

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie

**Generování hydridů pro speciační
analýzu arsenu atomovou absorpční
spektrometrií**

Diplomová práce

Praha 2006

Milan Svoboda

PROHLÁŠENÍ

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

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

V Praze dne.....

podpis:

Milan Svoboda

Poděkování

Na prvním místě bych chtěl poděkovat všem pracovníkům Oddělení stopové prvkové analýzy Ústavu analytické chemie Akademie Věd České republiky, Vídeňská 1083, 14220 Praha 4, kde byla tato práce vypracována, jmenovitě panu RNDr. Jiřímu Dědinovi, CSc. vedoucímu tohoto pracoviště a mému školiteli za přístup k řešení problémů týkajících se nejen této práce, díky kterému jsem byl začleněn do tohoto vědeckého týmu a také za velkou dávku trpělivosti. Panu Mgr. Tomáši Matouškovi, Ph.D. za vstřícnost k řešení problémů, vědeckou spolupráci a bohatou výměnu informací. Dále dámám RNDr. Vlastě Korunové, Anně Selecké a pánovi ing. Miloslavu Vobeckému, CSc., za ochotu diskutovat dílčí problémy, slečně Mgr. Olze Grossové, Mgr. Janu Kratzerovi a Stanislavu Musilovi za vytvoření přátelského prostředí, které je jednou z podmínek úspěšného začlenění do vědeckého týmu, slečně Mgr. Lence Langrové navíc za bohatou výměnu informací.

V neposlední řadě děkuji školiteli panu doc. RNDr. Petru Rychlovskému, CSc. za ochotu a porozumění.

Svým skvělým přátelům, s kterými jsem sdílel špatné i dobré chvíle, a kteří mě neváhali podpořit, kdykoliv bylo třeba.

Neméně vděčně děkuji mé rodině za lásku, péči a vytvoření zázemí, bez nichž by se nemohlo nic z toho uskutečnit...

Nakonec děkuji NIH-FIRCA project No. 1 R03 TW007057-01 (PI: M. Stýblo) a GA ASCR grant číslo: A400310507 za finanční podporu.

Obsah

Seznam zkrátek a symbolů	5
Úvod	6
1 Teoretická část.....	7
1.1 Arsen	7
1.1.1 Výskyt	7
1.1.2 Sloučeniny arsenu	7
1.1.3 Toxicita.....	8
1.2 Generování a atomizace hydridů pro AAS	9
1.2.1 Generování hydridů.....	9
1.2.1.1 Metody přímého přenosu	10
1.2.1.2 Metody kolejční.....	11
1.2.1.3 Redukční činidla.....	11
1.2.2 Atomizace hydridů	12
1.2.2.1 Difúzní plamen a grafitový atomizátor	12
1.2.2.2 Atomizátory typu křemenné trubice.....	12
1.2.3 Interference.....	16
1.3 Speciacie arsenu pomocí generování hydridů	16
1.3.1 Selektivní generování hydridů	17
1.3.2 Generování substituovaných hydridů	18
2 Experimentální část	19
2.1 Přístrojové vybavení.....	19
2.2 Chemikálie	21
2.3 Použité generátory hydridů	22
2.3.1 Pro měření s Perkin Elmer 503	22
2.3.2 Pro měření s Analyst 800, Perkin Elmer	23
2.4 Kryogenní past	24
2.5 Atomizátor.....	27
2.6 Zpracování naměřených dat	27
2.6.1 Software	27
2.6.2 Statistické vyhodnocení.....	27
2.7 Popis experimentů	29
2.7.1 Měření na PerkinElmer 503	29
2.7.2 Měření na Perkin Elmer Analyst 800	29
2.7.3 Způsoby vyhodnocení signálů v uspořádání s kryogenní pastí	31
3 Výsledková část a diskuse.....	33
3.1 Optimalizace podmínek pro selektivní generování iAs(III) a iAs(V).....	33
3.1.1 Kalibrační grafy.....	33
3.1.2 Vliv koncentrace kyseliny chlorovodíkové.....	34
3.1.3 Vliv velikosti reakční cívky	35
3.1.4 Shrnutí výsledků selektivního generování iAs(III) a iAs(V)	36
3.2 Vliv jednotlivých parametrů na LOD.....	37
3.2.1 Šum lampy a detektoru.....	37
3.2.2 Studium tvaru paprsku EDL.....	38
3.2.3 Příspěvek stínění paprsku atomizátorem k šumu	40
3.2.4 Příspěvek podmínek atomizace k šumu	41
3.3 Generování dávkováním do proudu	42
3.4 Generování substituovaných hydridů z iAs(III), MMA(V), DMA(V) - optimalizace	45
3.4.1 Vliv "BOC time" na opakovatelnost signálů.....	45

3.4.2 Vliv L-cysteinu na signál	46
3.4.3 Optimalizace průtoku helia při volatilizaci	48
3.5 Generování substituovaných hydridů - opakovatelnost chromatogramů	49
3.6 Generování substituovaných hydridů – LOD.....	51
3.7 Srovnání dosažených LOD s literaturou	53
4 Závěr.....	56
Seznam použité literatury	57

Seznam zkratek a symbolů

A	absorbance
AAS	atomová absorpční spektrometrie
A_i	i-tá hodnota absorbance
As	arsen
c	konzentrace
HPLC-ES-MS	spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostním detektorem s elektrosprejem
HPLC-ICP	spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie s indukčně vázaným plazmatem jako detektorem
HPLC-MS	spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostním detektorem
i.d.	vnitřní průměr
LOD	mez detekce (detekční limit)
Mr	relativní hmotnost
n	počet měření
o.d.	vnější průměr
PMMA	polymetylmetakrylát (plexisklo)
PP	polypropylen
PTFE	polytetrafluorethylen (teflon)
s	směrodatná odchylka
$s_r(\%)$	relativní směrodatná odchylka v procentech
t	čas (s)
T	teplota ($^{\circ}\text{C}$)
t_r	retenční čas (s)
txt soubor	textový soubor obsahující data ve formě číselných hodnot
v	výška píku
$w_{1/2}$	šířka píku v polovině výšky (s)
\bar{x}	aritmetický průměr
x_i	i-tá hodnota (výsledku)

Úvod

V průběhu několika posledních desetiletí je kladen důraz na sledování způsobu účinku arsenu a jeho sloučenin na lidský organismus. Bylo zjištěno, že arsen a většina jeho sloučenin jsou toxické látky at' už akutně či chronicky ve velmi malých množstvích a že arsen je i silný karcinogen. Sloučeniny arsenu způsobují rakovinu kůže, močového měchýře, ledvin, plic apod.

Obecným cílem této práce bylo přispět k vývoji metody pro speciální tří- a pětimocných metylovaných metabolitů anorganického arsenu v komplexních biologických matricích. Vývoj této metody, založené na selektivním generování metylsubstituovaných arsanů a na detekci atomovou absorpční spektrometrií, patří k hlavním záměrům řešeným na oddělení stopové prvkové analýzy Ústavu analytické chemie AV ČR. Vývoj je podporován projekty NIH-FIRCA project No. 1 R03 TW007057-01 (společný projekt Ústavu analytické chemie AV ČR a University of North Carolina v Chapel Hill) a GA AV ČR grant číslo: A400310507.

Konkrétními úkoly této diplomové práce bylo:

- (i) Posoudit možnost speciační analýzy tří- a pětimocných arsenových sloučenin selektivním generováním hydridů založeném na kontinuálním generování a na selekci generování z vyššího a nižšího oxidačního stupně volbou pH reakčního prostředí.
- (ii) Identifikovat faktory ovlivňující detekční limit speciační analýzy založené na kombinaci selektivního generování a generování metyl substituovaných arsanů a na atomizaci v křemenných atomizátorech pro atomovou absorpční spektrometrii a tím přispět k významnému snížení detekčních limitů.

1 Teoretická část

1.1 Arsen

1.1.1 Výskyt

Arsen není v zemské kůře příliš hojně zastoupen, i když tvoří hlavní složku některých minerálů. Průměrný obsah je přibližně 2 mg/kg. Vyskytuje se v několika alotropických modifikacích. Ze tří krystalických forem je nejběžnější kovový, šedý arsen s romboedrickou mřížkou (α - modifikace). Minerály arsenu jsou rozšířeny po celém světě a v malém množství byl arsen nalezen také ve volném stavu¹.

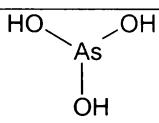
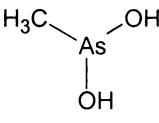
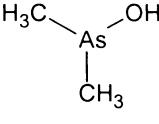
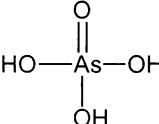
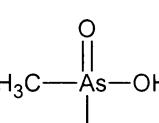
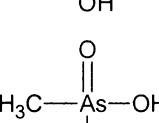
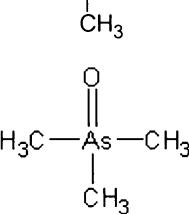
Nejvýznamnějšími zdroji arsenu a jeho sloučenin na zemi jsou sedimenty, které jsou vymývány podzemní vodou². Samozřejmě arsen a jeho sloučeniny jsou produkovány také lidskou činností. Příkladem je používání různých insekticidních, fungicidních prostředků obsahující arsen v různé podobě³. V průmyslovém měřítku se kovový arsen získává tavením loellingitu ($FeAs_2$) nebo arsenopyritu ($FeAsS$). Při technologiích na výrobu mědi a olova vzniká oxid arsenitý jako létavý prach a je nejvýznamnějším průmyslovým zdrojem arsenu.¹

1.1.2 Sloučeniny arsenu

Mezi anorganické sloučeniny arsenu patří sulfidy, oxidy, arsenitany, arseeničnany apod., ale existuje i velká skupina organických sloučenin jako jsou arsenocukry, organické kyseliny, jejich estery a soli, atd.

Přehled sloučenin arsenu tvořících těkavé hydridy a relevantních k této práci se zjednodušenými strukturálními vzorci (nejsou prostorové) uvádí tab. 1.1.

Tab. 1.1: přehled relevantních sloučenin

Zkratka užívaná v textu práce	Sloučenina	Sumární vzorec	Strukturní vzorec
iAs (III)	Trihydrogenarsenitá kyselina	H ₃ AsO ₃	
MMA (III)	Methylarsenitá kyselina	CH ₅ AsO ₂	
DMA (III)	Dimethylarsenitá kyselina	C ₂ H ₇ AsO	
iAs (V)	Trihydrogenarseničná kyselina	H ₃ AsO ₄	
MMA (V)	Methylarseničná kyselina	CH ₅ AsO ₃	
DMA (V)	Dimethylarseničná kyselina	C ₂ H ₇ AsO ₂	
TMAO (V)	Oxid trimethylarseničný	C ₃ H ₉ AsO	

1.1.3 Toxicita

Existují velké rozdíly v toxicitě jednotlivých specií. Obecně organické sloučeniny arsenu jsou podstatně méně toxické než sloučeniny anorganické. Trojmocné soli jsou lépe rozpustné, nestálé a více toxické než pětimocné sloučeniny. Toxicita je úzce spojena s mobilitou ve vodě a tělních tekutinách. Toxicita arsenových sloučenin klesá v řadě arsan a jeho deriváty > anorganické arsenitany > organické trojmocné sloučeniny > anorganické arseničnany > organické pětimocné sloučeniny > arsoniové sloučeniny > elementární arsen. Arsenobetain a arsenocholin jsou považovány za netoxické. Koncentrace arsenu a jeho

sloučenin, která je obvykle toxiccká pro rostliny a půdní organismy není ještě toxiccká pro zvířata a člověka.⁴

1.2 Generování a atomizace hydridů pro AAS

Metodami atomové absorpcní spektrometrie lze stanovit většinu prvků periodické tabulky.⁵ Generování hydridů je založené na redukci analytu na hydrid v kapalné fázi, na jeho převedení do plynné fáze a na následné atomizaci v optické cestě. Výhodou této techniky je separace analytu od matrice a jeho vyšší koncentrace v absorpcním prostředí ve srovnání s klasickými metodami atomové absorpcce. To vede ke zvýšení citlivosti a k výraznému omezení interferencí.⁶

Techniku generování hydridů je možné využít pro tzv. hydridotvorné prvky: antimon, arsen, bismut, cín, germanium, olovo, selen a tellur^{5,6}. Bylo dokonce popsáno generování hydridů india a thalia⁷.

Procedura stanovení prvků tvořících těkavé hydridy se skládá ze dvou kompletně nezávislých kroků – generování hydridu a atomizace hydridu.⁶

1.2.1 Generování hydridů

Generování hydridu se skládá ze dvou fází. První je redukce analytu v kapalné fázi na hydrid a jeho převedení do plynné fáze. Druhá fáze zahrnuje transport hydridu do atomizátoru a může zahrnovat i kolekci hydridu. Termín hydridový generátor označuje celou aparaturu, kde dochází k těmto procesům.⁷

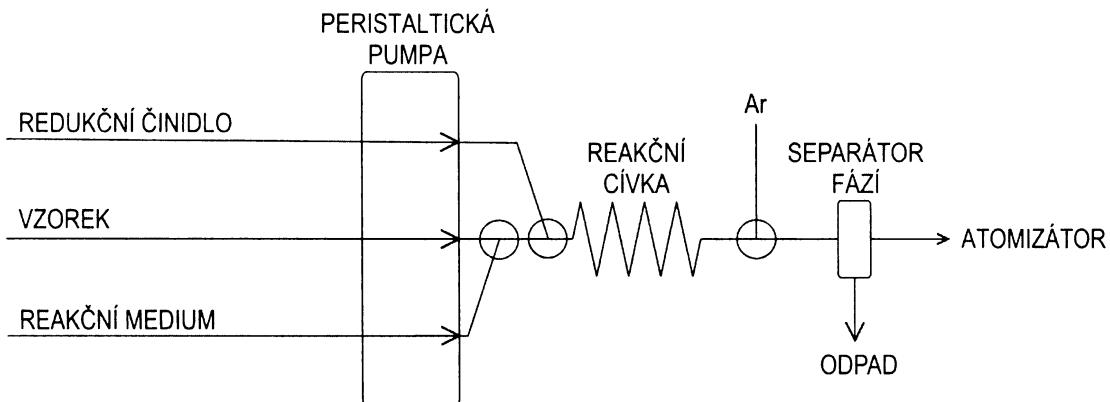
Pro generování hydridů lze využít dva základní přístupy a to přímého přenosu kdy je hydrid uvolněný z reakční směsi přímo veden do atomizátoru a kolejce kdy je hydrid shromážděný v části aparatury k tomu určené převeden do atomizátoru najednou až po ukončení reakce.⁸

1.2.1.1 Metody přímého přenosu

Mezi metody přímého přenosu patří kontinuální generování, dávkování do proudu a dávkové uspořádání.^{6, 9}

Principem **kontinuálního generování** je nejprve kontinuální míchání vzorku a reakčního media, poté i redukčního činidla a zreagování reakční směsi v reakční cívce. Plynná a kapalná fáze této reakční směsi je kontinuálně oddělena v separátoru fází, plynná postupuje směrem k atomizátoru, kapalná je odtahována jako odpad. Většinou před vstupem do separátoru fází se přidává nosný plyn.

Cílem kontinuálního uspořádání je dosažení ustáleného stavu. Citlivost při použití kontinuálního generování stoupá se stoupajícím průtokem hydridu a s klesajícím celkovým průtokem plynů z generátoru do atomizátoru. Pro vyhodnocení se používá výška signálu.⁷ Schéma kontinuálního uspořádání s nosným plynem argonem (Ar) ukazuje obr.1.1.



Obr. 1.1: schéma kontinuálního uspořádání, Ar-nosný plyn (argon)

Metoda **dávkování do proudu** se liší od kontinuálního uspořádání dávkováním vzorku do proudu nosného média, které je čerpáno ve třetím kanálu místo kanálu pro vzorek u kontinuálního uspořádání. Výsledný signál má tvar píku se strmou náběhovou hranou a s protaženou sestupovou hranou.⁶ Výška signálu je menší oproti kontinuálnímu generování díky disperzi v kapalné i plynné fázi.⁸

Dávkové uspořádání spočívá v redukcí dávky kapalného vzorku. Dávkový generátor tvoří nádoba, která plní funkci reaktoru a zároveň také separátoru fází. Ke vzorku v dávkovém generátoru je, peristaltickou pumpou nebo injekční stříkačkou, přidáno redukční činidlo. Výsledný signál má tvar píku. Stejně jako u metod kontinuálního generování a dávkování

do proudu je výška signálu přímo úměrná průtoku hydridu a klesá se stoupajícím celkovým průtokem plynů.⁸

1.2.1.2 Metody kolekční

Kolekční metody spočívají v zachycování (kolekci) analytu v určité části k tomu uzpůsobené aparatury. Kolekce může být tlaková (v poslední době téměř nepoužívaná)⁶, vymrazováním^{6,10,11,12,13} s použitím absorpčního media^{7,14,15} nebo tzv. „in situ“ kolekce^{16,17,18}.

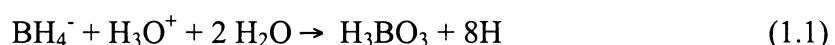
Při **kolekci vymrazováním** je hydrid zachycen v U-trubici ponořené do kapalného dusíku. Po skončení redukce se U-trubice ohřeje a hydrid je proudem plynu veden do atomizátoru. Výstupní signál je opět píkového tvaru.⁶ Pro kolekci je možné použítí křemenné U-trubice naplněné tělisky (křemenná vata¹⁹, skleněné kuličky²⁰) nebo chromatografickou náplní^{10,11,12,21}

Příkladem **kolekce v absorpčním mediu** je použití pevného nebo kapalného absorpčního média, na kterém se nejdříve analyt nakoncentruje a poté je z analytu zachyceném v absorpčním médiu generován hydrid.^{7,14}

„In-situ“ **kolekce** je využívaná hlavně u grafitových atomizátorů, ale lze ji uplatnit i při kolekci na křemenném skle při vysokých teplotách kdy průtokem vodíku křemennou pastí řídíme kolekci i uvolnění analytu do atomizátoru^{16,17,22}.

1.2.1.3 Redukční činidla

Jako redukční činidlo je v současnosti nejpoužívanější tetrahydroborat sodný nebo draselný^{23,24} stabilizovaný hydroxidem sodným nebo draselným⁷. Redukce analytu probíhá nejčastěji v kyselém prostředí. Dle donedávna přijímané teorie „nascentního vodíku“ analyt reaguje s nascentním vodíkem vzniklým rozkladem tetrahydroboratu za vzniku příslušného hydridu (viz rovnice (1.1) a (1.2))^{23,24,25}.



Podle nejnovějších poznatků dochází v kyselém prostředí k postupné hydrolyze tetrahydroboratu. Konečnými produkty jsou kyselina trihydrogenboritá a vodík. Analyt je postupně redukován meziprodukty hydrolyzy tetrahydroboratu na příslušný hydrid.^{23,24}

Empiricky byla zjištěna nutnost použití tetrahydroboratu v několika řádovém nadbytku vůči analytu. Přebytek vznikajícího vodíku usnadňuje uvolnění analytu z kapalné reakční směsi.⁷

1.2.2 Atomizace hydridů

Pro atomizaci hydridů se používají: difúzní plamen inertní plyn - vodík, grafitový atomizátor, plamínek v křemenné trubici nebo vyhřívaná křemenná trubice.^{6,7}

1.2.2.1 Difúzní plamen a grafitový atomizátor

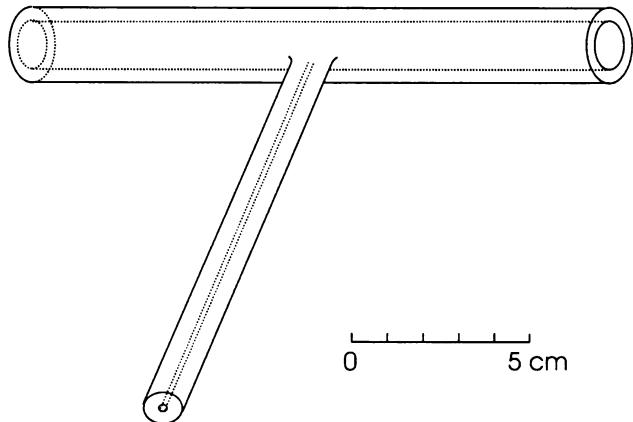
Při atomizaci v difúzním plameni jsou hydridy uvolněné v generátoru neseny proudem inertního plynu přímo do plamene. Jeho nevýhodou je nízká citlivost a oproti jiným atomizátorům používaných k atomizaci hydridů, vysoká nespecifická absorpce a proto se v současnosti používá jen vyjímečně.^{6,26} Pro atomizaci v grafitových atomizátorech existují dva přístupy: „in situ“ kolekce a „on-line“ atomizace. „In situ“ kolekce využívá grafitové kyvety

pro kolejci hydridu i pro jeho atomizaci. Kolekční teplota je v rozmezí 300 - 600°C a teplota atomizace obvykle 2000°C^{6,7}

1.2.2.2 Atomizátory typu křemenné trubice

Atomizátor typu plamínek v křemenné trubici (dále jen FIT) je tvořen plamínkem kyslík-vodík s velkým přebytkem vodíku, hořícím v jinak nevyhřívané trubici. Atomizátor se obvykle skládá z T-trubice a vstupní části připojené zábrusem. Obě části jsou z křemenného skla.^{6,7}

Vyhřívaná křemenná trubice (dále jen QTA) (Obr. 1.2) je v současnosti nejpoužívanější hydridový atomizátor. Jedná se o křemennou trubici ve tvaru T, s vodorovnou částí umístěnou do optické osy a vyhřívanou plamenem nebo elektricky pomocí odporového drátu. Hydrid je přiváděn proudem nosného plynu do optické trubice přívodním ramenem. Konce optické trubice jsou otevřené nebo uzavřené křemennými okénky. Teplota vyhřívání křemenného atomizátoru je omezená tepelnou odolností křemene (asi 1100°C) nicméně optimální citlivosti pro hydridy arsenu, bismutu, olova, antimonu, selenu, cínu a telluru se dosahuje mezi $800\text{-}1000^{\circ}\text{C}$.⁶



Obr. 1.2: klasický křemenný atomizátor (QTA)

Základní nedostatky QTA, jmenovitě: nízká odolnost vůči atomizačním interferencím a nedostatečná linearita kalibračních závislostí, jsou způsobeny tím, že v podstatné části optické trubice QTA nejsou vodíkové radikály.

1.2.2.3 Mechanismus atomizace hydridů v křemenných atomizátorech

V oblaku radikálů vzniklého reakcí kyslíku a vodíku v atomizátoru dochází atomizaci reakcí mezi radikálem vodíku s hydridem analytu např. arsenu dle následujících rovnic⁷:

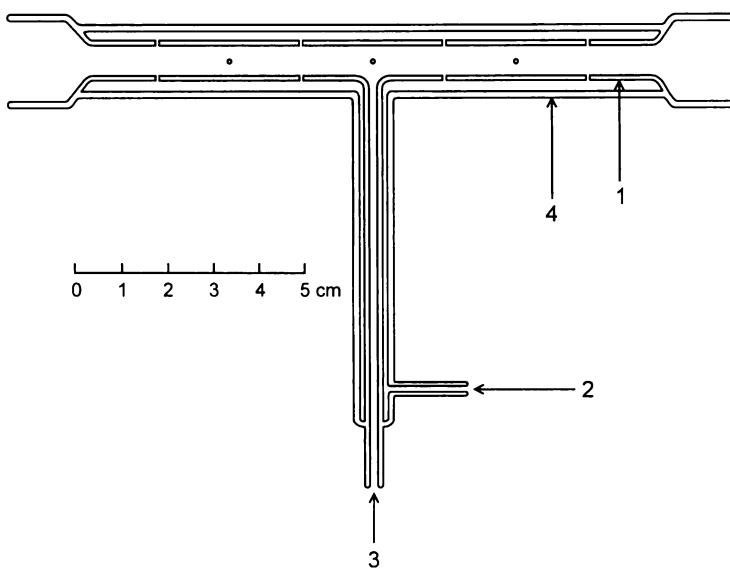


Experimentálně bylo dokázáno, že hydridy nemohou být atomizovány v křemenných atomizátorech bez přítomnosti vodíku^{27, 28, 29, 30, 31}. Zásobování vodíkem je v metodách přímého přenosu zabezpečeno rozkladem tetrahydroboratu v kyselém prostředí. Dosavadní pozorování mechanismu atomizace hydridů arsenu dokazují, že poměr kyslíku a vodíku v atomizátoru musí být udržován pod 0,5^{32, 33}. Přesné umístění oblaku vodíkových radikálů závisí na tvaru atomizátoru, teplotním profilu, průtoku nosného plynu. Protože pravděpodobnost tvorby volných atomů analytu je úměrná počtu srážek s vodíkovými radikály, atomizační účinnost lze zvýšit zvětšením hustoty vodíkových radikálů. V QTA vzniká oblak radikálů na začátku vyhřívaného místa atomizátoru reakcí mezi vodíkem a kyslíkem podobně jako ve FIT⁷. Jinak je tomu v tzv. multiatomizátoru.

Multiatomizátor je dvouplášťový externě vyhřívaný atomizátor. Jeho funkci objasňuje obr. 1.3. Horizontální rameno multiatomizátoru se skládá ze dvou koncentrických trubic a je zvenčí vyhříváno na teplotu 700 °C až 1100 °C. Vnitřní koncentrická trubice odpovídá optické trubici QTA atomizátoru, na rozdíl od něj je však děrovaná. Do prostoru mezikruží mezi koncentrickými trubicemi, je přiváděn kyslík (vzduch), odkud otvory v optické trubici vstupuje do jejího vnitřního objemu. K přívodu hydridu z generátoru slouží stejně jako u QTA kolmé přívodní rameno ve střední části horizontálních trubic. Na vstupu kyslíku do optické trubice, tj. v blízkosti každého otvoru, dochází reakcím kyslíku s přítomným vodíkem k tvorbě vodíkových radikálů.

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

Dosavadní způsob provedení multiatomizátoru je na obr. 1.3. V optické trubici má čtrnáct rovnoměrně rozložených otvorů o velikosti přibližně 0,5 mm. Použití tohoto multiatomizátoru podstatně snižuje nevýhody běžných jednoplášťových křemenných atomizátorů. Při zachování vynikající citlivosti se podstatně zvýší toleranční limit k atomizačním interferencím, tj. koncentrace interferentu, která způsobí 10% změnu signálu. Např. toleranční limit k interferenci arsenu při stanovení selenu se zvýšil nejméně o jeden řád. Lineární dynamický rozsah kalibrační závislosti pro selen se rozšířil k dvacetinásobně větším koncentracím.



Obr. 1.3: multiatomizátor; 1 – vnitřní trubice i.d. 6 mm, 2 – vstup pro vzduch nebo kyslík, 3 – vstup nosného plynu s analytem, 4 – vnější trubice i.d. 8 mm, délka optické trubice i se spojenými zakončeními 16 cm, délka optické trubice bez spojených zakončeních 12 cm

Odolnost současného multiatomizátoru vůči atomizačním interferencím je sice o jeden až dva řády vyšší ve srovnání s QTA, avšak stále o dva řády nižší než atomizátoru typu difúzního plaménku, ve kterém je celý pozorovaný prostor vyplněn vodíkovými radikály. Snížená odolnost vůči atomizačním interferencím multiatomizátoru je pravděpodobně způsobena tím, že vodíkové radikály nevyplní prostor optické trubice zcela. V místech bez výskytu vodíkových radikálů, kam nedosahují obláčky radikálů tvořené v jednotlivých otvorech stěny optické trubice, může docházet k zániku volných atomů analytu, což má za následek interference a zakřivení kalibračních závislostí.³⁴

1.2.2.4 Vliv kyslíku na atomizaci

Kyslík potřebný pro vznik radikálů v QTA se dostává do atomizačního procesu díky rozpuštěnému kyslíku v použitych chemikáliích, netěsnostem v aparatuře, ale i difúzí přívodními hadičkami. Obecně se požadavky na kyslík snižují se zvyšující se teplotou, snižujícím se průtokem nosného plynu a zmenšováním průměru přívodního ramena atomizátoru.⁷ U multiatomizátoru je zásobování zajištěno přívodem kyslíku (vzduchu) mezi vnější a vnitřní koncentrickou trubici.³⁵

1.2.3 Interference

Díky separaci analytu od matrice, nejsou v AAS při generování hydridu spektrální interference závažným problémem. Nespecifická absorpce je snadno kompenzovatelné.

Nespektrální interference se projevují v kapalné fázi, při redukci analytu na hydrid a při uvolnění hydridu z roztoku, a v plynné fázi, převážně v atomizátoru. Charakteristickým rysem nespektrálních interferencí je, že na rozdíl od spektrálních interferencí nejsou aditivní, tzn. lze je tudíž korigovat technikou přídavků. Zpravidla jsou způsobeny složkou matrice, která je vzhledem k analytu ve velkém nadbytku. Interference je potom kineticky procesem prvního rádu a její rozsah nezávisí na koncentraci analytu, ale na koncentraci interferentu. Obecně platí, že nebezpečí interferencí je vyšší, když nejsou dodrženy optimální podmínky při generování a atomizaci hydridu analytu a proto je nalezení optimálních podmínek základním předpokladem omezení interferencí.

Interference v kapalné fázi jsou způsobeny snížením účinnosti uvolnění hydridu některou složkou matrice.

Interference v plynné fázi jsou obvykle způsobeny těkavými látkami unikajícími z reakční směsi, eventuelně drobnými kapičkami rozprášenými při reakci v generátoru. Zdaleka nejobvyklejším zdrojem interferencí v plynné fázi jsou ostatní hydridy⁶. Pro interference hrají roli i velikost, design a teplota atomizátoru a množství kyslíku v atomizátoru.⁷

1.3 Speciace arsenu pomocí generování hydridů

Generování hydridů lze pro speciační analýzu využít třemi způsoby:³⁶

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

Jelikož post-kolonové generování hydridů není využito pro účely této práce, není dále zmiňováno.

1.3.1 Selektivní generování hydridů

Pro charakterizaci selektivního generování hydridů lze využít následujícího schématu:

generování hydridu → atomizace/detekce

Speciační analýza tímto přístupem je založena na odlišné účinnosti konverze jednotlivých forem analytu (specií) na hydrid. Obvykle se nejdříve vygeneruje jen hydrid z analytu v nižším oxidačním čísle a poté se z dalšího alikvotu vzorku generuje hydrid z analytu v obou oxidačních číslech. Toho lze dosáhnout vhodnou volbou podmínek generování.

Tohoto přístupu lze využít při generování například antimonu (III a V), arsenu (III a V), selenu (IV a VI), telluru (IV a VI). Pro detekci lze zvolit i jinou metodu než atomovou absorpční spektrometrii.³⁶

Při selektivním generování arsenu lze vhodnou volbou pH (koncentrace kyseliny chlorovodíkové, použití pufru) řídit účinnost generování hydridu z analytu v různých oxidačních číslech. V jednom alikvotu se při určitém pH (přibližně 6) vygeneruje hydrid z oxidačního čísla analytu III⁺ a poté změnou pH (přibližně 0) se generuje hydrid z oxidačních čísel analytu III⁺ i V⁺ a tím se získá celkový obsah arsenu. Obsah arsenu v oxidačním čísle V⁺ se dopočítá.^{37, 38}

Místo volby pH lze založit selektivní generování na předredukci pětimocných forem arsenu na trojmocné vhodným redukčním činidlem jako je L-cystein. Pětimocné formy arsenu ve vzorku zreagují s L-cysteinem na As(III) a spolu s As(III) přítomného ve vzorku před redukcí se vygenerují v podobě arsanu a tím se získá celkový obsah arsenu. Poté stačí vygenerovat pouze trojmocnou formu arsenu přítomnou ve vzorku před redukcí L-cysteinem a pětimocná forma je dopočtena.

Jako redukční činidla na předredukci lze použít i thioglykolovou kyselinu¹¹ nebo jodid draselný³⁹.

1.3.2 Generování substituovaných hydridů

je charakterizováno tímto schématem:

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

Speciační analýza založená na generování substituovaných hydridů je použitelná v případech, kdy jednotlivé formy analytu mohou být převedeny na různé alkyl substituované hydridy. Typickou aplikací je speciace iontových alkyl sloučenin typu $R_nA^{+(m-n)}$, kde m je valence analytu A a n je mezi 1 a $m-1$ a R je alkyl substituent. Výsledkem generování je směs alkyl substituovaných hydridů sumárního vzorce $R_nAH_{(m-n)}$ s příslušným binárním hydridem AH_m . Směs hydridů je separována a nalezené zastoupení jednotlivých hydridů pak udává zastoupení analyzovaných forem analytu. Tento přístup je užitečný pro speciační analýzu methyl substituovaných As, Sb a Ge forem, methyl a butyl substituovaných Sn forem a methyl, ethyl a butyl substituovaných Pb forem.³⁶

Vygenerovaná směs hydridů je prekoncentrovaná vymrazováním. Následně, po ohřevu, jsou zachycené hydridy uvolněny a separovány. Obvykle se používá křemenné kolony naplněné chromatografickou náplní. Kolona je v kolekční fázi ponořena do kapalného dusíku.

Pro detekci je prakticky výhradně používána AAS, ačkoliv principiálně použitelná je jakákoli atomově spektrometrická metoda.³⁶

Spojením selektivního generování hydridů s generováním substituovaných hydridů je možné získat účinný systém ke speciaci arsenových sloučenin uvedených v tab. 1.1 .

2 Experimentální část

2.1 Přístrojové vybavení

Tab. 2.1: použité AAS spektrometry a části generátorů hydridů

	<i>Perkin Elmer 503</i>	<i>Aanalyst 800, Perkin Elmer</i>
Prvek	As	As
Vlnová délka analytické čáry	193,7	193,7
Lampa	Bezelektrodová výbojka (Perkin Elmer systém 1)	Bezelektrodová výbojka (Perkin Elmer systém 2)
Nastavení buzení lampy	8 W	379 mA
Šířka spektrálního intervalu (nm)	0,7	0,7
Korekce pozadí	-	Deuteriová (pokud uvedeno v textu)
Detektor	fotonásobič	„solid state“
Záznam signálu	Analogový - zapisovač Perkin Elmer 56	Digitální - soubory s příponou TXT a ASCI
Software pro ovládání spektrometru	-	Aawinlab 4.1, Perkin Elmer instruments LLC.
Separátory fází	Skleněný s nuceným odtahem	Z PP a PMMA, s nuceným odtahem
Peristaltické pumpy	Reglo Digital (Ismatec, Switzerland) čtyřkanálová	FIAS 400 (Perkin Elmer, Germany)
Čerpací hadičky-materiál		Tygon

Tab. 2.2: trubice použité při sledování vlivu průměru a délky optické trubice na signál z lampy

Materiál trubice	i.d./délka (mm)
Keramika	16/12
Keramika	8,8/15,6
Keramika	6,1/16
Křemenné sklo	6,3/15,9
Křemenné sklo	5,9/16
Křemenné sklo	10/14,7

Tab. 2.3: ostatní použitá zařízení

Regulace průtoku plynů	Hmotnostní průtokoměry Omega (Stamford, USA), Rotametr FM 042–15, Cole Parmer, USA
Digitální průtokoměr pro kapaliny	Digital Calibrator, Humonics, Agilent Technologies, USA
Digitální průtokoměr pro plyny	Digi Sense Thermocouple Thermomether model 8528 – –20, Cole Parmer, USA
Sušící trubice	Nafionová membrána, délka 22 cm, i.d. 2 mm, průtok N ₂ jako sušidla 500 ml/min
Clona	S nastaviteľným otvorem: kovová, nejmenší průměr 2,2 mm a největší průměr 16,8 mm Fixní: čtvercová z černého papíru, (10x10 cm) s vyříznutým okénkem 2x2 cm
Odporový drát k využívání kryogenní pasti	Ni80-Cr20, o.d. 0,6 mm, Omega engineering, inc., Stamford
Termočlánek	Omega, USA (KMTXL-020G-12)

2.2 Chemikálie

deionizovaná voda připravená zařízením Ultrapur firmy Watrex, USA

HCl p.a. 37% Merck, Darmstadt, Germany, pracovní koncentrace 1 mol/l, pokud jiná je uvedeno u konkrétního experimentu

KOH čistý, Lach-Ner, s.r.o., Neratovice, ČR

NaBH₄ 97% v tabletách po 2 g, FLUKA, Steinheim, Germany, pracovní roztok 1% NaBH₄ v 0,1 % KOH

1000 mg/l As^{III} v HNO₃ připraveno z As₂O₃, NaOH a HNO₃, pH ≈ 3, FLUKA, Steinheim, Germany

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

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

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

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

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

0,75 mol/l TRIS pufr (pH = 6), rozpuštění 11,8200 g Trizma hydrochloridu (NH₂C(CH₂OH)₃.HCl; Mr = 157,6; Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) a doplnění na 100 ml

L-cystein hydrochlorid (C₃H₈ClNO₂S · H₂O; Mr = 176; Merck, Darmstadt, Germany)

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

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

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

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

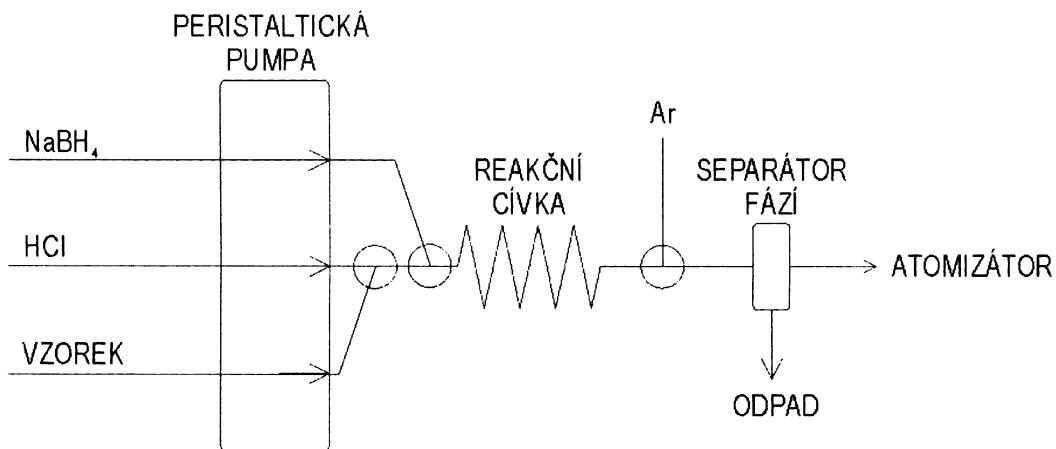
vodík čistoty 99,95 %, SIAD, Praha, ČR

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

2.3 Použité generátory hydridů

2.3.1 Pro měření s Perkin Elmer 503

bylo využito uspořádání pro kontinuální generování znázorňuje obr. 2.1.



Obr. 2.1: schéma kontinuálního generování

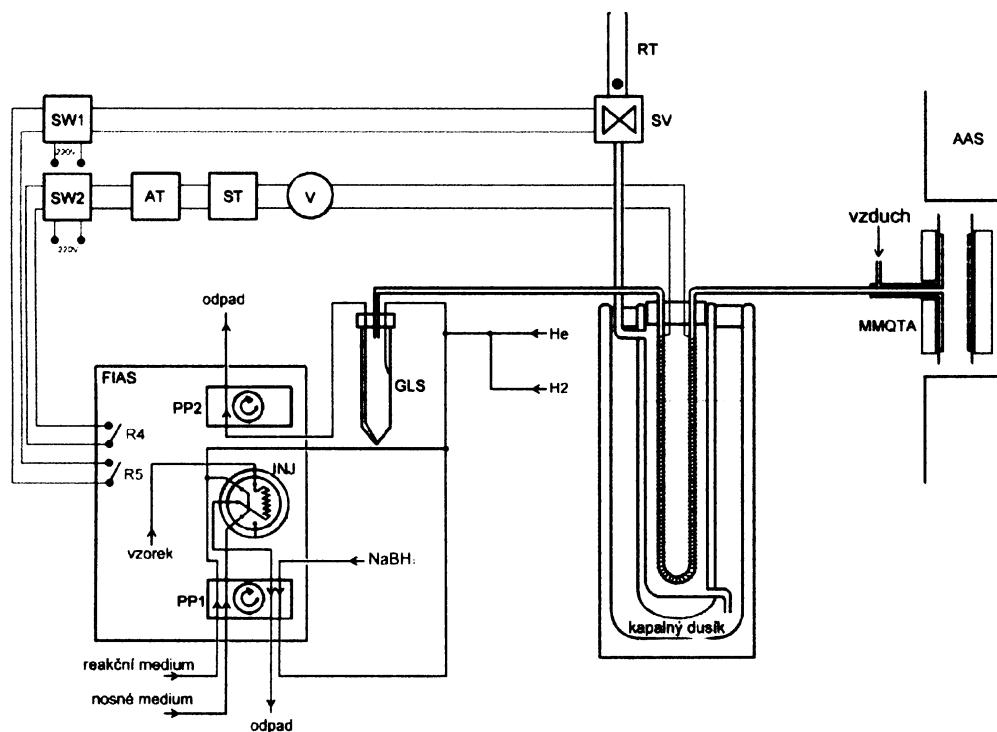
Kanálem pro vzorek (viz. obr. 2.1) byl čerpán pracovní standard, který byl v případě měření slepého vzorku nahrazen kyselinou chlorovodíkovou, o stejné koncentraci jako v kanálu pouze pro kyselinu chlorovodíkovou (koncentrace uvedena u experimentu). Po smíchání kyseliny chlorovodíkové a vzorku v prvním T-spoji byl ještě přimíchán v dalším T-spoji 1% tetrahydroborat sodný stabilizovaný hydroxidem draselným o koncentraci 0,1 %. Každá z těchto tří reagencií byla čerpána rychlosí 1ml/min peristaltickou pumpou znázorněnou ve schématu. Druhá peristaltická pumpa (není uvedena ve schématu) byla využita na odtah odpadu ze separátoru fází. K čerpání reagencií byly použity tygonové hadičky o i.d. 0,64 mm a k odtahu odpadu tygonová hadička o i.d. 2,4 mm. Po zreagování v teflonové reakční cívce, jejíž velikost byla také předmětem výzkumu (velikost udána u každého experimentu), byl k reakční směsi přimíchán nosný plyn argon pomocí dalšího teflonového T-spoje průtokem 50 ml/min (teflonovou hadičkou i.d. 0,5 mm). Průtok byl ovládán hmotnostním průtokoměrem (viz. „Přístrojové vybavení“). V separátoru fází došlo k oddělení plynné fáze od kapalné. Plynná fáze postupovala k atomizátoru a kapalná byla odtahována jako odpad. Odtahování kapaliny bylo nastaveno tak (přibližně 3 ml/min), aby nedocházelo k velkým ztrátám plynné směsi.

Konstrukce separátoru odpovídá separátoru s nuceným odtahem s odtahovou hadičkou umístěnou tak, aby v separátoru neustále zůstával objem přibližně 3 ml. Celkový objem tohoto skleněného separátoru byl 10 ml.

Průtok kapalin byl pravidelně ověřován digitálními průtokoměry. Materiál hadiček, jiných než čerpacích byl teflon o i.d. 1 mm kromě hadiček pro přívod plynů (Ar, vzduch) (i.d. 0,5 mm). Veškeré T-spoje byly z teflonu.

2.3.2 Pro měření s Aanalyst 800, Perkin Elmer

Schéma generátoru napojeného na kryogenní past je uvedeno na Obr. 2.2. Mezi separátor fází a kryogenní past byla ještě vložena sušící trubice, která není pro přehlednost uvedena (viz. „2.1 Přístrojové vybavení“). Materiál hadiček, jiných než čerpacích byl teflon, až na výjimky o i.d. 1 mm.



Obr. 2.2: schéma generátoru s kryogenní pastí, modře vyznačeny cesty kapalin, červeně vyznačeny vodiče, některé části elektrických zařízení a elektricky využívaná míčka pro atomizátor, R₄, R₅ – spínače FIAS, SW1, SW2 – vypínače, AT – autotransformátor, ST – oddělovací transformátor, V – voltmetr, SV – ventil pro řízení hladiny dusíku, RT – rotametr, PP1, PP2 – peristaltické pumpy FIAS, INJ – dávkovací smyčka, GLS – separátor fází z PP a PMMA, MMQTA – multiatomizátor

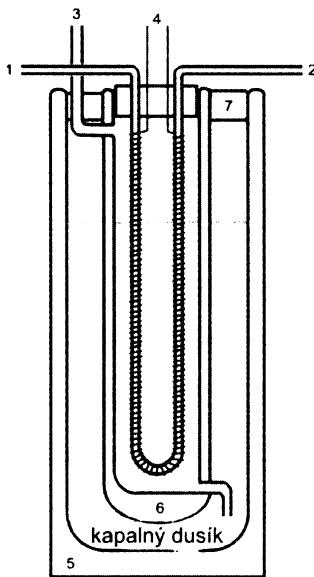
Čerpání reagencií bylo obdobné jako u kontinuálního uspořádání, rychlosť 1 ml/min. Kanálem pro nosné medium byla čerpána deionizovaná voda směrem do dávkovací smyčky (není-li uvedeno jinak objem 0,5 ml), kde vytlačovala předem nadávkovaný objem vzorku/slepého vzorku do T-spoje kde bylo přimícháváno reakční medium 0,75 mol/l TRIS pufr (pH=6). Dalším T-spojem byl přimíchán 1% tetrahydroborat sodný stabilizovaný 0,1% hydroxidem draselným. Tato reakční směs postupovala reakční cívkou o i.d. 1 mm a délce 1 m, která byla umístěna za T-spoj, kde se přimíchával tetrahydroborat (není ve schématu pro přehlednost uvedena), do posledního T-spoje, kde byly přimíchávány nosný plyn - helium průtokem 75 ml/min, a vodík 15 ml/min (odpovídá přibližně teoretickému průtoku vodíku při běžícím generátoru-rozklad tetrahydroboratu). Plynná fáze této reakční směsi se oddělila v separátoru fází s nuceným odtahem (celkový objem 50 ml, odtahová hadička umístěná až u dna) a putovala po oddělení vodních par v sušící trubici do kryogenní pasti a dále do atomizátoru. Použité sušidlo v sušící trubici, které proudilo protiproudě vůči vysušovanému plynu v prostoru mezi vnitřní trubicí polopropustné nafionové membrány (jí prostupuje vodní pára z vysušovaného plynu) a vnější trubicí z teflonu, byl dusík o průtoku 500 ml/min.

Pro generování hydridů metodami přímého přenosu (kontinuální generování a dávkování do proudu) bylo využito separátoru fází, stejného jako ve schématu na obr. 2.1. Uspořádání bylo stejné jako pro selektivní generování hydridů ve spojení s generováním substituovaných hydridů s kryogenní pastí (Obr. 2.2), ale s vypuštěním kryogenní pasti samotné a výměnou již zmíněného separátoru fází. U kontinuálního generování bylo nutno zvětšit dávkovací smyčku kvůli dosažení ustáleného stavu na 5 ml oproti běžně používané 0,5 ml. Průtok nosných plynů byl stejný jako v uspořádání s kryogenní pastí. Čerpání reagencií probíhalo také rychlosť 1 ml/min.

2.4 Kryogenní past

Náplň kryogenní pasti tvořil chromosorb (viz. „Chemikálie“), který byl po nasypání do křemenné U-trubice i.d. 2,5 mm silanizován 100 µl Rejuv-8 nadávkovaného na začátek kolony při průtoku $20 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ helia po 5 hodin. Do obou konců U-trubice byla vložena skelná vata (asi 1 cm v U-trubici) k zabránění vysypání chromosorbu. Ještě před

nasypáním chromosorbu do trubice byla trubice ovinuta odporovým drátem (Ni-Cr, jehož elektrický odpor činil 15 ohmů). Vzdálenost závitů byla maximálně 5 mm a snahou bylo vytvořit závity ve stejné vzdálenosti po celé délce trubice. Vinutí odporového drátu dosahovalo přibližně 50 mm pod ohyb výstupní/vstupní části U-trubice a bylo asi 5 mm nad náplní kolony, aby při zadržení vlhkosti v chromosorbu, bylo možné vlhkost odstranit zapnutím vyhřívání, aby tak nezpůsobila ucpání kolony v dalším speciačním kroku.



Obr. 2.3: uspořádání kryogenní pasti, 1-vstup nosného plynu s analytem ze separátoru fází a sušící trubice, 2-výstup nosného plynu s/bez analytu k atomizátoru, 3-výstup par dusíku s vnitřního prostoru skleněně dvoupláštové nádoby počítacově ovládaným ventilem, 4-elektrické vyhřívání pasti, 5-dvoupláštová nádoba s ochranným plechem, 6-skleněná dvoupláštová nádoba, 7-izolace pěnového polyethylenu s buňkovou strukturou

Tato U-trubice byla umístěna ve speciálně vyrobené skleněné dvoupláštové vakuované nádobě s možností vstupu kapalného dusíku do prostoru vnitřního pláště a zafixována pomocí sanitárního silikonu. Tento celek byl umístěn do další dvoupláštové nádoby ze skla a ochranným pláštěm z plechu. Vrchní část (prostor u hrdel obou dvoupláštových nádob) byla izolována pomocí pěnového polyetylénu s uzavřenou buňkovou strukturou. Uspořádání pasti je dobře znatelné na obr. 2.3.

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

Při vlastním měření se nejdříve nadávkuje vzorek do dávkovací smyčky přitom generátor hydridů „běží“. Poté se nadávkuje vzorek do proudu nosného média, následuje míchání s TRIS pufrem a tetrahydroboratem a tato směs postupuje až do separátoru fází. Během tohoto procesu dochází ke generování hydridu analytu (krok 1 v tab. 2.4). Po vypnutí generátoru hydridů nosný plyn spolu s vodíkem z reakční směsi a z tlakové nádoby unášejí hydrid analytu do kryogenní pasti kde dochází ke kolekci (krok 2 tab. 2.4). Hladina kapalného dusíku dosahuje nejvyšší úrovně (téměř až k poslednímu závitu odporového drátu). Počítačově řízený ventil pro ovládání hladiny kapalného dusíku je otevřený. Poté se tento ventil sepne (uzavře) a zapne se také ohřev pasti a dochází k postupnému uvolnění všech forem s mezikrokem, kde se na 7 s vypne ohřev pasti (krok 3 až 6 tab. 2.4). Ve fázi uvolnění hydridu analytu je třeba past ohřát postupně až na přibližně 110 °C a proto všechn kapalný dusík musí opustit prostor kolem U-trubice. Toho se dosáhne právě uzavřením počítačově ovládaného ventilu. Při postupném ohřevu pasti dochází k nárůstu objemu zplyněného dusíku a ten vytlačí kapalný dusík do vnější dvoupláštové nádoby. Při kroku 6 tab. 2.4 je zapnuta odtahová pumpa, která zreagovanou reakční směs ze separátoru odtáhne do odpadu. Při kroku 7 tab. 2.4 je ohřev vypnut, ventil pro ovládání hladiny dusíku také a past se ochladí na původní teplotu záchytu (trvá déle než 1 s – určena jen pro vypnutí programu). Empiricky bylo zjištěno, že kompletní zchlazení pasti vyžaduje přibližně 2 minuty.

Teplotní program (část programu v Aawinlab 4.1) na ohřev pasti je uveden v tab. 2.4 .

Tab. 2.4: teplotní program pasti

Krok	<i>t</i> (s)	Ventil uzavřen	Ohřev zapnut	Popis děje
1	60			Dochází k záchytu
2	90			
3	20	x	x	
4	35	x	x	Uvolnění hydridu z
5	7	x		pasti
6	40	x	x	
7	1			Ochlazení pasti na teplotu záchytu

2.5 Atomizátor

K atomizaci byl používán multiatomizátor znázorněném na obr. 1.3. Vzduch byl vháněn do multiatomizátoru zvláštním přívodem viz. obr. 1.3 průtokem 35 ml/min a tento průtok řízen hmotnostním průtokoměrem.

Po určité době docházelo k poklesu citlivosti a proto bylo nutné multiatomizátor vyčistit ve směsi kyseliny fluorovodíkové a dusičné v poměru 7:3 po dobu 10 minut.

2.6 Zpracování naměřených dat

2.6.1 Software

K naměření, zpracování a vyhodnocení dat byl používán následující software: Aawinlab 4.1 (Perkin Elmer instruments LLC); Microsoft® Word a Microsoft® Excel 2000 (Microsoft Corporation, USA); Microcal™ Origin® 6.0 (Microcal Software, USA);

2.6.2 Statistické vyhodnocení

Z výsledků opakovaného měření za stejných podmínek odhadneme správnou hodnotu pomocí aritmetického průměru, pro který platí:

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i \quad (2.1)$$

kde n představuje počet provedených paralelních měření sledované veličiny a x_i naměřenou hodnotu sledované veličiny pro v pořadí i -té měření. Aritmetický průměr je nestranným, velmi vydatným odhadem očekávané hodnoty, který téměř úplně odstraňuje vliv náhodných chyb. Není však, zejména pro menší n , příliš robustní.

Charakteristikou náhodné chyby (přesnosti výsledků) měření je tzv. směrodatná odchylka:

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n \left(x_i - \bar{x} \right)^2} \quad (2.2)$$

kde n opět představuje počet provedených paralelních měření sledované veličiny a x_i naměřenou hodnotu sledované veličiny pro v pořadí i -té měření.

Charakteristikou relativní hodnoty náhodné chyby vůči očekávané správné hodnotě je relativní směrodatná odchylka, jež je vyjádřena jako:

$$s_r = \frac{s}{\bar{x}} \text{ resp. v procentech: } s_r (\%) = 100 \frac{s}{\bar{x}} \quad (2.3)$$

Jiným, ovšem méně vydatným a málo robustním odhadem parametru σ (rozptylu) je rozpětí:

LOD byl stanoven jako trojnásobek směrodatné odchylky naměřených hodnot slepého vzorku (IUPAC⁴⁰) získaných z většího počtu měření (10 a více) vztažený na citlivost příslušného módu měření.

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

$$T = \frac{|x_i - \bar{x}|}{s} \sqrt{\frac{n}{n-1}} ; \quad (i) = 1, n \quad (2.4)$$

kde x_i je testovaná hodnota, \bar{x} je aritmetický průměr, T porovnáváme s kritickou hodnotou $T(\alpha, n)$ (viz. tab. 13 uvedené citace), s je směrodatná odchylka ze všech výsledků včetně podezřelého, n je počet výsledků.⁴¹

Pokud není explicitně uvedeno jinak výsledky jsou uváděny jako aritmetický průměr \pm směrodatná odchylka.

2.7 Popis experimentů

2.7.1 Měření na PerkinElmer 503

Na tomto přístroji bylo studováno pouze selektivní generování obou anorganických forem arsenu (oddíl 3.1), k tomu sloužilo výhradně kontinuální generování dle obr. 2.1. Pro uspořádání kontinuálního generování (podmínky viz. „2.3 Použité generátory hydridů“) byl výstupem ustálený stav (absorbanční signál odečítán v okamžiku, kdy dále neroste ani neklesá), kde výškový rozdíl mezi signálem slepého vzorku a standardu byl přímo úměrný koncentraci analytu ve vzorku.

Pokud není explicitně uvedeno jinak, byly použity koncentrace standardů iAs(III) a iAs(V) 20 µg/l. Tyto standardy byly připraveny příslušným ředěním zásobních roztoků (viz. „Chemikálie“).

2.7.2 Měření na Perkin Elmer Analyst 800

Tento spektrometr byl využit pro všechny experimenty kromě těch uvedených ve výsledkové části této práce v kapitole 3.1. Jednalo se modelové experimenty provedené pro posouzení vlivu jednotlivých parametrů na detekční limit, dále pak o přímý přenos hydridů generovaných meodou dávkování do proudu a o generování substituovaných hydridů s kryogenní pastí. Pokud není uvedeno jinak, měření byla prováděna bez deuteriové korekce pozadí (DBC). Detekční limit uváděných metod generování byl stanoven pouze na tomto přístroji. Všechny experimenty prováděné na tomto přístroji byly nastaveny a řízeny programem Aawinlab 4.1. Jedná se kromě ovládání spektrometru o ovládání čerpacích pump, dávkovací cívky, ovládání ventilu na vypouštění dusíku a ohřev pasti.

Pro sledování vlivu i.d. a délky optické trubice na absorbanci a šum byly použity trubice a clona uvedené v oddílu „2.1 Přístrojové vybavení“. Trubice byly upevněny v pícce stejně jako multiatomizátor a obloženy křemennou vatou, aby nedocházelo k průniku paprsku mimo vnitřek trubice. Clona byla upevněna na část pícky kde vstupoval paprsek z lampy. Pícka byla zahřívána na teplotu 100 °C, protože ovládací software spektrometru neumožňuje měřit při teplotě laboratoře. Nejdříve byla nastavena hodnota absorbance volné optické dráhy na nulovou hodnotu, poté umístěna do optické dráhy pícka s trubicí nebo clonou a odečtena hodnota absorbance pomocí softwarového módu „Continuous graphic“. Při vyhodnocení

šumu byl proveden 58s záznam měření signálu, který byl vyexportován z Aawinlab 4.1 jako txt soubor a vyhodnocen pomocí Microsoft Excelu.

Pro sledování tvaru paprsku byla použita clona čtvercového tvaru z černého papíru s vyříznutým okénkem uprostřed, která byla umístěna na podstavec, který při běžných případech sloužil k upevnění pícky. Rovina papíru byla kolmá k optické ose. S tímto podstavcem bylo manipulováno pomocí Aawinlab 4.1, a tím zakrýván paprsek lampy, a odečítána hodnota absorbance pomocí softwarového módu „Continuous graphic“. Clona byla nastavována ve dvou polohách vůči paprsku (v místě zaostření paprsku a 3 cm před místem zaostření) (viz konkrétní experimenty).

Rozpouštědlem pro standardy arsenových sloučenin použité pro přímý přenos hydridů generovaných metodou dávkování do proudu a pro generování substituovaných hydridů s kryogenní pastí byla deionizovaná voda, pro iAs(III) formu s odstraněným kyslíkem probubláváním dusíkem průtokem 500 ml/min po dobu min. 1 hodiny, aby se zabránilo oxidaci na pětimocnou formu rozpuštěným kyslíkem v roztoku. Pokud byla prováděna předredukce standardů arsenových sloučenin L-cysteinem, je to uvedeno u experimentů. V případě že ano, byly standardy redukovány L-cysteinem po dobu 30 minut a to tak, že do odměřeného objemu standardu byla převedena vypočtená hmotnost pevného L-cysteingu tak, aby vznikl 2% roztok.

Pro generování dávkováním do proudu (v režimu přímého přenosu) jehož výsledným signálem byl pík, byla odečítána výška píku přímo z programu Aawinlab 4.1. Jako nosné médium byla používána deionizovaná voda jen u některých experimentů byl použit L-cystein (uvedeno u diskuze konkrétního experimentu).

Pro generování substituovaných hydridů s kryogenní pastí (použití kryogenní pasti, podmínky viz. pododdíl 2.3.2) byl jako výstup chromatogram tzn. vyhodnocovacím parametrem byla v některých případech výška v jiných plocha píku. Výsledný chromatogram byl exportován jako txt soubor pro další vyhodnocení, jelikož software Aawinlab 4.1 nedokázal vypočítat plochu nebo výšku pouze samostatného píku, ale jen signálu v celém čtecím kroku. Plocha nebo výška jednotlivých píků z chromatogramu byla vyhodnocována pomocí programu Microcal Origin nebo Microsoft Excel (viz. pododdíl 2.7.3).

Při této metodě generování vyvstává nutnost použití helia jako nosného plynu. Argon nelze použít jelikož při teplotě kapalného dusíku zkopalňuje. Pro atomizaci je nutný přídavek vodíku, protože při uvolnění hydridu analytu z pasti generátor hydridů „neběží“ a nevzniká tak vodík potřebný pro radikálové reakce v atomizátoru. Proto se vodík přidává z tlakové láhve průtokem 15 ml/min.

2.7.3 Způsoby vyhodnocení signálů v uspořádání s kryogenní pastí

Plocha jednotlivých píků standardů byla získána integrací od manuálně nastavené základní linie v programu Microcal origin. Výšky píků standardů byly korigovány na manuálně nastavenou základní linii pomocí téhož programu.

Pro zjištění plochy jednotlivých píků u slepých vzorků byly používány dva přístupy. Oba jsou založeny na (pro každou sérii experimentů samostatně zjištěných) časových intervalech, ve kterých se v chromatogramech nacházejí jednotlivé píky. Interval pro určitou formu byl určen z aritmetického průměru retenčního času píků, n-násobků šířek v polovině výšky píků a k tomu byla přičtena neurčitost odhadu začátku a konce píku v podobě směrodatné odchylky určení retenčního času, aby výsledný interval pokrýval oblast, kde by se pík určité formy mohl vyskytnout. Výsledné určení retenčního času, obsahující již směrodatnou odchylku, uvádí tab. 2.5.

Tab. 2.5: n-násobky šířek v polovině výšek píků před maximem a za maximem píků pro jednotlivé formy pro vyhodnocení signálů slepých vzorků

Forma arsenu	n-násobek $w_{1/2}$ před maximem píku	n-násobek $w_{1/2}$ za maximem píku
iAs(III)	1,5	5,5
MMA(V)	2,0	3,2
DMA(V)	1,2	2,5

Interval pro daný pík začíná v čase t_z a končí v čase t_k . Hodnoty absorbance změřené spektrometrem v tomto intervalu byly exportovány do Microsoft Excel. Protože spektrometr odečítá absorbanci 50 krát za sekundu, počet změřených hodnot, n , absorbance je:

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

(i) **integrace od nuly** je definovaná vztahem pro integrál I_0 :

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

kde A_i je i-tá hodnota absorbance, $i=1$ platí pro čas $t_{\tilde{i}}$ (začátek intervalu), $i=n$ platí pro čas t_k (konec intervalu).

(ii) **integrace tzv. korigovaná na základní linii** pro níž pro korigovaný integrál I_k platí:

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

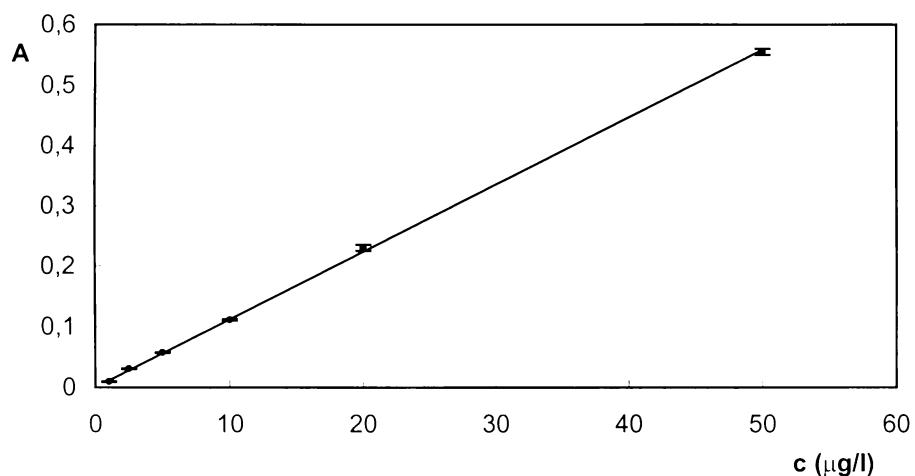
Kde A_z je průměr z 50 čtení absorbance (1 s) od času $t_z - 1$ do času t_z a A_k je průměr z 50 čtení absorbance (1 s) od času t_k do času $t_k + 1$.

3 Výsledková část a diskuse

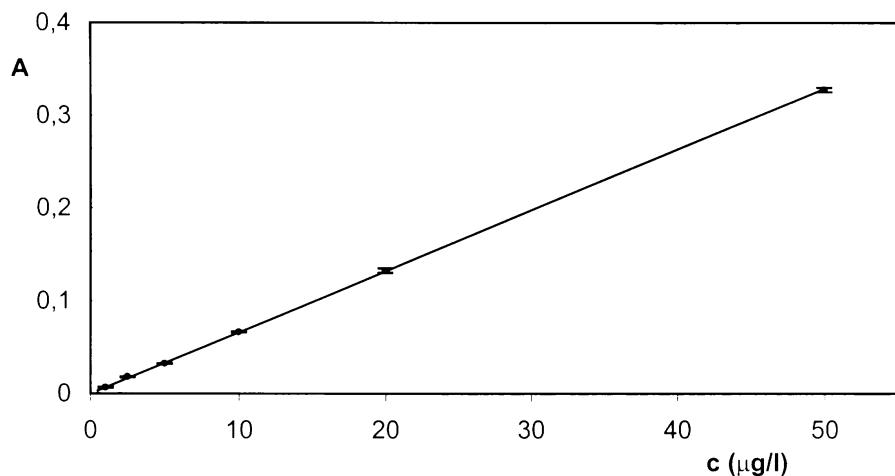
3.1 Optimalizace podmínek pro selektivní generování iAs(III) a iAs(V)

3.1.1 Kalibrační grafy

Konzentrace arsenu u použitych standardů iAs(III) a iAs(V) byly: 1; 2,5; 5; 10; 20; 50; 100 $\mu\text{g/l}$. Pro měření byla použita kyselina chlorovodíková 1 mol/l a 0,79 ml reakční cívka. U koncentrace arsenu 100 $\mu\text{g/l}$ docházelo v obou případech k zakřivení kalibračních grafů. Obr. 3.1 a 3.2 ukazují lineární části kalibračních grafů pro uvedené standardy.



Obr. 3.1: kalibrační graf iAs(III); směrnice $0,0112x$; korelační koeficient 0,9997; c-konzentrace standardu; A-absorbance, reakční cívka 0,79 ml, 1mol/l HCl

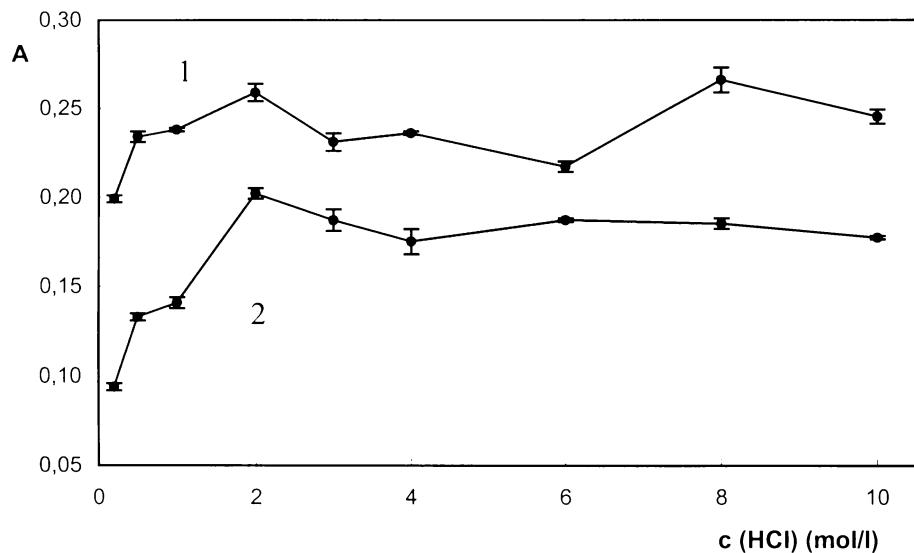


Obr. 3.2: kalibrační graf pro iAs(V); směrnice $0,0066x$; korelační koeficient 0,9999; c - koncentrace standardu; A-absorbance, reakční cívka 0,79 ml, 1mol/l HCl

Z obrázků je patrné, že citlivost iAs(V) je podstatně nižší než pro iAs(III), přestože podle literárních zdrojů citovaných v teoretické části by v prostředí 1mol/l HCl měla být účinnost generování arsanu z obou forem a tedy i jejich citlivost, stejná. Proto byl studován vliv relevantních experimentálních parametrů, tj. koncentrace kyseliny chlorovodíkové a reakční doby, na citlivost obou anorganických forem arsenu. Výsledky jsou prezentovány v následujících kapitolách.

3.1.2 Vliv koncentrace kyseliny chlorovodíkové

Obr. 3.3 ukazuje, že se vzrůstající koncentrací kyseliny chlorovodíkové zhruba do koncentrace 2 mol/l klesá rozdíl v účinnosti generování arsanu z obou anorganických forem arsenu. Další zvyšování koncentrace kyseliny chlorovodíkové už na rozdíl v účinnosti generování z obou forem nemá signifikantní vliv.



Obr. 3.3: vliv koncentrace HCl na generování arsanu z iAs(III) a iAs(V); 1 - iAs(III), 2 - iAs(V); A-absorbance; c-látková koncentrace HCl, 5 měření pro každý bod, reakční cívka o objemu 0,79 ml,

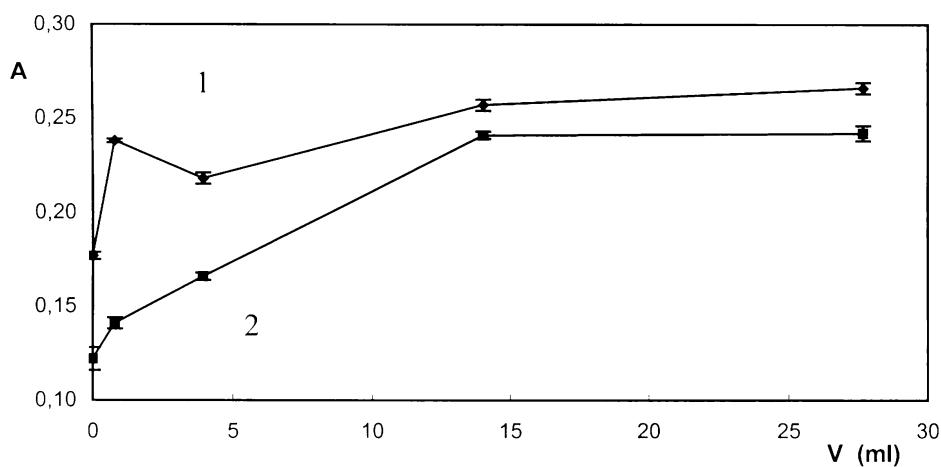
3.1.3 Vliv velikosti reakční cívky

Dalším parametrem významným pro účinnost generování je délka reakční doby. Proto byl studován vliv objemu reakční cívky na signál obou anorganických forem arsenu. Objem reakční cívky a tudíž i reakční doba byl dán délkou a vnitřním průměrem použité hadičky. Reakční cívky byly vyrobeny z teflonových trubic příslušných vnitřních průměrů a délek, které uvádí tab. 3.1.

Tab. 3.1: objem použitých reakčních cívek a teoretická doba setrvání reakční směsi v cívce

i.d. / délka (mm/m)	V reakční cívky (ml)	doba setrvání v reakční cívce (s)
1/0	0	0
1/1	0,79	2
1/5	3,93	11
2,4/2,86	14,02	39
2,4/6,12	27,67	80

Obr. 3.4 ukazuje zvyšující se účinnost generování hydridu z iAs(V) se stoupající reakční dobou. Zvýšením objemu reakční cívky nad 14 ml se účinnost generování hydridu z iAs(V) téměř nemění a nedosahuje účinnosti generování hydridu z iAs(III). Proto ani při použití nadměrně velké reakční cívky a odpovídajícím prodloužením reakční doby není možné dosáhnout stejné účinnosti generování pro obě formy arsenu s použitím 1 mol/l kyseliny chlorovodíkové.



Obr. 3.4: vliv velikosti reakční cívky na účinnost generování arsanu z iAs(III) a iAs(V); 1 - iAs(III), 2 - iAs(V); A-absorbance; V-objem reakční cívky, 5 měření každého bodu, rozpouštědlo pro standardy 1 mol/l HCl

3.1.4 Shrnutí výsledků selektivního generování iAs(III) a iAs(V)

Z výše diskutovaných experimentů vyplývá nevhodnost použití kyseliny chlorovodíkové jako reakčního media pro selektivní generování hydridů z iAs(III) a iAs(V), jelikož ani při vysokých koncentracích kyseliny chlorovodíkové ani při použití extrémně objemných reakčních cívek nelze dosáhnout stejné účinnosti pro obě formy arsenu. Což je jednak v rozporu s literárními údaji uvedenými v pododdílu 1.3.1, ale hlavně to vylučuje založit speciační analýzu trojmocných a pětimocných sloučenin arsenu selektivním generováním hydridů na volbě pH.

Proto bylo nutné zvolit jiný přístup k selektivnímu generování. Požadavkem byla stoprocentní účinnost generování pro všechny formy arsenu v jednom alikvótu vzorku a v druhém alikvótu úplné generování z trojmocných forem a kompletní potlačení generování z pětimocných forem. Proto bylo zvoleno selektivní generování hydridů založené

na předredukci L-cysteinem (viz. pododdíl 1.3.1) v prostředí TRIS pufru pro stoprocentní účinnost generování arsanů ze všech forem arsenu. Pro úplné generování z trojmocných forem a kompletní potlačení generování z pětimocných forem bylo zvoleno také prostředí TRIS pufru, ale bez předredukce L-cysteinem.

3.2 Vliv jednotlivých parametrů na LOD

V této kapitole jsou diskutovány modelové experimenty provedené pro posouzení vlivu jednotlivých parametrů na LOD měření založených na generování hydridů pro AAS.

Jak je rozebráno v literární části, LOD je dán rozptylem měření série slepých vzorků a citlivosti. Chceme-li minimalizovat LOD, je třeba maximalizovat citlivost a minimalizovat rozptyl pro slepé vzorky. Tato kapitola je věnována minimalizaci rozptylu blanku: je zde proveden rozbor faktorů ovlivňujících rozptyl blanku a na tomto základu je provedena optimalizace relevantních experimentálních parametrů.

Odhlédneme-li od kontaminace reagencií, rozptyl signálů pro slepé vzorky může být ovlivněn šumem spektrální lampy a detektoru, ztrátami záření v atomizátoru a šumem absorpčního prostředí v atomizátoru. Výsledný rozptyl signálů pro slepé vzorky je také ovlivněn volbou analytického signálu, t.j. zdali je zvolena výška či plocha píku, eventuálně integrační doba.

3.2.1 Šum lampy a detektoru

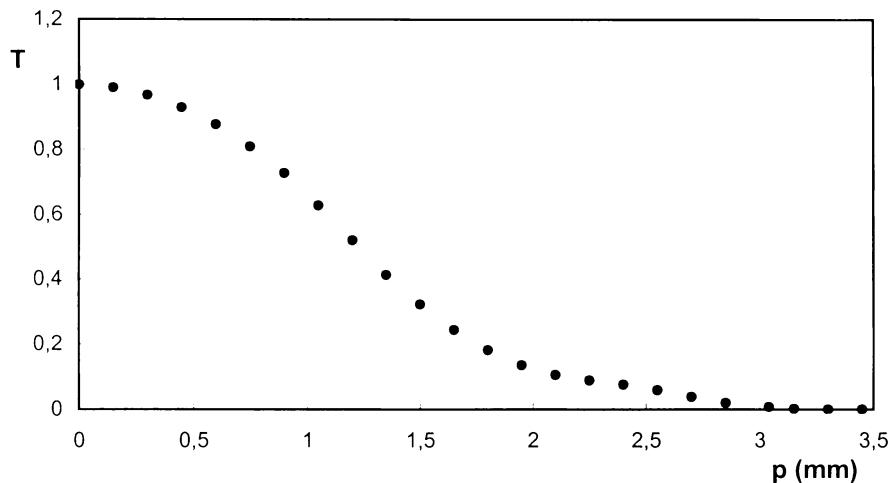
Bezelektrodové výbojky (EDL) se vyznačují o řád vyšší vyzařovanou energií než klasické výbojky s dutou katodou (HCL). Vycházející paprsek z lampy má velmi nízký šum. Než dopadne paprsek z lampy na detektor dochází ke ztrátám při odrazu na optice (čočky, zrcadla, monochromátor), která usměrňuje paprsek do prostoru atomizátoru a detektoru. Tyto ztráty jsou dány konstrukcí spektrometru a nelze je proto odstranit. Šum lampy registrovaný spektrometrem pro "prázdnou" optickou cestu (bez atomizátoru) je proto základem, jehož úroveň je dalšími příspěvky jen zvyšována. Účelem optimalizace je tyto další příspěvky minimalizovat. Základní šum je v principu ovlivněn i šumem detektoru. Základní šum obecně závisí na budící energii EDL: čím vyšší energie, tím nižší šum. Energie použitá k popisovaným experimentům (viz. Tab. 2.1) je maximální - její zvýšení by vedlo

k nestabilitě zářivého toku a k riziku degradace lampy. Základní šum je samozřejmě také závislý na šířce štěrbiny monochromátoru. Šířka štěrbiny monochromátoru použitá k popisovaným experimentům (viz. Experimentální část) je pro stanovení arsenu doporučena výrobcem spektrometru a proto nebyla měněna. Vzhledem k vysoké kvalitě "solid state" detektoru a použité spektrální lampy je hladina základního šumu velice nízká, což dává dobré vyhlídky pro studium dalších příspěvků.

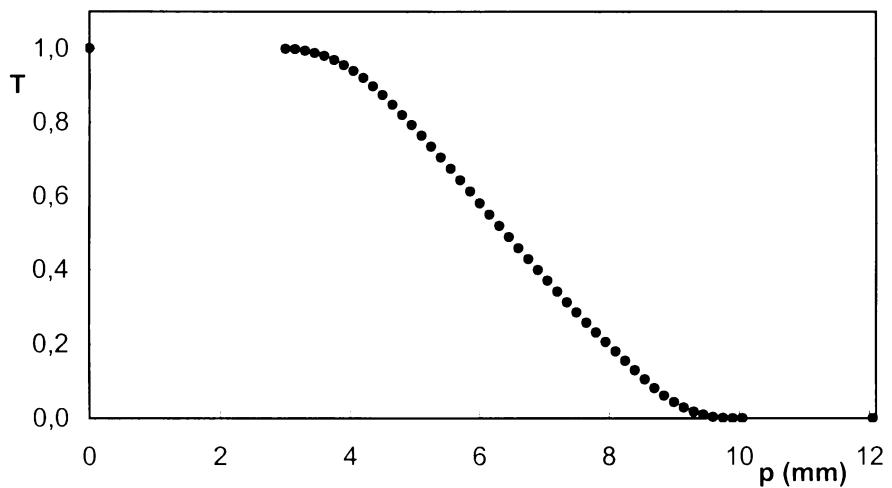
Na atomizátoru dochází ke stínění části paprsku a tím ke zmenšení zářivého toku dopadajícímu na detektor. To tvoří první příspěvek k základní hladině šumu. Vhodnou volbou velikosti (délky a průměru) atomizátoru je možné snížit stínění paprsku a tím také zmenšit výsledný šum. Pro optimální volbu velikosti atomizátoru je výhodné znát geometrii paprsku v optickém uspořádání spektrometru. Problematikou tvaru paprsku a příspěvků k základnímu šumu se zabývají následující pododdíly.

3.2.2 Studium tvaru paprsku EDL

Studium tvaru paprsku bylo prováděno stíněním clonou o čtvercovém tvaru z černého papíru (viz. „Přístrojové vybavení“) upevněnou na posuvný mechanismus. Bylo prováděno stínění ve dvou pozicích vůči paprsku: na místě zostření paprsku (uprostřed dráhy paprsku) a 3 cm před zaostřením paprsku. Před měřením byl čtvercový otvor ve cloně umístěn přibližně doprostřed paprsku podle hodnot absorbance až nedocházelo k žádnému stínění (nulová pozice). Poté bylo stínítkem posunováno ve směru dolů, doleva, doprava a nahoru od nastavené nulové pozice a odečítány hodnoty absorbance. Příkladem z naměřených závislostí jsou obr. 3.5 a obr. 3.6 přepočítané hodnoty absorbance pro závislost na posunu clony na hodnoty transmitance. Obr. 3.5 ukazuje pouze úsek z původní naměřené závislosti kvůli přehlednosti.



Obr. 3.5: v místě zaostření paprsku, posun clony směrem dolů, T-transmitance, p(mm) – posun clony



Obr. 3.6: 3 cm před zaostřením paprsku, posun clony směrem dolů , T-transmitance, p (mm) – posun clony

Všechny ostatní závislosti jsou podobné s ohledem na směr stínění. V případě, že vezmeme v úvahu prostor na ose posunu mezi 95% a 5% transmitancí vyplýne, že průměr paprsku v této poloze (3 cm před zaostřením) je přibližně 5,5 mm a v poloze zaostření paprsku 2,3 mm. To zhruba odpovídá vizuálně pozorovatelné složce paprsku.

3.2.3 Příspěvek stínění paprsku atomizátorem k šumu

Z výše odhadnutého tvaru paprsku EDL vyplývá, že běžně používané atomizátory, které mají obvykle délku přes 10 cm a vnitřní průměr pod 10 mm, musí odstínit část zářivého toku z lampy a tím zvyšovat základní hladinu šumu. Pro přesnější posouzení tohoto efektu byla provedena měření příspěvku k šumu způsobeného stíněním části paprsku trubicemi různých délek a světlostí. Tyto trubice sloužily jako modely optické trubice atomizátoru.

Stínění paprsku každou "modelovou" trubicí bylo kvantifikováno absorbancí této trubice. Pro toto měření byl přístroj nejdříve vynulován při volné optické cestě, poté byla do optické cesty vložena elektricky vyhřívaná pícka (ta sloužila pro snadnou justaci trubice do optické cesty spektrometru) s dotyčnou trubicí. Poté byla automaticky (spektrometrem) nastavena optimální pozice trubice pro průchod paprsku na detektor. Hodnoty absorbance jednotlivých trubic obsahuje tab. 3.2. Pro srovnání je v této tabulce zahrnut i multiatomizátor.

Jako kritérium šumu byla zvolena směrodatná odchylka 5s intervalu tzn. z 250 měření absorbance (Tab. 3.2).

Tab. 3.2: porovnání šumu jednotlivých trubic, aritmetický průměr ze směrodatných odchylek 5s intervalů ($\overline{x_s}$), A - absorbance

A _{trubic}	Trubice, i.d./délka mm/cm	$\overline{x_s} \pm s$.10 ⁻⁴ (s)
0,00	16/12	4,4±0,1
0,25	10/14,7	5,9±0,3
0,37	Multiatomizátor 6,0/16	6,2±0,1
0,42	8,8/15,6	8,1±0,5
0,72	6,3/15,9	17,8 ±0,6
0,77	6,1/16	16,5±0,8
0,76	5,9/16	17,9±0,8

Tab. 3.2 ukazuje, že hladina základního šumu, uvedená v prvém řádku, se signifikantně zvyšuje pro již výrazné stínění paprsku odpovídající absorbanci 0,25.

Vzhledem k potřebě detailnějšího prozkoumání vlivu průměru optické trubice bylo použito nastavitelné kruhové clony upevněné na levý konec elektrické pícky, tedy z hlediska paprsku na její vstupní část. Střed clony byl justován do optické osy spektrometru. Vzdálenost clony od místa zaostření paprsku (to bylo v polovině délky pícky) byla 6 cm. Clona tudíž

sloužila jako model pro atomizátor, který je dlouhý 12 cm (což je obvyklá délka) s i.d. rovným průměru otvoru clony.

Absorbance clony pro různé průměry otvoru byly naměřeny stejným způsobem jak uvedeno výše pro trubice. I šum byl kvantifikován stejně jak uvedeno výše pro trubice. Zde byl navíc změřen šum s deuteriovou korekcí pozadí (DBC). Výsledky jsou v Tab. 3.3.

Tab. 3.3: porovnání šumu pro jednotlivé nastavení kruhové clony, aritmetický průměr ze směrodatných odchylek 5s intervalů (\bar{x}_s), A – absorbance, DBC- deuteriová korekce pozadí

i.d. (mm)	A	\bar{x}_s bez DBC .10 ⁻⁴ (s)	\bar{x}_s DBC .10 ⁻⁴ (s)
16,8	0,00	4,1 ± 0,2	6,3 ± 1,3
6	0,48	9,5 ± 0,8	31,0 ± 1,1
3	0,96	24,5 ± 0,0	92,1 ± 2,3
2,2	1,44	70,9 ± 3,0	136,0 ± 6,7

Z tab. 3.3 vyplývá, že snížení i.d. pod běžně používanou hodnotu 6 mm má za následek výrazný nárůst šumu. Použití DBC vede podle očekávání k signifikantnímu nárůstu šumu.

3.2.4 Příspěvek podmínek atomizace k šumu

Další příspěvek k šumu může být způsoben absorpcním prostředím v atomizátoru. To je dáno teplotou a dále identitou plynů protékajících atomizátorem a jejich průtokem. Pro posouzení těchto efektů byla provedena měření šumu základní linie multiatomizátoru za různých podmínek. Výsledky uvádí tab. 3.4 . Šum byl kvantifikován stejně jak uvedeno výše pro trubice nebo pro kruhovou clonu.

Tab. 3.4: porovnání šumu jednotlivých uspořádání, aritmetický průměr ze směrodatných odchylek 5s intervalů

($\overline{x_s}$)

uspořádání	$\overline{x_s} \pm s$.10 ⁻⁴ (s)
jen signál z lampy	4,4±1,3
multiatomizátor 100°C	6,7±0,3
multiatomizátor 900°C+75ml/min He	6,6±0,3
multiatomizátor 900°C+75ml/min He, 15ml/min H ₂	7,8±0,8
generátor běží	90±16
generátor běží +15ml/min H ₂	68±21

Tab. 3.4 ukazuje, že hladina základního šumu, uvedená v prvém řádku, zvýšená stíněním paprsku multiatomizátorem (viz. druhý řádek) není ovlivněna zvýšením minimální teploty na teplotu atomizace. Ani přidáním proudu vodíku 15 ml/min nevede k signifikantnímu zvýšení šumu. Tento přívod vodíku se blíží teoreticky spočtenému průtoku tohoto plynu produkovaném běžícím generátorem hydridů tj. 18 ml/min. Avšak skutečné spuštění generátoru vede k dramatickému - řádovému nárůstu šumu. Zdrojem šumu je tedy samotný generátor hydridů, nikoliv produkovaný proud vodíku. Tento závěr je podporován i v poslední řadce uvedeným pozorováním, že další přídavek vodíku vede ke snížení šumu. Pravděpodobným vysvětlením jsou fluktuace průtoku plynů atomizátorem způsobené pulzacemi v generátoru hydridů.

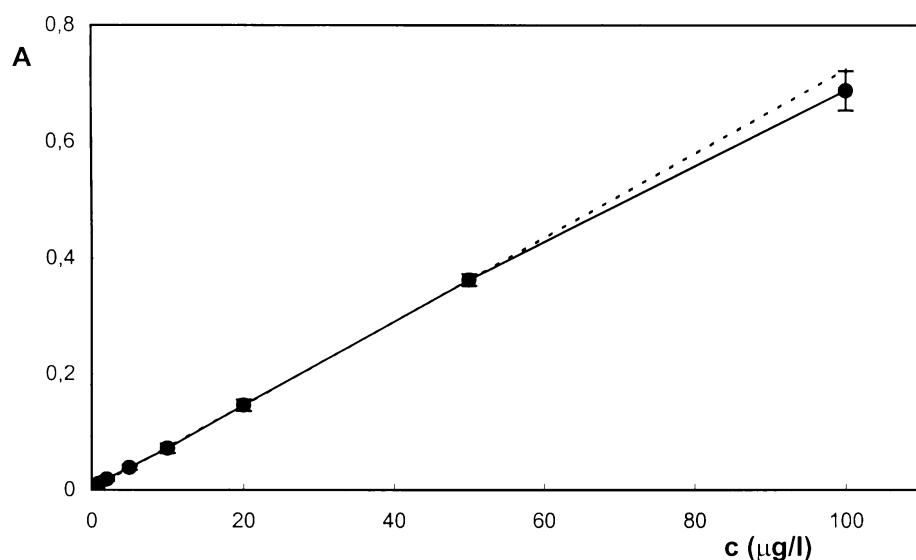
3.3 Generování dávkováním do proudu

V této kapitole jsou diskutovány faktory ovlivňující detekční limit měření založených na generování hydridů přímým přenosem.

Software spektrometru bohužel nedovoluje měřit v delším časovém intervalu než 58 s a to k dosažení ustáleného stavu nestačí, takže nebylo možno pracovat metodou kontinuálního generování. Proto byla použita pouze metoda generování dávkováním do proudu.

Standardy iAs(III), MMA(V) a DMA(V) byly před měřením ponechány k redukci v 2% L-cysteinu po dobu 30 minut (viz. „Experimentální část“).

Byla použita dávkovací smyčka 0,5 ml a 0,05 ml a koncentrace 20 $\mu\text{g/l}$. Vyhodnocována byla pouze výška píku. Plocha nemohla být použita, protože sestupová část píku se v průběhu čtecího kroku (software neumožňuje nastavit delší čtecí krok než 58 s) nevrátila na základní úroveň (pro slepý vzorek) ani v případě nižšího dávkovaného objemu vzorku (dávkovací smyčka 0,05 ml).



Obr. 3.7: kalibrační graf pro dávkování do proudu pro 0,5 ml dávkovací smyčku; směrnice 0,0073x, korelační koeficient 0,9996; $c(\text{iAs(III)}) = 1,00; 2,00; 5,00; 10,00; 20,00; 50,00; 100,00 \mu\text{g/l}$, nadávkovaná hmotnost As=0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 10,0; 25,0; 50,0 ng

Z kalibrace provedené pro objemnější smyčku (obr. 3.7) je patrné, že při hmotnosti arsenu nad 25 ng dochází k zakřivení kalibrační závislosti.

Kvůli studiu LOD bylo provedeno zjištění vlivu velikosti dávkovací smyčky na LOD a tyto dvě smyčky porovnány. Toto porovnání uvádí tab. 3.5 .

Tab. 3.5: Citlivost a LOD pro obě cívky, předredukce 2% L-cysteinem, s-směrodatná odchylka (použitá pro výpočet LOD), v – výška píku, koncentrace standardu iAs(III) 20 $\mu\text{g/l}$

Dávkovací cívka (ml)	$V_{\text{iAs(III)}}$	s slepý vzorek $\cdot 10^{-4}$ (s)	LOD (ng/l)
0,5	0,18	8,9	30
0,05	0,06	8,7	91

Hodnoty v Tab. 3.5 platí pro předredukci L-cysteinem. Předredukce byla provedena preventivně kvůli převedení pětimocné formy vzniklé oxidací z iAs(III) při přípravě standardu iAs(III).

Tab. 3.6: LOD pro různé složení slepého vzorku a nosného média, 0,5 ml dávkovací smyčka

Obsah L-cysteinu	LOD _{iAs(III)} (ng/l)	LOD _{MMA(V)} (ng/l)	LOD _{DMA(V)} (ng/l)
Slepý vzorek i standard bez cysteinu	13	-	-
2% L-cystein - slepý vzorek	30	77	74
2% L-cystein i jako nosné medium	22	22	22

Tab. 3.6 uvádí detekční limity pro různé složení slepého vzorku a nosného média. V prvním případě – použití deionizované vody jako slepého vzorku i jako nosného média jsou ve srovnání s ostatními hodnotami LOD nejnižší. V tomto případě ovšem nelze kvantifikovat MMA(V) a DMA(V) a je nutné zabránit oxidaci iAs(III) (viz. „Experimentální část“). Ve druhém řádku jsou uvedeny LOD pro předredukci L-cysteinem a nosným médiem deionizovanou vodou a posledním případem je použití předredukce 2% L-cysteinem s tím rozdílem, že byl L-cystein použit i jako nosné médium. Z Tab. 3.6 jasně vyplývá, že L-cystein má negativní vliv na šum základní linie a tím i na LOD. Zhoršení LOD L-cysteinem je způsobeno jeho bouřlivou reakcí s tetrahydroboratem. Druhý případ se liší od třetího přítomností

L-cysteinu (pouze v dávkovací smyčce) až přibližně 5 sekund po začátku čtecího kroku, ale nastavením „BOC time“ (viz. výše) již na začátku čtecího kroku. Ve třetím případě je L-cystein vháněn do systému jako nosné médium již od začátku čtecího kroku a „BOC time“ se nastaví již v průběhu průtoku L-cysteinu. L-cystein, který se nadává s dávkovací smyčky již nezpůsobí tak velkou změnu v šumu.

V případě použití L-cysteinu jen jako slepého vzorku došlo v záznamu k malému poklesu absorbance po pěti vteřinách od začátku záznamu jejíž hodnota se po dalších 3 vteřinách vrátila na původní hodnotu. Toto pozorování odpovídá bouřlivé reakci L-cysteinu a tetrahydroboratu.

Dosažené detekční limity pro iAs(III) metodou dávkování do proudu jsou třikrát a více nižší než uvádí literatura 0,1 µg/l 0,3 µg/l^{37,38}.

3.4 Generování substituovaných hydridů z iAs(III), MMA(V), DMA(V) - optimalizace

Kompletní procedura speciace tří a pětimocných forem iAs, MMA a DMA je založená na kombinaci selektivního generování tří a pětimocných forem s generováním methyl substituovaných hydridů arsenu, konkrétně AsH_3 , CH_3AsH_2 a $(\text{CH}_3)_2\text{AsH}$. V této kapitole jsou popisovány experimenty sloužící pro optimalizaci generování methyl substituovaných hydridů arsenu. Jako modelové specie arsenu pro generování těchto hydridů byly kvůli dostupnosti příslušných standardů použity iAs(III), MMA(V) a DMA(V). Protože generování příslušných hydridů z MMA(V) a DMA(V) při pH 6 prakticky neprobíhá, bylo nutné provést jejich předredukci reakcí s L-cysteinem (viz. „Experimentální část“). Vliv předredukce L-cysteinem je diskutován níže.

V následujících pododdílech je popsána optimalizace BOC, vliv předredukce cysteinem a optimalizace průtoku nosného He při volatilizaci.

3.4.1 Vliv "BOC time" na opakovatelnost signálů

„BOC time“ je doba, po kterou spektrometr čte absorbanci, která slouží jako nulová hodnota pro vlastní měření. „BOC time“ se odečítá těsně před započetím čtení záznamu. Délka „BOC time“ je volitelná mezi 1 a 5 s. Pro optimální volbu této délky byl sledován vliv „BOC time“ na opakovatelnost signálu pro slepý vzorek. Pro vyhodnocení bylo využito směrodatných odchylek získaných z ploch integrovaných od nuly v časových intervalech, ve kterých se generují hydridy jednotlivých forem arsenu iAs(III), MMA(V) a DMA(V). Intervaly pro jednotlivé formy byly určeny z chromatogramů standardů (viz. experimentální část).

Výsledky uvedené v tab. 3.7 dokazují, že délka „BOC time“ 1 s je nedostatečná a čas delší než 2 s není nutný. Jako optimální bylo proto nadále používáno nastavení „BOC time“ 2 s.

Tab. 3.7: s - směrodatné odchylky získané z ploch integrovaných od nuly v intervalech pro uvedené intervaly (v závorkách) při měření slepého vzorku, s deuteriovou korekcí pozadí

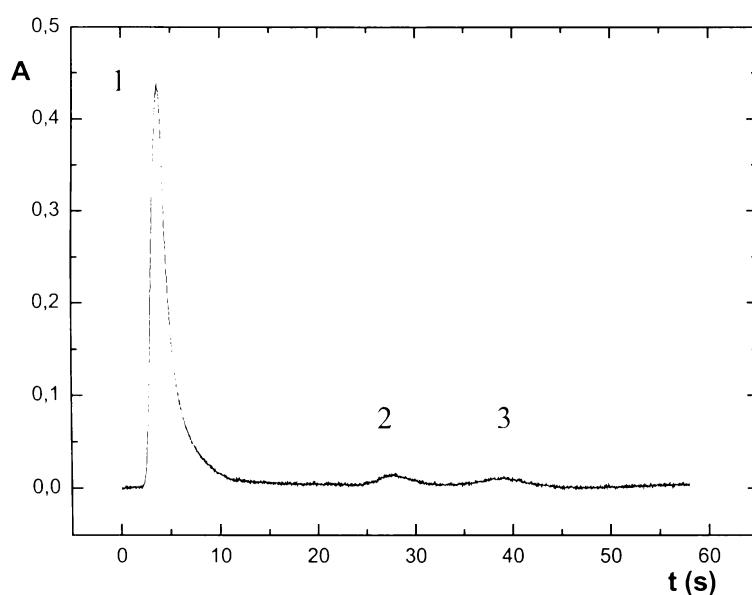
BOC time (s)	$s(1,28-14,32 \text{ s})$	$s(23,26-35,72 \text{ s})$	$s(35,06-45,74 \text{ s})$
	$\cdot 10^{-3} (\text{s})$	$\cdot 10^{-3} (\text{s})$	$\cdot 10^{-3} (\text{s})$
1	10,8	12,2	11,0
2	8,2	7,2	5,9
5	5,7	7,4	5,5

3.4.2 Vliv L-cysteinu na signál

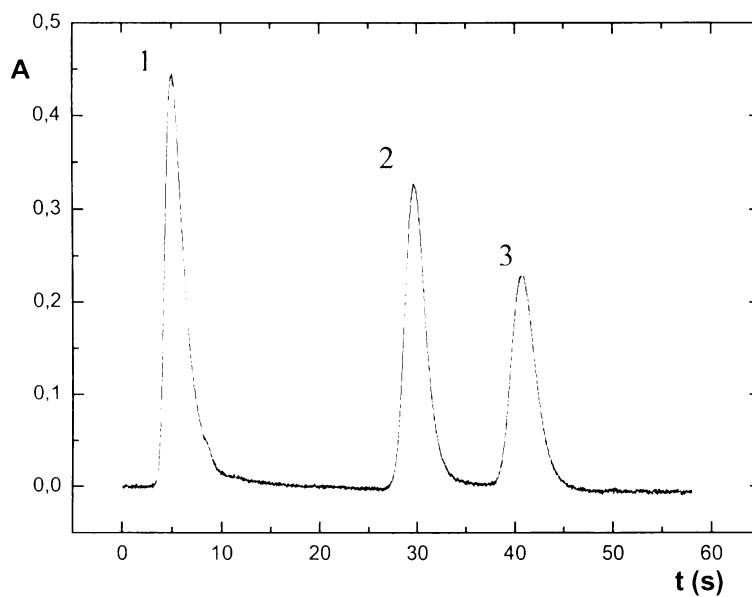
Jak bylo zmíněno výše, L-cystein byl použit jako předredukční činidlo pro standardy obsahující arsen v pětimocné formě a redukoval ji na trojmocnou formu. Rozdíl mezi chromatogramem s použitím L-cysteinu a bez použití L-cysteinu pro formy iAs(III), MMA(V) a DMA(V) i obr. 3.8 (bez L-cysteinu) obr. 3.9 (s L-cysteinem).

Z obr. 3.8 je zřejmé, že dochází k generování malého množství hydridu z obou pětimocných forem MMA(V) a DMA(V), ke kterému by nemělo dojít. Vysvětlení je dáné malým obsahem trojmocných forem arsenu v obou standardech, který byl zjištěn experimenty provedenými v naší laboratoři v době dokončování této práce.

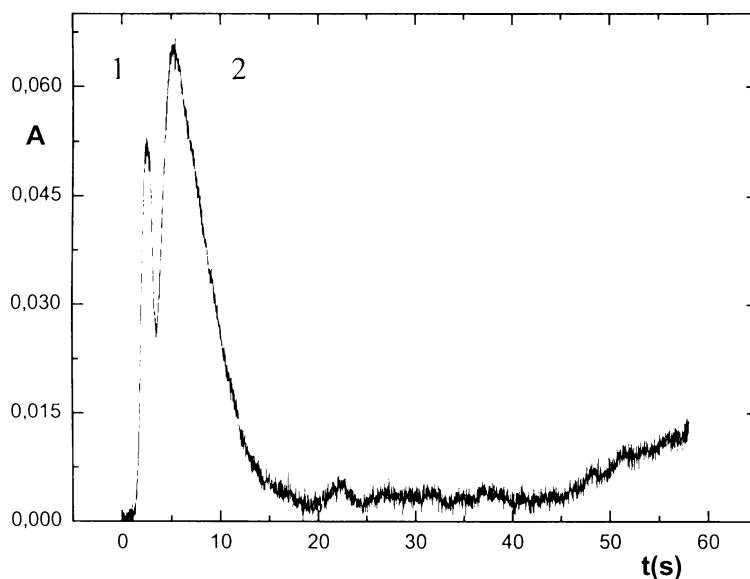
Použití 2% L-cysteinu vede ke zvýšení hodnoty pro slepý vzorek v oblasti iAs(III), která je jasně patrná při použití 5 ml dávkovací smyčky. Kromě toho vede k signifikantnímu nárůstu nespecifické absorpcie, také pouze v oblasti iAs(III). Jakým způsobem ovlivňuje signál použití L-cysteinu jako slepého vzorku ukazuje obr. 3.10. To, že druhý pík je způsoben nespecifickou absorpcí bylo ověřeno měřením s korekcí pozadí kdy tento pík byl kompenzován kdežto pík číslo 1 ne.



Obr. 3.8: chromatogram bez použití L-cysteinu, 0,5 ml dávkovací smyčka 1-iAs(III), 2-MMA(V), 3-DMA(V) všechny o $c=2 \mu\text{g/l}$,



Obr. 3.9: chromatogram s použitím L-cysteinu, 0,5 ml dávkovací smyčka 1-iAs(III), 2-MMA(V), 3-DMA(V) všechny o $c=2 \mu\text{g/l}$



Obr. 3.10: záznam pro slepý vzorek (2% L-cystein), 1 - zvýšení hodnoty slepého vzorku, 2 – nespecifická absorpcie, 5 ml dávkovací smyčka

3.4.3 Optimalizace průtoku helia při volatilizaci

Byly testovány průtoky: 32,5 ml/min, 75 ml/min a 120 ml/min. Jako standardy byly použity iAs(III), MMA(V) a DMA(V) předredukované 2% L-cysteinem. Pro vyhodnocení byly využity plochy píků. Bylo naměřeno pět záznamů po 58 s. Výsledky uvedené v tab. 3.8 vedou k jasnému závěru: optimální průtok je 75 ml/min. Nižší průtok vede k významně horší opakovatelnosti; při průtoku 120 ml/min je již znatelně nižší citlivost.

Tab. 3.8: plocha píků P jednotlivých forem integrovaná s korekcí na základní linii pro různé průtoky helia

Hc (ml/min)	$P_{\text{iAs(III)}} \cdot 10^{-1}$ (s)	$P_{\text{MMA(V)}} \cdot 10^{-1}$ (s)	$P_{\text{DMA(V)}} \cdot 10^{-1}$ (s)
32,5	$9,3 \pm 0,5$	$4,9 \pm 0,3$	$4,5 \pm 0,3$
75	$10,1 \pm 0,2$	$7,6 \pm 0,2$	$5,1 \pm 0,2$
120	$6,9 \pm 0,1$	$5,6 \pm 0,2$	$4,5 \pm 0,2$

3.5 Generování substituovaných hydridů - opakovatelnost chromatogramů

Pro posouzení opakovatelnosti chromatogramů byla sledována opakovatelnost následujících parametrů každého ze tří píků: retenční čas t_r , šířka píku v polovině výšky $w_{1/2}$, výška v a plocha P .

Tab. 3.9 ukazuje vynikající opakovatelnost retenčních časů.

Tab. 3.9: opakovatelnost retenčních časů (t_r) píků pro jednotlivé formy, použití L-cysteinu, 5 opakování, \bar{x} -aritmetický průměr, s-směrodatná odchylka

Statistická veličina	t_r iAs(III) (s)	t_r MMA(V) (s)	t_r DMA(V) (s)
\bar{x}	4,93	30,09	41,38
s	0,18	0,30	0,40

Bylo zjištěno, že dobrá opakovatelnost retenčních časů je podmíněna stabilitou výšky hladiny kapalného dusíku. S nižší hladinou je retenční čas menší a s vyšší hladinou se retenční čas prodlužuje. Vysvětlením je zmenšování objemu části náplně zachytávající hydridy analytu.

Tab. 3.10, 3.11 a 3.12 ukazují opakovatelnost šírek v polovině výšky, výšek a ploch píků. Data uvedená v Tab. 3.10, 3.11, 3.12 pocházejí ze stejné série měření.

Tab. 3.10: šířky v polovině výšek píků jednotlivých forem ($w_{1/2}$), \bar{x} -aritmetický průměr, s-směrodatná odchylka, $s_r(\%)$ - relativní směrodatná odchylka v procentech, jedna série měření - 5 opakování

Statistická veličina	$w_{1/2}$ iAs(III) (s)	$w_{1/2}$ MMA(V) (s)	$w_{1/2}$ DMA(V) (s)
\bar{x}	1,57	2,68	3,20
s	0,06	0,14	0,39
$s_r(\%)$	4,07	5,06	12,07

Tab. 3.11: výška píků v jednotlivých forem, \bar{x} -aritmetický průměr, s-směrodatná odchylka, $s_r(\%)$ - relativní směrodatná odchylka v procentech, jedna série měření - 5 opakování

Statistická veličina	$V_{iAs(III)}$	$V_{MMA(V)}$	$V_{DMA(V)}$
\bar{x}	0,513	0,254	0,155
s	0,018	0,010	0,018
$s_r(\%)$	3,5	4,5	11,7

Tab. 3.12: plocha píků P jednotlivých forem, \bar{x} -aritmetický průměr, s-směrodatná odchylka, $s_r(\%)$ - relativní směrodatná odchylka v procentech, jedna série měření - 5 opakování

Statistická veličina	$P_{iAs(III)}$ (s)	$P_{MMA(V)}$ (s)	$P_{DMA(V)}$ (s)
\bar{x}	1,15	0,89	0,69
s	0,02	0,03	0,04
$s_r(\%)$	1,7	3,0	5,7

Z těchto tabulek vyplývá, vhodnost použití plochy jako vyhodnocovacího parametru – rozptyl ploch je u všech píků podstatně nižší než výšek. Důvodem je zřejmě to, že plocha není ovlivňována hladinou kapalného dusíku jako výška a retenční čas. Tato dedukce byla potvrzena i dalšími experimenty, při kterých byly sledovány výše uvedené parametry.

Na základě těchto výsledků bylo možné uskutečnit měření detekčního limitu metody.

Z tab. 3.9 vyplývá velice dobrá opakovatelnost retenčních časů v rámci jedné série měření v jeden den. Pokud jde o srovnání sérií naměřených ve dvou různých dnech, opakovatelnost není již dostatečná. Rozdíl mezi retenčními časy činí i dvě vteřiny. Z toho důvodu vyvstala nutnost určovat intervaly výskytu píků jednotlivých forem pro každou sérii měření.

3.6 Generování substituovaných hydridů – LOD

Za podmínek generování substituovaných hydridů byla provedena měření šumu základní linie. Šum byl kvantifikován stejně jako je diskutováno v pododdílu 3.2.5 (viz. tab. 3.4). Výsledky uvádí Tab. 3.13. Data v prvních čtyř řádcích v této tabulce jsou totožná s tab. 3.4, zde jsou uvedena pro srovnání s posledními třemi řádkami, které se vztahují k měřením s kryogenní pastí. Je zřejmé, že měření s kryogenní pastí, na rozdíl od metod generování hydridů s přímým přenosem, zvyšuje hladinu šumu pozorovanou v nevyhřívaném atomizátoru jen nepatrně. To dokazuje velmi slibný potenciál této metody generování substituovaných hydridů pro dosažení velmi nízkého detekčního limitu.

Tab. 3.13: porovnání šumu vzniklého z jednotlivých uspořádání, uveden aritmetický průměr ze směrodatných odchylek jedenácti 5s intervalů

uspořádání	$\bar{x}_s \pm s$ $\cdot 10^{-4}$ (s)
jen signál z lampy	4,4±1,3
multiatomizátor 100°C	6,7±0,3
multiatomizátor 900°C+75ml/min He	6,6±0,3
multiatomizátor 900°C+75ml/min He, 15ml/min H ₂	7,8±0,8
past bez ohřevu + 75ml/min He, 15ml/min H ₂	8,3±0,5
past s ohřevem + 75ml/min He, 15ml/min H ₂	8,6±1,5
slepý vzorek	8,7±0,6

Během experimentů byl zjištěn vliv několika dalších faktorů na hodnotu LOD jednotlivých forem. Jednou z nich je i přítomnost L-cysteinu ve slepém vzorku, který ovlivňuje tvar základní linie a dále velikost dávkovací smyčky nebo-li objem nadávkovaného vzorku. Složení slepého vzorku pro generování jednotlivých forem by mělo obsahovat 2% L-cystein. Kvůli zmíněným problémům a zjištění vlivu na LOD pro použití 5 ml dávkovací smyčky, nebyl L-cystein v jedné sérii experimentů ve slepém vzorku obsažen a v druhé sérii ano. Hodnoty LOD pro methylované formy s použitím deionizované vody jako slepého vzorku jsou proto jen orientační a mohou sloužit jako odhad LOD pro stanovení odpovídajících trojmocných forem As, protože pro tato stanovení se, jak uvedeno výše, L-cysteinu neužívá. Tab. 3.14 dokládaje hodnoty získané měřením v přítomnosti a nepřítomnosti L-cysteinu ve slepém vzorku s použitím 5 ml dávkovací smyčky s použitím koncentrací standardů iAs(III), MMA(V), DMA(V) 0,2 µg/l.

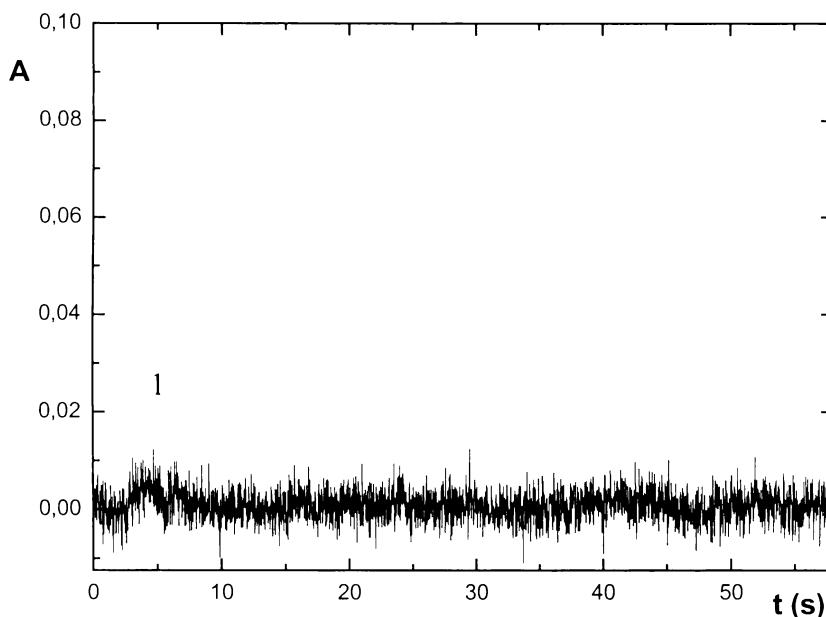
Tab. 3.14: LOD s použitím slepých vzorků: vody nebo 2% L-cystein (cys), 15 měření slepého vzorku neobsahující L-cystein a 15 obsahující L-cystein, standardy redukovány L-cysteinem před měřením, koncentrace všech standardů 0,2 µg/l, 5 ml dávkovací smyčka, P-plocha píku

Formy arsenu	P standardu (s)	$S_{\text{slepý vzorek}} \cdot 10^{-3} (\text{s})$	LOD (ng/l)
iAs(III)	0,97	8,5	5
iAs(III) cys	0,97	123	76
MMA(V)	0,69	7,4	6
MMA(V) cys	0,69	4,7	4
DMA(V)	0,59	9,4	10
DMA(V) cys	0,59	7,7	8

Bylo naměřeno 5 záznamů standardů a 15 záznamů pro slepý vzorek obsahující 2% L-cystein a obsahující pouze deionizovanou vodu. Z tab. 3.14 je pro iAs(III) s L-cysteinem jako slepým vzorkem nadměrně vysoká hodnota LOD oproti ostatním formám. Vysvětlení podává obr. 3.10, který poukazuje na vysoký pík v oblasti pro iAs(III). Takový záznam byl obdržen právě s použitím L-cysteingu jako slepého vzorku a dávkovací smyčky o objemu 5 ml. U dávkovací smyčky 0,5 ml není vliv L-cysteingu znatelný. U použití deionizované vody jako slepého vzorku se nachází v prostoru iAs(III) také pík, ovšem mnohonásobně nižší ovlivňující určení LOD nevýznamně. Doklad o tom podává první řádek tab. 3.14 kde pro iAs(III) je LOD dokonce nižší než pro ostatní formy arsenu. Jakou velikost tento pík (označen 1) má dokladuje obr. 3.11. U obr. 3.11 byla úmyslně zvětšena osa y pro zvýraznění píku v oblasti iAs(III).

Velikost píku při použití slepého vzorku deionizované vody se v závislosti na čase měnila, avšak nikdy se zcela neztratila. Velikost tohoto píku nepřesahovala hodnotu 0,015 absorbance.

Pro měření vlivu dávkovací smyčky na LOD bylo použito dvou různě velkých dávkovacích smyček: 5 ml a 0,5 ml. Pro zkoumání bylo použito takových standardů, aby hmotnost analytu v dávkovací smyčce byla stejná tzn. při použití dávkovací smyčky 0,5 ml byla použita koncentrace 2 µg/l, kdežto u 5 ml koncentrace 0,2 µg/l, tudíž hmotnost nadávkovaného analytu byla v obou případech 1 ng arsenu.



Obr. 3.11: záznam pro slepý vzorek, který obsahoval pouze deionizovanou vodu, A-absorbance, t(s)-čas, dávkovací smyčka 0,5 ml

Bylo také použito předredukce 2% L-cysteinem po dobu 30 minut pro každý standard.

Z výsledků shrnutých v tab. 3.13 vyvstává možnost použití ještě větší dávkovací smyčky s jejíž pomocí by bylo možné dosáhnout ještě nižšího detekčního limitu. Separátor fází je schopen pojmet až 30-40 ml kapalné fáze a proto by množství vzorku bylo možno několikanásobně zvýšit.

3.7 Srovnání dosažených LOD s literaturou

Srovnání dosažených LOD pro jednotlivé metody generování hydridů uvádí tab. 3.16. Pro uspořádání s kryogenní pastí je rozdíl v použití nebo nepoužití předredukce L-cysteinem standardů a použití L-cysteinu ve slepém vzorku. Pro uvedené detekční limity této metody platí, že nosným médiem je deionizovaná voda.

Pro generování dávkováním do proudu je rozdíl ve složení slepého vzorku a nosného média. Předredukce vzorků standardů byla provedena ve všech třech případech. Při většině

experimentů je používána deionizovaná voda jako nosné médium. Pokud je složení jiné, je to v tab. 3.15 uvedeno.

Tab. 3.15: LOD pro uspořádání s kryogenní pastí (Cryo), dávkování do proudu (FI), pro dávkovací smyčku 5 ml použity standardy 0,2 µg/l As, pro 0,5 ml 2 µg/l As, pro 0,05 ml 20 µg/l,

Metoda (dávkovací smyčka), další podmínky	iAs(III) (ng/l)	MMA(V) (ng/l)	DMA(V) (ng/l)
Cryo (0,5 ml), předredukce L-cysteinem, slepý vzorek: L-cystein	45	51	47
Cryo (0,5 ml), bez předredukce L-cysteinem	31	-	-
Cryo (5 ml), předredukce L-cysteinem, slepý vzorek: L-cystein	76	4	8
Cryo (5 ml), předredukce L-cysteinem, slepý vzorek: deionizovaná voda	5	6	10
FI (0,5 ml), slepý vzorek: 2%L-cystein	30	77	74
FI (0,5 ml) slepý vzorek: deionizovaná voda	13	18	18
FI (0,5 ml), slepý vzorek: 2% L-cystein, nosné médium: 2% L-cystein	22	22	22
FI (0,05 ml), slepý vzorek: 2% L-cystein	91	-	-

Jak je vidět z tab. 3.15, LOD pro uspořádání s kryogenní pastí se s zvětšující se dávkovací smyčkou snižuje. Teoreticky tedy vyplývá možnost použít dávkovací smyčku mnohonásobně větší než dosud a snížit tak LOD ještě více. Toto umožňuje i již zmíněný objem separátoru fází. Problémem je ovšem použití L-cysteingu i pro slepý vzorek jak dokládá LOD pro iAs(III) (3.řádek tab.3.15). Nutnost předredukce vzorků L-cysteinem dokládá druhý řádek tab. 3.15 z něhož vyplývá, že pětimocné formy nelze v tomto uspořádání generovat.

Pro poslední čtyři řádky tab. 3.15 určené generování hydridů metodou dávkování do proudu vyplývá možnost použití vyšší rychlosti čerpání reagencií než doposud (1 ml/min) a tím také ještě více snížit LOD. Toto je možné uskutečnit jen v případě nevýznamného vlivu zvýšení rychlosti čerpání na šum.

Porovnání LOD podobných uspořádání s kryogenní pastí nalezených v literatuře obsahuje tab. 3.16. První sloupec LOD získaný z literatury platí pro selektivní generování jednotlivých forem, ale bez použití L-cysteinu jako předredukčního činidla¹⁰ a druhý sloupec LOD také získaný z literatury také selektivní generování bez L-cysteinu a v PTFE pasti ponořené v kapalném dusíku¹³. Třetí sloupec uvádí výsledné nejnižší hodnoty LOD dosažené v této práci.

Tab. 3.16: porovnání LOD s literaturou-podobná uspořádání s kryogenní pastí

Forma arsenu	LOD (ng)		
iAs(III)	0,27	0,20	0,026
MMA(V)	0,24	0,35	0,020
DMA(V)	0,31	0,60	0,039

Z tab. 3.16 je jasné vidět, že optimalizací generování hydridů pomocí selektivního generování ve spojení s metodou generování substituovaných hydridů (použití kryogenní pasti) lze detekční limitu snížit až o řád. Je nutno podotknout, že uvedené detekční limity je možné ještě snížit výše uvedeným způsobem.

Pro srovnání s ostatními metodami používanými k speciační analýze organických sloučenin obsahující arsen dosahuje spojení ICP-MS nejnižších detekčních limitů v rozsahu 0,5-10 pg arsenu⁴². Naproti tomu stanovení metodou HPLC-MS dosahuje detekčních limitů 0,2; 0,2; 0,3 a 0,5 µg/l pro iAs(III), DMA(V), MMA(V) a iAs(V)⁴³, což je srovnatelné s uspořádáním kontinuálního generování v této práci (viz. tab.3.16). Dalším příkladem použití metody na stanovení organických sloučenin arsenu je spojení metod HPLC-ES-MS, které dosahuje detekčních limitů pod 10 µg/l⁴.

4 Závěr

Úkolem první části práce bylo studium selektivního generování arsanu z obou anorganických forem arsenu. K tomu sloužilo kontinuální generování a detekce spektrometrem PerkinElmer 503. Bylo zjištěno, že selektivní generování založené na volbě koncentrace kyseliny chlorovodíkové je pro kontinuální generování nepoužitelné: v rozporu s literárními údaji ani při vysokých koncentracích kyseliny chlorovodíkové ani při použití extrémně objemných reakčních cívek nelze dosáhnout stejné účinnosti pro obě formy arsenu. Toto je velmi důležitý závěr předkládané práce, z něhož vyplynula nutnost zvolit jiný přístup k selektivnímu generování. Proto bylo zvoleno selektivní generování hydridů založené na předredukci L-cysteinem v prostředí TRIS pufru pro generování arsanů ze všech forem arsenu a na generování z trojmocných forem v prostředí TRIS pufru bez předredukce.

Úkolem další části práce bylo identifikovat faktory ovlivňující detekční limit speciační analýzy založené na kombinaci selektivního generování a generování metyl substituovaných arsanů a tím přispět k významnému snížení detekčních limitů. K příslušným měřením byl použit spektrometr Perkin Elmer Analyst 800. Modelové experimenty provedené pro posouzení vlivu jednotlivých parametrů na detekční limitu prokázaly, že snížení světlosti atomizátoru pod běžně používanou hodnotu 6 mm má za následek výrazný nárůst šumu. Dále byl kvantifikován příspěvek deuteriové korekce pozadí k pozorovanému šumu. Dalším výrazným příspěvkem k šumu jsou fluktuace průtoku plynu atomizátorem způsobené pulzacemi v generátoru při generování přímým přenosem. Naproti tomu, měření s kryogenní pastí zvyšuje hladinu šumu jen nepatrně. To dokazuje velmi slibný potenciál metody generování substituovaných hydridů pro dosažení velmi nízkého detekčního limitu.

Dále byly stanoveny aktuální detekční limity pro měření spektrometrem Perkin Elmer Analyst 800 při generování arsanu přímým přenosem a při generování metyl substituovaných arsanů s kryogenní pastí. Kvůli stanovení detekčních limitů generování metyl substituovaných arsanů bylo potřeba posoudit vliv „BOC time“, vliv předredukce L-cysteinem a vliv průtoku nosného plynu helia při volatilizaci. Kromě toho bylo nezbytné stanovit opakovatelnost chromatogramů pozorovaných při volatilizaci jednotlivých arsanů z kryogenní pasti. Detekční limity nalezené v této práci jsou několikrát nižší než hodnoty publikované jinými skupinami.

Seznam použité literatury

1. Greenwood, N. N.; Earnshaw, A.: *Chemie prvků*. Praha, Informatorium (1993).
2. Anawar, H. M.; Akai, J.; Komaki, K.; Terao, H.; Yoshioka, T.; Ishizuka, T.; Safiullah, S.; Kato, K.: Geochemical occurrence of arsenic in groundwater of Bangladesh: sources and mobilization processes. *Journal of Geochemical Exploration*, **77**, 109-131 (2003).
3. Bhattacharya, P.; Mukherjee, A. B.; Jacks, G.; Nordqvist, S.: Metal contamination at a wood preservation site: characterisation and experimental studies on remediation. *The Science of The Total Environment*, **290**, 165-180 (2002).
4. Cornelis, R.; Caruso, J.; Crews, H.; Heumann, K.: *Handbook of Elemental Speciation II, Species in the Environment, Food, Medicine and Occupational Health*. Chichester, England, Wiley (2005).
5. Tsalev, D. L.: Vapor generation or electrothermal atomic absorption spectrometry? - - Both! *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, **55**, 915-931 (2000).
6. Dědina, J.; Fara, M.; Kolihová, D.; Korečková, J.; Musil, J.; Plško, E.; Sychra, V.: *Vybrané metody analytické atomové spektrometrie*. Praha, Česká spektroskopická společnost (1987).
7. Dědina, J.; Tsalev, D. L.: *Hydride generation atomic absorption spectrometry*. Chichester, Wiley (1995).
8. Pavelka, J.; Spěváčková, V.; Fara, M.; Kolihová, D.; Sysalová, J.; Kubáň, V.; Hoenig, M.; Kučera, J.; Plško, E.; Dědina, J.; Černohorský, T.: *Kurz atomové absorpcní spektrometrie (pro pokročilé)*. Praha, Spektroskopická společnost Jana Marca Marci (1996).
9. Němcová I.; Čermáková L.; Rychlovský P.: *Spektrometrické analytické metody I*. Praha, Univerzita Karlova, Karolinum (1997).

10. Devesa, V.; Del Razo, L. M.; Adair, B.; Drobna, Z.; Waters, S. B.; Hughes, M. F.; Styblo, M.; Thomas, D. J.: Comprehensive analysis of arsenic metabolites by pH-specific hydride generation atomic absorption spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, **19**, 1460-1467 (2004).
11. Howard, A. G.; Salou, C.: Arsenic speciation by cryogenic trap hydride generation atomic absorption spectroscopy: performance enhancement by pre-derivatization. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, **13**, 683-686 (1998).
12. Howard, A. G.; Salou, C.: Cysteine enhancement of the cryogenic trap hydride AAS determination of dissolved arsenic species. *Analytica Chimica Acta*, **333**, 89-96 (1996).
13. Burguera, J. L.; Burguera, M.; Rivas, C.; Carrero, P.: On-line cryogenic trapping with microwave heating for the determination and speciation of arsenic by flow injection/hydride generation/atomic absorption spectrometry. *Talanta*, **45**, 531-542 (1998).
14. Bortoleto, G. G.; Cadore, S.: Determination of total inorganic arsenic in water using on-line pre-concentration and hydride-generation atomic absorption spectrometry. *Talanta*, **67**, 169-174 (2005).
15. Pozebon, D.; Dressler, V. L.; Gomes Neto, J. A.; Curtius, A. J.: Determination of arsenic(III) and arsenic(V) by electrothermal atomic absorption spectrometry after complexation and sorption on a C-18 bonded silica column. *Talanta*, **45**, 1167-1175 (1998).
16. Kratzer, J.; Dedina, J.: In situ trapping of stibine in externally heated quartz tube atomizers for atomic absorption spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, **60**, 859-864 (2005).
17. Kratzer, J.; Dedina, J.; Rychlovsky, P.: A novel approach to hydride preconcentration: in-situ trapping of SbH₃ in quartz tube atomizer for AAS. XVIIth Slovak Spectroscopic Conference, Kosice (2004).

18. Matusiewicz, H.; Sturgeon, R. E.: Atomic spectrometric detection of hydride forming elements following in situ trapping within a graphite furnace. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, **51**, 377-397 (1996).
19. Arenas, V.; Stoeppler, M.; Bergerhoff, G.: Arsenic Determination in the Ultratrace Range by Atomic-Absorption Spectrometry After Preconcentration of the Hydride. *Fresenius Zeitschrift Fur Analytische Chemie*, **332**, 447-452 (1988).
20. Howard, A. G.; Arbabzavar, M. H.: Determination of Inorganic Arsenic(III) and Arsenic(V), Methylarsenic and Dimethylarsenic Species by Selective Hydride Evolution Atomic-Absorption Spectroscopy. *Analyst*, **106**, 213-220 (1981).
21. Vancleuvenbergen, R. J. A.; Vanmol, W. E.; Adams, F. C.: Arsenic Speciation in Water by Hydride Cold Trapping - Quartz Furnace Atomic-Absorption Spectrometry - An Evaluation. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, **3**, 169-176 (1988).
22. Kratzer, J.; Dedina, J.: In situ trapping of bismuthine in externally heated quartz tube atomizers for atomic absorption spectrometry. *Journal of Analytical Absorption Spectrometry*, **accepted**, (2006).
23. D'Ulivo, A.; Onor, M.; Pitzalis, E.: Role of hydroboron intermediates in the mechanism of chemical vapor generation in strongly acidic media. *Analytical Chemistry*, **76**, 6342-6352 (2004).
24. D'Ulivo, A.: Chemical vapor generation by tetrahydroborate(III) and other borane complexes in aqueous media: A critical discussion of fundamental processes and mechanisms involved in reagent decomposition and hydride formation. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, **59**, 793-825 (2004).
25. Robbins, W. B.; Caruso, J. A.: Development of hydride generation methods for As analysis. *Anal.Chem.*, **51**, 889 (1979).
26. Dočekal, B. a. k.: *Atomová absorpční spektrometrie, Sborník přednášek z kurzu*. Český Těšín, Ing.Václav Helán - 2 THETA (2003).

27. Welz, B.; Schubert-Jacobs, M.; Styris, D. L.; Redfield, D. A.: Investigation of reactions and atomization of arsine in a heated quartz tube using AA and MS. *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy*, **45**, 1235 (1990).
28. Welz, B.; Melcher, M.: Investigations on atomisation mechanism of volatile hydride-forming elements in a heated quartz cell. Part 1. Gas-phase and surface effects: decomposition and atomisation of arsine. *Analyst*, **108**, 213 (1983).
29. Bax, D.; Peters, F. F.; Van Noort, J. P.; Agterdenbos, J.: Determination of Se with HGAAS-II. The role of Na borohydride and of hydrogen gas. *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy*, **41**, 275 (1986).
30. Narsito; Agterdenbos, J.; Santosa, S. J.: Study of processes in the hydride generation atomic-absorption spectrometry of antimony, arsenic and selenium. *Analytica Chimica Acta*, **237**, 189-199 (1990).
31. Agterdenbos, J.; Bax, D.: Mechanism in hydride generation AAS. *Fresenius.J.Anal.Chem.*, **323**, 783 (1986).
32. Narsito; Agterdenbos, J.: A study of arsenic(III) and arsenic(V) reduction and of arsine decomposition in hydride-generation atomic-absorption spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, **197**, 315-321 (1987).
33. Dedina, J.; Welz, B.: Quartz tube atomizers for hydride generation atomic absorption spectrometry - mechanism for atomization of arsine - invited lecture. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, **7**, 307-314 (1992).
34. Grossová, O.: *Modulární L-design atomizátoru hydridů*. Praha, (2005).
35. Dědina, J.; Grossová, O.: Modular design of hydride atomizer for atomic absorption spectrometry. Applied to Industrial Property Office of the Czech Republic 13.5.2005
36. Kolektiv autorů: *Kurz atomové absorpcní spektrometrie*. Praha, Spektroskopická společnost Jana Marka Marci V tisku (2006).

37. Coelho, N. M. M.; da Silva, A. C.; da Silva, C. M.: Determination of As(III) and total inorganic arsenic by flow injection hydride generation atomic absorption spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, **460**, 227-233 (2002).
38. Anthemidis, A. N.; Zachariadis, G. A.; Stratis, J. A.: Determination of arsenic(III) and total inorganic arsenic in water samples using an on-line sequential insertion system and hydride generation atomic absorption spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, **547**, 237-242 (2005).
39. Nielsen, S.; Hansen, E. H.: Determination of As(III) and As(V) by flow injection-hydride generation-atomic absorption spectrometry via on-line reduction of As(V) by KI. *Analytica Chimica Acta*, **343**, 5-17 (1997).
40. CITAC and EURACHEM: *Guide to Quality in Analytical Chemistry An Aid to Accreditation.* (2002).
41. Eckschlager, K.: *Chemometrie I, II.* Praha, Katedra anorganické chemie PřF UK Praha (1994).
42. Tseng, C. M.; Amouroux, D.; Brindle, I. D.; Donard, O. F. X.: Field cryofocussing hydride generation applied to the simultaneous multi-elemental determination of alkyl-metal(loid) species in natural waters using ICP-MS detection. *Journal of Environmental Monitoring*, **2**, 603-612 (2000).
43. Szpunar, J.; Lobinski, R.: *Hyphenated Techniques in Speciation Analysis.* Cambridge, The Royal Society of Chemistry (2003).