-3}$  Se(VI)

kyselina; 0,5M	$A_{196,0} \pm \text{SD}$
HCOOH	$0,069 \pm 0,008$
$\text{CH}_3\text{COOH}$	$0,143 \pm 0,005$
$\text{C}_2\text{H}_5\text{COOH}$	$0,079 \pm 0,002$

Závislost odezvy na koncentraci kyseliny octové byla následně proměřena v intervalu 0,1 – 2,0 mol dm<sup>-3</sup> (viz obr. 4.9). Během této optimalizace se ukázalo, že nejvhodnější koncentrací kyseliny octové je opět původně použitá koncentrace 0,5 mol dm<sup>-3</sup> poskytující nejvyšší signály. Na rozdíl od FIA módu byla ale pozorována závislost se zřejmým maximem. Příčinou poklesu signálů při vyšších koncentracích kyseliny mohou být děje spočívající v interakci analytu s katalyzátorem; např. může být Se nadbytkem činidla omezován v interakci s TiO<sub>2</sub> nebo může jeho interakce klesat v důsledku nižší disociace kyseliny octové a tudíž rostoucího pH.



Obr. 4.9.: Vliv koncentrace kyseliny octové v módu CFA

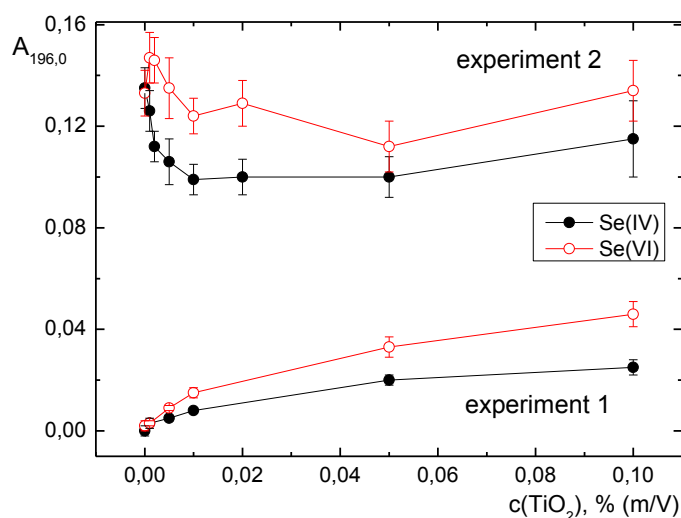
$Fr(vz) = 2,1 \text{ ml min}^{-1}$ ,  $Fr(\text{Ar}) = 40 \text{ ml min}^{-1}$ ,  $Fr(\text{H}_2) = 4,5 \text{ ml min}^{-1}$ ,  $c(\text{TiO}_2) = 0,005\%$  (m/V),  $L_{\text{RC}} = 340 \text{ cm}$ ,  $c(\text{Se}) = 10 \mu\text{g dm}^{-3}$

#### 4.2.2. Vliv přítomnosti TiO<sub>2</sub> v reaktoru na signál Se(IV) a Se(VI)

Stejně jako v případě FIA bylo pozorováno, že je-li v reaktoru použita nová hadička, tak ke generování nedochází, protože samotný přídavek TiO<sub>2</sub> nepostačuje pro redukci Se a generování jeho těkavé sloučeniny. Odezva na koncentraci TiO<sub>2</sub> (m/V) byla zkoumána s novou a již aktivovanou hadičkou do koncentrace suspenze TiO<sub>2</sub> 0,1 % (m/V). Pro tyto dva případy byly nalezeny odlišné závislosti zobrazené na obr. 4.10. Experiment 1 představuje závislost bez předchozí aktivace a experiment 2 představuje závislost v již aktivovaném reaktoru. Pozorované trendy naznačují, že důležitější než koncentrace přidávané suspenze může být již existující vrstva TiO<sub>2</sub> uvnitř reaktoru. Závěrem vyvozeným z experimentu je, že by měla pro generování Se

postačovat modifikace vnitřních povrchů oxidem titaničitým bez dalšího přidávání suspenze.

Aparatura byla zjednodušena do stavu odpovídajícímu schématu v kapitole 3.4.2.2. Tento postup umožnil dosažení vyšší citlivosti měření (dosaženy přibližně dvojnásobné signály), protože vzorek není před vstupem do reaktoru ředěn suspenzí fotokatalyzátoru. Testování stability odezev během 180 min neprokázalo, že by docházelo k uvolňování fotokatalyzátoru ze stěn reaktoru a k poklesu signálů.



Obr. 4.10.: Vliv přítomnosti  $\text{TiO}_2$ , experiment 1: bez předchozí aktivace reaktoru  $\text{TiO}_2$ , experiment 2: po předchozí aktivaci reaktoru  $\text{TiO}_2$

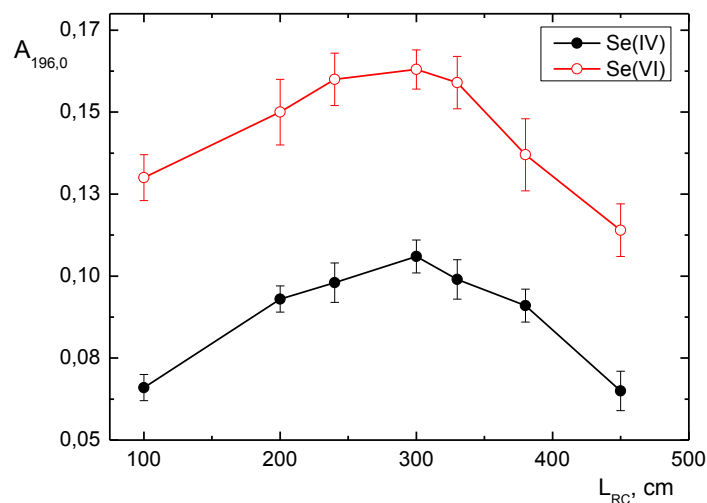
$$c(\text{CH}_3\text{COOH}) = 0,5 \text{ mol dm}^{-3}, Fr(\text{vz}) = 2,1 \text{ ml min}^{-1}, Fr(\text{Ar}) = 40 \text{ ml min}^{-1},$$

$$Fr(\text{H}_2) = 4,5 \text{ ml min}^{-1}, L_{\text{RC}} = 340 \text{ cm}, c(\text{Se}) = 10 \text{ } \mu\text{g dm}^{-3}$$

#### 4.2.3. Optimalizace délky reakční cívky

V módu kontinuální průtokové analýzy lze očekávat odlišnou závislost na době ozařování resp. na vnitřním objemu reaktoru než v usprádaní průtokové injekční analýzy, protože není nutné uvažovat disperzi vzorku v reakčním činidle. Maximum výsledné závislosti bude určeno zvyšující se účinností generování těkavé sloučeniny s prodlužující se dobou reakce a rozkladem nebo rozpuštěním těkavé sloučeniny po překročení optimálního vnitřního objemu reaktoru. Délka reakční cívky byla měněna v rozmezí 70 – 450 cm postupným zkracováním ozařované oblasti odstříhováním a byla získána závislost se zřetelným maximem. Výsledný vnitřní objem reaktoru pro nalezenou optimální délku 300 cm je 1,5 ml. Závislost je znázorněna na obr. 4.11.

Rozdíl v citlivostech měření může souviset s rozdílnou rychlostí sorpce specií Se na  $\text{TiO}_2$ , která byla zmíněna Yang et al. [83]

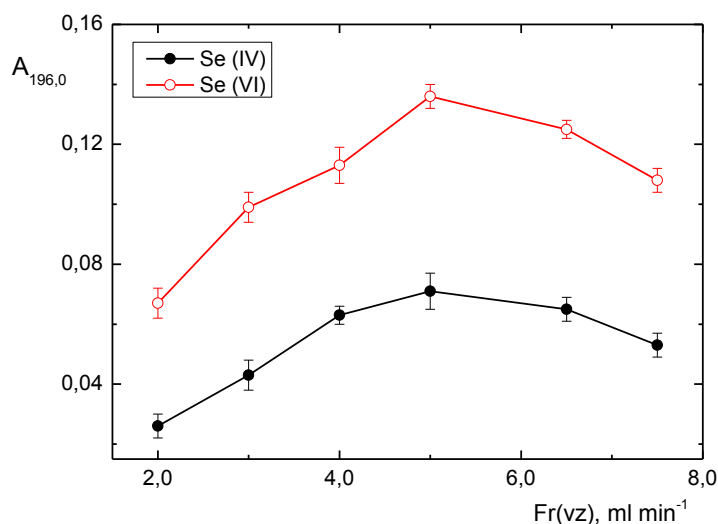


Obr. 4.11.: Vliv délky reaktoru

$c(\text{CH}_3\text{COOH}) = 0,5 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $Fr(\text{vz}) = 2,1 \text{ ml min}^{-1}$ ,  $Fr(\text{Ar}) = 40 \text{ ml min}^{-1}$ ,  
 $Fr(\text{H}_2) = 4,5 \text{ ml min}^{-1}$ ,  $c(\text{Se}) = 10 \text{ } \mu\text{g dm}^{-3}$

#### 4.2.4. Vliv průtokové rychlosti vzorku

V uspořádání kontinuální průtokové analýzy je maximum závislosti řízeno dvěma procesy. Na jedné straně vede vyšší průtoková rychlost k vyššímu přívodu analytu do reaktoru a ke generování většího množství těkavé sloučeniny. Na druhé straně od dosažení určité rychlosti přívodu analytu vede jeho další přísun ke snižování účinnosti konverze na těkavou sloučeninu a celkový výtěžek konverze začne klesat. Optimalizace průtokové rychlosti vzorku byla provedena v rozmezí  $2,0 - 7,5 \text{ ml min}^{-1}$  a je uvedena na obr. 4.12. Na základě předchozích úvah a také poznatků z UV-fotochemického generování těkavé sloučeniny Se bez účasti fotokatalyzátoru [156] bylo možno očekávat, že v uspořádání kontinuální průtokové analýzy bude zapotřebí vyšší průtoková rychlost vzorku než v uspořádání průtokové injekční analýzy. Maxima bylo dosaženo při průtokové rychlosti vzorku  $5,0 \text{ ml min}^{-1}$ .



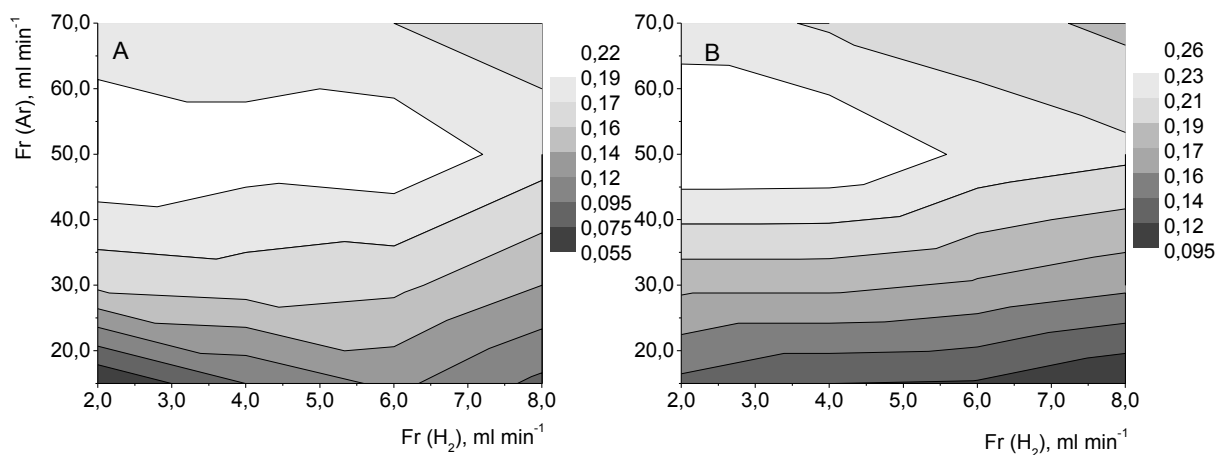
Obr. 4.12.: Vliv průtokové rychlosti vzorku

$c(\text{CH}_3\text{COOH}) = 0,5 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $Fr(\text{Ar}) = 40 \text{ ml min}^{-1}$ ,  $Fr(\text{H}_2) = 4,5 \text{ ml min}^{-1}$ ,  
 $L_{\text{RC}} = 300 \text{ cm}$ ,  $c(\text{Se}) = 10 \text{ } \mu\text{g dm}^{-3}$

#### 4.2.5. Optimalizace průtokových rychlostí plynů

Průtokové rychlosti nosného plynu Ar a atomizačního plynu H<sub>2</sub> byly optimalizovány zároveň s cílem zjistit, jaký je ideální poměr jejich průtoků pro úspěšnou atomizaci těkavé sloučeniny. Na obr 4.13 jsou uvedeny závislosti (konturové grafy) pro seleničitan a selenan, ze kterých vyplývá, že optimální průtoková rychlost nosného plynu se nachází při 50 – 60 ml min<sup>-1</sup> a optimální průtoková rychlost vodíku by v porovnání s průtokovou rychlostí Ar měla být přibližně 10x nižší. Nebyl zjištěn významně odlišný průběh závislostí a je pravděpodobné, že při UV-fotochemickém generování těkavé sloučeniny vzniká ze selenanu a seleničitanu pouze jedna těkavá specie. Pro další měření byly zvoleny hodnoty průtokových rychlostí plynů 55 ml min<sup>-1</sup> Ar a 5,0 ml min<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>.





Obr. 4.13.: Vliv průtokových rychlostí Ar a H<sub>2</sub>, A – Se(IV) , B – Se(VI)

$c(\text{CH}_3\text{COOH}) = 0,5 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $Fr(\text{vz}) = 5,0 \text{ ml min}^{-1}$ ,  $L_{\text{RC}} = 300 \text{ cm}$ ,

$c(\text{Se}) = 10 \mu\text{g dm}^{-3}$

#### 4.2.6. Základní charakteristiky stanovení

Za podmínek uvedených v tab. 4.5 byly změřeny základní charakteristiky stanovení, ty jsou uvedeny v tabulce 4.6. Pro porovnání jsou uvedeny i optimalizované podmínky chemického generování těkavé sloučeniny Se provedeného v aparatuře se stejnou délkou transportní cesty, separátorem fází a atomizátorem.

Tab. 4.5: Optimální podmínky stanovení Se(IV) a Se(VI) v módu CFA

Parametr	TiO <sub>2</sub> /UV-PVG	CVG
$c(\text{CH}_3\text{COOH})$ , mol dm <sup>-3</sup>	0,5	-
$c(\text{HCl})$ , mol dm <sup>-3</sup>	-	1,0
$c(\text{NaBH}_4)$ , % (m/V) <sup>a</sup>	-	0,5
$Fr(\text{vz})$ , ml min <sup>-1</sup>	5,0	4,5
$Fr(\text{NaBH}_4)$ , ml min <sup>-1</sup>	-	1,4
$Fr(\text{H}_2)$ , ml min <sup>-1</sup>	5,0	-
$Fr(\text{Ar})$ , ml min <sup>-1</sup>	55	40
délka reakční cívky, cm	300	80
objem reaktoru, ml	1,5	0,4

<sup>a</sup> stabilizován 0,4% roztokem NaOH (m/V)

Dosažené základní charakteristiky stanovení jsou podobné jako v případě UV-fotochemického stanovení Se(IV) v prostředí mravenčí kyseliny bez použití

fotokatalyzátoru publikovaným v doktorské disertační práci Mgr. Rybínové, kdy byl s podobným reaktorem získán limit detekce 102 ng/L, citlivost  $0,016 \text{ dm}^3 \mu\text{g}^{-1}$ , LDR do 15  $\mu\text{g/L}$ . [57,156] Dosažení vyšší citlivosti při použití fotokatalyzátoru bylo kompenzováno zkrácením lineárního dynamického rozsahu daného zvolenou detekční technikou. Zvýšení účinnosti generování a dalšího snížení LOD by bylo možné dosáhnout použitím reaktoru z křemene, který je propustnější pro používané vlnové délky UV záření než PTFE kapiláry.

Základní charakteristiky byly porovnány i s chemickým generováním těkavých sloučenin (tab. 4.6). Mírně horší limit detekce dosažený touto metodou souvisí s vývojem velkého množství vodíku během hydrolyzy  $\text{NaBH}_4$  a výraznějším šumem základní linie. Účinnost generování těkavé sloučeniny Se metodou  $\text{TiO}_2/\text{UV-PVG}$  v kyselině octové byla zjištěna porovnáním citlivostí s chemickým generováním Se(IV) a byla nalezena hodnota 81 % účinnosti CVG. Aby bylo možné zanedbat účinnost separace fází, transportu a atomizace musí být zachovány prakticky stejné podmínky všech dějů probíhajících po vygenerování těkavé sloučeniny. Tyto podmínky byly alespoň přibližně zajištěny díky použitím aparatury se stejně dlouhou transportní cestou, stejným separátorem fází a atomizátorem (viz. kapitoly 3.2 a 3.4.2).

Tab. 4.6: Základní charakteristiky stanovení Se(IV) a Se(VI) v módu CFA a porovnání s chemickým generováním

Parametr	UV-PVG		CVG
	Se(IV)	Se(VI)	Se(IV)
LOD, $\mu\text{g dm}^{-3}$	0,1	0,2	0,2
LOQ, $\mu\text{g dm}^{-3}$	0,3	0,5	0,6
citlivost, $\text{dm}^3 \mu\text{g}^{-1}$	$21 \cdot 10^{-3}$	$21 \cdot 10^{-3}$	$27 \cdot 10^{-3}$
RSD, % ( $5 \mu\text{g dm}^{-3}$ )	3,1	3,0	3,9
LDR, $\mu\text{g dm}^{-3}$	10	10	10
R	0,9993	0,9998	0,9971

### 4.3. Aplikace metody fotokatalyzovaného UV-fotochemického generování na reálné vzorky

#### 4.3.1. Stanovení Se(IV) a Se(VI) ve vodných vzorcích

Metody založené na generování těkavých sloučenin jsou nejčastěji používány pro stanovení obsahu hydridotvorných prvků ve vodných matricích, přičemž relevantní výsledky jsou získávány pouze v poměrně jednoduchých matricích. Za účelem ověření vhodnosti metody UV-fotochemického generování pro tyto matrice byl do vodných vzorků přidán Se a byly zjišťovány výtěžnosti. Zároveň bylo cílem zjistit, zda existuje významný rozdíl vlivu matrice při UV-generování těkavé sloučeniny ze Se(IV) a Se(VI) při analýze minerálních vod. Zkoumány byly vzorky pitné a minerální vody a vzorek povrchové vody. Vzorek kohoutkové pitné vody byl odebrán v centru Prahy v budově s plastovými rozvody vody. Dle polohy odběrového místa by pitná voda použitá pro odběr vzorku měla pocházet z úpravny vody Želivka. Vzhledem k technologii úpravy vody používané v této úpravně lze očekávat obsah síranu vápenatého ve vzorku. [157] Vzorky minerálních vod byly zakoupeny v běžné obchodní síti a jednalo se o neperlivé neochucené minerální vody značek Magnesia (minerální voda A) a Mattoni (minerální voda B). Vzorek povrchové vody pocházel z potoka protékajícího centrálním parkem na pražském sídlišti Stodůlky, na kterém je vybudováno několik retenčních nádrží sloužících mimo jiné i jako chovné rybníky. Vzorek byl odebrán z potoka pod první z těchto nádrží. Všechny vzorky byly před analýzou pouze přefiltrovány přes filtr o velikosti pórů 45  $\mu\text{m}$ . Při analýze byl použit přídavek standardu do vodného vzorku odpovídající výsledné koncentraci přídávku 80  $\mu\text{g dm}^{-3}$ . Výsledky jsou uvedeny v tabulce 4.7. Byl pozorován odlišný vliv obsažených iontů na stanovení Se touto metodou, přičemž mnohem výraznější interference byly pozorovány v případě Se(VI). V případě Se(IV) byly vždy naměřeny hodnoty vyšší než 100 %. Pravděpodobným zdrojem odlišného vlivu matrice na zkoumané specie může být odlišná kinetika interakce seleničitanu a selenanu s  $\text{TiO}_2$ .

Kromě spikování vodných matric byla přesnost měření ověřena také analýzou certifikovaných referenčních materiálů NIST SRM 1643e a NIST SRM 1640a. Použité podmínky měření jsou k nalezení v kapitole 4.1.9. v tabulce 4.1. Na základě předchozích zkušeností byla forma Se přítomná v referenčních materiálech považována za Se(IV). Byla nalezena dobrá shoda s certifikovaným obsahem Se v referenčních

materiálech (viz tab. 4.7). Tento výsledek spolu s obecně vyššími výtěžnostmi Se nalezenými ve vzorcích pitné vody a minerální vody A vede k závěru, že příslušné vzorky obsahovaly koncentrace Se v blízkosti limitu stanovitelnosti metody (viz tab. 4.2 v kap. 4.1.1).

Tab. 4.7.: Obsah Se(IV) a Se(VI) nalezený ve vodných referenčních materiálech<sup>b</sup> a ve vzorcích pitných a povrchových vod obohacených  $80 \mu\text{g dm}^{-3}$  Se(IV) resp. Se(VI)

	Se(IV)		Se(VI)	
	c (Se) [ $\mu\text{g dm}^{-3}$ ]	Výtěžnost [%]	c (Se) [ $\mu\text{g dm}^{-3}$ ]	Výtěžnost [%]
Pitná voda	$87 \pm 3$	$109 \pm 4$	$80 \pm 3$	$100 \pm 4$
Povrchová voda	$86 \pm 5$	$107 \pm 6$	$69 \pm 4$	$86 \pm 5$
Minerální voda A	$91 \pm 2$	$114 \pm 2$	$78 \pm 4$	$97 \pm 5$
Minerální voda B	$83 \pm 4$	$104 \pm 5$	$70 \pm 2$	$87 \pm 3$
NIST SRM 1643e	$12 \pm 1$	$103 \pm 9$	-	-
NIST SRM 1640a	$20 \pm 1$	$99 \pm 5$	-	-

#### 4.3.2. Stanovení Se(IV) a Se(VI) v reálných vzorcích potravinových doplňků

Druhým zkoumaným typem vzorku byly potravinové doplňky s obsahem anorganických forem Se. Tento typ vzorku byl zvolen proto, že v současné době existuje poptávka po kontrole Se v potravinách. Dále lze očekávat, že tento typ vzorku neobsahuje ostatní hydridotvorné prvky a Ni, které jsou nejvýznamnějšími interferenty v technice generování těkavých sloučenin. Vliv obsažených potenciálně interferujících přechodných kovů (Fe, Cu) je možno omezit vhodnou předúpravou vzorku. Cílem bylo vyvinout co nejjednodušší metodu extrakce kombinovatelnou s již vyvinutou metodou stanovení Se  $\text{TiO}_2/\text{UV-PVG-AAS}$ . Zakoupeno bylo 6 doplňků stravy od různých výrobců, různého složení a obsahu Se.<sup>c</sup> Vzorky A a B obsahovaly výrazně jednodušší matici než ostatní vzorky, kterými byly multivitaminové a mutiminerální přípravky.

<sup>b</sup> NIST SRM 1643e má deklarován obsah  $11,68 \pm 0,13 \mu\text{g dm}^{-3}$  Se a NIST SRM 1640a  $20,13 \pm 0,17 \mu\text{g dm}^{-3}$  Se

<sup>c</sup> V publikaci E. Nováková, O. Linhart, V. Červený, P. Rychlovský and J. Hraníček: Flow Injection Determination of Se in Dietary Supplements Using  $\text{TiO}_2$  Mediated UV-photochemical Volatile Species Generation, která je přílohou této dizertační práce je uvedeno 5 přípravků; vynechán je vzorek zde označený B a označení následujících vzorků je posunuto.

Praktické problémy související se stanovením obsahu Se v této komplikované matrici jsou shrnuty např. v souhrnné práci Jankowski et al. [149] Tamtéž lze nalézt také přehled metod použitých pro tuto aplikaci do roku 2015. Za účelem validace přesnosti metody bylo provedeno stanovení Se také v certifikovaném referenčním materiálu o odpovídající matrici (NIST SRM 3280 – Multivitamin/multimineral tablets).

Tablety musí být schopny se rozložit a uvolnit svůj rozsah v rozmezí fyziologických podmínek trávicí soustavy. Kromě enzymatického štěpení se v lidském žaludku uplatňuje kyselé pH a ve dvanáctníku a tenkém střevu je pH bazické. Protože Se byl v tabletách přítomen pouze v anorganických formách, měl by být uvolnitelný z matrice i bez enzymatického štěpení vzorku v průběhu extrakce. Všechny vzorky byly extrahovány v kyselém (kyselina octová), neutrálním (deionizovaná voda) a bazickém prostředí (NaOH) za pomoci ultrazvuku (30 min, 35 °C). Po extrakci byl vzorek přefiltrován přes filtr z polyamidu (póry 0,45 μm). Kyselina octová se jako extrakční činidlo neosvědčila, použití kyseliny chlorovodíkové bylo zamítnuto, protože je významným interferentem při UV-fotochemickém generování. Deklarovaný obsah Se(VI) bylo možno kvantitativně stanovit po extrakci deionizovanou vodou naopak pro stanovení Se(IV) se osvědčila extrakce 0,3 mol dm<sup>-3</sup> NaOH. Nebylo zkoumáno, zda se Se(IV) v neutrálním prostředí dostatečně neextrahuje z matrice nebo zda dochází během extrakce z matrice k uvolnění interferentů rušících stanovení Se.

Všechny vzorky byly po extrakci analyzovány jak metodou kalibrační přímky, tak metodou přidavku standardu a referenční hodnoty byly pořízeny metodou ETAAS po úplném mikrovlnném rozkladu vzorku v koncentrované kyselině dusičné. Výsledky jsou uvedeny v tab. 4.8. Pro měření Se(IV) extrahovaného bazicky metodou kalibrační přímky byla zkonstruována kalibrační závislost v roztoku 0,06 mol dm<sup>-3</sup> NaOH a bylo ověřeno, že nedojde k významné změně základních charakteristik oproti deionizované vodě. Porovnáním výsledků pomocí statistického testu bylo zjištěno, že se výsledky získané metodou kalibrační přímky a metodou přidavku standardu statisticky významně neliší. Ze šesti vzorků byl v pěti nalezen obsah Se odpovídající deklarované hodnotě a hodnotě zjištěné pomocí ETAAS, v případě vzorku B byl všemi metodami nalezen vyšší obsah Se než jaký byl výrobcem deklarován.

Tab. 4.8: Stanovení obsahu Se ve vzorcích potravinových doplňků

Vzorek	Metoda přídatku standardu, $\mu\text{g}$	Metoda kalibrační přímky $\mu\text{g}$	Deklarovaný obsah, $\mu\text{g}$	ETAAS, $\mu\text{g}$
A <sup>a</sup>	50,5 ± 3,5	52,4 ± 3,4	50	49 ± 4
B <sup>b</sup>	33,6 ± 5,5	26,1 ± 4,8	14	24 ± 4
C <sup>b</sup>	36,2 ± 2,4	33,5 ± 2,8	30	33 ± 4
D <sup>b</sup>	61,1 ± 8,6	59,3 ± 6,0	55	51 ± 3
E <sup>a</sup>	57,2 ± 1,8	55,2 ± 1,7	55	53 ± 5
F <sup>b</sup>	21,6 ± 4,6	24,3 ± 1,7	25	26 ± 6
SRM 3280 <sup>c</sup>	17,3 ± 0,19	-	17,42 ± 0,45 $\mu\text{g g}^{-1}$ , <sup>d</sup>	-
SRM 3280 <sup>e</sup>	17,5 ± 0,70	-	17,42 ± 0,45 $\mu\text{g g}^{-1}$ , <sup>d</sup>	-

<sup>a</sup> vzorek dle výrobce obsahoval  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  a byl extrahován NaOH o koncentraci 0,3 mol  $\text{dm}^{-3}$ , kalibrační závislost byla změřena v 0,06 mol  $\text{dm}^{-3}$  NaOH

<sup>b</sup> vzorek dle výrobce obsahoval  $\text{Na}_2\text{SeO}_4$  a byl extrahován deionizovanou vodou

<sup>c</sup> vzorek extrahován NaOH o koncentraci 0,3 mol  $\text{dm}^{-3}$

<sup>d</sup> certifikovaná hodnota, vzorek pro analýzu odebrán z 15 rozdrcených tablet

<sup>e</sup> vzorek extrahován deionizovanou vodou

Pro vzorky C a E byla přesnost metody ověřena také spikováním rozdrceného vzorku tablety roztokem standardu příslušné specie. Polovina tablety byla extrahována a analyzována bez přídatku standardu, druhá polovina tablety byla extrahována a analyzována s přídatkem. Obsah odpovídající přídatku by následně vypočten z rozdílu získaných obsahů Se. Ke vzorku C bylo přidáno 33  $\mu\text{g}$  seleničitanu sodného a ke vzorku E 55  $\mu\text{g}$  selenanu sodného. Příslušné výtěžnosti činily 107 ± 14 % (vzorek C) a 104 ± 9 % (vzorek E), čímž se potvrdilo, že rozpuštěné specie Se se nesorbují na matrici vzorku během extrakce. Metoda pro stanovení Se tedy osvědčila.

Součástí aplikace metody pro stanovení Se v reálných vzorcích byla také interferenční studie zkoumající vliv obsažených potenciálních interferentů na přesnost stanovení. Ukázalo se, že velikost interferencí může značně souviset s pH roztoku, protože studie byla měřena pro Se(IV) v 0,06 mol  $\text{dm}^{-3}$  NaOH a pro Se(VI) v deionizované vodě. Výsledky jsou uvedeny v tab. 4.9.

Tab. 4.9: Vliv potenciálních interferentů na stanovení Se v doplňcích stravy metodou FIA-TiO<sub>2</sub>/UV-PVG-QFAAS

	Koncentrace interferentu	Se(IV) <sup>a</sup>	Se(VI) <sup>b</sup>
		Výtěžnost (%)	Výtěžnost (%)
Mn <sup>II</sup>	4 mg dm <sup>-3</sup>	97 ± 1	98 ± 3
Zn <sup>II</sup>	1 mg dm <sup>-3</sup>	77 ± 2	97 ± 2
	10 mg dm <sup>-3</sup>	74 ± 6	95 ± 5
Fe <sup>III</sup>	2 mg dm <sup>-3</sup>	91 ± 3	96 ± 2
	15 mg dm <sup>-3</sup>	85 ± 1	100 ± 4
Cu <sup>II</sup>	500 µg dm <sup>-3</sup>	60 ± 4	93 ± 5
	1 mg dm <sup>-3</sup>	49 ± 5	99 ± 6
Cr <sup>III</sup>	100 µg dm <sup>-3</sup>	93 ± 5	103 ± 5
Mo <sup>VI</sup>	50 µg dm <sup>-3</sup>	100 ± 2	109 ± 5
I <sup>-</sup>	150 µg dm <sup>-3</sup>	105 ± 4	105 ± 6
Mg <sup>II</sup>	100 mg dm <sup>-3</sup>	139 ± 9	112 ± 10
Ca <sup>II</sup>	100 mg dm <sup>-3</sup>	103 ± 2	110 ± 3
	200 mg dm <sup>-3</sup>	113 ± 15	115 ± 19
Sb <sup>III</sup>	100 µg dm <sup>-3</sup>	96 ± 6	95 ± 5
	5 mg dm <sup>-3</sup>	86 ± 10	64 ± 8
As <sup>III</sup>	100 µg dm <sup>-3</sup>	94 ± 3	94 ± 2
	5 mg dm <sup>-3</sup>	107 ± 2	78 ± 4
Te <sup>IV</sup>	500 µg dm <sup>-3</sup>	100 ± 2	140 ± 1
	5 mg dm <sup>-3</sup>	98 ± 1	141 ± 1
Ni <sup>II</sup>	5 mg dm <sup>-3</sup>	75 ± 1	101 ± 3
	10 mg dm <sup>-3</sup>	72 ± 1	97 ± 1

<sup>a</sup> měřeno v NaOH o koncentraci 0,06 mol dm<sup>-3</sup>

<sup>b</sup> měřeno v deionizované vodě

Ukázalo se, že přechodné kovy měly významnější vliv na stanovení Se(IV) v bazickém prostředí než na stanovení Se(VI) v neutrálním pH. Nikl a další hydridotvorné prvky by v potravinových doplňcích neměly být obsaženy, jejich vliv byl zkoumán za účelem vyhodnocení vlivu atomizačních a transportních interferencí.

Ukázalo se, že s výjimkou Te byl vliv ostatních hydridotvorných prvků zanedbatelný. Přítomnost  $500 \mu\text{g dm}^{-3}$  Te(IV) ve vzorku vedla k výtěžnosti 140 % Se(VI), tedy na rozdíl od očekávané kompetice prvků při generování, separaci fází a následně při atomizaci došlo pravděpodobně k nějakému stabilizačnímu efektu alespoň při jednom z těchto kroků. Vysoký obsah hořečnatých a vápenatých iontů způsoboval nárůst směrodatných odchylek měření v obou matricích. Ze srovnání tohoto pozorování s výsledky uvedenými v tab. 4.7 vyplývá, že vliv pH a vysoké mineralizace na UV-fotochemické generování by si zasloužil další výzkum, který je ovšem nad rámec této disertační práce.

#### 4.4. Speciační analýza kombinovanou metodou HPLC-UV/TiO<sub>2</sub>-AFS

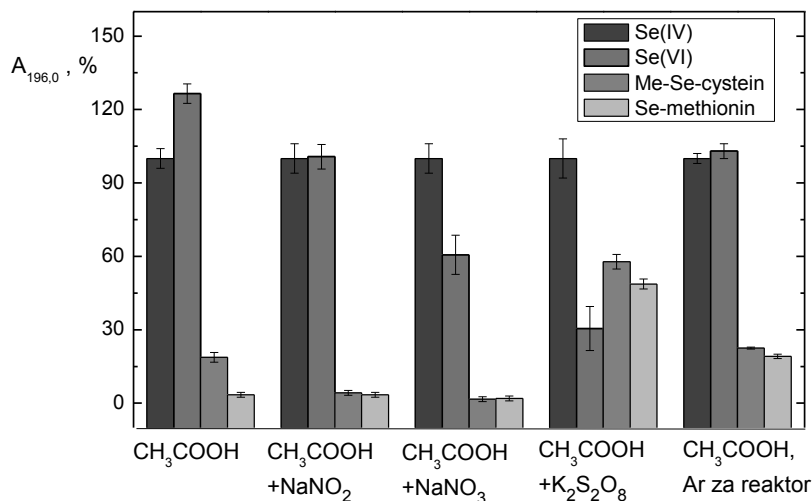
##### 4.4.1. Modifikace podmínek UV-fotochemického generování těkavých sloučenin pro stanovení organických specií

Cílem úkolu bylo nalézt vhodné podmínky pro UV-fotochemické generování těkavé sloučeniny Se z organických specií selenoaminokyselin, které by umožnilo speciační analýzu prostřednictvím spojení HPLC separace a UV-fotochemického generování za účasti fotokatalyzátoru. Pracováno bylo s následujícími organickými speciemi: S-methioninem a methyl-Se-cysteinem. S ohledem na plánované spojení generování těkavých sloučenin s chromatografickou separací byl i nadále zkoumán vliv podmínek v uspořádání FIA, které je HPLC bližší než CFA. Optimalizace složení generačního činidla na citlivost generování těkavé sloučeniny z organických specií a výběr možných mobilních fází byly provedeny na základní aparatuře uvedené v kapitole 3.4.2.1.

V uspořádání použitém při optimalizaci stanovení anorganických forem selenu byly zjištěny výrazně nižší odezvy na organické specie než na anorganické. V kyselině octové byla získána odezva organických specií v poměru vůči Se(IV) 3,4 % (S-methionin) a 18,7 % (methyl-Se-cystein), v mravenčí kyselině byly signály ještě nižší. Za účelem zvýšení účinnosti generování těkavé specie Se byl vyzkoušen přídavek různých látek, které by mohly posloužit jako modifikátory reakce a dále byl vyzkoušen také vliv delší doby ozařování (viz obr. 4.14). Cílem bylo zvýšit účinnost generování těkavé sloučeniny Se z organického skeletu. Přídavek roztoku dusičnanu nebo dusitanu sodného o koncentraci 0,01% k octové kyselině neměl na žádnou specii pozitivní efekt. Tyto soli snižují stabilitu organických specií Se při uchovávání vzorků, proces rozkladu



organické kostry ale zřejmě není dostatečně rychlý. [158] Při přidavku 0,01% roztoku (m/V)  $K_2S_2O_8$  došlo k nárůstu signálu Se-methioninu, ale zároveň ke snížení účinnosti generování anorganických forem, především k více než dvoutřetinovému poklesu účinnosti generování ze Se(VI). Jako druhá varianta, která by neměla vést k potlačení signálu Se(VI), byla vyzkoušena úprava aparatury spočívající v zavádění nosného plynu (Ar) až za reaktor. Výrazné prodloužení doby ozařování UV zářením zvýšilo účinnost generování těkavé sloučeniny z organických forem a ukázalo se být nejvhodnější variantou. Pohybuje-li se těkavá sloučenina pouze průtokovou rychlostí kapalného vzorku, stráví v reaktoru 34 s. Naopak minimální doba pobytu vzorku při zavádění Ar před reaktor daná průtokovou rychlostí nosného plynu by byla pouze 2 s. Zapojení nosného plynu za reaktor tedy prodlouží dobu ozařování vzorku až 17x.



Obr. 4.14.: Vliv potenciálních modifikátorů reakce na UV-fotochemické generování

těkavé sloučeniny z různých specií, relativní odezvy jsou vztaženy k Se(IV)

$c(CH_3COOH) = 0,5 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $Fr(vz) = 3,0 \text{ ml min}^{-1}$ ,  $Fr(Ar) = 55 \text{ ml min}^{-1}$ ,

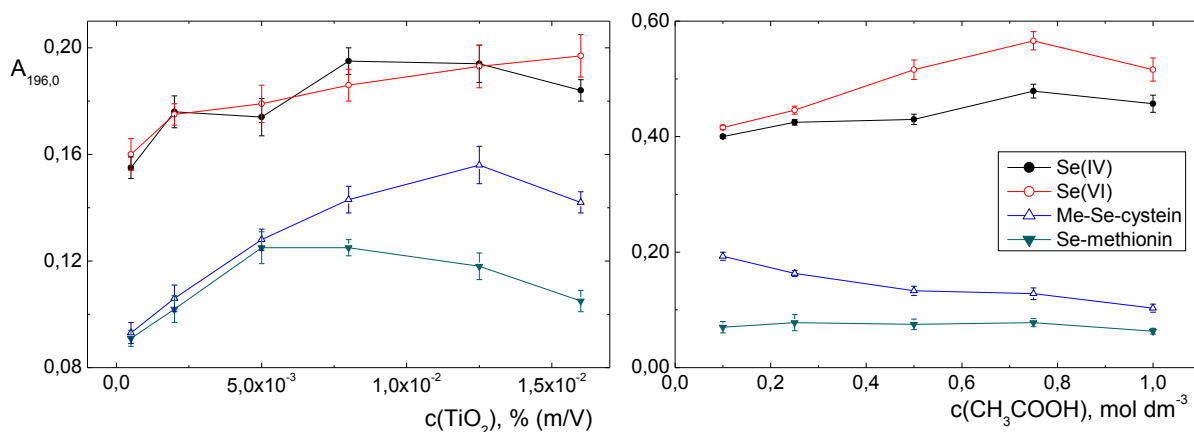
$L_{RC} = 340 \text{ cm}$ ,  $Fr(H_2) = 4,5 \text{ ml min}^{-1}$ ,  $V(vz) = 100 \text{ } \mu\text{l}$ ,  $c(TiO_2) = 0,005\% \text{ (m/V)}$ ,

$c(Se) = 200 \text{ } \mu\text{g dm}^{-3}$

#### 4.4.2. Vliv koncentrace kyseliny octové a suspenze oxidu titaničitého při zapojení nosného plynu za reaktor

Nejprve byl znovu zkoumán vliv koncentrace používané kyseliny octové na generování těkavých sloučenin Se, protože při zapojení Ar za reaktor se významně prodlužuje doba interakce analytu s reakčním médiem. Vliv koncentrace kyseliny na analytický signál byl zkoumán pro anorganické i organické specie a to v rozmezí

0,1–1,0 mol dm<sup>-3</sup>. Ukázalo se, že za použitých podmínek organické specie preferují spíše nižší koncentrace kyseliny octové. Zatímco Se-methionin je vůči koncentraci kyseliny poměrně inertní, v případě methyl-Se-cysteinu docházelo se vzrůstající koncentrací kyseliny k poklesu signálů. Jako kompromisní hodnota byla zvolena koncentrace 0,25 mol dm<sup>-3</sup>. Účelem optimalizace koncentrace oxidu titaničitého bylo zjistit, jak změna místa zavádění nosného plynu a koncentrace kyseliny octové ovlivní optimální hodnotu koncentrace suspenze TiO<sub>2</sub> pro generování těkavé sloučeniny. Výsledek poněkud překvapil, protože optimální byla více než dvojnásobně vyšší koncentrace suspenze než jaká byla používána pro generování těkavých specií z anorganických sloučenin. Reakční médium se tak stalo výrazně méně průhledným pro UV záření, nicméně tento jev může být kompenzován delší dobou pro reakci. Opět bylo možno pozorovat značný rozdíl mezi chováním Se-methioninu a methyl-Se-cysteinu. Ve snaze dosáhnout vyšší účinnosti generování alespoň z jedné organické specie byla zvolena koncentrace suspenze TiO<sub>2</sub> 0,0125 % (m/V), která umožnila zvýšit citlivost stanovení Me-Se-cysteinu. Obě závislosti jsou zobrazeny na obr.4.15. Optimální délka reakční cívky při těchto podmínkách byla 300 cm.



Obr. 4.15: Vliv koncentrace kyseliny octové a suspenze TiO<sub>2</sub> při zavádění Ar za reaktor  $Fr(vz) = 3,0 \text{ ml min}^{-1}$ ,  $L_{RC} = 340 \text{ cm}$ ,  $Fr(Ar) = 55 \text{ ml min}^{-1}$ ,  $Fr(H_2) = 4,5 \text{ ml min}^{-1}$ ,  $V(vz) = 100 \text{ } \mu\text{l}$ ,  $c(iSe) = 200 \text{ } \mu\text{g dm}^{-3}$ ,  $c(orgSe)$ :  $200 \text{ } \mu\text{g dm}^{-3}$  (optimalizace konc. kyseliny octové) respektive  $500 \text{ } \mu\text{g dm}^{-3}$  (optimalizace konc. TiO<sub>2</sub>), legenda se vztahuje k oběma grafům

Vliv ostatních parametrů optimalizace metody UV-fotochemického generování těkavých sloučenin ve spojení s chromatografickou separací a detekcí AFS byl zkoumán

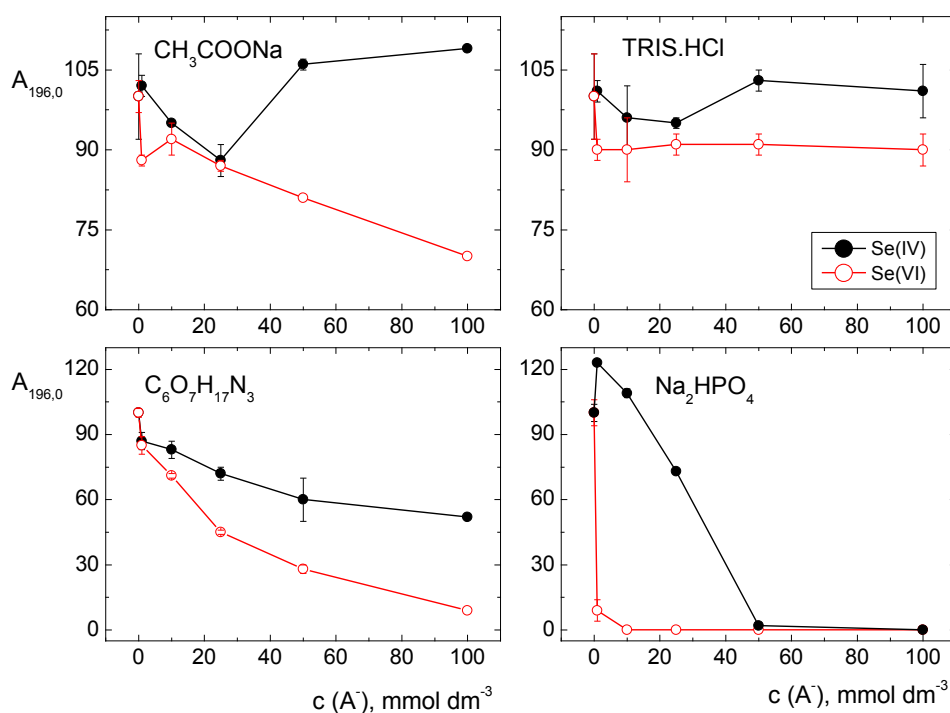
v uspořádání zahrnujícím celou aparaturu zobrazenou v kapitole 3.4.2.3. Vlivy jednotlivých faktorů byly vyzkoušeny nejprve bez použití separační kolony a následně byly optimalizovány podmínky separace. Ve zkratce je možné zmínit, že v uspořádání FIA-AFS bylo pro detekci těkavých sloučenin Se metodou nutné použít vysoké průtoky nosného plynu Ar i pomocného atomizačního plynu H<sub>2</sub> a optimální průtoková rychlost vzorku v reaktoru by měla být výrazně nižší než v případě detekce QFAAS. Mechanismus atomizace je při QFAAS a AFS v miniaturizovaném difúzním plamenovém atomizátoru založen na stejném mechanismu, kterého se účastní vodíkové radikály. [159,92,160,112] Pro optimalizaci separačních podmínek byly zvoleny následující hodnoty průtokových rychlostí plynů: Fr (Ar) = 155 ml min<sup>-1</sup>, Fr (H<sub>2</sub>) = 70 ml min<sup>-1</sup> a rychlost přívodu suspenze TiO<sub>2</sub> do UV-fotochemického reaktoru 0,5 ml min<sup>-1</sup>.

#### 4.4.3. Složení mobilní fáze

Volba stacionární fáze byla jednoznačná, separace seleničitanu, selananu, methyl-Se-cysteinu a Se-methioninu byly provedena na aniontově výměnné koloně, kde interakce probíhá mezi nabitými skupinami. Disociační konstanty separovaných specií jsou následující: seleničitanový anion vykazuje dvě disociační konstanty a to pK<sub>a1</sub> = 2,5 a pK<sub>a2</sub> = 7,3. Selenanový anion se chová jako silná kyselina a je plně disociován při pK<sub>a2</sub> = 2,0. Hodnoty disociačních konstant pro methyl-Se-cystein v literatuře nebyly nalezeny, ale je pravděpodobné, že budou blízké hodnotám disociačních konstant Se-cysteinu, které jsou: pK<sub>a1</sub> = 2,4 a pK<sub>a2</sub> = 8,9. Se-methionin vykazuje také dva disociační stupně a to při pK<sub>a1</sub> = 2,3 a pK<sub>a2</sub> = 9,2. [155,131] Je nutné poznamenat, že hodnoty pK<sub>a</sub> publikované v literatuře se vzájemně liší až o půl jednotky pH.

Podmínkou pro úspěšné spojení HPLC a AFS s derivatizací analytů na těkavé sloučeniny prostřednictvím UV-PVG je kompatibilita mobilní fáze případně použitého pH s UV-PVG generováním. Nejčastěji používanými mobilními fázemi pro separaci různých organických a anorganických specií Se v iontově výměnné chromatografii jsou octan amonný (v případě potřeby těkavého pufru pro spojení s hmotnostní spektrometrií), citrátový a fosfátový pufr. Další informace jsou shrnuty v tabulce 2.1 v kapitole 2.3.2. Z těchto pufrů je s UV-fotochemickým generováním bezvýhradně kompatibilní pouze octanový pufr. Uhličitanový pufr byl v této práci zamítnut z důvodu

zachování delší doby ozařování vzorku v reaktoru; reakce uhličitanového aniontu s kyselinou octovou před vstupem do reaktoru by generovala oxid uhličitý, který by mohl transportovat těkavé sloučeniny podobně jako nosný plyn a vést tedy ke ztrátě citlivosti organických specií. Citrátový a fosfátový pufr by nebyly vhodné, protože bylo zjištěno, že způsobují pokles analytického signálu Se(VI), viz obr. 4.16. Pokles účinnosti generování v přítomnosti fosfátového aniontu byl pozorován i Sun et al, kteří ho přičetli pevné interakci aniontů fosfátu s oxidem titaničitým. [87] Naopak nebyly zaznamenány významné změny signálů v případě přítomnosti octanu sodného a TRIS·HCl, které tak byly vyhodnoceny jako vhodné mobilní fáze.



Obr. 4.16: Vliv vybraných potenciálních pufrů na účinnost generování těkavých sloučenin, závislosti měřeny v uspořádání FIA-AAS, mobilní fáze přítomna v nosném toku

$c(\text{CH}_3\text{COOH}) = 0,75 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $Fr(\text{vz}) = 1,0 \text{ ml min}^{-1}$ ,  $L_{\text{RC}} = 340 \text{ cm}$ ,  $Fr(\text{H}_2) = 4,5 \text{ ml min}^{-1}$ ,  $V(\text{vz}) = 100 \text{ } \mu\text{l}$ ,  $c(\text{TiO}_2) = 0,025\% \text{ (m/V)}$ ,  $c(\text{Se}) = 200 \text{ } \mu\text{g dm}^{-3}$ , C<sub>6</sub>O<sub>7</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub> – citrát amonný

Optimalizace separace specií na chromatografické koloně a detekce vzniklých těkavých specií AFS byla dále prováděna v aparatuře popsané v kapitole 3.4.2.3. V  $50 \text{ mmol dm}^{-3}$  octanovém pufru o  $\text{pH} = 5,5$  v isokratickém uspořádání bylo možno

dostatečně rozseparovat pouze seleničitan a Se-methionin. Me-Se-cystein nebyl zadržován a eluoval v mrtvém čase, naopak selenan pravděpodobně zůstával v této mobilní fázi zadržen na koloně.

Na základě reference [132] byl vyzkoušen i méně tradiční postup využívající pouze p-hydroxybenzoovou kyselinu (p-HBA). Dle zmíněné práce disociuje tato kyselina do dvou stupňů při  $pK_{a1} = 4,58$  a  $pK_{a2} = 9,23$ , tudíž u ní lze očekávat pufrální schopnosti v oblasti pH vyšších disociačních stupňů organických specií Se. Nevýhodou je, že tato kyselina je jen omezeně rozpustná ve vodě, za asistence ultrazvuku se podařilo připravit pouze  $10 \text{ mmol dm}^{-3}$  roztok p-HBA. V případě použití isokratické separace v  $10 \text{ mmol dm}^{-3}$  p-HBA,  $\text{pH} = 8,5$  byly separovány pouze Se-methionin, seleničitanový a selenanový anion. V souladu s uvedeným článkem [132] byl vyzkoušen i gradient využívající vyššího pH na začátku separace a vymytí silněji zadržovaných specií poklesem pH. Konkrétně byl aplikován lineární gradient od hodnoty  $\text{pH} = 8,6$  do hodnoty  $\text{pH} = 7,1$ , ale ani tento postup nevedl během 50 min k separaci a vymytí většího počtu specií pravděpodobně v důsledku příliš nízké iontové síly mobilní fáze.

Nejvhodnějším adeptem na mobilní fázi byl pufr obsahující TRIS.HCl ( $pK_a = 8,3$ ) [161] Bylo zjištěno, že v  $50 \text{ mmol dm}^{-3}$  TRIS o pufru  $\text{pH} = 9,0$  bylo možné isokraticky dosáhnout úspěšné separace všech zkoumaných specií během 40 minut. Následná optimalizace separační metody již probíhala v TRIS pufru.

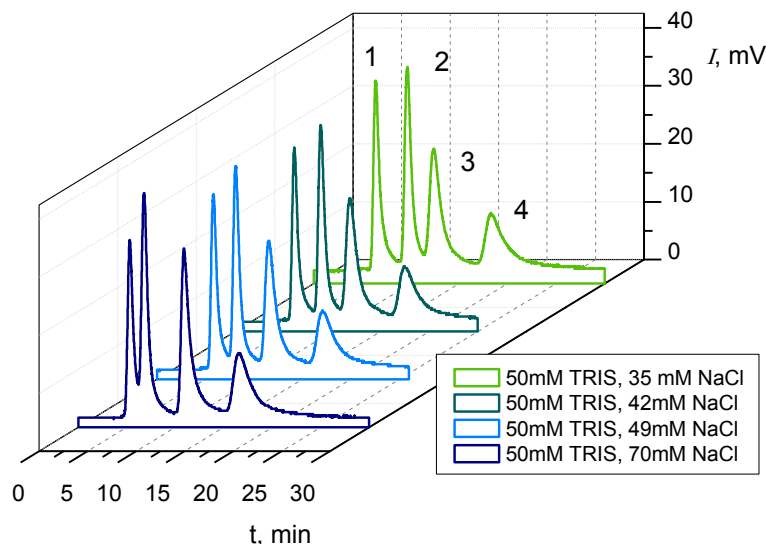
#### 4.4.4. Optimalizace separační metody

##### 4.4.4.1. Vliv iontové síly mobilní fáze

Při použití koncentrace TRIS pufru  $50 \text{ mmol dm}^{-3}$  bylo pro separaci čtyř specií zapotřebí analýzy dlouhé 38 min, ve  $100 \text{ mmol dm}^{-3}$  pufru došlo k separaci do 25 min, ale píky byly významně asymetrické v sestupné fázi (tzv. chvostující). Tento jev byl následně omezen použitím mobilních fází, které kromě pufru o koncentraci  $50 \text{ mmol dm}^{-3}$  obsahovaly také různé koncentrace NaCl.

Získané závislosti jsou uvedeny na obr. 4.17 a je z nich zřejmé, že s rostoucí koncentrací NaCl sice mírně klesá výška píku Se(IV), ale zároveň dochází k patrnému nárůstu signálů organických specií a lepší separaci Se(VI) a methyl-Se-cysteinu. Pro všechny specie také platí, že s rostoucí koncentrací NaCl v mobilní fázi klesá jejich retenční na koloně až při koncentraci  $70 \text{ mmol dm}^{-3}$  NaCl dojde ke ztrátě rozlišení

Se(IV) a Se(VI). Obr. 4.17 zobrazuje posun retenčních časů a změnu rozlišení píků při nárůstu koncentrace NaCl z 35 mmol dm<sup>-3</sup> na 70 mmol dm<sup>-3</sup>. Jako optimální byla zvolena mobilní fáze obsahující 50mmol dm<sup>-3</sup> TRIS o pH = 9,0 a 50 mmol dm<sup>-3</sup> NaCl, výsledky získané v této mobilní fázi shrnuje tab. 4.10.



Obr. 4.17: Vliv iontové síly mobilní fáze na separaci specií Se, v pořadí dle retenčního času píky představují Se(IV), Se(VI), Me-Se-cystein a Se-methionin

Podmínky separace: kolona Hamilton PRP-X100, pH = 9,0,  $Fr$  (HPLC) = 0,34 ml min<sup>-1</sup>,  $V(vz)$  = 30  $\mu$ l

Podmínky generování:  $c(\text{CH}_3\text{COOH}) = 0,75 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $c(\text{TiO}_2) = 0,025 \%$  (m/V),  $Fr(\text{TiO}_2) = 0,5 \text{ ml min}^{-1}$ ,  $L_{RC} = 340 \text{ cm}$ ,  $Fr(\text{Ar}) = 155 \text{ ml min}^{-1}$ ,  $Fr(\text{H}_2) = 70 \text{ ml min}^{-1}$

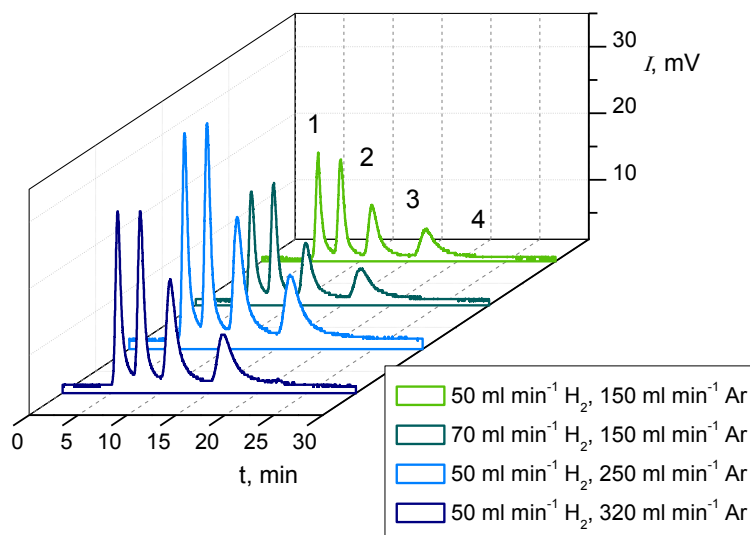
Tab. 4.10: Parametry separace v mobilní fázi obsahující 50 mmol dm<sup>-3</sup> TRIS pufr o pH = 9,0 a 50 mmol dm<sup>-3</sup> NaCl

Specie	$t_R$ , min	A (mV min)	$w_{1/2}$ , min <sup>d</sup>	$R_{1,2}$
seleničitan	5,83	20,89	0,608	2,13
selenan	8,13	25,13	0,665	2,29
Me-Se-cystein	11,5	23,60	1,067	2,49
Se-methionin	17,1	13,08	1,590	-

<sup>d</sup> Výpočet je založen na použití šířky píku v polovině výšky a aproximaci píku Gaussovským píkem tzn., nezohledňuje asymetrii píku v sestupné části, která je způsobena mrtvým objemem za kolonou a podílí se na ní pravděpodobně i kinetika desorpce těžkých sloučenin Se z povrchu TiO<sub>2</sub>.

#### 4.4.4.2. Vliv průtokových rychlostí nosného a atomizačního plynu

Za účelem zajištění dostatečné citlivosti detekce byly ověřeny optimální průtokové rychlosti nosného (Ar) a atomizačního plynu (H<sub>2</sub>). Tato optimalizace by neměla ovlivňovat rozlišení píků pouze citlivost detekce, což bylo potvrzeno. Na obr. 4.18 je zobrazena závislost při čtyřech vybraných různých kombinacích průtokových rychlostí nosného a atomizačního plynu. Ze závislosti je zřetelná tendence nárůstu citlivosti s rostoucí průtokovou rychlostí nosného plynu ze 150 ml min<sup>-1</sup> na 250 ml min<sup>-1</sup>, ale vyšší průtoková rychlost vodíku přidávaného až k plynné fázi neměla významný efekt. Ke ztrátám těkavé sloučeniny tak pravděpodobně docházelo především při transportu do separátoru fází. Zároveň bylo zjištěno, že i při průtokové rychlosti nosného plynu 250 ml min<sup>-1</sup> byla optimální průtoková rychlost vodíku 70 ml min<sup>-1</sup> (chromatogram není mezi ilustračními závislostmi uveden).



Obr. 4.18: Vliv průtokových rychlostí nosného a atomizačního plynu na citlivost detekce v kombinované metodě HPLC-TiO<sub>2</sub>/UV-AFS, 1 – Se(IV), 2 – Se(VI), 3 – methyl-Se-cystein, 4 – Se-methionin

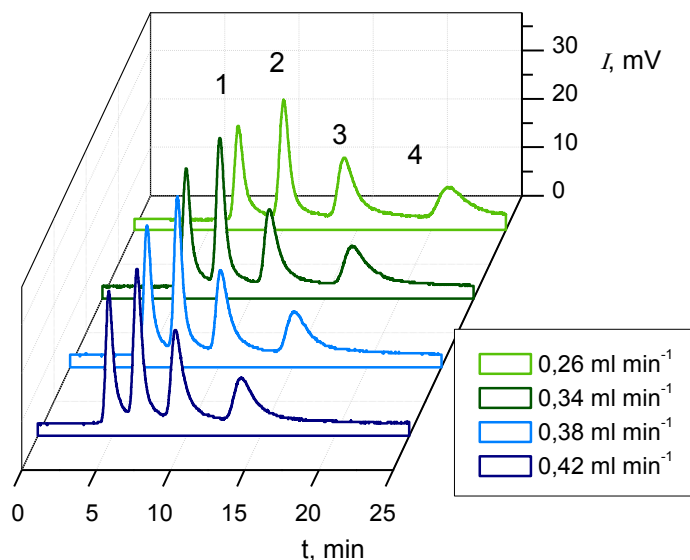
Podmínky separace: kolona Hamilton PRP-X100, 50 mmol dm<sup>-3</sup> TRIS pufr, 50 mmol dm<sup>-3</sup> NaCl, pH = 9,0, *Fr* (HPLC) = 0,34 ml min<sup>-1</sup>, *V*(vz) = 30 μl

Podmínky generování: *c*(CH<sub>3</sub>COOH) = 0,75 mol dm<sup>-3</sup>, *c*(TiO<sub>2</sub>) = 0,025 % (m/V), *Fr* (TiO<sub>2</sub>) = 0,5 ml min<sup>-1</sup>, *L*<sub>RC</sub> = 340 cm

#### 4.4.4.3. Vliv průtokové rychlosti MF separační kolonou

Průtoková rychlost mobilní fáze má částečný vliv na separaci jednotlivých analytů. V případě vyvíjené metody se pravděpodobně mnohem více projeví ve fázi

generování těkavé sloučeniny než ve fázi separace specií Se. Vliv průtokové rychlosti mobilní fáze na účinnost separace a na analytický signál byl zkoumán v rozmezí 0,26 - 0,42 ml min<sup>-1</sup> za účelem nalezení optimálního poměru doby analýzy a separace. Ze získaných výsledků zobrazených na obr. 4.19 vyplynulo, že nejvhodnější by mohla být průtoková rychlost 0,38 ml min<sup>-1</sup>, ale kvůli významnému chvostování píků byla zvolena průtoková rychlost 0,34 ml min<sup>-1</sup>. Parametry separace jsou uvedeny v tab. 4.11.



Obr. 4.19: Vliv průtokové rychlosti mobilní fáze, 1 – Se(IV), 2 – Se(VI), 3 – methyl-Se-cystein, 4 – Se-methionin

Podmínky separace: kolona Hamilton PRP-X100, 50 mmol dm<sup>-3</sup> TRIS pufr, 50 mmol dm<sup>-3</sup> NaCl, pH = 9,0,  $V(vz) = 30 \mu\text{l}$

Podmínky generování:  $c(\text{CH}_3\text{COOH}) = 0,75 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $c(\text{TiO}_2) = 0,025 \text{ \% (m/V)}$ ,  $Fr(\text{TiO}_2) = 0,5 \text{ ml min}^{-1}$ ,  $L_{RC} = 340 \text{ cm}$ ,  $Fr(\text{Ar}) = 250 \text{ ml min}^{-1}$ ,  $Fr(\text{H}_2) = 70 \text{ ml min}^{-1}$

Tab. 4.11: Parametry separace specií při průtokové rychlosti mobilní fáze 0,34 ml min<sup>-1</sup>

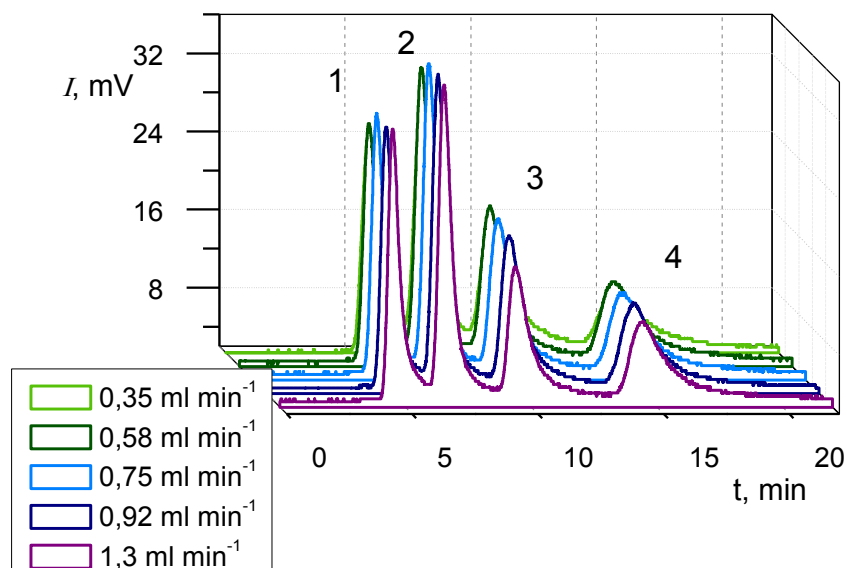
Specie	$t_R$ , min	A (mV min)	$w_{1/2}$ , min	$R_{1,2}$
seleničitan	5,67	16,05	0,580	2,20
selenan	7,89	19,66	0,612	2,58
Me-Se-cystein	11,2	15,04	0,914	2,77
Se-methionin	16,8	11,16	1,459	-

#### 4.4.4.4. Vliv průtokové rychlosti derivatizačních činidel

Při optimální průtokové rychlosti mobilní fáze 0,34 ml min<sup>-1</sup> byla optimalizována i rychlost toku činidel zajišťujících generování těkavé sloučeniny.



Suspenze  $\text{TiO}_2$  v kyselině octové byla přidávána do UV-fotochemického reaktoru různými průtokovými rychlostmi v rozmezí  $0,35 - 1,3 \text{ ml min}^{-1}$ ; celková průtoková rychlost reaktorem tedy byla zkoumána v rozmezí  $0,69 - 1,64 \text{ ml min}^{-1}$ . S narůstající průtokovou rychlostí derivatizačního činidla je omezena disperze vzorku za kolonou čímž dochází k menšímu rozmytí píku a zachování lepší separace. Graf na obr. 4.20 je orientován tak, aby bylo zřejmé, že s rostoucí průtokovou rychlostí derivatizačního činidla klesá rozmytí píku. Nejlepších parametrů bylo dosaženo při použití průtokové rychlosti  $0,9 \text{ ml min}^{-1}$ , její další navýšení by sice dále zlepšilo separaci methyl-Se-cysteinu a Se-methioninu, ale také by mírně snížilo citlivost stanovené organických specií Se. Parametry separace při průtokové rychlosti derivatizačního činidla  $0,9 \text{ ml min}^{-1}$  jsou uvedeny v tab. 4.12.



Obr. 4.20: Vliv průtokové rychlosti derivatizačních činidel, 1 – Se(IV), 2 – Se(VI), 3 – methyl-Se-cystein, 4 – Se-methionin

Podmínky separace: kolona Hamilton PRP-X100,  $50 \text{ mmol dm}^{-3}$  TRIS pufr,  $50 \text{ mmol dm}^{-3}$  NaCl,  $\text{pH} = 9,0$ ,  $Fr(\text{HPLC}) = 0,34 \text{ ml min}^{-1}$ ,  $V(\text{vz}) = 30 \mu\text{l}$

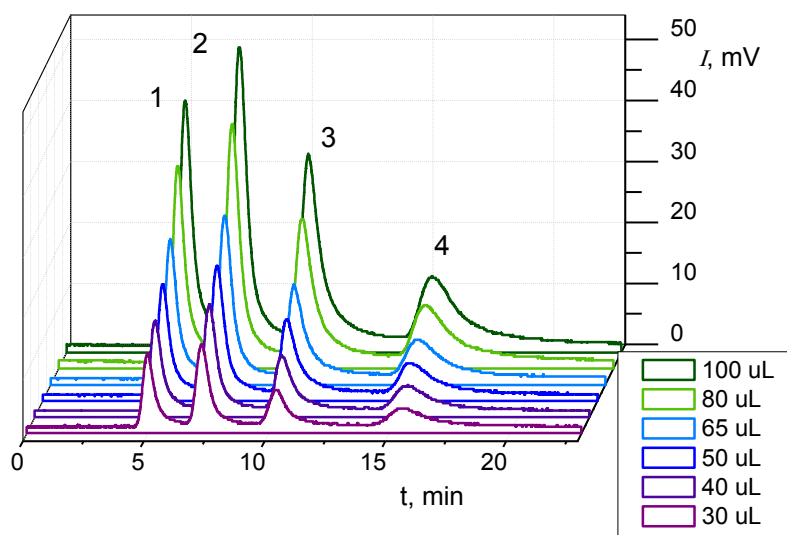
Podmínky generování:  $c(\text{CH}_3\text{COOH}) = 0,75 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $c(\text{TiO}_2) = 0,025 \%$  (m/V),  $L_{\text{RC}} = 340 \text{ cm}$ ,  $Fr(\text{Ar}) = 250 \text{ ml min}^{-1}$ ,  $Fr(\text{H}_2) = 70 \text{ ml min}^{-1}$

Tab.4.12: Parametry separace při průtokové rychlosti derivatizačního činidla  $0,92 \text{ ml min}^{-1}$

Specie	$t_R$ , min	A (mV min)	$w_{1/2}$ , min	$R_{1,2}$
seleničitan	4,78	14,94	0,477	2,40
selenan	6,54	17,13	0,528	2,58
Me-Se-cystein	9,31	9,30	0,742	2,99
Se-methionin	14,4	8,68	1,263	

#### 4.4.4.5. Vliv dávkovaného objemu

Je udáváno, že objem vzorku dávkovaného na kolonu by měl představovat maximálně 1 – 5 % celkového objemu kolony, aby nedošlo k jejímu objemovému přetížení. [161] V případě kolony použité v této práci by tedy maximální doporučený dávkovaný objem vzorku měl být 45  $\mu\text{l}$ . Dávkovaný objem byl zvolen tak, aby bylo dosaženo co nejvyšší citlivosti měření, aniž by došlo k posunu maxima píku a zvýraznění tailingu, které by představovaly projevy zmíněného objemového přetížení kolony. Závislost výšky signálů je uvedena na obr. 4.21 a údaje o retenčních časech, plochách, pološířkách a rozlišení píků jsou uvedeny v tab. 4.13.



Obr. 4.21: Vliv dávkovaného objemu vzorku, 1 – Se(IV), 2 – Se(VI), 3 – methyl-Se-cystein, 4 – Se-methionin

Podmínky separace: kolona Hamilton PRP-X100,  $50 \text{ mmol dm}^{-3}$  TRIS pufr,  $50 \text{ mmol dm}^{-3}$  NaCl, pH = 9,0,  $Fr$  (HPLC) =  $0,34 \text{ ml min}^{-1}$

Podmínky generování:  $c(\text{CH}_3\text{COOH}) = 0,75 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $c(\text{TiO}_2) = 0,025 \%$  (m/V),

$Fr$  ( $\text{TiO}_2$ ) =  $0,9 \text{ ml min}^{-1}$ ,  $L_{RC} = 340 \text{ cm}$ ,  $Fr$  (Ar) =  $250 \text{ ml min}^{-1}$ ,  $Fr$  ( $\text{H}_2$ ) =  $70 \text{ ml min}^{-1}$

Jako optimální byl zvolen dávkovaný objem 50  $\mu\text{l}$ , jednak na základě výše uvedeného doporučení a také proto, že při dávkování objemu 65  $\mu\text{l}$  již bylo možno pozorovat zvýšení základní linie mezi píky methyl-Se-cysteinu a Se-methioninu. Zvolená hodnota je tedy kompromisem mezi citlivostí a rizikem objemového přetížení kolony.

Tab. 4.13: Parametry separace pro dávkovaný objem 50  $\mu\text{l}$

Specie	$t_R$ , min	A (mV min)	$w_{1/2}$ , min	$R_{1,2}$
seleničitan	4,95	11,42	0,513	2,43
selenan	7,20	14,83	0,586	2,69
Me-Se-cystein	10,1	10,06	0,687	2,89
Se-methionin	15,1	6,30	1,331	-

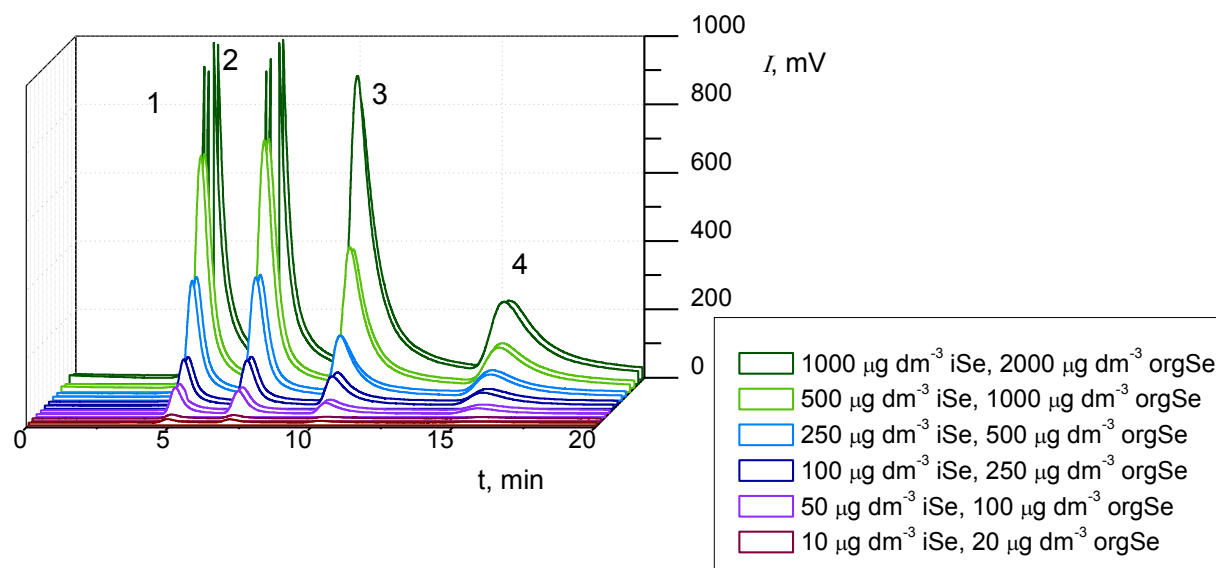
#### 4.4.5. Základní charakteristiky stanovení

Za optimálních podmínek shrnutých v tab. 4.14 byly změřeny základní charakteristiky stanovení vybraných specií Se kombinovanou metodou HPLC-TiO<sub>2</sub>/UV-PVG-AFS. Základní charakteristiky jsou uvedeny v tab. 4.15, chromatogramy použité pro konstrukci kalibrační závislosti jsou zobrazeny na obr. 4.22.

Tab. 4.14: Podmínky stanovení základních charakteristik vybraných specií Se kombinovanou metodou HPLC-TiO<sub>2</sub>/UV-PVG-AFS

Parametr	
stacionární fáze	silný měnič aniontů, kvartérní amoniová sůl
rozměry kolony, mm	250 x 2,1
Velikost částic, $\mu\text{m}$	5
mobilní fáze	50 mmol dm <sup>-3</sup> TRIS pufr, pH = 9,0 , 50 mmol dm <sup>-3</sup> NaCl,
$Fr$ (mobilní fáze), ml min <sup>-1</sup>	0,34
$V$ (vz), $\mu\text{l}$	50
koncentrace kyseliny octové, mol dm <sup>-3</sup>	0,75
koncentrace TiO <sub>2</sub> , % (m/V)	0,025
$Fr$ (TiO <sub>2</sub> , CH <sub>3</sub> COOH), ml min <sup>-1</sup>	0,90

Parametr	
délka reakční cívky, cm	340
objem reaktoru, ml	1,7
$Fr$ (Ar), ml min <sup>-1</sup>	250
$Fr$ (H <sub>2</sub> ), ml min <sup>-1</sup>	70



Obr. 4.22: Kalibrační závislost pro kombinovanou metodu HPLC-TiO<sub>2</sub>/UV-PVG-AFS, 1 – Se(IV), 2 – Se(VI), 3 – methyl-Se-cystein, 4 – Se-methionin, podmínky viz tab. 4.14

S rostoucí koncentrací Se se zhoršovalo chvostování píků způsobené mrtvým objemem za kolonou, které je způsobeno použitou derivatizační metodou. V porovnání s UV-fotochemickým generováním těkavé sloučeniny Se bylo dosaženo limitů detekce z anorganických specií téměř na úrovni kontinuálního generování s QFAAS detekcí. Ztráta citlivosti způsobená zařazením chromatografické separace byla vyrovnána použitím citlivější metody detekce.

Chromatografické retenční veličiny  $k$  (retenční poměr) a  $\alpha$  (selektivita) nebyly určeny, protože z důvodu použité detekce nebylo možno zjistit mrtvý čas chromatografické metody ( $t_M$ ). Bylo zjištěno, že směsné standardy jsou v mobilní fázi stabilní minimálně po dobu 18 hodin při laboratorní teplotě.

Tab. 4.15: Základní charakteristiky stanovení Se metodou HPLC-UV/TiO<sub>2</sub>-AFS

Specie	Se(IV)	Se(VI)	Me-Se-cystein	Se-methionin
LOD, $\mu\text{g dm}^{-3}$	0,6	0,5	1,1	2,9
Citlivost, mV min $\text{dm}^3 \mu\text{g}^{-1}$	0,843	1,05	0,453	0,163
$t_R$ , min	4,89	7,11	10,2	15,4
n <sup>a</sup>	557	871	965	784
$R_{1,2}$ <sup>a</sup>	2,51	2,45	2,25	-
LDR, $\mu\text{g dm}^{-3}$	2-500	2 - 500	4 - 2000	10 - 2000
R	0,9998	0,9996	0,9987	0,9949

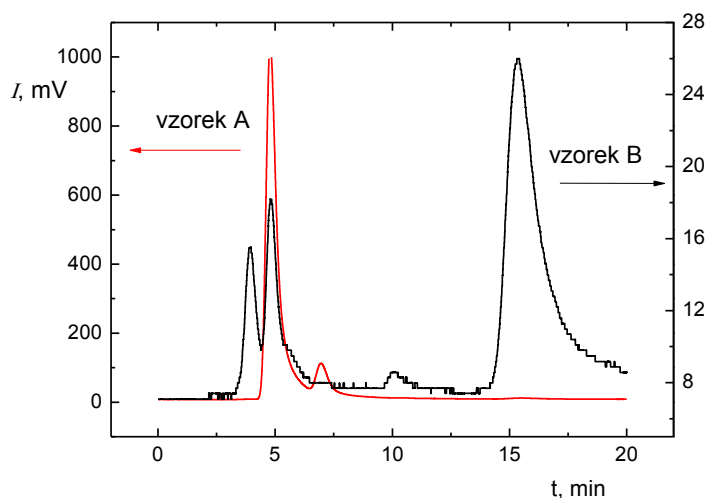
<sup>a</sup> hodnota odpovídající měření v polovině LDR

#### 4.4.6. Kvalitativní analýza vzorku potravinového doplňku metodou HPLC-TiO<sub>2</sub>/UV-PVG-AFS

Vyvinutá separační a detekční metoda byla aplikována pro identifikaci specií Se ve dvou vzorcích doplňků stravy (A, B) obsahujících dle výrobců selenem obohacené kvasnice v dávce 100  $\mu\text{g}$  Se v tabletě, obsažené specie selenu by tedy měly být organického charakteru. Analýza byla provedena pouze jako předběžný experiment zkoumající vliv matrice na separaci specií Se v dané mobilní fázi. Nebyla provedena optimalizace extrakce specií ze vzorku ani nebylo ověřeno zachování speciace při extrakci analýzou referenčního materiálu. Vzorky byly extrahovány mobilní fází za pomoci sonikace po dobu 30 min při 35 °C. Výsledné chromatogramy jsou uvedeny na obr. 4.23.

Ve vzorku A bylo nalezeno stopové množství Se-methioninu a Se(VI) a především vysoký obsah seleničitanového aniontu v porovnání s organickými speciemi. Ve vzorku B bylo nalezeno převažující množství Se-methioninu a stopová množství Se(IV) a methyl-Se-cysteinu, dále byl zaznamenán také pík neznámé speciie předcházející Se(IV). Nejprve byl předpokládán posun retenčních časů Se(IV) a Se(VI), ale tento pík eluuje v čase odpovídajícím odhadovanému mrtvému objemu kolony, na základě literárních údajů by se mohlo jednat o oxidovanou formu Se-methioninu. [132] Do budoucna tedy může být metoda HPLC-TiO<sub>2</sub>/UV-PVG-AFS validována a

aplikována pro stanovení specií Se v praktických vzorcích. Pro příslušný typ vzorku samozřejmě bude muset být optimalizována a validována i extrakční technika a identifikovány případné další specie.



Obr. 4.23: Ilustrativní chromatogramy reálných vzorků doplňků stravy s deklarovaným obsahem organických specií Se

Podmínky separace: kolona Hamilton PRP-X100, 50 mmol dm<sup>-3</sup> TRIS pufr, 50 mmol dm<sup>-3</sup> NaCl, pH = 9,0,  $Fr$  (HPLC) = 0,34 ml min<sup>-1</sup>,  $V$  (vz) = 50  $\mu$ l

Podmínky generování:  $c(\text{CH}_3\text{COOH}) = 0,75$  mol dm<sup>-3</sup>,  $c(\text{TiO}_2) = 0,025$  % (m/V),  $Fr$  (TiO<sub>2</sub>) = 0,9 ml min<sup>-1</sup>,  $L_{RC} = 340$  cm,  $Fr$  (Ar) = 250 ml min<sup>-1</sup>,  $Fr$  (H<sub>2</sub>) = 70 ml min<sup>-1</sup>

#### 4.5. TiO<sub>2</sub> asistované UV-fotochemické generování těkavých sloučenin Te

Těkavá sloučenina Te již byla několikrát UV-fotochemicky generována, nicméně práce nalezené během literární rešerše byly omezeny na stanovení Te(IV). Pouze v jednom případě byla publikována aplikace této metody na reálné vzorky a dosud nebyla publikována předredukce pomocí TiO<sub>2</sub>. Souhrn dosavadních výsledků je uveden v tabulce tab. 4.16, ze které vyplývá, že limity detekce dosažitelné v případě Se AAS jsou pro Te dosahovány s detekcí ICP-MS. Absolutní limity detekce v rozmezí 0,5 – 2 ng Te získané s CVG-AAS uvedené v monografii Dědiny a Tsaleva [1] naznačují, že důvodem může být nízká stabilita hydridu Te v plynné fázi a zároveň vysoká rozpustnost ve vodných roztocích. H<sub>2</sub>Te se samovolně rozkládá na molekulární vodík a Te<sup>0</sup> při teplotách vyšších než je jeho bod varu –2 °C. [162]

Cílem experimentů shrnutých v této disertační práci bylo zjistit, zda je možné provádět UV-fotochemické generování těkavé sloučeniny a on-line redukcí Te(VI) podobně jako u generování těkavé sloučeniny Se. Dále také, zda UV-fotochemické

generování těkavých sloučenin bez použití fotokatalyzátoru vede k produkci odlišné stabilnější těkavé specie. Následující podkapitoly srovnávají výsledky získané při generování Te s i bez využití fotokatalýzy. Generování těkavé sloučeniny bylo prováděno v uspořádání FIA v aparatuře popsané v kapitole 3.4.2.1.

Tab. 4.16: Publikovaná stanovení Te metodami UV-fotochemického generování těkavých sloučenin

Metoda	Matrice, generační médium	Zdroj
ICP-MS, ICP-OES	Propionová kyselina	[53]
AFS	Účinnost generování 20 – 30 %, generační médium: kyselina mravenčí, účinnost stanovená porovnáním s CVG	[60]
ICP-AES	generační médium: kyselina octová, účinnost generování $68 \pm 4$ %, stanovená z nezureagovaného analytu v odpadu	[37]
UV-PVG-ICP-MS, alkoholické nápoje	LOD = $0,4 \mu\text{g dm}^{-3}$ , generační médium: směs kyseliny octové a mravenčí 1:1	[6]

#### 4.5.1. Optimalizace atomizačních podmínek

Při počátečních experimentech s UV-fotochemickým generováním těkavé sloučeniny Te s využitím  $\text{TiO}_2$  byly pozorovány výrazně odlišné odezvy na obě specie, proto byly jako první zkoumány podmínky atomizace, tedy atomizační teplota  $T_{\text{at}}$  v rozmezí  $900 - 960$  °C a průtoková rychlost atomizačního plynu  $Fr$  ( $\text{H}_2$ ) v rozmezí  $4-16 \text{ ml min}^{-1}$ . Charakter získaných závislostí se významně neodlišoval. Protože je nepravděpodobné, že by docházelo ke vzniku dvou různých těkavých specií, byl značný rozdíl v citlivosti přičten rozdílné míře interakce s  $\text{TiO}_2$ . Tato hypotéza je ovšem diskutabilní, protože na základě znalosti disociačních konstant kyseliny teluričité a kyseliny telurové nebyly očekávány natolik odlišné elektrostatické interakce. Obě kyseliny jsou dvojsytné a slabé; kyselina teluričitá má  $\text{pK}_{\text{a}1} = 6,27$  a  $\text{pK}_{\text{a}2} = 8,43$ , kyselina telurová vykazuje  $\text{pK}_{\text{a}1} = 7,68$  a  $\text{pK}_{\text{a}2} = 11,0$ . [162] V kyselém prostředí by se tedy obě specie Te měly nacházet v nedisociované formě, z toho ovšem také vyplývá, že by na rozdíl od analogických specií Se neměly být elektrostaticky přitahovány

k  $\text{TiO}_2$ . Je pravděpodobné, že mechanismus interakce analytu ve vodném roztoku s  $\text{TiO}_2$  ve spolupráci s UV zářením, je komplikovanější, než je ve výše uvedených úvahách předpokládáno.

Byl učiněn závěr, že pro atomizaci těkavé sloučeniny postačují teploty běžně používané pro atomizaci těkavých hydridů, ale v porovnání s atomizací těkavé sloučeniny Se je vyžadován vyšší přísun vodíku (viz. kap. 4.1.7). Zvoleny byly atomizační podmínky  $T_{\text{at}} = 950 \text{ }^\circ\text{C}$  a  $Fr(\text{H}_2) = 11 \text{ ml min}^{-1}$ .

Generování těkavé sloučeniny teluru z teluričitanu sodného bez katalýzy  $\text{TiO}_2$  nebylo možné z roztoku kyseliny octové o koncentraci  $0,5 \text{ mol dm}^{-3}$ , ale bylo nutné použít řádově vyšší koncentraci  $4,0 \text{ mol dm}^{-3}$ . Nelze vyloučit vznik odlišné těkavé sloučeniny, a proto byly ověřeny atomizační podmínky. Získaná závislost vedla k volbě teploty atomizace  $960 \text{ }^\circ\text{C}$  a přívodu vodíku průtokovou rychlostí  $12 \text{ ml min}^{-1}$ .

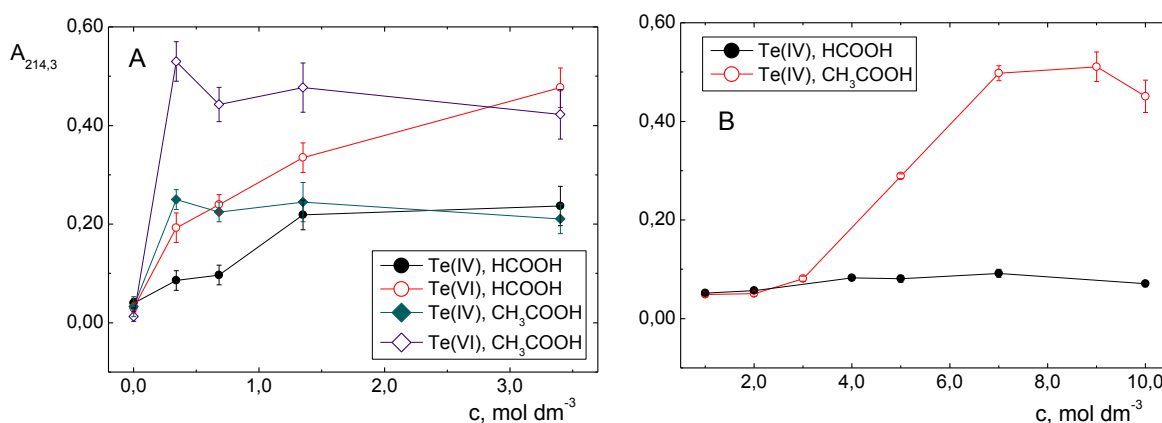
#### 4.5.2. Volba kyseliny a její koncentrace

Dále byly změřeny závislosti na koncentraci kyseliny mravenčí a octové. K měření byla použita v obou experimentech koncentrace teluru  $1,0 \text{ mg dm}^{-3}$ . Bylo zjištěno, že v přítomnosti kyseliny octové a  $\text{TiO}_2$  dochází k pění roztoku na vstupu do separátoru fázi, které sice může zlepšovat separaci plynné fáze, ale také způsobuje vnášení kapiček kapaliny do vstupního ramene atomizátoru. Tento jev byl pozorován i při generování těkavé sloučeniny Se z kyseliny octové, ale při třikrát nižším průtoku nosného plynu nezhoršoval opakovatelnost měření. Zároveň byl pozorován vyšší šum pozadí v přítomnosti kyseliny octové v porovnání s kyselinou mravenčí, který při generování těkavé sloučeniny Se s QFAAS detekcí pozorován nebyl. Šum pozadí byl pozorován v obou variantách fotochemického generování a nebylo možno ho omezit používáním  $\text{D}_2$  korekce. Byl tedy nejspíše způsoben strukturovaným absorpčním pásem některého produktu rozkladu kyseliny octové. Kyselina mravenčí poskytovala užší a méně deformované píky, ale nižší citlivost měření. Ze závislosti na obr. 4.24A je viditelné, že počínaje hodnotou  $0,5 \text{ mol dm}^{-3}$  již velikost signálu na koncentraci kyseliny octové závisí jen minimálně, zatímco s rostoucí koncentrací kyseliny mravenčí absorbance dále narůstá. Tyto efekty mohou souviset jak s rostoucí schopností vyšší koncentrace kyseliny vychytávat kladné náboje generované na povrchu  $\text{TiO}_2$  tak i s klesající schopností  $\text{TiO}_2$  interagovat s rozpuštěnými solemi Te při nízkých pH. Citlivosti srovnatelné s kyselinou octovou je pro generování z  $\text{Te(VI)}$  dosaženo až



při použití kyseliny mravenčí o koncentraci přibližně  $3,0 \text{ mol dm}^{-3}$  pro generování z Te(IV) již při  $1,5 \text{ mol dm}^{-3}$ . Pro další měření byla tedy zvolena  $0,5 \text{ mol dm}^{-3}$  kyselina octová. Závislosti signálu na čase vykazovaly pro Te(IV) a Te(VI) různé průběhy. Signály Te(VI) měly tvar píku, zatímco signály Te(IV) nevykazovaly zřetelné maximum a tvarem odpovídaly spíše plató. Ačkoliv rychlost reakce nebyla náplní prováděných optimalizací, bylo pozorováno, že pík Te(VI) má vždy dřívější nástup než pík Te(IV). Hypotéze, že příčina tkví v kinetice dějů probíhajících mezi speciemi Te a povrchem katalyzátoru ovšem neodpovídá, že tvar a výška píku nejsou pro specie Te různě ovlivněny pH.

V případě UV-fotochemického generování bez fotokatalýzy (obr.4.24B) bylo pozorováno, že generování těkavé sloučeniny probíhá až při koncentraci kyseliny octové vyšší než  $3,0 \text{ mol dm}^{-3}$ . Z kyseliny mravenčí nebylo generování prakticky možné. Pro další měření byla zvolena koncentrace kyseliny octové  $8,0 \text{ mol dm}^{-3}$ , zásadní nevýhodou této volby je vysoká spotřeba kyseliny a agresivní prostředí, které může vést k poškození dávkovacího ventilu. Redukce Te(VI) vlivem UV záření byla možná pouze při využití fotokatalýzy, bez přídavku  $\text{TiO}_2$  nedocházelo ke generování těkavé sloučeniny teluru z Te(VI) z prostředí  $2,0 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $4,0 \text{ mol dm}^{-3}$  ani  $9,0 \text{ mol dm}^{-3}$  kyseliny mravenčí ani octové.



Obr. 4.24.: Vliv použité kyseliny a její koncentrace, A – s  $\text{TiO}_2$ , B – bez  $\text{TiO}_2$

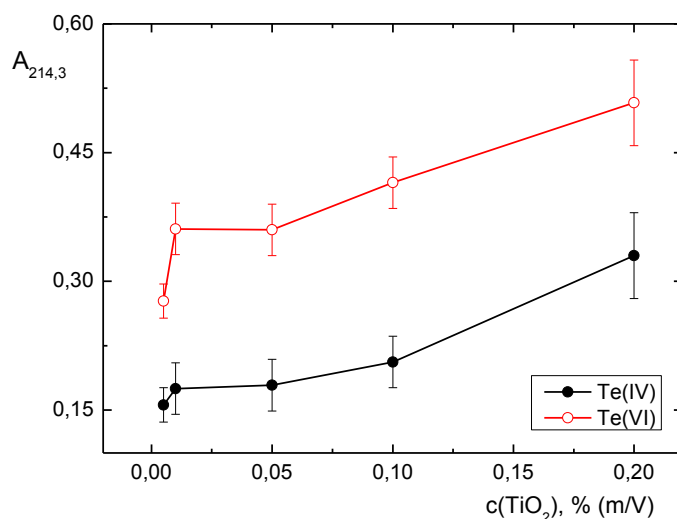
Podmínky A:  $c(\text{TiO}_2) = 0,01 \text{ \% (m/V)}$ ,  $Fr(\text{Ar}) = 150 \text{ ml min}^{-1}$ ,  $Fr(\text{vz}) = 4,5 \text{ ml min}^{-1}$ ,  
 $Fr(\text{H}_2) = 11 \text{ ml min}^{-1}$ ,  $L_{\text{RC}} = 300 \text{ cm}$ ,  $V(\text{vz}) = 500 \text{ }\mu\text{l}$ ,  $c(\text{Te}) = 1 \text{ mg dm}^{-3}$

Podmínky B: Podmínky:  $Fr(\text{vz}) = 2,6 \text{ ml min}^{-1}$ ,  $Fr(\text{Ar}) = 150 \text{ ml min}^{-1}$ ,

$Fr(\text{H}_2) = 12 \text{ ml min}^{-1}$ ,  $L_{\text{RC}} = 200 \text{ cm}$ ,  $V(\text{vz}) = 500 \text{ }\mu\text{l}$ ,  $T_{\text{at}} = 960 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $c(\text{Te}) = 1 \text{ mg dm}^{-3}$

#### 4.5.3. Vliv koncentrace $\text{TiO}_2$

Vliv koncentrace fotochemického katalyzátoru na analytický signál byl zkoumán v rozsahu  $5 \cdot 10^{-3}$  –  $2 \cdot 10^{-1}$  % (m/V) a závislost je zobrazena na obr. 4.25. Nebylo nalezeno maximum závislosti, přestože suspenze v reaktoru je při koncentracích vyšších než 0,1 % jen omezeně propustná pro UV záření. Tento poznatek vede k závěru, že samotná interakce analytu s UV zářením není nezbytná, postačuje interakce záření s  $\text{TiO}_2$ , který následně redukuje analyt předáním záporného náboje. Pro další měření byla zvolena hodnota 0,1 % (m/V), protože používání vyšších koncentrací  $\text{TiO}_2$  by bylo neekonomické. Průběhy závislostí byly opět podobné pro obě specie.



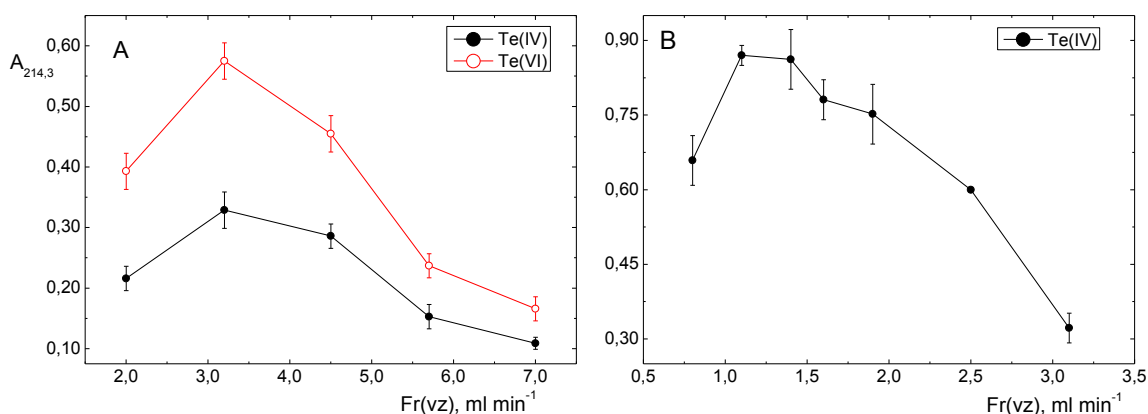
Obr. 4.25.: Vliv koncentrace suspenze  $\text{TiO}_2$

$c(\text{CH}_3\text{COOH}) = 0,5 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $Fr(\text{Ar}) = 150 \text{ ml min}^{-1}$ ,  $Fr(\text{H}_2) = 11 \text{ ml min}^{-1}$ ,  
 $L_{\text{RC}} = 300 \text{ cm}$ ,  $Fr(\text{vz}) = 4,5 \text{ ml min}^{-1}$ ,  $V(\text{vz}) = 500 \mu\text{l}$ ,  $c(\text{Te}) = 1,0 \text{ mg dm}^{-3}$

#### 4.5.4. Vliv průtokové rychlosti vzorku reaktorem

Průtoková rychlost vzorku nemá při zapojení vysokých průtoků nosného plynu před reaktor řídicí vliv na dobu reakce, ale stále významně ovlivňuje disperzi vzorku v kyselině a interakci s přidávanou suspenzí  $\text{TiO}_2$  před vstupem do reaktoru. Vliv průtokové rychlosti vzorku při katalyzovaném generování těkavé sloučeniny byl zkoumán v intervalu  $2,0$  –  $7,0 \text{ ml min}^{-1}$ . Byly pozorovány závislosti podobného průběhu pro Te(IV) i Te(VI). Závislost je zobrazena na obr. 4.26A. Podobný průběh

závislosti byl pozorován při generování bez použití  $\text{TiO}_2$  v  $8,0 \text{ mol dm}^{-3}$  kyselině octové, ovšem vyplývá z něj, že je potřeba dvojnásobný čas pro proběhnutí reakce. Optimální průtoková rychlost vzorku při katalyzovaném generování byla zvolena  $3,2 \text{ ml min}^{-1}$ , při generování bez fotokatalýzy  $1,4 \text{ ml min}^{-1}$ .



Obr. 4.26: Vliv průtokové rychlosti vzorku reaktorem, A – s  $\text{TiO}_2$ , B – bez  $\text{TiO}_2$

Podmínky A:  $c(\text{CH}_3\text{COOH}) = 0,5 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $c(\text{TiO}_2) = 0,01 \%$  (m/V),  $Fr(\text{Ar}) = 150 \text{ ml min}^{-1}$ ,  $Fr(\text{H}_2) = 11 \text{ ml min}^{-1}$ ,  $L_{\text{RC}} = 300 \text{ cm}$ ,  $V(\text{vz}) = 500 \mu\text{l}$ ,  $c(\text{Te}) = 1 \text{ mg dm}^{-3}$

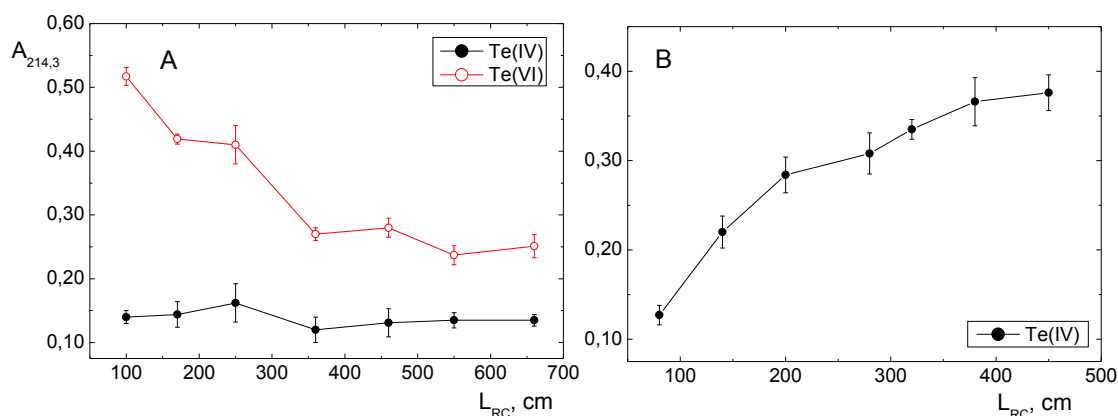
Podmínky B:  $c(\text{CH}_3\text{COOH}) = 8,0 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $Fr(\text{Ar}) = 150 \text{ ml min}^{-1}$ ,  $Fr(\text{H}_2) = 12 \text{ ml min}^{-1}$ ,  $L_{\text{RC}} = 200 \text{ cm}$ ,  $V(\text{vz}) = 500 \mu\text{l}$ ,  $T_{\text{at}} = 960 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $c(\text{Te}) = 1 \text{ mg dm}^{-3}$

#### 4.5.5. Vliv délky reakční cívky

Překvapivé výsledky byly pozorovány při optimalizaci délky reakční cívky (vnitřního objemu reaktoru) při katalyzovaném generování. Při UV-fotochemickém generování Se bylo nutno používat při průtokové rychlosti nosného plynu  $55 \text{ ml min}^{-1}$  reakční cívku o minimální délce  $300 \text{ cm}$ , aby bylo dosaženo maximální účinnosti generování a transportu těkavé sloučeniny. Vzhledem k trojnásobně vyšší průtokové rychlosti nosného plynu při optimalizaci UV generování těkavé sloučeniny Te bylo očekáváno odpovídající prodloužení reakční cívky, aby byl zachován čas potřebný pro reakci. Ovšem ukázalo se, že závislost (viz obr. 4.27A) má odlišné průběhy pro Te(IV) a Te(VI), kdy absorbance Te(IV) je prakticky nezávislá na délce reaktoru a v případě Te(VI) signály s rostoucí délkou reakční cívky klesají. Účinnost generování z Te(IV) je natolik nízká, že v porovnání se směrodatnými odchylkami měření žádné závěry o průběhu závislosti činit nelze. Pozorování učiněné pro Te(VI) odpovídá ztrátám na vnitřních površích reaktoru a je tedy v souladu s hypotézou o nízké stabilitě těkavé

sloučeniny. Pro další měření byla použita reakční cívka o délce 100 cm, která odpovídá vnitřnímu objemu 0,5 ml.

V případě nekatalyzovaného generování těkavé sloučeniny Te byla pozorována rostoucí závislost (obr. 4.27B), ovšem nebyla změřena pro délku reaktoru větší než 450 cm, protože pak již nebylo možné udržet stabilní průtokovou rychlost nosného plynu. Nebylo dosaženo maxima závislosti, nicméně zvolena byla délka reakční cívky 320 cm (vnitřní objem odpovídá 1,6 ml). Rozdíl v charakteru závislostí A a B naznačuje vznik odlišných specií při katalyzovaném a nekatalyzovaném generování. Vyjdeme-li analogicky z mechanismů odvozených pro Se, měl by v případě nekatalyzovaného generování vznikat  $\text{Te}(\text{CH}_3)_2$ ; mechanismus v případě  $\text{TiO}_2/\text{UV-PVG}$  je navržen pouze pro  $\text{HCOOH}$  jako reakční činidlo, nicméně nízká stabilita těkavé sloučeniny Te naznačuje, že by se mohlo opravdu jednat o  $\text{TeH}_2$ . Detailní popis mechanismů a literární zdroje jsou uvedeny v kapitole 2.1.5.3.



Obr. 4.27: Vliv délky reaktoru, A – s  $\text{TiO}_2$ , B – bez  $\text{TiO}_2$

Podmínky A:  $c(\text{CH}_3\text{COOH}) = 0,5 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $c(\text{TiO}_2) = 0,1 \text{ \% (m/V)}$ ,  $Fr(\text{Ar}) = 150 \text{ ml min}^{-1}$ ,  $Fr(\text{H}_2) = 11 \text{ ml min}^{-1}$ ,  $Fr(\text{vz}) = 3,2 \text{ ml min}^{-1}$ ,  $V(\text{vz}) = 500 \text{ }\mu\text{l}$ ,  $c(\text{Te}) = 1 \text{ mg dm}^{-3}$

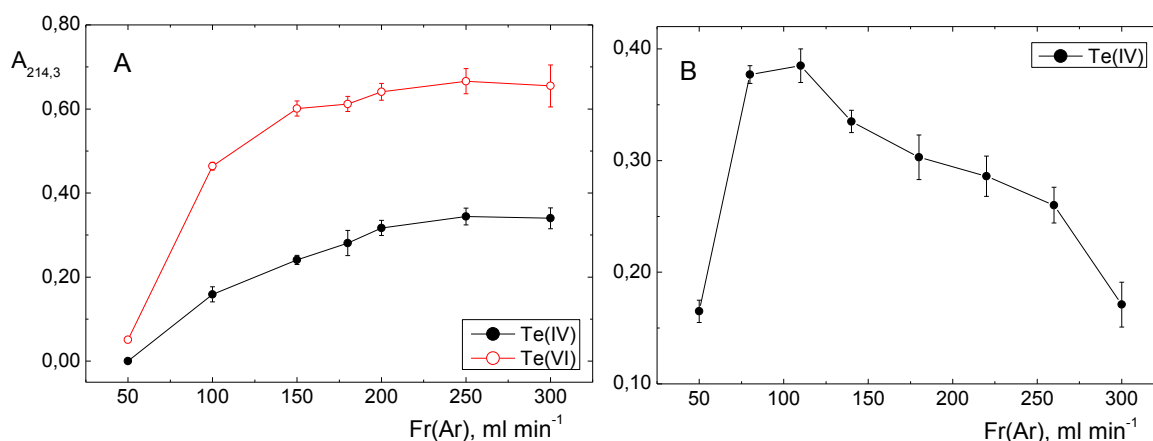
podmínky B:  $c(\text{CH}_3\text{COOH}) = 8,0 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $Fr(\text{Ar}) = 150 \text{ ml min}^{-1}$ ,  $Fr(\text{H}_2) = 12 \text{ ml min}^{-1}$ ,  $Fr(\text{vz}) = 1,4 \text{ ml min}^{-1}$ ,  $V(\text{vz}) = 500 \text{ }\mu\text{l}$ ,  $T_{at} = 960 \text{ }^\circ\text{C}$

#### 4.5.6. Vliv průtokové rychlosti Ar

Průtoková rychlost nosného plynu při jeho zapojení před reaktor ovlivňuje analýzu třemi ději, které mají značně protichůdné charakteristiky. Jednak při vysokých průtocích významně reguluje délku pobytu analytu v UV-fotochemickém reaktoru.

Za druhé strhává a transportuje vznikající těkavou sloučeninu do atomizátoru. Zde platí, že čím vyšší je průtoková rychlost plynu, tím nižší budou ztráty těkavé sloučeniny vlivem jejího rozpouštění v kapalně fázi a vlivem rozkladu na vnitřních površích vedení. Za třetí odnáší těkavou sloučeninu z atomizačního prostředí, čímž při vysokých průtokových rychlostech snižuje citlivost stanovení. Průtoková rychlost nosného plynu byla zkoumána v případě katalyzovaného generování v intervalu 50–300 ml min<sup>-1</sup> tedy do poměrně vysokých průtokových rychlostí. Jak lze vidět z obr. 4.28A, při vysokých průtokových rychlostech již nedocházelo k výraznému zvýšení signálu, naopak vysoké průtokové rychlosti Ar vedly ke zhoršené opakovatelnosti výsledků. Jako optimum byla zvolena průtoková rychlost 200 ml min<sup>-1</sup>. Při nižších průtokových rychlostech docházelo k transportním ztrátám viditelně se projevujícím tvorbou kovového zrcátka na vnitřních površích za UV reaktorem. Pokud nejsou těkavou sloučeninou Te redukované nanočástice tohoto prvku, tak evidentně docházelo k rozkladu těkavé sloučeniny.

Při klasickém UV-fotochemickém generování byly při delší reakční době preferovány nižší průtokové rychlosti Ar (obr. 4.28B). Jako optimum byla zvolena průtoková rychlost argonu 100 ml min<sup>-1</sup>. Jsou možná dvě vysvětlení: těkavá sloučenina může být stabilnější anebo může být kinetika její tvorby nebo uvolňování do plynné fáze výrazně pomalejší. Dle navrhovaného mechanismu vzniku těkavé specií při UV-fotochemickém generování přicházejí v úvahu všechny možnosti.

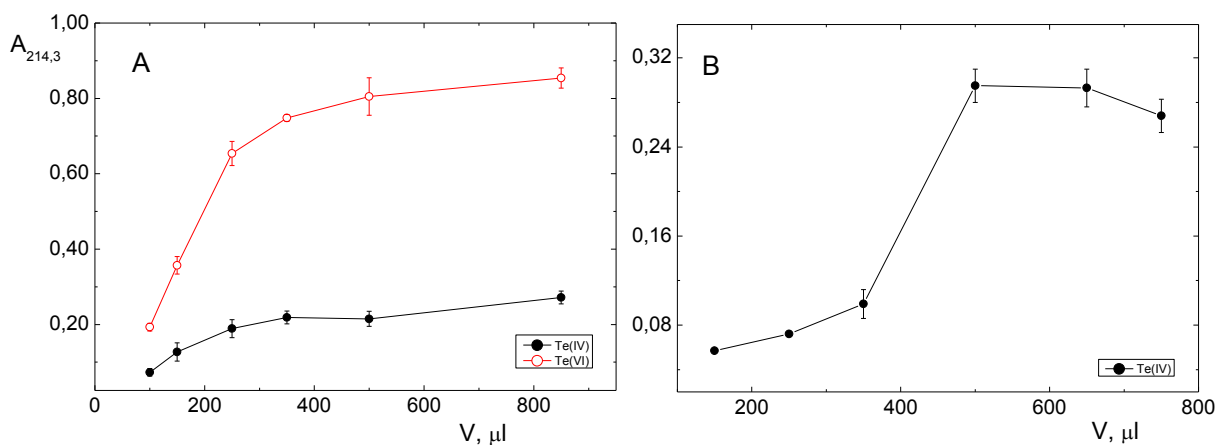


Obr. 4.28: Vliv průtokové rychlosti nosného plynu, A – s TiO<sub>2</sub>, B – bez TiO<sub>2</sub>

Podmínky A:  $c(\text{CH}_3\text{COOH}) = 0,5 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $c(\text{TiO}_2) = 0,1 \text{ \% (m/V)}$ ,  $Fr(\text{H}_2) = 11 \text{ ml min}^{-1}$ ,  $Fr(\text{vz}) = 3,2 \text{ ml min}^{-1}$ ,  $L_{\text{RC}} = 100 \text{ cm}$ ,  $V(\text{vz}) = 500 \text{ }\mu\text{l}$ ,  $c(\text{Te}) = 1 \text{ mg dm}^{-3}$   
 Podmínky B:  $c(\text{CH}_3\text{COOH}) = 8,0 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $Fr(\text{H}_2) = 12 \text{ ml min}^{-1}$ ,  $Fr(\text{vz}) = 1,4 \text{ ml min}^{-1}$ ,  $L_{\text{RC}} = 320 \text{ cm}$ ,  $V(\text{vz}) = 500 \text{ }\mu\text{l}$ ,  $T_{\text{at}} = 960 \text{ }^\circ\text{C}$

#### 4.5.7. Vliv dávkovaného objemu

Na závěr optimalizace byl studován vliv dávkovaného objemu vzorku na tvar a výšku signálu. Dávkovaný objem vzorku musí být volen jako kompromis mezi citlivostí měření a tvarem píku. Při příliš velkých dávkovaných objemech nedochází k dostatečné disperzi vzorku v reakčních činidlech, zatímco při příliš malých objemech je zbytečně zhoršována citlivost metody. Na obr. 4.29A je zřetelně viditelné, že nárůst signálů je přibližně lineární pouze do objemu vzorku 250  $\mu\text{l}$ . Počínaje objemem 500  $\mu\text{l}$  je pro Te(IV) dosaženo signálu odpovídajícího stacionárnímu stavu (steady state) – plató. Vliv dávkovaného objemu při nekatalyzovaném generování byl zkoumán v intervalu 150-750  $\mu\text{l}$ . Až do objemu 350  $\mu\text{l}$  byly pozorovány jen nízké signály a při 500  $\mu\text{l}$  došlo ke skokovému nárůstu citlivosti, nárůst signálů tedy nebyl lineární jako je obvyklé. Tentýž výsledek byl získán i při opakování experimentu. Ani vzhled analytických signálů neodpovídal očekávání – při velkých dávkovaných objemech nedošlo ke vzniku plató pouze k mírnému zploštění maxima vedoucího ke snížení výšky píku v důsledku toho, že v centru zóny analytu nebyly dosaženy podmínky umožňující dostatečně účinné generování těkavé sloučeniny např. dostatečná koncentrace kyseliny octové.



Obr. 4.29: Vliv dávkovaného objemu, A – s  $\text{TiO}_2$ , B – bez  $\text{TiO}_2$

Podmínky A:  $c(\text{CH}_3\text{COOH}) = 0,5 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $c(\text{TiO}_2) = 0,1 \text{ \% (m/V)}$ ,  $Fr(\text{H}_2) = 11 \text{ ml min}^{-1}$ ,  $Fr(\text{vz}) = 3,2 \text{ ml min}^{-1}$ ,  $Fr(\text{Ar}) = 200 \text{ ml min}^{-1}$ ,  $L_{\text{RC}} = 100 \text{ cm}$ ,  $c(\text{Te}) = 1 \text{ mg dm}^{-3}$

Podmínky B:  $c(\text{CH}_3\text{COOH}) = 8,0 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $Fr(\text{Ar}) = 100 \text{ ml min}^{-1}$ ,  $Fr(\text{H}_2) = 12 \text{ ml min}^{-1}$ ,  $F(\text{vz}) = 1,4 \text{ ml min}^{-1}$ ,  $L_{\text{RC}} = 320 \text{ m}$ ,  $T_{\text{at}} = 960 \text{ }^\circ\text{C}$

#### 4.5.8. Základní charakteristiky stanovení Te pomocí katalyzovaného UV-fotochemického generování

Při zvolených optimálních podmínkách (tab. 4.17) byly změřeny základní charakteristiky stanovení Te(IV) a Te(VI) metodou katalyzovaného i nekatalyzovaného UV-fotochemického generování s AAS detekcí. Vzhledem k nalezeným limitům detekce (tab. 4.18) je málo pravděpodobné, že vyvinutá metoda může mít analytické využití bez jejich dalšího vylepšení. Při UV-fotochemickém generování těkavé sloučeniny Te s využitím fotokatalyzátoru byly hlavním zdrojem nízké účinnosti transportní ztráty respektive nestabilita těkavé sloučeniny. V případě nekatalyzovaného UV-fotochemického generování těkavé sloučeniny Te by mohlo být vyšší citlivosti dosaženo použitím UV reaktoru o větším vnitřním objemu, měřením v uspořádání kontinuální průtokové analýzy, nalezením vhodných reakčních modifikátorů nebo by mohlo zvýšení účinnosti generování napomoci vyhřívání aparatury zvyšující těkavost předpokládané specie  $(\text{CH}_3)_2\text{Te}$ . Snížení limitů detekce by bylo možné dosáhnout také spojením s citlivějším detektorem např. AFS nebo ICP-MS. Spojení se záchytem těkavé sloučeniny v grafitové kyvetě není smysluplné kvůli používání vysokých průtokových rychlostí nosného plynu při generování, které by neumožnily účinný záchyt.

Tab. 4.17: Souhrn optimálních podmínek

Parametr	s $\text{TiO}_2$	bez $\text{TiO}_2$
$T_{\text{at}}$ , °C	950	960
koncentrace $\text{CH}_3\text{COOH}$ , $\text{mol dm}^{-3}$	0,5	8,0
koncentrace suspenze $\text{TiO}_2$ , % (m/V)	0,1	-
délka reakční cívky, cm	100	320
objem reaktoru, ml	0,5	1,6
$Fr$ (vz), $\text{ml min}^{-1}$	3,2	1,4
$V$ (vz), $\mu\text{l}$	350	500
$Fr$ (Ar), $\text{ml min}^{-1}$	200	100
$Fr$ ( $\text{H}_2$ ), $\text{ml min}^{-1}$	11	12

Tab. 4.18: Základní charakteristiky stanovení Te UV-fotochemickým generováním jeho těkavé sloučeniny

Parametr	Katalýza TiO <sub>2</sub>		Bez TiO <sub>2</sub>
	Te(IV)	Te(VI)	Te(IV)
LOD, mg dm <sup>-3</sup>	0,03	0,04	0,03
LOQ, mg dm <sup>-3</sup>	0,11	0,12	0,1
citlivost, dm <sup>3</sup> mg <sup>-1</sup>	31 10 <sup>-2</sup>	67 10 <sup>-2</sup>	13 10 <sup>-2</sup>
RSD, %	3,8 (1,0 mg dm <sup>-3</sup> )	3,4 (0,5 mg dm <sup>-3</sup> )	6,9 (0,25 mg dm <sup>-3</sup> )
LDR, mg dm <sup>-3</sup>	LOQ – 2,0	LOQ – 1,0	LOQ – 0,5
R	0,9992	0,9925	0,9969

#### 4.6. Porovnání interferencí v různých metodách generování těkavých sloučenin

##### Se

Interferenční studie měla za cíl posouzení vlivu matrice v UV-fotochemickém generování ve srovnání s ostatními technikami generování těkavých sloučenin. Zkoumána byla i možnost nalezení potenciálních reakčních modifikátorů, které by mohly do budoucna sloužit k dalšímu zvýšení citlivosti UV-fotochemického generování těkavých sloučenin. Měření byla provozována za podmínek snažících se přiblížit rutinnímu provozu. Vzorky každého interferentu byly měřeny v rychlém sledu za sebou bez zařazení čistících kroků. Toto omezení se negativně projevilo především v případě elektrochemického generování, které bylo při interferenční studii značně zatíženo paměťovými efekty.

Pro účely srovnání interferencí v chemickém, elektrochemickém a UV-fotochemickém generování Se byly zoptimalizovány podmínky měření (tab. 4.19) a zjištěny základní charakteristiky (tab. 4.20) s aparaturami uvedenými na obr. 3.7 v kapitole 3.4.3. Optimální hodnoty byly voleny s cílem dosáhnout maximální citlivosti měření. S chemickým i UV fotochemickým generováním bylo dosaženo přibližně stejných limitů detekce, ale citlivost byla při V-fotochemickém generování nižší než při chemickém generování. Citlivost elektrochemického generování byla o více než půl řádu nižší, limit detekce byl horší o jeden řád skrze citlivost a vyšší šum základní linie. Elektrochemické generování těkavých sloučenin vykazuje při kontinuálním provozu generátoru dva hlavní nedostatky. Prvním je nemožnost zajistit reprodukovatelnost povrchu katody, na kterém probíhá vznik těkavé sloučeniny. Druhým je výrazné



zahřívání roztoků vlivem procházejícího elektrického proudu vedoucí k produkci vodní páry, která následně kondenzuje v transportním vedení a zhoršuje opakovatelnost měření. Nelze vyloučit ani ztráty vznikajícího hydridu jeho rozpouštěním v kondenzátu. Je pravděpodobné, že v dané aparatuře nebylo ani při optimalizovaných generačních podmínkách s elektrochemickým generováním dosaženo maximální účinnosti generování a transportu.

Tab. 4.19: Podmínky použité při porovnání interferencí v různých metodách generování těkavých sloučenin

Parametr	CVG	EcVG	PVG
koncentrace NaBH <sub>4</sub> , % (m/V)	0,5 (v 0,4 % NaOH)	-	-
koncentrace HCl, mol dm <sup>-3</sup>	1,0	1,0	-
koncentrace HCOOH, mol dm <sup>-3</sup>	-	-	0,5
koncentrace H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , mol dm <sup>-3</sup>	-	2,0	-
délka reakční cívky, cm	80 ( <i>V</i> = 0,63 ml)	-	350 ( <i>V</i> = 2,7 ml)
katoda	-	Pb (99,99 %, S = 820 mm <sup>2</sup> )	-
generační proud, A	-	1,0	-
průtoková rychlost blanku / vzorku, ml min <sup>-1</sup>	5,0	5,5	6,0
průtoková rychlost NaBH <sub>4</sub> , ml min <sup>-1</sup>	0,8	-	-
průtoková rychlost Ar, ml min <sup>-1</sup>	20,0	70,0	15,0
průtoková rychlost H <sub>2</sub> , ml min <sup>-1</sup>	-	-	3,0

Tab. 4.20: Základní charakteristiky různých metod generování těkavých sloučenin s detekcí QFAAS

	CVG	EcVG	UV-PVG
LOD, ng dm <sup>-3</sup>	58	490	45
LOQ, ng dm <sup>-3</sup>	194	1,62 10 <sup>3</sup>	147
citlivost, dm <sup>3</sup> ng <sup>-1</sup>	4,1 10 <sup>-2</sup>	7,6 10 <sup>-3</sup>	3,3 10 <sup>-2</sup>
RSD, %	1,4	3,1	1,5
LDR, µg dm <sup>-3</sup>	LOQ – 15	LOQ – 100	LOQ – 12

Vliv potenciálních interferentů byl zkoumán v kapalně fázi – tedy interferenty byly přítomny v modelovém vzorku spolu s roztokem Se(IV) o koncentraci 5 µg dm<sup>-3</sup> (CVG, UV-PVG) nebo 25 µg dm<sup>-3</sup> (EcVG). Odlišné koncentrace Se odpovídají přibližně absorpenci 0,20 pro každou ze tří metod. S vybranými potenciálními interferenty (jmenovitě As(III), Sb(III), Pb(II), Cu(II) a Ni(II)) byly provedeny také experimenty, kdy plynné produkty vznikající v přítomnosti interferentu byly s těkavou sloučeninou Se míchány až v plynné fázi (viz. kapitola 3.4.3). Cílem bylo potvrzení nebo vyvrácení hypotézy, že ostatní hydridotvorné prvky interferují především během atomizace zatímco přechodné kovy pouze v kapalně fázi. Získané výsledky byly vyjádřeny jako výtěžnosti resp. relativní odezvy Se (viz rovnice 20). Vzájemné poměry interferentu a Se jsou udávány jako poměry jejich hmotnostních koncentrací v měřených modelových vzorcích. Procentuální výtěžnosti uvedené v tabulkách představují průměr tří hodnot.

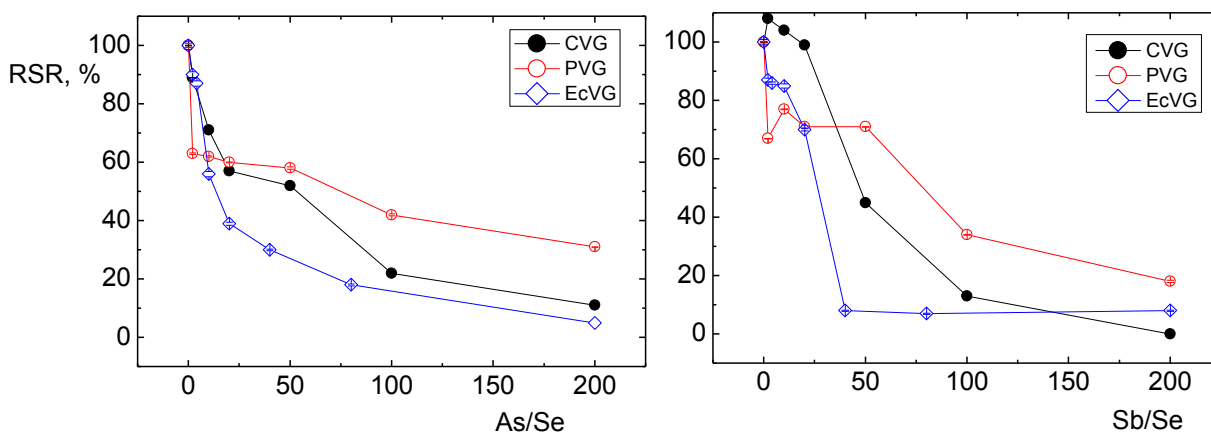
$$RSR = A_{\text{modelový vzorek}} / A_{\text{Se}} \cdot 100 [\%] \quad (20)$$

Do řady modelových vzorků daného interferentu byly náhodně zařazovány také roztoky Se bez interferentu za účelem zjištění případných paměťových efektů. V případě UV-PVG a CVG žádné paměťové efekty pozorovány nebyly ani nebyla pozorována viditelná redukce kovových prvků na vnitřních površích aparatur. Naopak elektrochemické generování těkavých sloučenin bylo zatíženo paměťovými efekty v důsledku modifikace povrchu katody vrstvou redukovaného interferentu. [163,164]

V případě zkoumání vlivu mědi byla zřetelně pozorovatelná barevná změna povrchu katody.

#### 4.6.1. Porovnání interferencí hydridotvorných prvků

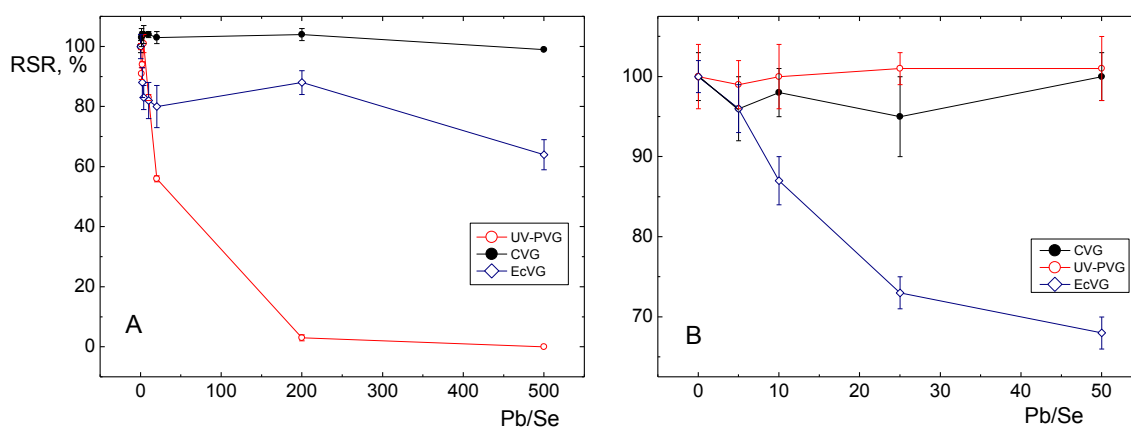
Při generování těkavých sloučenin je u ostatních hydridotvorných prvků očekáván vliv především v plynné fázi. [165,111,166,167] Tato informace byla potvrzena při experimentech, kdy byla těkáva sloučenina interferentu k těkávé sloučenině Se přidávána až v plynné fázi. Při chemickém a elektrochemickém generování byl při přidavku interferentu v až plynné fázi pozorován významnější vliv Sb než As. Naopak při UV-fotochemickém generování byly vlivy Sb a As srovnatelné ale mnohem méně významné, než bylo očekáváno na základě velikosti jejich vlivu při přítomnosti v kapalně fázi. Při UV-fotochemickém generování není vliv hydridotvorných prvků omezen pouze na atomizační interference, ale uplatňuje se i některý z mechanismů interference v kapalně fázi. Obecně ale ze závislosti vlivu As a Sb v kapalně fázi na generování těkávé sloučeniny Se uvedené na obr. 4.30 vyplynulo, že v ohledu interferencí ostatních hydridotvorných prvků se zkoumané metody významně kvantitativně neliší.



Obr. 4.30: Vliv As(III) a Sb(III) přítomných v kapalně fázi na generování těkávé sloučeniny Se, podmínky viz tab. 4.19

Olovo se při generování těkavých sloučenin často nechová jako typický hydridotvorný prvek. V případě chemického generování nelze těkávou sloučeninu Pb(II) generovat přímo reakcí s  $\text{NaBH}_4$ , ale musí být používány modifikátory reakce. [168,169] Tomu odpovídají i pozorování v této interferenční studii, kdy při chemickém

generování nebyl pozorován žádný vliv Pb(II) na signály Se (viz. obr. 4.31A a 4.31B). Odlišná pozorování byla učiněna při UV-fotochemickém a elektrochemickém generování. Při UV-fotochemickém generování byla pozorována významná interference v kapalně fázi, ale vliv v plynné fázi byl zanedbatelný, ionty olova tedy vykazovaly vliv spíše podobný přechodným kovům. Ke generování těkavé sloučeniny olova tedy pravděpodobně nedocházelo. Při elektrochemickém generování byl pozorován prakticky totožný vliv v kapalně i plynné fázi a interferenci olova tedy lze považovat za lokalizovanou v plynné fázi.



Obr. 4.31: Vliv Pb(II) přítomného v kapalně fázi (A) a v plynně fázi (B) na generování těkavé sloučeniny Se, podmínky viz tab. 4.19

#### 4.6.2. Porovnání interferencí přechodných kovů

Pro posouzení vlivu přechodných prvků bylo vybráno osm zástupců d-bloku včetně kadmia, které se v případě technik generování těkavých sloučenin projevuje na hranici mezi přechodnými kovy a hydridotvornými prvky. Přehled vlivu vybraných hodnot koncentrací potenciálních interferentů v poměru ku koncentraci selenu ve všech třech metodách generování těkavých sloučenin shrnuje tab. 4.21. Hluběji jsou v textu diskutovány spíše výsledky, které jsou překvapivé nebo poukazují na možnost využití reakčních modifikací v technice UV-fotochemického generování těkavých sloučenin.

Tab. 4.21: Přehled vlivu přechodných prvků na různé metody generování těkavých sloučenin Se, výsledky včetně RSD uvedeny jako RSR, podmínky viz tab. 4.19, n – hodnota není k dispozici

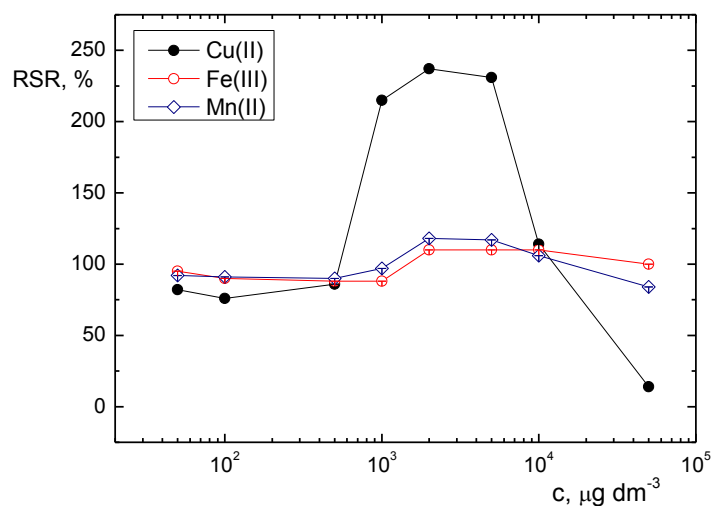
Potenciální interferent	Poměr interferent:Se	CVG	EcVG	UV-PVG
Cr(III)	200:1	100 ± 1	30 ± 3	113 ± 2
Mn(II)	10:1	114 ± 2	84 ± 1	101 ± 1
	200:1	106 ± 1	101 ± 2	112 ± 1
Fe(III)	10:1	102 ± 1	82 ± 3	65 ± 2
	200:1	104 ± 1	97 ± 3	64 ± 2
Co(II)	200:1	99 ± 2	82 ± 2	188 ± 2
Ni(III)	10:1	98 ± 2	87 ± 4	97 ± 1
	200:1	83 ± 2	33 ± 2	121 ± 2
Cu(II)	10:1	102 ± 3	61 ± 3	132 ± 2
	200:1	2 ± 2	176 ± 4	4 ± 1
Ag(I)	10:1	52 ± 1	74 ± 1	19 ± 1
	200:1	0	34 ± 2	0
Cd(II)	100:1	99 ± 1	n	79 ± 3
	200:1	105 ± 1	89 ± 3	103 ± 2

#### 4.6.2.1. Interference v CVG

Při chemickém generování byly nejvýznamnější interference pozorovány v přítomnosti Ag(I) a Cu(II). Nejvýznamnějším interferentem byly stříbrné kationty, v jejichž přítomnosti signál překročil toleranční limit  $\pm 10\%$  již při koncentraci  $10 \mu\text{g dm}^{-3}$  tedy při poměru stříbra ku selenu 2:1. Podobným tématem se zabývala práce Pagliano et al. [170], ve které navrhují tzv. mechanistickou interferenci Au a Pt – tyto ušlechtilé kovy v  $10^{-3}\text{M}$  koncentracích významně měnily mechanismus hydrolýzy  $\text{NaBH}_4$ . Oproti tomu vliv ostatních přechodných prvků byl zdaleka méně výrazný. Zásadní odlišností interferenční studie při chemickém generování těkavých sloučenin oproti elektrochemickému a fotochemickému přístupu byl výskyt pouze negativních změn signálu.

#### 4.6.2.2. Interference v EcVG

Při elektrochemickém generování jsou dle literárních zdrojů nejvýznamnějšími interferenty Cu a Ni, které způsobují nevratnou změnu povrchu katody. [171] V porovnání s chemickým i UV-fotochemickým generováním je tato metoda odolnější vůči vlivu stříbra. Nicméně bylo pozorováno, že mnohé prvky se mohou v určitých koncentračních rozmezech chovat jako interferenty a v jiných jako reakční modifikátory, tzn., že různé koncentrace téhož prvku mohou vést ke snížení nebo zvýšení signálu Se oproti čistému vzorku. Konkrétně byl tento jev pozorován Cu(II) a méně výrazně u Mn(II), Fe(III). Závislosti jsou uvedeny na obr. 4.32. Měď a mangan se takto projevovaly v koncentračním rozmezí 1–10 mg dm<sup>-3</sup> (tedy 40 – 400-násobné koncentraci vůči obsahu Se), železo v rozmezí 1 – 5 mg dm<sup>-3</sup> (40 – 200-násobném nadbytku).



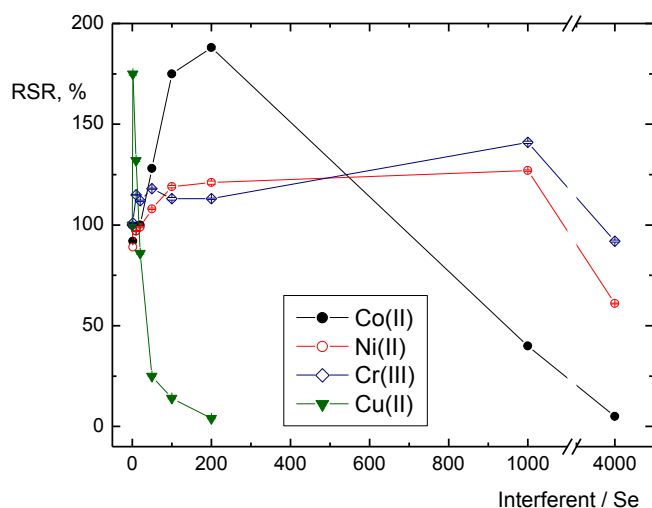
Obr. 4.32: Vliv přítomnosti Cu, Fe a Mn v kapalně fázi na elektrochemické generování těžké sloučeniny Se, podmínky viz tab. 4.19

Výskyt reakčních modifikací, které byly mimochodem pozorovány i při UV-fotochemickém generování, svědčí o možnosti dále zvýšit účinnost generování úpravou reakčních podmínek. V případě elektrochemického generování lze předpokládat nějakou zatím neznámou změnu kinetiky dějů na katodě. Mechanismus elektrochemického generování je založen na předpokladu růstu účinnosti generování s rostoucím přepětím vodíku na katodě (viz. kapitola 2.1.5.2), tudíž nelze předpokládat, že by modifikace povrchu Pb katody přechodnými kovy vedla ke zvýšení účinnosti generování. Experimenty s lokalizací vlivu Cu a Ni ukázaly, že během atomizace

i během separace fází měly zvláště generované těkavé sloučeniny obou prvků negativní vliv na signál. Byl tedy učiněn závěr, že příčinou interference v plynné fázi by mohly být nanočástice redukovaného Ni a Cu uvolněné z povrchu katody, které jsou strhávány nosným plynem a unášeny do atomizačního prostředí. Zároveň z experimentů vyplynulo, že modifikace reakce pozorovaná v přítomnosti Cu(II) v kapalném vzorku je lokalizována v kapalně fázi.

#### 4.6.2.3. Interference v UV-PVG

Guo et al. [34] ve své práci uvedli, že Ni ani Co nevykazují vliv při UV-fotochemickém generování Se ( $100 \mu\text{g dm}^{-3}$ ) v přítomnosti Ni o koncentraci  $500 \text{ mg dm}^{-3}$  a Co o koncentraci  $100 \text{ mg dm}^{-3}$ . UV-fotochemické generování tedy mělo být minimálně stejně odolné vůči interferencím jako chemické generování. Na druhou stranu také publikovali, že přítomnost  $3 \text{ mg dm}^{-3}$  Fe (II) vedla ke snížení odezvy selenu o 20 %. Z jejich výsledků navíc vyplynulo, že Fe(II) a Fe(III) by mohly mít rozdílný vliv na generování těkavé sloučeniny. Generování ve zmíněné práci probíhalo z prostředí kyseliny octové. Na rozdíl od jejich výsledků byl v této práci pozorován podobný efekt jako při elektrochemickém generování; v případě Co, Ni, Cu a Cr byly pozorovány zvýšené signály odpovídající reakční modifikaci. Naměřené závislosti jsou uvedeny na obr. 4.33.



Obr. 4.33: Vliv Ni, Cu, Co a Cr na UV-fotochemické generování těkavé sloučeniny Se, podmínky viz tab. 4.19

V případě mědi je zvýšení signálu omezeno pouze na velmi úzký rozsah koncentrací, naopak Cr a Ni zvyšují odezvy sice výrazně méně ale stabilně v širokém rozmezí cca 0,25 – 500 mg dm<sup>-3</sup> a mohly by tedy být použity pro zvýšení účinnosti generování těkavé sloučeniny Se. V poslední době bylo publikováno několik prací, kde byly reakční modifikace použity pro zvýšení citlivosti stanovení As [64] a Pb [66] metodou UV-fotochemického generování. V případě As bylo pozorováno, že Ni(II) Fe(III) a Cu(II) jsou významnými interferenty způsobujícími pokles signálů As již při poměrech koncentrací ku analytu 1:1 nebo 1:10. Naopak Co(II) působil i u tohoto prvku jako reakční modifikátor zvyšující signál o 65 % v rozmezí koncentrací 0,01 až 0,1 mg dm<sup>-3</sup> (při koncentraci As(III) 1 mg dm<sup>-3</sup>). Je nutné předpokládat, že velikost interferencí resp. reakční modifikace se u různých analytů mohou lišit.

Na rozdíl od chemického a elektrochemického generování byl v případě Ni pozorován pozitivní vliv na signál Se i v plynné fázi. Z prostředí kyseliny mravenčí lze UV-fotochemicky generovat těkavý karbonyl Ni, který by se mohl účastnit transportu těkavé sloučeniny Se. Jako nejpravděpodobnější se jeví stabilizace těkavé sloučeniny Se buď při transportu nebo při vstupu do atomizátoru. Interakce Se a Ni nemá negativní efekt na atomizaci Se, ale nebyl pozorován žádný signál Ni, přesto že byl proveden pokus o generování NiCO za stejných reakčních podmínek. V případě Cu nebyly pozorovány známky reakční modifikace při interakci s těkavou sloučeninou Se v plynné fázi. Závěr, že k modifikaci reakce dochází v kapalně fázi je nutno brát s rezervou vzhledem k velmi úzkému intervalu koncentrací, kdy by se mohl jev projevit.

#### 4.6.3. Porovnání interferencí elektrolytů

Chemické generování těkavých sloučenin je v porovnání s jeho alternativami odolnější vůči interferencím způsobovaným anorganickými kyselinami a solemi. Tento fakt vyplývá již ze samotného mechanismu chemického generování; kyselé prostředí je nezbytné pro hydrolýzu NaBH<sub>4</sub>, ale samotný anion kyseliny se vzniku těkavé sloučeniny neúčastní. Jediné překvapivé pozorování v interferenční studii souviselo s nárůstem odezvy Se v přítomnosti NaCl a Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. Nabízí se závěr, že ani chemické generování nebylo dokonale zoptimalizováno pro dosažení maximální účinnosti, není ale zřejmé, proč reakční modifikaci nedocházelo např. i v přítomnosti Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Shrnutí závislosti vlivu různých anorganických elektrolytů na generování těkavé sloučeniny Se různými metodami je uvedeno v tab. 4.22.



Tab. 4.22: Vliv různých anorganických elektrolytů na generování těkavé sloučeniny Se, výsledky včetně RSD uvedeny jako RSR, podmínky viz tab. 4.19, n-hodnota není k dispozici

Elektrolyt	Koncentrace, $\cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$	CVG	EcVG	UV-PVG
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5	95 ± 1	104 ± 1	91 ± 1
	50	101 ± 1	99 ± 1	38 ± 1
	250	105 ± 1	86 ± 1	7 ± 2
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5	91 ± 2	100 ± 2	89 ± 2
	50	108 ± 2	85 ± 4	96 ± 1
	250	95 ± 3	72 ± 3	104 ± 2
HCl	5	n	n	153 ± 2
	100	n	n	104 ± 1
	500	n	n	10 ± 3
NaCl	10	98 ± 1	78 ± 4	105 ± 2
	50	104 ± 2	49 ± 5	91 ± 2
	250	144 ± 3	27 ± 5	45 ± 1
	500	160 ± 3	9 ± 4	n
HNO <sub>3</sub>	5	107 ± 1	96 ± 1	230 ± 3
	50	106 ± 2	9 ± 2	6 ± 3
	1000	65 ± 0	n	n
NaNO <sub>3</sub>	5	94 ± 2	111 ± 3	146 ± 2
	50	92 ± 2	12 ± 3	3 ± 1
	500	92 ± 1	n	n
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	5	109 ± 1	76 ± 3	101 ± 1
	100	103 ± 0	52 ± 1	77 ± 1
	1000	101 ± 1	13 ± 2	70 ± 2
Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	5	121 ± 2	106 ± 2	88 ± 2
	50	120 ± 2	117 ± 2	98 ± 1
	250	n	45 ± 1	n

Při elektrochemickém generování těkavých sloučenin na Pb katodě je nejvýznamnějším očekávaným mechanismem interference tvorba nerozpustných solí olova. Ze zkoumaných aniontů by tento efekt měl být pozorovatelný v přítomnosti síranů a fosforečnanů, ale ve skutečnosti byl opravdu významný pouze ve druhém případě. Jak bylo uvedeno v kapitole 2.1.3, kyselina sírová je běžně využívána jako katolyt pro generování těkavých sloučenin As a Sb. Přítomnost NaCl vedla k poklesu signálů stejně jako vyšší koncentrace kyseliny dusičné a dusičnanu. Poslední jmenované elektrolyty si zaslouží zvýšenou pozornost. Interference v přítomnosti kyseliny dusičné je pravděpodobně způsobena jejími oxidačními vlastnostmi. V úvahu připadá např. oxidace analytu do vyššího oxidačního čísla, ze kterého probíhá generování těkavých sloučenin s nižší účinností. V přítomnosti chloridů alkalických kovů (NaCl, KCl) dochází vlivem procházejícího elektrického proudu k rozpouštění olovené katody. Tento proces je poměrně pomalý a lze ho např. úspěšně využít pro čištění povrchu katody od sorbovaných interferentů [172], ale při dlouhodobém provozu cely v roztoku obsahujícím NaCl nebo KCl může dojít až k přerušení elektrolýzy úplným rozpuštěním katody. Tentýž jev byl pozorován i v případě katody z kadmia. [173] Pokud tedy má být elektrochemické generování těkavých sloučenin prováděno ve vzorcích s vysokým obsahem chloridů, měly by být používány elektrody z ušlechtilých kovů.

Při UV-fotochemickém generování z pohledu na tab. 4.22 vyplývá, že kyseliny i jejich soli mohou interferovat stejně jako působit reakční modifikace, ale často nebyl pozorován stejný typ vlivu pro kyselinu a její sodnou sůl. Např. na základě uvedených výsledků by bylo možné o kyselině dusičné, dusičnanech a kyselině chlorovodíkové uvažovat jako o potenciálních reakčních modifikátorech. Mechanismus jejich vlivu by bylo možné vysvětlit prostřednictvím větší tvorby reaktivních radikálových meziproduktů při ozařování a tudíž zvýšenou účinností generování těkavé sloučeniny Se, ale v přítomnosti NaCl nárůst signálů pozorován nebyl. Výsledky získané Mgr. Rybínovou se směsí HCOOH a HNO<sub>3</sub> jako fotochemickým činidlem ovšem naznačily, že by kombinované systémy mohly být ještě náchylnější k interferencím než samotné UV-fotochemické generování. [156] Dále byly změřeny výrazně odlišné závislosti signálu na rostoucích koncentracích kyseliny sírové a síranu sodného, kdy kyselina výrazně interferovala při měření Se, zatímco přítomnost síranu sodného ve stejném intervalu koncentrací v podstatě nevedla ke změně signálu mimo toleranční rozmezí  $\pm 10\%$  signálu.

Ráda bych zde zdůraznila ještě jednu souvislost. Přítomnost kyseliny fosforečné resp. fosforečnanového aniontu při generování UV-fotochemickém generování těkavé sloučeniny Se bez  $\text{TiO}_2$  má omezený vliv a bylo by tedy možno UV-fotochemické generování s úspěchem aplikovat na biologické vzorky se zvýšeným obsahem fosfátu. Tentýž postup ale nelze použít ve spojení s fotoredukcí (viz kapitola 4.4.3), protože fosforečnanový anion blokuje aktivní místa  $\text{TiO}_2$ .

## 5. Závěry

Byla vyvinuta metoda pro stanovení seleničitanového a selenanového aniontu UV-fotochemickým generováním jejich těkavé sloučeniny za asistence fotokatalytických účinků  $\text{TiO}_2$ . Praktická použitelnost vyvinuté metody byla ověřena analýzou referenčních materiálů a reálných vzorků. Kromě vodných matric byla metoda aplikována také pro stanovení obsahu Se ve vzorcích doplňků stravy. Dále byla metoda UV-fotochemického generování modifikována jako derivatizační technika pro identifikaci a stanovení Se ze seleničitanového a selenanového aniontu a selenoaminokyselin Se-methylselenocysteinu a selenomethioninu po HPLC separaci. Kromě Se bylo UV-fotochemické generování s využitím fotokatalýzy oxidem titaničitým aplikováno i pro generování těkavých specií teluru z teluričitanového a teluránového aniontu a bylo porovnáno s UV-fotochemickým generováním těkavé sloučeniny Te bez použití fotokatalýzy. Dosažené výsledky zatím neumožňují metodu aplikovat pro stanovení Te v reálných vzorcích.

Za účelem porovnání metod generování těkavé sloučeniny Se z hlediska použitelnosti pro praktické aplikace byla provedena rozsáhlá interferenční studie, při které byly zkoumány rozdíly v interferencích při chemickém, elektrochemickém a UV-fotochemickém generování Se.

Nejdůležitější závěry vyplývající z výzkumu, který byl podkladem předkládané disertační práce, jsou shrnuty v následujících odstavcích.

$\text{TiO}_2$  umožňuje redukci Se(VI) a Te(VI) nejen v kyselině mravenčí ale i v kyselině octové a propionové, přičemž v kyselině octové bylo dosaženo nejvyšších analytických signálů. V případě generování těkavé sloučeniny s využitím fotokatalýzy pomocí  $\text{TiO}_2$  tedy délka uhlíkaté kostry kyseliny pravděpodobně není rozhodující.

Pro Se(IV) byla v uspořádání kontinuální průtokové analýzy zjištěna účinnost generování těkavé sloučeniny 81 % na základě porovnání citlivostí s chemickým generováním těkavých sloučenin.

Při používání kyseliny octové jako reakčního prostředí je pro úspěšnou atomizaci těkavé sloučeniny Se a Te nutné přidávat vodík.

Bylo zkoumáno UV-fotochemické generování těkavé sloučeniny teluru z Te(VI) i bez použití  $\text{TiO}_2$ , ale za podmínek zkoumaných v této práci nebylo dosaženo úspěšného generování. Reakční produkty vznikající rozkladem nízkomolekulárních

organických kyselin UV zářením nepostačují k redukci Te(VI) a tvorbě těkavé sloučeniny Te. V přítomnosti fotokatalyzátoru vznikala těkavá specie, která se samovolně rozkládala v transportním vedení za vzniku kovového Te a vyžadovala pro úspěšný transport do atomizátoru používání vysokých průtokových rychlostí nosného plynu. Těkavá sloučenina produkovaná v 8,0 mol dm<sup>-3</sup> kyselině octové bez TiO<sub>2</sub> byla dostatečně stabilní i při mírnějších experimentálních podmínkách.

Vliv matrice na jednotlivé studované specie může být při TiO<sub>2</sub>/UV-fotochemickém generování odlišný, alespoň byl takovýto jev pozorován při stanovení Se(IV) a Se(VI) ve vodných matricích. Vyhodnocení vlivu potenciálních interferentů je tedy nutné provádět pro každou specii.

Navzdory vlivu vysoké koncentrace Ca(II) a Mg(II) iontů na přesnost a preciznost stanovení Se metodou TiO<sub>2</sub>/UV-fotochemického generování, byla tato metoda úspěšně aplikována a validována pro určení obsahu Se ve vzorcích doplňků stravy. Pro stanovení Se je tedy UV-fotochemické generování nadějnou alternativou k chemickému generování těkavých sloučenin. Další možností aplikace techniky TiO<sub>2</sub>/UV-fotochemického generování je její využití pro derivatizaci různých specií Se na těkavé sloučeniny pro spojení HPLC separace a detekce atomovými spektrometrickými metodami.

Během interferenční studie bylo potvrzeno, že obě alternativní techniky generování těkavých sloučenin jsou náchylnější k interferencím než chemické generování. Během této studie byly také vybrány potenciální reakční modifikátory (Co, Ni, Cr), které by mohly zvýšit citlivost stanovení Se nebo i jiných analytů metodou UV-fotochemického generování. V případě Ni bylo zjištěno, že k reakční modifikaci dochází prostřednictvím stabilizace těkavé sloučeniny Se v plynné fázi.

## Literatura:

- [1] Dědina, J.; Tsalev, D. L.: *Hydride generation atomic absorption spectrometry*. 1995.
- [2] Feng, Y. L.; Lam, J. W.; Sturgeon, R. E.: *Analyst* **126**, 1833–1837 (2001).
- [3] Zheng, C.; Yang, L.; Sturgeon, R. E.; Hou, X.: *Anal. Chem.* **82**, 3899–3904 (2010).
- [4] de Jesus, H. C.; Grinberg, P.; Sturgeon, R. E.: *J. Anal. At. Spectrom.* **0**, 1590–1604 (2016).
- [5] Liu, L.; Deng, H.; Wu, L.; et al.: *Talanta* **80**, 1239–1244 (2010).
- [6] de Quadros, D. P. C.; Borges, D. L. G.: *Microchem. J.* **116**, 244–248 (2014).
- [7] Wu, P.; He, L.; Zheng, C.; et al.: *J. Anal. At. Spectrom.* **25**, 1217–1246 (2010).
- [8] Gil, S.; Lavilla, I.; Bendicho, C.: *Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc.* **62**, 69–75 (2007).
- [9] Marsh, J.: *Edinburgh New Philos. J.* **21**, 229–236 (1836).
- [10] Brindle, I. D.: *Anal. Bioanal. Chem.* **388**, 735–741 (2007).
- [11] Holak, W.: *Anal. Chem.* **41**, 1712–1713 (1969).
- [12] D’Ulivo, A.: *Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc.* **59**, 793–825 (2004).
- [13] D’Ulivo, A.; Onor, M.; Pitzalis, E.: *Anal. Chem.* **76**, 6342–6352 (2004).
- [14] D’Ulivo, A.; Mester, Z.; Sturgeon, R. E.: *Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc.* **60**, 423–438 (2005).
- [15] Marschner, K.; Musil, S.; Dědina, J.: *Anal. Chem.* **88**, 4041–4047 (2016).
- [16] Feng, Y.-L.; Sturgeon, R. E.; Lam, J. W.: *J. Anal. At. Spectrom.* **18**, 1435 (2003).
- [17] Sturgeon, R. E.; Liu, J.; Boyko, V. J.; Luong, V. T.: *Anal. Chem.* **68**, 1883–1887 (1996).
- [18] Pohl, P.; Prusisz, B.: *Anal. Bioanal. Chem.* **388**, 753–762 (2007).
- [19] Matoušek, T.: *Anal. Bioanal. Chem.* **388**, 763–767 (2007).
- [20] Lin, Y.; Wang, X.; Yuan, D.; et al.: *J. Anal. At. Spectrom.* **7**, 287–291 (1992).
- [21] Brockmann, A.; Nonn, C.; Golloch, A.: *J. Anal. At. Spectrom.* **8**, 397–401 (1993).
- [22] Denkhaus, E.; Golloch, A.; Guo, X. M.; Huang, B.: *J. Anal. At. Spectrom.* **16**, 870–878 (2001).
- [23] Laborda, F.; Bolea, E.; Castillo, J. R.: *J. Anal. At. Spectrom.* **15**, 103–107 (2000).
- [24] Šíma, J.; Rychlovský, P.: *Chem. List.* **92**, 676–679 (1998).
- [25] Zhang, W.; Yang, X.; Xue, J.; Wang, S.: *J. Anal. At. Spectrom.* **27**, 928 (2012).
- [26] Caiminagua, A.; Fernández, L.; Romero, H.; et al.: *Anal. Chem. Res.* **3**, 82–88 (2015).
- [27] Ordoñez, J.; Fernández, L.; Romero, H.; et al.: *Talanta* , 259–266 (2015).
- [28] Welz, B.; Sperling, M.: *Atomic absorption spectrometry*. 3rd editio.1998.
- [29] Laborda, F.; Bolea, E.; Castillo, J. R.: *Anal. Bioanal. Chem.* **388**, 743–751 (2007).
- [30] Šíma, J.; Rychlovský, P.; Dědina, J.: *Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc.* **59**, 125–133 (2004).
- [31] He, Y.; Hou, X.; Zheng, C.; Sturgeon, R. E.: *Anal. Bioanal. Chem.* **388**, 769–774 (2007).
- [32] Canário, J.; Vale, C.: *Environ. Sci. Technol.* **38**, 3901–3907 (2004).
- [33] Siciliano, S. D.; O’Driscoll, N. J.; Tordon, R.; et al.: *Environ. Sci. Technol.* **39**, 1071–1077 (2005).
- [34] Guo, X.; Sturgeon, R. E.; Mester, Z.; Gardner, G. J.: *Anal. Chem.* **75**, 2092–2099 (2003).
- [35] Guo, X.; Sturgeon, R. E.; Mester, Z.; Gardner, G. J.: *Environ. Sci. Technol.* **37**,

- 5645–5650 (2003).
- [36] Cai, Y.; Li, S.-H.; Dou, S.; et al.: *Anal. Chem.* **87**, 1366–1372 (2015).
- [37] Zheng, C.; Sturgeon, R. E.; Brophy, C.; Hou, X.: *Anal. Chem.* **82**, 3086–3093 (2010).
- [38] de Jesus, A.; Zmozinski, A. V.; Vieira, M. A.; et al.: *Microchem. J.* **110**, 227–232 (2013).
- [39] da Silva, C. S.; Ezer, E.; Oreste, Q.; et al.: *J. Anal. At. Spectrom.* **27**, 689 (2012).
- [40] Ribeiro, A. S.; Vieira, M. A.; Grinberg, P.; Sturgeon, R. E.: *J. Anal. At. Spectrom.* **24**, 689–694 (2009).
- [41] Xia, H.; Liu, X.; Huang, K.; et al.: *Spectrosc. Lett.* **43**, 550–554 (2010).
- [42] Han, C.; Zheng, C.; Wang, J.; et al.: *Anal. Bioanal. Chem.* **388**, 825–830 (2007).
- [43] Vieira, M. A.; Ribeiro, A. S.; Curtius, A. J.; Sturgeon, R. E.: *Anal. Bioanal. Chem.* **388**, 837–847 (2007).
- [44] Hou, X.; Ai, X.; Jiang, X.; et al.: *Analyst* **137**, 686–690 (2012).
- [45] Francisco, B. B. A.; Rocha, A. A.; Grinberg, P.; et al.: *J. Anal. At. Spectrom.* **31**, 751–758 (2016).
- [46] Liu, R.; Xu, M.; Shi, Z.; et al.: *Talanta* **117**, 371–5 (2013).
- [47] Bendl, R. F.; Madden, J. T.; Regan, A. L.; Fitzgerald, N.: *Talanta* **68**, 1366–1370 (2006).
- [48] dos Santos, E. J.; Herrmann, A. B.; dos Santos, A. B.; et al.: *J. Anal. At. Spectrom.* **25**, 1627 (2010).
- [49] Sturgeon, R. E.; Luong, V.: *J. Anal. At. Spectrom.* **28**, 1610 (2013).
- [50] de Jesus, A.; Sturgeon, R. E.; Liu, J.; Silva, M. M.: *Microchem. J.* **117**, 100–105 (2014).
- [51] Suzuki, T.; Sturgeon, R. E.; Zheng, C.; et al.: *Anal. Sci.* **28**, 807–811 (2012).
- [52] Guo, X.; Sturgeon, R. E.; Mester, Z.; Gardner, G. J.: *Appl. Organomet. Chem.* **17**, 575–579 (2003).
- [53] Guo, X.; Sturgeon, R. E.; Mester, Z.; Gardner, G. J.: *Anal. Chem.* **76**, 2401–2405 (2004).
- [54] Garcá, M.; Figueroa, R.; Lavilla, I.; Bendicho, C.: *J. Anal. At. Spectrom.* **21**, 582–587 (2006).
- [55] Matusiewicz, H.; Ślachciński, M.: *Spectrosc. Lett.* **46**, 315–326 (2013).
- [56] Rybínová, M.; Červený, V.; Rychlovský, P.: *J. Anal. At. Spectrom.* **30**, 1752–1763 (2015).
- [57] Rybínová, M.; Musil, S.; Červený, V.; et al.: *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.* **123**, 134–142 (2016).
- [58] Rybínová, M.; Červený, V.; Hraniček, J.; Rychlovský, P.: *Microchem. J.* **124**, 584–593 (2016).
- [59] Campanella, B.; Menciassi, A.; Onor, M.; et al.: *Spectrochim. Acta part B At. Spectrosc.* **126**, 11–16 (2016).
- [60] Zheng, C.; Ma, Q.; Wu, L.; et al.: *Microchem. J.* **95**, 32–37 (2010).
- [61] Gao, Y.; Sturgeon, R. E.; Mester, Z.; et al.: *Anal. Chim. Acta* **901**, 34–40 (2015).
- [62] Guo, X.; Sturgeon, R. E.; Mester, Z.; Gardner, G. J.: *J. Anal. At. Spectrom.* **20**, 702–709 (2005).
- [63] McSheehy, S.; Guo, X. M.; Sturgeon, R. E.; Mester, Z.: *J. Anal. At. Spectrom.* **20**, 709–716 (2005).
- [64] Linhart, O.; Smolejová, J.; Červený, V.; et al.: *Monatshefte für Chemie* **147**, 1447–1454 (2016).
- [65] Gao, Y.; Sturgeon, R. E.; Mester, Z.; et al.: *Anal. Chem.* **87**, 7996–8004 (2015).
- [66] Gao, Y.; Xu, M.; Sturgeon, R. E.; et al.: *Anal. Chem.* **87**, 4495–4502 (2015).

- [67] Grinberg, P.; Sturgeon, R. E.: *J. Anal. At. Spectrom.* **24**, 508–514 (2009).
- [68] Grinberg, P.; Sturgeon, R. E.: *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.* **64**, 235–241 (2009).
- [69] Grinberg, P.; Mester, Z.; D’Ulivo, A.; Sturgeon, R. E.: *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.* **64**, 714–716 (2009).
- [70] Sturgeon, R. E.: *Anal. Chem.* **87**, 3072–3079 (2015).
- [71] Gao, Y.; Li, S.; He, H.; et al.: *Microchem. J.* **130**, 281–286 (2017).
- [72] Gao, Y.; Sturgeon, R. E.; Mester, Z.; et al.: *Microchem. J.* **124**, 344–349 (2016).
- [73] Zheng, C.; Sturgeon, R. E.; Hou, X.: *J. Anal. At. Spectrom.* **25**, 1159 (2010).
- [74] Grinberg, P.; Sturgeon, R. E.; Gardner, G.: *Microchem. J.* **105**, 44–47 (2012).
- [75] Zheng, C.; Sturgeon, R. E.; Brophy, C. S.; et al.: *Anal. Chem.* **82**, 2996–3001 (2010).
- [76] Zeng, Y.; Zheng, C.; Hou, X.; Wang, S.: *Microchem. J.* **117**, 83–88 (2014).
- [77] Zheng, C.; Sturgeon, R. E.; Hou, X.: *J. Anal. At. Spectrom.* **24**, 1452–1458 (2009).
- [78] Shen, Y.; Zheng, C.; Jiang, X.; et al.: *Microchem. J.* **123**, 164–169 (2015).
- [79] Deng, H.; Zheng, C.; Liu, L.; et al.: *Microchem. J.* **96**, 277–282 (2010).
- [80] Grinberg, P.; Mester, Z.; Sturgeon, R. E.; Ferretti, A.: *J. Anal. At. Spectrom.* **23**, 583–587 (2008).
- [81] Nóbrega, J.; Sturgeon, R. E.; Grinberg, P.; et al.: *J. Anal. At. Spectrom.* **26**, 2519–2523 (2011).
- [82] Wang, Z.-H.; Zhuang, Q.-X.: *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **75**, 105–111 (1993).
- [83] Yang, W.; Gao, Y.; Wu, L.; et al.: *Microchim. Acta* **181**, 197–204 (2014).
- [84] Liang, J.; Wang, Q.; Huang, B.: *Anal. Bioanal. Chem.* **381**, 366–372 (2005).
- [85] Deng, D.; Zhou, J.; Ai, X.; et al.: *J. Anal. At. Spectrom.* **27**, 270 (2012).
- [86] Wang, Q.; Liang, J.; Qiu, J.; Huang, B.: *J. Anal. At. Spectrom.* **19**, 715–716 (2004).
- [87] Sun, Y. C.; Chang, Y. C.; Su, C. K.: *Anal. Chem.* **78**, 2640–2645 (2006).
- [88] Zheng, C.; Wu, L.; Ma, Q.; et al.: *J. Anal. At. Spectrom.* **23**, 514–520 (2008).
- [89] Shih, T. T.; Hsu, I. H.; Wu, J. F.; et al.: *J. Chromatogr. A* **1304**, 101–108 (2013).
- [90] Jia, J.; Long, Z.; Zheng, C.; et al.: *J. Anal. At. Spectrom.* **30**, 339–342 (2015).
- [91] Bobbins, W. B.; Caruso, J. A.: *Anal. Chem.* **51**, 889A–899A (1979).
- [92] Kumar, A. R.; Riyazuddin, P.: *Anal. Sci.* **21**, 1401–1410 (2005).
- [93] Feng, Y. L.; Sturgeon, R. E.; Lam, J. W.; D’Ulivo, A.: *J. Anal. At. Spectrom.* **20**, 255–265 (2005).
- [94] D’ulivo, A.: *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.* **65**, 360–375 (2010).
- [95] D’Ulivo, A.; Baiocchi, C.; Pitzalis, E.; et al.: *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.* **59**, 471–486 (2004).
- [96] D’Ulivo, A.; Mester, Z.; Meija, J.; Sturgeon, R. E.: *Anal. Chem.* **79**, 3008–3015 (2007).
- [97] Sturgeon, R. E.; Grinberg, P.: *J. Anal. At. Spectrom.* **27**, 222–231 (2012).
- [98] Yin, Y.; Liu, J.; Jiang, G.: *TrAC - Trends Anal. Chem.* **30**, 1672–1684 (2011).
- [99] Takatani, T.; Fitzgerald, N.; Galbraith, J. M.: *Anal. Bioanal. Chem.* **388**, 859–862 (2007).
- [100] Tan, T.; Beydoun, D.; Amal, R.: *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **159**, 273–280 (2003).
- [101] Nguyen, V. N. H.; Beydoun, D.; Amal, R.: *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **171**, 113–120 (2005).
- [102] Kikuchi, E.; Sakamoto, H.: *J. Electrochem. Soc.* **147**, 4589–4593 (2000).



- [103] Li, H.; Luo, Y.; Li, Z.; et al.: *Anal. Chem.* **84**, 2974–2981 (2012).
- [104] Tan, T. T. .; Yip, C. .; Beydoun, D.; Amal, R.: *Chem. Eng. J.* **95**, 179–186 (2003).
- [105] Linsebigler, A. L.; Yates Jr, J. T.; Lu, G.; Yates, J. T.: *Chem. Rev.* **95**, 735–758 (1995).
- [106] Kumar, A. R.; Riyazuddin, P.: *TrAC - Trends Anal. Chem.* **29**, 166–176 (2010).
- [107] Bax, D.; Agterdenbos, J.; Worrell, E.; Kolmer, J. B.: *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.* **43**, 1349–1354 (1988).
- [108] Ragnar, B.: *Talanta* **33**, 705–706 (1986).
- [109] Henden, E.; İşlek, Y.; Kavas, M.; et al.: *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.* **66**, 793–798 (2011).
- [110] Barth, P.; Krivan, V.; Hausbeck, R.: *Anal. Chim. Acta* **263**, 111–118 (1992).
- [111] D’Ulivo, A.; Dědina, J.: *Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc.* **51**, 481–498 (1996).
- [112] Dědina, J.: *Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc.* **62**, 846–872 (2007).
- [113] Dědina, J.; D’Ulivo, A.: *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.* **52**, 1737–1746 (1997).
- [114] Musil, S.; Pétursdóttir, Á. H.; Raab, A.; et al.: *Anal. Chem.* **86**, 993–999 (2014).
- [115] Musil, S.; Matoušek, T.: *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.* **63**, 685–691 (2008).
- [116] Vilanó, M.; Padró, A.; Rubio, R.; Rauret, G.: *J. Chromatogr. A* **819**, 211–220 (1998).
- [117] Kozak, L.; Rudnicka, M.; Niedzielski, P.: *Food Anal. Methods* **5**, 1237–1243 (2012).
- [118] Dumont, E.; De Cremer, K.; Van Hulle, M.; et al.: *J. Anal. At. Spectrom.* **19**, 167–171 (2004).
- [119] Viñas, P.; López-García, I.; Merino-Meroño, B.; et al.: *Anal. Chim. Acta* **535**, 49–56 (2005).
- [120] Chatterjee, A.; Shibata, Y.; Yoneda, M.; et al.: *Anal. Chem.* **73**, 3181–3186 (2001).
- [121] Svoboda, M.; Kratzer, J.; Vobecký, M.; Dědina, J.: *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.* **111**, 46–51 (2015).
- [122] Musil, S.; Matoušek, T.; Currier, J. M.; et al.: *Anal. Chem.* **86**, 10422–10428 (2014).
- [123] Liu, R.; Wu, P.; Xi, M.; et al.: *Talanta* **78**, 885–890 (2009).
- [124] Matoušek, T.; Hernández-Zavala, A.; Svoboda, M.; et al.: *Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc.* **63**, 396–406 (2008).
- [125] Quináia, S. P.; Rollemberg, M. da C. E.: *J. Brazilian Chem. Soc.* **8**, 349–356 (1997).
- [126] Qiu, J.; Wang, Q.; Ma, Y.; et al.: *Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc.* **61**, 803–809 (2006).
- [127] da Silva, E. G.; Mataveli, L. R. V.; Arruda, M. A. Z.: *Talanta* **110**, 53–7 (2013).
- [128] Dernovics, M.; Lobinski, R.: *Anal. Chem.* **80**, 3975–3984 (2008).
- [129] Gómez-Ariza, J. L.; Caro de la Torre, M. A.; Giráldez, I.; Morales, E.: *Anal. Chim. Acta* **524**, 305–314 (2004).
- [130] Gómez, M. M.; Gasparic, T.; Palacios, M. A.; Camara, C.: *Anal. Chim. Acta* **374**, 241–251 (1998).
- [131] Jagtap, R.; Maher, W.; Krikowa, F.; et al.: *Microchem. J.* **128**, 248–257 (2016).
- [132] Ayouni, L.; Barbier, F. J.; Imbert, J. L.; et al.: *Anal. Bioanal. Chem.* **385**, 1504–1512 (2006).

- [133] Greenwood, N. N.; Earnshaw, A.: Selenium, Tellurium and Polonium. In: *Chemistry of the Elements* 2nd editio. 1997, p. 747–788.
- [134] Zýka, J.; Karpenko, V.: *Prvky očima minulosti*. 1984.
- [135] Bufka, A.; Velebil, D.: *Bull. Miner. Odd. Nár. Muz.* **10**, 77–84 (2002).
- [136] Starý, J.; Sitenský, I.; Mašek, D.; et al.: *SUROVINOVÉ ZDROJE ČESKÉ REPUBLIKY* Dostupné z URL: [http://www.geology.cz/extranet/publikace/online/surovinove-zdroje/surovinove-zdroje-ceske-republiky-2016\\_m.pdf](http://www.geology.cz/extranet/publikace/online/surovinove-zdroje/surovinove-zdroje-ceske-republiky-2016_m.pdf) [cit. 05/06/2017].
- [137] Perrone, D.; Monteiro, M.; Nunes, J. C.: The Chemistry of Selenium. In: *Food and Nutritional Components in Focus No. 9 Selenium: Chemistry, Analysis, Function and Effects*, (ed.) Preedy, V. R. 2015, p. 3–15.
- [138] Markert, B.; Fränzle, S.; Wünschmann, S.: *Chemical Evolution - The Biological System of the Elements*. 2015.
- [139] Rayman, M. P.: *Lancet* **379**, 1256–1268 (2012).
- [140] Rayman, M. P.: *Br. J. Nutr.* **100**, 254–268 (2008).
- [141] Rayman, M. P.: *Lancet* **356**, 233–41 (2000).
- [142] Papp, L. V.; Lu, J.; Holmgren, A.; Khanna, K. K.: *Antioxid. Redox Signal.* **9**, 775–806 (2007).
- [143] Navarro-Alarcon, M.; Cabrera-Vique, C.: *Sci. Total Environ.* **400**, 115–141 (2008).
- [144] B'Hymer, C.; Caruso, J. A.: *J. Anal. At. Spectrom.* **15**, 1531–1539 (2000).
- [145] Sager, M.: *Pure Appl. Chem.* **78**, 111–113 (2006).
- [146] Ruszczynska, A.; Konopka, A.; Kurek, E.; et al.: *Spectrochim. Acta Part B* **130**, 7–16 (2017).
- [147] Pyrzynska, K.: *Food Chem.* **114**, 1183–1191 (2009).
- [148] Dumont, E.; Vanhaecke, F.; Cornelis, R.: *Anal. Bioanal. Chem.* **385**, 1304–1323 (2006).
- [149] Jankowski, K.; Tyburska, A.; Jankowska, M.: Assay of Selenium in Dietary Supplements. In: *Food and Nutritional Components in Focus No. 9 Selenium: Chemistry, Analysis, Function and Effects*, (ed.) Preedy, V. R. 2015, p. 221–239.
- [150] Kolachi, N. F.; Kazi, T. G.; Afridi, H. I.; et al.: *Food Chem. Toxicol.* **48**, 3327–3332 (2010).
- [151]: *Vyhláška č. 225/2008 Sb. kterou se stanoví požadavky na doplňky stravy a na obohacování potravin*. 2008. [cit. 03/04/2017]
- [152] Chen, X.; Burda, C.: *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 5018–5019 (2008).
- [153] NIST: *Nist Handbook of Basic Element Spectroscopic Data* Dostupné z URL: <http://physics.nist.gov/PhysRefData/Handbook/Tables/mercurytable3.htm> [cit. 05/06/2017].
- [154] Jordan, N.; Foerstendorf, H.; Weiß, S.; et al.: *Geochim. Cosmochim. Acta* **75**, 1519–1530 (2011).
- [155] Larsen, E. H.; Hansen, M.; Fan, T.; Vahl, M.: *J. Anal. At. Spectrom.* **16**, 1403–1408 (2001).
- [156] Rybínová, M.: Univerzita Karlova, 2016.
- [157]: *Úpravny vody - Pražské vodovody a kanalizace, a.s.* Dostupné z URL: <http://www.pvk.cz/o-spolecnosti/technicka-a-vyrobni-data/zakladni-informace/upravny-vody/> [cit. 02/04/2017].
- [158] Chen, Y. W.; Zhou, X. L.; Tong, J.; et al.: *Anal. Chim. Acta* **545**, 149–157 (2005).
- [159] D'Ulivo, A.; Dědina, J.; Lampugnani, L.; Matoušek, T.: *J. Anal. At. Spectrom.*

- 17**, 253–257 (2002).
- [160] Dědina, J.: *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.* **47**, 689–700 (1992).
- [161] Nováková, L.; Douša, M.; Blatný, P.; et al.: *Moderní HPLC separace v teorii a praxi II*. 2013.
- [162] Lide, D. R.; Haynes, W. M., Eds.: *CRC Handbook of Chemistry and Physics*. 90th Edition. 2010.
- [163] Junková, G.; Šíma, J.; Rychlovský, P.: *Chem. Pap.* **57**, 192–196 (2003).
- [164] Bolea, E.; Laborda, F.; Belarra, M. A.; Castillo, J. R.: *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.* **56**, 2347–2360 (2001).
- [165] Welz, B.; Stauss, P.: *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.* **48**, 951–976 (1993).
- [166] Welz, B.; Melcher, M.: *Anal. Chim. Acta* **131**, 17–25 (1981).
- [167] Dědina, J.: *Anal. Chem.* **54**, 2097–2102 (1982).
- [168] Kratzer, J.: *Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc.* **71–72**, 40–47 (2012).
- [169] Novotný, P.; Kratzer, J.: *Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc.* **79–80**, 77–81 (2013).
- [170] Pagliano, E.; Onor, M.; Meija, J.; et al.: *Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc.* **66**, 740–747 (2011).
- [171] Ding, W. W.; Sturgeon, R. E.: *J. Anal. At. Spectrom.* **11**, 421–425 (1996).
- [172] Nováková, E.; Rychlovský, P.; Resslerová, T.; et al.: *Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc.* **117**, 42–48 (2016).
- [173] Hilmich, O.: Univerzita Karlova, 2017.