

**Mineralizační metody pro speciální analýzu
toxikologicky významných forem arsenu
v tkáních pomocí generování hydridů s kolekcí
vymrazováním a atomovou absorpční
spektrometrií**

**Digestion methods for speciation analysis of toxicology
significant forms of arsenic in tissues by hydride generation
with cryotrapping and atomic absorption spectrometry**

Diplomová práce

Tato práce byla vypracována na Oddělení stopové prvkové analýzy, detašovaném pracovišti Ústavu analytické chemie AV ČR, v.v.i., Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitele Mgr. Tomáše Matouška, Ph.D. a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze (a pracoviště Ústavu Analytické chemie AV ČR, v.v.i.) je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity (a pracoviště Ústavu Analytické chemie AV ČR, v.v.i.).

V Praze dne 1. května 2010

.....
Petra Taurková

Poděkování

Děkuji panu Mgr. Tomáši Matouškovi, Ph.D., školiteli mé diplomové práce za odborné vedení při experimentální činnosti, cenné rady a připomínky při vypracování této diplomové práce. Také děkuji Doc. RNDr. Petru Rychlovskému, CSc. za všestrannou pomoc a porozumění. Poděkování patří také vědeckému týmu z Oddělení stopové prvkové analýzy Ústavu analytické chemie AV ČR, v.v.i. za vstřícnost, ochotu a vytvoření přátelského prostředí.

Nakonec děkuji projektům, díky jejichž finanční podpoře mohla být tato diplomová práce vypracována:

Výzkumný záměr UIACH AV ČR, v.v.i. č. AV0Z40310501

Grantová agentura České republiky, projekt č. GA 203/09/1783

Výzkumný záměr PřF UK č. MSM 0021620857

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

Abstrakt

Diplomová práce rozvíjí metodiku speciální analýzy arsenu pomocí selektivního generování hydridů s kolekcí vymrazováním a atomovou absorpční spektrometrií. Touto technikou lze stanovit toxikologicky významné formy arsenu, tj. arsenitany a arseničnany a jejich mono-, di- a trimethylsubstituované formy, v koncentracích nižších než 0.1 ng.ml^{-1} .

První část diplomové práce je zaměřena na testování sušení plynné fáze s vygenerovanými hydridy pomocí trubic s nafionovou membránou, u kterých byla zkoumána vhodnost použití pro speciální analýzu arsenu a byly zjištěny transportní ztráty jednotlivých specií arsenu. Druhá část diplomové práce popisuje mineralizační postupy vhodné pro speciální analýzu arsenu v tkáních. Byly porovnány dva mineralizační postupy, kyselá mineralizace kyselinou fosforečnou a novější zásaditá mineralizace tetramethylamonium hydroxidem. Mineralizační postupy byly vyzkoušeny na certifikovaném referenčním materiálu DOLT - 4 (žraločí játra) a dále na reálné matrici – kuřecích játrech.

Klíčová slova: Sušící trubice s nafionovou membránou, Speciální analýza arsenu, Mineralizace, Kyselina fosforečná, Tetramethylamonium hydroxid, Kuřecí játra, CRM DOLT – 4, Generování hydridů; Atomová absorpční spektrometrie.

Abstract

This diploma thesis develops methodology of arsenic speciation analysis by selective hydride generation with cryotrapping and atomic absorption spectrometry. Using this technique it is possible to determine toxicologically important forms of arsenic, i.e. arsenites, arsenates and their mono-, di-, and trimethylated forms at concentration levels below $0,1 \text{ ng.ml}^{-1}$.

The first part of the thesis is focused on testing tubular membrane gas dryers with nafion membrane for drying gaseous phase containing generated hydrides. The suitability for arsenic speciation analysis was investigated and transport losses of individual arsenic species were found.

The second part describes mild digestion procedures suitable for arsenic speciation analysis in tissues. Two procedures were compared, acid digestion in phosphoric acid and more recent alkalic digestion by tetramethylammonium hydroxide. Digestion procedures were tested on certified reference material DOLT – 4 (Dogfish Liver) and chicken liver matrix.

Key words: Tubular nafion membrane dryers, Arsenic speciation analysis, Digestion, Phosphoric acid, Tetramethylammonium hydroxide, Chicken liver, CRM DOLT – 4, Hydride generation, Atomic absorption spectrometry

Obsah:

Seznam zkratk a symbolů	8
Úvod	10
1 Teoretická část	11
1.1 Arsen	11
1.1.1 Výskyt arsenu	11
1.1.2 Arsen v pitné vodě	11
1.1.3 Toxikologicky významné formy arsenu	13
1.1.4 Toxicita významných forem arsenu	14
1.1.5 Metabolismus arsenu	15
1.1.6 Důsledky chronických otrav z pitné vody	16
1.2 Generování a atomizace hydridů pro AAS	16
1.2.1 Generování hydridů	16
1.2.2 Metody generování hydridů	17
1.2.2.1 Metody přímého přenosu	17
1.2.2.2 Kolekční metody	18
1.2.3 Atomizace hydridů	18
1.2.3.1 Grafitové atomizátory	18
1.2.3.2 Křemenné atomizátory	18
1.2.4 Interference	19
1.3 Speciální analýza arsenu	20
1.3.1 Speciace arsenu pomocí generování hydridů	20
1.3.2 Selektivní generování hydridů	21
1.3.3 Generování substituovaných hydridů	22
1.4 Sušení plynné fáze při generování hydridů	22
1.4.1 Sušící trubice Perma Pure	23
1.4.2 Použití sušících trubic Perma Pure v generování hydridů	24
1.5 Mineralizace biologických vzorků pro AAS	25
1.5.1 Kyselá mineralizace	25
1.5.2 Zásaditá mineralizace	25
2. Experimentální část	27
2.1 Použité chemikálie	27
2.2 Pracovní roztoky a jejich příprava	28
2.3 Standardní roztoky arsenu	28
2.4 Použitý materiál	28
2.5 Sušící trubice	29
2.6 Přístrojové vybavení	29
2.7 Systémy pro generování hydridů	30
2.7.1 Automatizovaný systém generování hydridů	30
2.7.2 Kryogenní past	32
2.7.3 Multiatomizátor	34
2.7.4 Měřicí cyklus pro experiment se sušícími trubicemi	35
2.7.5 Měřicí cyklus pro experiment s kuřecími játry	36
2.8 Statistické zpracování naměřených dat	37
2.8.1 Vyhodnocení plochy píků	37
2.9 Sušící trubice	38

2.10	Postupy přípravy vzorků kuřecích jater.....	39
2.10.1	Homogenizace kuřecích jater	39
2.10.2	Kyselá mineralizace.....	39
2.10.3	Zásaditá mineralizace	40
3.	Výsledky a diskuze.....	41
3.1	Selektivní generování substituovaných hydridů.....	41
3.2	Ztráty forem arsenu v sušicích trubicích Perma Pure.....	43
3.3	Kalibrační závislosti iAs, MAs, DMAs a TMA ^s VO a meze detekce	44
3.4	Kyselá mineralizace kuřecích jater.....	47
3.4.1	Testování čistoty kyselin	47
3.4.2	Ověření vhodnosti postupu kyselé mineralizace pro speciální analýzu..	48
3.4.3	Analýza CRM DOLT-4 po kyselé mineralizaci	50
3.4.4	Analýza kuřecích jater po kyselé mineralizaci	52
3.5	Zásaditá mineralizace kuřecích jater	55
3.5.1	Ověření vhodnosti postupu zásadité mineralizace pro speciální analýzu	55
3.5.2	Analýza CRM DOLT – 4 po zásadité mineralizaci.....	56
3.5.3	Zásaditá mineralizace kuřecích jater	58
3.5.4	Porovnání kyselé a zásadité mineralizace CRM DOLT - 4.....	60
3.5.5	Zásaditá mineralizace standardního roztoku arsenobetainu	61
4.	Závěr.....	63
	Seznam použité literatury	64

Seznam zkratek a symbolů

<i>a</i>	směrnice kalibrační přímky
AAS	atomová absorpční spektrometrie
AFS	atomová fluorescenční spektrometrie
As	arsen
AS3MT(methyltransferáza)	arsenitmethyltransferáza
AsB	arsenobetain
<i>c</i>	molární koncentrace (mol.l^{-1})
CRM	certifikovaný referenční materiál
<i>t</i>	čas (s)
EPA	Agentura pro ochranu životního prostředí (Environmental Protection Agency)
ETA – AAS	elektrotermická atomizace ve spojení s atomovou absorpční spektrometrií
GC	plynová chromatografie
HG	generování hydridů
HG – CT - AAS	generování hydridů s kolekcí vymrazováním a atomovou absorpční spektrometrií
HG - CT	generování hydridů s kolekcí vymrazováním
<i>w</i>	hmotnostní koncentrace (ng.g^{-1} , mg.kg^{-1} , ng.ml^{-1})
HPLC – ICP - MS	vysokoúčinná kapalinová chromatografie s indukčně vázaným plazmatem a s hmotnostní detekcí
I	elektrický proud (A)
LOD	mez detekce (detekční limit)
LOQ	mez stanovitelnosti
<i>n</i>	počet měření
<i>P</i>	integrovaná absorbance (s)
<i>p, q</i>	hodnoty nabývající příslušných směrodatných odchylek u (<i>p, q</i>)
pK_a	disociační konstanta kyseliny
Q	průtok (ml.min^{-1})
PTFE	polytetrafluorethylen (teflon)
R	elektrický odpor (Ω)
<i>r</i>	výtěžek (recovery) (%)
<i>f</i>	frekvence (ot.min^{-1})
<i>s</i>	směrodatná odchylka
s_r	relativní směrodatná odchylka (%)
σ	směrodatná odchylka slepého pokusu
<i>t</i>	teplota ($^{\circ}\text{C}$)
TMAH	tetramethylamonium hydroxid
U	elektrické napětí (V)
UIACH	Ústav analytické chemie Akademie věd České republiky, v.v.i.

UNC	Univerzita Severní Karolíny v Chapel Hill (University of North Carolina in Chapel Hill)
UNICEF	Mezinárodní dětský fond neodkladné pomoci (United Nations International Children's Fund)
$u(p)/\bar{p}$	nejistoty vstupních parametrů ve formě relativní směrodatné odchylky
u_c	kombinovaná standardní nejistota
USA	Spojené státy americké
V	objem (ml)
λ	vlnová délka (nm)
WHO	Světová zdravotnická organizace (World Health Organization)
x_i	i-tá hodnota (výsledku)
\bar{x}	aritmetický průměr

Úvod

Arsen patří v dnešní době mezi významné kontaminanty životního prostředí a způsobuje závažné zdravotní potíže. Nejenom antropogenním vlivem došlo k jeho zvýšení v přírodních zdrojích, především je důležité zmínit, že je přítomen v řadě přírodně se vyskytujících minerálech, jejímž rozpouštěním dochází k jeho zvýšenému obsahu v pitných zdrojích, což má negativní důsledek na zdraví obyvatel žijících v postižených oblastech (především jihovýchodní Asie).

Velký význam má v této oblasti výzkumu především speciální analýza toxikologicky významných forem arsenu, vznikajících v organismu při jejich metabolizaci. Použitím metody generování hydridů s kolecí vymrazováním a atomovou absorpční spektrometrií lze získat velmi dobrou citlivost pro všechny toxikologicky významné speciie bez předchozí separace. Tato diplomová práce má za úkol přispět ke speciální analýze arsenu v biologických matricích a zjištěnými výsledky tak pomoci při populačních studiích výzkumných záměrů společného projektu Ústavu analytické chemie AV ČR a Univerzity Severní Karolíny v Chapel Hill, sledující negativní dopad na obyvatele zmíněných oblastí.

Konkrétními úkoly této diplomové práce bylo:

- (i) zjistit, zda-li nedochází ke ztrátám vygenerovaných hydridů arsenu průchodem sušícími trubicemi Perma Pure s použitím metody HG-CT-AAS.
- (ii) Dále stejnou metodou stanovit obsah specií arsenu v biologickém materiálu – kuřecích jater s použitím dvou rozdílných mineralizačních postupů. Klasická kyselá mineralizace s kyselinou fosforečnou a novější zásaditá mineralizace s tetramethylamonium hydroxidem.

1 Teoretická část

1.1 Arsen

1.1.1 Výskyt arsenu

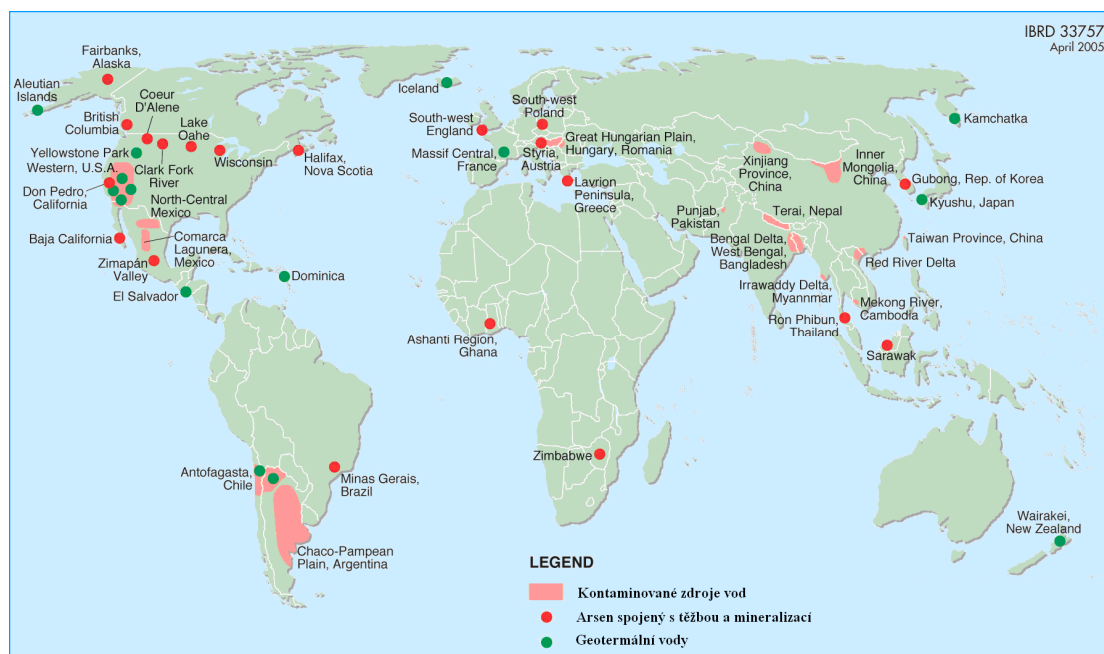
Arsen je polokov hojně rozšířený v zemské kůře, kde se vyskytuje v průměrné koncentraci 2 mg.kg^{-1} . Je přítomen ve více než 200 minerálních speciích, z nichž nejběžnější je arsenopyrit¹. V nízkých koncentracích se vyskytuje v pramenité i mořské vodě a ve vulkanických plynech. V nepatrných koncentracích je proto přítomen ve všech živočišných a rostlinných tkáních a tekutinách.²

Těžba, zpracování neželezných kovů a spalování fosilních paliv jsou hlavní průmyslové procesy, které přispívají k antropogennímu znečištění arsenem ve vzduchu, vodě a půdě. Užití pesticidů zanechalo v minulosti velké plochy kontaminované zemědělské půdy obsahující arsen. Používání arsenu při konzervaci dřeva vedlo ke kontaminaci prostředí.¹

1.1.2 Arsen v pitné vodě

Arsen je běžně se vyskytující kontaminant v pitné vodě. Dostává se do vody především rozpouštěním minerálů a rud. Nicméně v některých oblastech jsou hlavním zdrojem arsenu průmyslové odpadní vody kontaminující místní zdroje pitné vody. iAs^{V} a iAs^{III} jsou dvě významné formy iAs běžně se nacházející jak v povrchových, tak podzemních zdrojích pitné vody.³

Arsenitan je pravděpodobněji najít v podzemní vodě, kde se nenachází kyslík (anaerobní podmínky), zatímco arseničnan je běžnější v aerobních povrchových vodách. Arsenitanový ion je oxidován na arseničnanový (ox. stav +V) za přítomnosti kyslíku, chlóru nebo manganistanu draselného.⁴



Obr. 1.1 Zdokumentované případy kontaminace podzemní vody iAs podle Britského geologického průzkumu a podle zpráv ze Světové banky ^{5,6}

Chronická expozice iAs v pitné vodě celosvětově ovlivňuje významnou část populace (viz. obr. 1.1). ^{6,7}

Na celém světě trpí milióny lidí rakovinou a dalšími nemocemi, které jsou spojeny s požitím vody obsahující vysokou hladinu iAs. Tyto stavy vyvolané pomalou otravou iAs jsou všeobecně označovány jako arsenicosis. ⁶

Například v Jižní a Východní Asii je odhadem 60 miliónů lidí (35 až 40 milionů v samotné Bangladéši) v ohrožení kvůli vysoké hladině běžně se vyskytujícího iAs v pitné vodě. (viz. tab. 1.1). ^{6,7}

Tab. 1.1 Populace v zemích Jižní a Východní Asie zasažená vysokými koncentracemi iAs v pitné vodě

Poloha	Úroveň iAs v pitné vodě (µg/l)	Ohrožená populace ^a	Počet pacientů s arsenicosis
Bangladéš	<1-2,300	35,000,000	10,000 (data z roku 2001)
Čína	40-4,400	5,600,000	522,566
Indie (Západní Bengál)	<10-3,200	5,000,000	200,000
Nepál	<10-200	550,000	8,600
Taiwan	10-1,800	10,000 ^b	ND

Poloha	Úroveň iAs v pitné vodě (µg/l)	Ohrožená populace ^a	Počet pacientů s arsenicosis
Vietnam	1-3,100	10,000,000 ^c	ND
Barma	ND	3,400,000	ND
Kambodža	ND	320,000 ^d	ND

^a Pitná voda s iAs > 50 µg.l⁻¹ ^b Před snížením ^c Odhad UNICEF ^d Maximum ND neznámé, data nejsou dostupná

Maximální přípustná koncentrace arsenu v pitné vodě je 50 µg.l⁻¹. Doporučená hodnota je podle EPA a WHO⁸ 10 µg.l⁻¹, což odpovídá také české normě.⁹

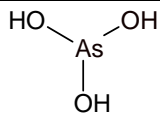
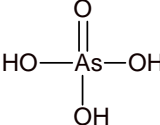
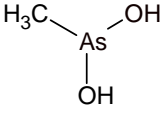
Expozice iAs v pitné vodě jsou běžné i v jiných geografických regionech, včetně USA.¹⁰ Dopad expozice iAs na lidské zdraví je v USA zřejmě méně závažný než v jiných regionech. Je to pravděpodobně zásluhou všeobecně nižších expozičních hodnot, lepší stravy a lepšímu přístupu k lékařské péči.⁶

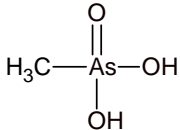
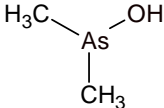
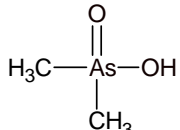
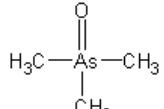
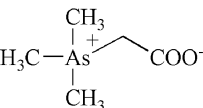
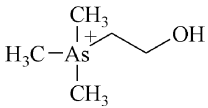
V České republice je zvýšený výskyt iAs v povrchových vodách především v okolí tepelných elektráren a také v oblastech s výskytem arsenopyritu.(jižně od Prahy).¹¹

1.1.3 Toxikologicky významné formy arsenu

Arsen může existovat v několika oxidačních stavech (+III, +V, 0, -III) a různých anorganických a organických formách. Tab. 1.2 ukazuje nejrozšířenější formy arsenu v životním prostředí a biologických matricích.¹²

Tab. 1.2 Specie arsenu běžně se vyskytující v přírodních a biologických systémech^{13,14,15}

Název	Zkratka	Chemický vzorec	Strukturní vzorec
Kyselina trihydrogenarsenitá	iAs ^{III}	As(OH) ₃	
Kyselina trihydrogenarseničná	iAs ^V	AsO(OH) ₃	
Kyselina monomethylarsenitá	MAs ^{III}	CH ₃ -As(OH) ₂	

Název	Zkratka	Chemický vzorec	Strukturní vzorec
Kyselina monomethylarseničná	MAs ^V	CH ₃ -As(O)(OH) ₂	
Kyselina dimethylarsenitá	DMAs ^{III}	(CH ₃) ₂ -As (OH)	
Kyselina dimethylarseničná	DMAs ^V	(CH ₃) ₂ -As (O)(OH)	
Oxid trimethylarseničný	TMAS ^V O	(CH ₃) ₃ AsO	
Arsenobetain	AsB	(CH ₃) ₃ As ⁺ CH ₂ COO ⁻	
Arsenocholin	AsC	(CH ₃) ₃ As ⁺ CH ₂ CH ₂ OH	

*pokud není uvedeno oxidační číslo As, jedná se o sumu V a III

1.1.4 Toxicita významných forem arsenu

Toxicita arsenu silně závisí na jeho chemické formě. Anorganické specie arsenu jsou toxicitější než organické specie. iAs^{III} formy jsou toxicitější než iAs^V .¹⁶ Toxicitý účinek arsenu a jeho sloučenin se snižuje v tomto pořadí: $iAs^{III} > iAs^V > MAs > DMAs >> AsB$.¹⁷ Arsen je tedy všeobecně toxický jak v arsenitých tak arseničných formách, ale je netoxický v některých vysoce methylovaných organických formách jako je arsenobetain a arsenocholin.¹⁸

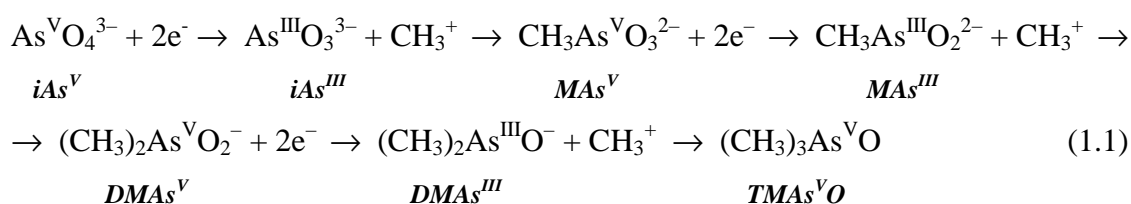
1.1.5 Metabolismus arsenu

Metabolismus iAs hraje klíčovou roli ve zmírnění jeho toxicity. Biomethylace je hlavní metabolickou cestou iAs v lidském organismu.¹⁹

Osud přijatého arsenu *in vivo* závisí:

- (1) na oxidačních a redukčních reakcích mezi iAs^V a iAs^{III} v plazmě,
- (2) na následných methylačních reakcích v játrech.⁸

Tato cesta zahrnuje následné reakce, ve kterých jsou specie iAs^V redukovány na trojmocné a specie iAs^{III} podléhají AS3MT methyltransferázou - katalyzované oxidační methylaci, poskytující methylované arseničnany obsahující iAs^V viz. schéma (1.1).



Jako hlavní produkty metabolismu iAs v lidském organismu byly určeny čtyři methylované sloučeniny arsenu. Methylarsenitá kyselina (MAs^{III}), methylarseničná kyselina (MAs^V), dimethylarsenitá kyselina (DMAs^{III}) a dimethylarseničná kyselina (DMAs^V).^{20,21,22,23,24}

Navíc trimethylované metabolity, včetně oxidu trimethylarseničného (TAs^VO), byly nalezeny v moči křečků vystavených iAs^{III} nebo DMAs^V, v moči krys vystavených iAs^{III}, MAs^V nebo DMAs^V a v moči lidí, kteří potravou přijali DMAs^V nebo arsenocukry. Zejména TAs^VO je hlavním produktem *in vitro* methylace iAs rekombinant krysí iAs^{III} - methyltransferázy.²⁵ Tyto methylované sloučeniny arsenu a specie iAs, arseničnan (iAs^V) a arsenitan (iAs^{III}) jsou pravidelně nacházeny v moči jedinců vystavených iAs v pitné vodě.^{20,21,22,23,24} Podíl těchto methylovaných metabolitů se mezi jedinci významně liší,^{26,27,28,29,30,31} což naznačuje, že změny v metabolismu iAs mezi jednotlivci mohou být z části zodpovědné za rozdíl v náchylnosti na toxicitu iAs.^{24,26,32,33}

Arsenobetain je absorbován a vylučován v nezměněné formě. Přítomnost arsenu ve vlasech a nehtech se používá jako indikátor předchozí expozice arsenu, protože arsen (stejně jako jeho trojmocná forma) se hromadí v tkáních bohatých na keratin (jako je

například kůže, vlasy a nehty). Tři z nejběžněji používaných bio-ukazatelů pro zjištění nebo kvantitu expozice arsenu je celkový arsen ve vlasech nebo nehtech, arsen v krvi a celkový arsen nebo specie metabolitů arsenu v moči.⁸

1.1.6 Důsledky chronických otrav z pitné vody

Dlouhodobé vystavení se arsenu z pitné vody má příčinnou souvislost se zvýšeným rizikem rakoviny kůže, plic, močového měchýře a ledvin, stejně jako další změny na kůži, jako je hyperkeratosa a pigmentační změny. Bylo uveřejněno, že přijímáním pitné vody o koncentraci ≥ 50 μg arsenu/litr souvisí se zvýšeným rizikem rakoviny plic, močového měchýře a arsenem způsobených kožních lézí.¹

Dalším rizikem jsou nemoci nerakovinového původu jako je onemocnění vnějšího vaskulárního a kardiovaskulárního systému,^{34,35,36,37} hypertenze³⁸ a cukrovky.^{39,40,41,42,43}

1.2 Generování a atomizace hydridů pro AAS

1.2.1 Generování hydridů

Generování plyných hydridů je jednou z nejrozsáhlejších metod v analytické praxi, jejímž základním rysem je vyšší účinnost vnášení analytu do absorpčního prostředí, což vede ke zvýšení citlivosti a separace analytu od matrice vedoucí k výraznému omezení interferencí.⁴⁴

Generování hydridů spočívá v uvolnění hydridu z roztoku (tj. v konverzi analytu na hydrid a v jeho přechodu do plynné fáze) a v transportu uvolněného hydridu proudem nosného plynu do atomizátoru. Ke konverzi analytu na hydrid se v nedávné historii používaly rozličné chemické reakce, ale v posledních letech se prakticky výhradně používá redukce borohydridem v kyselém (obvykle HCl) prostředí.⁴⁵

Ve vodných roztocích je reakce borohydridu s prvky v iontové či neiontové formě považována za redoxní reakci za předpokladu, že všechny čtyři vodíky od borohydridu jsou potenciálně schopny reagovat s M^{n+} , aby poskytly odpovídající hydrid MH_m . Za těchto podmínek se borohydrid, který je přidáván v mnohořádovém přebytku, rozkládá postupnou hydrolýzou za vzniku boranových komplexů, které postupně redukují analyt na těkavý hydrid. Každý atom vodíku ve vzniklém hydridu přitom pochází z jiné molekuly borohydridu.⁴⁶

1.2.2 Metody generování hydridů

Pro generování hydridů existují dva základní přístupy. Prvním z nich jsou metody přímého přenosu, při nichž je vygenerovaný hydrid veden přímo do atomizátoru. Druhým přístupem je kolekce, kdy je hydrid po nashromáždění v kolektoru přiveden do atomizátoru najednou.⁴⁴

1.2.2.1 Metody přímého přenosu

- *Kontinuální uspořádání (continuous flows – CF)*

Při kontinuálním uspořádání je konstatní tok vzorku smícháván s konstantním tokem redukčního činidla a průchodem přes reakční cívku se dostává až do separátoru fází, kde dochází k oddělení plynné fáze od kapalně. Plynná fáze je vedena do atomizátoru, zatímco kapalná fáze je ze separátoru fází odtahována jako odpad. Nosný plyn se přidává před vstupem do separátoru fází.⁴⁵

- *Dávkování do proudu (flow injection –FI)*

Do proudu nosného média jsou vstřikovány malé objemy vzorku, které jsou dále smíchány s redukčním činidlem a ještě před vstupem do separátoru fází smíchány s nosným plynem. V separátoru fází je stejně jako u kontinuálního generování oddělena kapalná fáze, která jde do odpadu, od fáze plynné vstupující do atomizátoru.⁴⁴

Celkový tok plynů je ustálený, ale vstupní funkce má tvar nesymetrického píku se strmou náběhovou hranou a s protaženou sestupovou hranou.⁴⁷

- *Dávkové uspořádání (batch)*

Dávkový generátor je nádobka, která slouží jako reaktor a zároveň jako separátor fází. Vzorek se nadávkuje dovnitř generátoru a k němu se přidá pomocí peristaltické pumpy nebo injekční stříkačky redukční činidlo. Uvolněný hydrid je transportován do atomizátoru nosným plynem, který se přidává do generátoru. Další dávka může být přidána až po odstranění zreagované směsi do odpadu a po vypláchnutí generátoru.⁴⁵

1.2.2.2 Kolekční metody

- *Kolekce vymrazováním*

Ke kolekci vymrazováním slouží obvykle U-trubice ponořená v kapalném dusíku. Vygenerovaný hydrid je v U-trubici zachycen, naopak nosný plyn (helium) společně s vodíkem prochází. Po ohřevu U-trubice dochází k uvolnění a transportu hydridů do atomizátoru proudem nosného plynu.

V U-trubici zároveň dochází k rozdělení plynných hydridů, což je komplexní chromatografický proces.

Hlavní předností kolekce vymrazováním je zachycení hydridu z velkého objemu vzorku (nakoncentrování) a tím lze dosáhnout vysoké citlivosti.⁴⁵ Podrobněji viz. 1.3.3.

1.2.3 Atomizace hydridů

1.2.3.1 Grafitové atomizátory

- *“In-situ“ kolekce*

Při in-situ kolekci slouží grafitový atomizátor jako kolekční médium a zároveň jako atomizační cela. Hydrid je přiváděn z generátoru do grafitového atomizátoru, kde dochází k jeho zachycení při teplotách mezi 200-600°C. Pro přívod hydridu do grafitové kyvety je používána křemenná kapilára, která je po skončení generování odstraněna a následně je provedena atomizace hydridu⁴⁵ obvykle při teplotě nad 2000°C.⁴⁷

1.2.3.2 Křemenné atomizátory

Obvykle mají T – uspořádání, jejichž vodorovné rameno je umístěné v optické části spektrometru a je zevně vyhříváné buď plamenem acetylen-vzduch nebo pomocí odporově zahříváné píčky na teplotu 550 – 1100°C.⁴⁵

- *Konvenční atomizátory QTA*

K atomizaci hydridu dochází v oblaku extrémně energetických vodíkových radikálů, které vznikají na začátku horké zóny konvenčního atomizátoru a to reakcí mezi vodíkem (vzniká při rozkladu borohydridu) a kyslíkem. Oblak vodíkových radikálů se

může nacházet v přívodním rameni konvenčního atomizátoru, ve spoji přívodního ramene s optickou trubicí, ale může být i v celé optické trubicí. Účinnost atomizace závisí na plošné hustotě oblaku vodíkových radikálů, která je u konvenčních atomizátorů nedostatečná. Proto mají tyto atomizátory velice nízkou odolnost vůči interferencím, která je způsobena jinými těkavými sloučeninami, nedostatečnou linearitou analytických kalibrací a špatnou opakovatelností citlivosti.⁴⁵

- *Multiatomizátor*

Je tvořen optickou trubicí, která se skládá ze dvou koncentrických trubic a tím se liší od konvenčního atomizátoru. Vnitřní trubice je tvořena mnohočetnými miniaturními otvory, které se nacházejí po celé délce multiatomizátoru. Vzduch přiváděný vnější trubicí se dostává pomocí miniaturních otvorů do celého prostoru vnitřní trubice a vznikající vodíkové radikály tak zaujmají celý objem optické trubice. Tímto dochází ke zlepšení odolnosti vůči interferencím a ke zlepšení linearit analytických kalibrací.⁴⁸

1.2.4 Interference

Díky separaci analytu od matrice jsou **spektrální interference** v metodě HG - AAS nevýznamné. V úvahu přichází pouze nespecifická (molekulární) absorpce, kterou lze snadno vykompenzovat.⁴⁷

Nespektrální interference se projevují v kapalně a plynné fázi. V kapalně fázi se interference projevuje snížením účinnosti redukční reakce,⁴⁴ což má za následek neúplné převedení analytu do plynné fáze či reakci hydridu s interferentem.⁴⁵ Z důvodu široké rozmanitosti interferentů (organické látky, anorganické ionty i rozpuštěné plyny) je nutné pro odstranění interferencí v kapalně fázi zvolit individuální přístup vzhledem ke stanovovanému analytu, analyzovanému materiálu a použité technice generování.⁴⁴

V plynné fázi jsou nejčastějšími interferenty těkavé látky unikající z reakční směsi, drobné kapičky rozprášené při reakci v generátoru a zdaleka nejobvyklejšími interferenty jsou ostatní hydridy. Vlivem uvedených interferentů dochází ke snížení populace vodíkových radikálů a k zániku volných atomů analytu reakcemi s interferentem, což vede až ke snížení účinnosti atomizace. Zmíněné interference

v plynné fázi lze eliminovat vhodnou volbou atomizátoru nebo volbou podmínek generování, za kterých se podstatně sníží generování interferentu.⁴⁷

1.3 Speciační analýza arsenu

Stanovení množství individuálních forem analytu je označováno jako speciační analýza (nebo stanovení specií). Specie mohou být rozlišeny např. oxidačním stavem (redoxní specie), molekulovou formou (organokovové sloučeniny), koordinací (komplexy), skupenstvím, ve kterém se analyt nachází (rozpuštěný, koloidní, suspendovaný, sorbovaný) nebo také rozpustností (vyluhovatelností) ve vybraném rozpouštědle (např. voda, roztok soli, kyseliny). Protože jen velmi málo atomových spektrálních technik je selektivních pro stanovení specií, zahrnuje speciační analýza většinou dva kroky: separaci a stanovení.¹⁷ Separaci a následné stanovení lze provést pomocí generování substituovaných hydridů a pomocí post - kolonového generování. U generování substituovaných hydridů se nejdříve vygenerují příslušné substituované hydridy, které se následně rozdělí a postupně dochází k jejich atomizaci a detekci. K tomuto přístupu se používá především generování hydridů spojené s kolekcí vymrazováním (HG – CT) s použitím AAS, AFS popř. ICP – MS detekce. V případě post-kolonového generování hydridů je nejdříve provedena separace s následným generováním hydridů (např. HPLC – HG) a s následnou detekcí pomocí AFS popř. ICP - MS. Lze také využít separační techniky s citlivou detekcí bez generování hydridů např. HPLC – ICP - MS, která se s úspěchem používá pro separaci sloučenin arsenu.¹³

1.3.1 Speciace arsenu pomocí generování hydridů

Stanovení iAs^{III} , iAs^V a methylovaných specií arsenu použitím HG - CT přístupu vyžaduje ve skutečnosti dvou-dimenzionální analýzu. První dimenze, tj. rozlišení methylace a specií, je kolekce vymrazováním a separace arsanů vygenerovaných z iAs , MAs , $DMAs$ a $TMAAs^VO$ specií bez ohledu na oxidační stav As . Druhá dimenze, rozlišující mezi tří- a pětimocnými sloučeninami arsenu, je zajištěna selektivním generováním hydridů. Je obvykle založena na specifické schopnosti generování arsanů z příslušných valencí v závislosti na pH.⁴⁹

1.3.2 Selektivní generování hydridů

Tento přístup těží ze skutečnosti, že generování arsanů je značně vylepšeno z protonizovaných substrátových specií a že pK_a hodnoty pro iAs^{III} a iAs^V a také pro $MAAs^{III,V}$ a $DMAAs^{III,V}$ specie se významně liší.⁴⁹ Obecně jsou sloučeniny arsenu redukovány na hydridy, když je pH nižší než jejich hodnota pK_a , což je v případě, kdy sloučeniny arsenu nejsou ionizovány. Např. iAs^V má mnohem nižší pK_a (2,2) než iAs^{III} (9,23). iAs^{III} může být redukován při vyšším pH než 2,2, potřebné pro generování arsanů z iAs^V . Je stanoveno, že hodnota pK_a pro třímocné methylované arsenitany, $MAAs^{III}$ a $DMAAs^{III}$ bude větší než pro $MAAs^V$ (4,1) a $DMAAs^V$ (6,2) dovolující selektivní redukci třímocných specií při vyšším pH.

Současná práce ukazuje, že arsenitany obsahující As^{III} (iAs^{III} , $MAAs^{III}$, $DMAAs^{III}$) jsou hned připraveny k převedení na arsany redukcí při pH 6 nebo nižším pH. Na druhou stranu arseničnany obsahující As^V (iAs^V , $MAAs^V$, $DMAAs^V$) jsou převedeny na arsany jen redukcí při pH 2 nebo nižším. Tedy selektivní generování hydridů ve spojení s AAS může být použito pro určení oxidačního stavu arsenu iAs , $MAAs$ a $DMAAs$ v moči a dalších biologických matricích.²¹

Protože je ve skutečnosti nemožné selektivně generovat arsan z pěti-mocných forem v přítomnosti tří-mocných forem, postup selektivního generování hydridů je založen na následujícím schématu: určení třímocných forem v jednom alikvótu vzorku (aliquót A) a sumou obou forem v druhém alikvótu vzorku (aliquót B). Poté je z rozdílu vypočítáno množství pětímocných arsanů. Třímocné formy jsou určeny výběrem podmínek generování pro kompletní konverzi trojmocných forem na hydrid a současně zabraňující generování hydridů z vyšší valence.⁴⁹

Jiným přístupem selektivního generování hydridů je před-redukce L-cysteinem. Pětímocné sloučeniny jsou nejprve zredukovány na třímocné ošetřením reduktantem L-cysteinem. Jsou potřebná tedy dvě měření na každý vzorek, aby se určilo množství iAs^{III} - obsahujících specií a iAs^{III+V} specií po úpravě L-cysteinem. Množství iAs^V obsažených specií je poté vypočítáno jako rozdíl mezi dvěma měřeními.⁵⁰

Předredukcí L-cysteinem se získá stejná účinnost generování, pokud se generování provádí z HCl média, protože generování hydridů je účinné jen ve velmi nízkém rozmezí koncentrace kyseliny (0.01 – 0.1 mol.l⁻¹). Tento problém byl vyřešen použitím Tris-HCl pufru, který zároveň zajišťuje selektivní generování hydridů jen z třímocných

specií arsenu bez předredukce.⁵¹ L-cystein redukuje pětimocné arseničnany na třímocné a reaguje s třímocnými arsenitany za vzniku arsenothiolových derivátů. Také bylo publikováno, že L-cystein zvyšuje výkon generování hydridů tvořením boranových komplexů s borohydridem.⁴⁹

Předredukce 2% L-cysteinem s použitím Tris pufru (pH 6) při generování byla úspěšně použita pro speciální analýzu arsenu v biologických vzorcích jako jsou buňky odloučené z výstelky močového měchýře.⁵² Také bylo odzkoušeno použití předredukce na vzorky moči s použitím 2% L-cysteinu a kyseliny thioglykolové, která se jevila ještě lepším předredukčním činidlem než L-cystein a značně zkracovala dobu předredukce.⁵¹

1.3.3 Generování substituovaných hydridů

- *Kolekce vymrazováním*

Kolekce vymrazováním - cryotrapping je nakoncentrování a separace vygenerovaných arsanů.⁵⁰ Protože body varu arsanů jsou rozdílné: AsH_3 (-55°C), CH_3AsH_2 (2°C), $(\text{CH}_3)_2\text{AsH}$ ($35,6^\circ\text{C}$), $(\text{CH}_3)_3\text{As}$ (70°C)⁵³, mohou být specie arsenu rozlišeny pomocí generování hydridů s kolekcí vymrazováním a GC. Arsany produkované reakcí s borohydridem jsou zachyceny v U-trubici ponořené v kapalném dusíku. Po kompletním záchytu je U-trubice odstraněna z kapalného dusíku a zahřáta. Hydridy jsou postupně uvolněny a vedeny do detekčního systému.¹⁴

Záchyt arsanů probíhá při -196°C v U-trubici obvykle naplněné chromatografickou náplní.⁵⁴

1.4 Sušení plynné fáze při generování hydridů

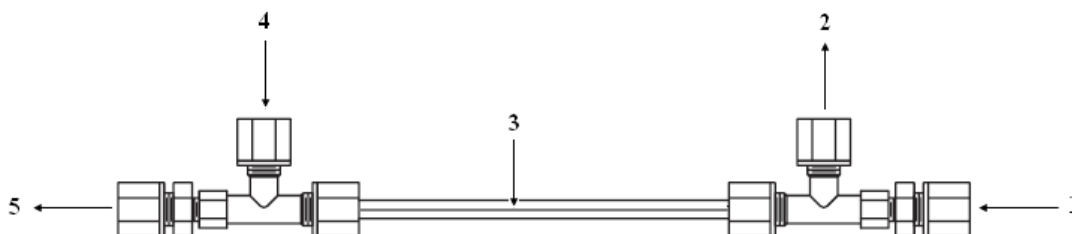
Jednou z nevýhod metody generování hydridů je produkce významného množství vodní páry během reakce.⁵⁵ Při použití metody HG – CT - AAS se vodní pára společně s vygenerovanými arsany může dostat do U-trubice a po jejím vymražení při teplotě kapalného dusíku tvoří krystalky ledu a může U-trubici ucpat. Z uvedeného důvodu byly používány různé způsoby na odstraňování vodní páry např. umístění chlazeného kondenzátoru, který byl v systému zařazen mezi generátor hydridů a U-trubici a byl chlazen směsí suchého ledu a acetonu, nebo ledem a vodou popř. ledem a chloridem sodným. Nebo byla použita různá sušidla (NaOH , H_3PO_4 , H_2SO_4 , CaO , silikagel apod.).

Nejvhodnějším sušidlem pro arsany a methylsubstituované arsany byl hydroxid sodný, protože jeho použitím nedocházelo k absorpci vygenerovaných arsanů.⁵³ Další možností jsou membránové sušící trubice viz. následující kapitola.

1.4.1 Sušící trubice Perma Pure

Základem sušících trubic je kopolymer Nafion, který je vysoce selektivní a ideální pro odstraňování vodní páry z plynů. Voda prochází stěnou membrány Nafion a vyprchává do vnějšího prostředí (vzduchu nebo plynu). Tento proces je nazýván „preevaporace“ a je závislý na gradientu vlhkosti mezi plynem uvnitř a prostředím vně stěny hadičky (viz. obr. 1.2).

Dnes jsou takové trubice vyráběné firmou Perma Pure široce využívány po celém světě pro úpravu plyných vzorků zejména pro analýzu v medicíně, vědě a průmyslu.



Obr. 1.2 Schéma sušící trubice; 1 – vstup plyného vzorku s vodní párou, 2 – výstup dusíku s vodní párou, 3 – membrána Nafion, 4 – vstup suchého plynu dusíku, 5 – výstup vysušeného plyného vzorku

Nafion je kopolymer tetrafluoroethylenu a perfluoro-3,6-dioxa-4-metyl-7-okten-sulfonové kyseliny (viz. obr. 1.3). Podobně jako teflon, má Nafion vysokou chemickou odolnost, ale přítomnost funkčních skupin sulfonové kyseliny mu dává neobvyklé vlastnosti. Sulfonová kyselina má vysokou afinitu k vodě a je schopná absorbovat 13 molekul vody na jednu skupinu sulfonové kyseliny v polymeru. Nafion absorbuje až 22% vody (hmotnostní podíl).

Přenos vody přes mikroporézní permeační membránu je velmi pomalý proces difúze. Nafion, na rozdíl od mikroporézních membrán, odstraňuje vodu absorpcí (hydratací). Tato absorpce vykazuje kinetickou reakci prvního řádu, takže rovnováha je ustanovena velmi rychle (typicky během milisekund).

1.5 Mineralizace biologických vzorků pro AAS

Pevné biologické vzorky - tkáně je možné analyzovat pomocí generování hydridů až po jejich mineralizaci (rozkladu). Rozklad, resp. odstranění organické matrice, je také nutným krokem k minimalizaci chemických nebo fyzikálních interferencí.

Konkrétně pro stanovení arsenu generováním hydridů je dokonalý rozklad vzorku velmi důležitý, a to z toho důvodu, že jeho organické formy jsou velmi odolné vůči redukci borohydridem sodným.⁶¹ Zároveň musí být pro speciační analýzu použita taková mineralizace, při které nebude docházet ke vzájemné přeměně specií analytu. Při speciační analýze arsenu v kuřecích játrech, které byly hlavním předmětem této diplomové práce, byly použity dva mineralizační přístupy: kyselá mineralizace s kyselinou fosforečnou a novější zásaditá mineralizace s tetramethylamonium hydroxidem (TMAH).

1.5.1 Kyselá mineralizace

Vlivem mineralizace docházelo k oxidaci iAs^{III} na iAs^V , a proto nebyl brán zřetel na stanovení iAs^V , ale pouze na stanovení obou forem iAs^{III+V} .

Při mineralizaci kuřecích jater se vycházelo z již odzkoušeného postupu kyselé mineralizace s kyselinou fosforečnou, která byla používána v předchozích referencích.^{50,62}

1.5.2 Zásaditá mineralizace

Novějším přístupem je mineralizace pomocí TMAH, která byla použita pro stanovení specií arsenu v mořské⁶³ a rybí tkáni^{64,65}, v rýži⁶⁶ a v rostlinných materiálech,⁶⁷ nebo také při stanovení celkového množství nejen As, ale i jiných prvků jako např. Cd, Ni, Pb, atd. v lidských vlasech⁶⁸ či v živočišných tkáních.^{69,70,71} Způsob provedení zásadité mineralizace se lišil druhem stanovení uváděných prvků. Ve většině případů byl použit koncentrovaný 25% vodný roztok TMAH^{64,68,69,71}, nebo byl zředěn na nižší koncentrace (1 – 10%).^{63,65,66,67} Výjimečně byl použit 25% roztok TMAH v methanolu.⁷⁰ Mineralizace byla ve většině čerpaných zdrojů provedena použitím mikrovlnného systému,^{64,65,66,67} nebo bylo použito pouze ohřevu,^{63,71} vodní lázně vyhřáté na teplotu 60 – 70°C,^{68,69,70} popř. jen pokojové teploty.⁶⁸

Podmínky zásadité mineralizace pro speciální analýzu arsenu z výše uvedené rešerše jsou shrnuty v tab. 1.3. Postup zásadité mineralizace (viz. 2.11.3), vypracovaný na základě výše uvedené rešerše, byl použit pro mineralizaci kuřecích jater a také na CRM.

Tab. 1.3 Podmínky zásadité mineralizace pro speciální analýzu arsenu

Reference	Matrice	Analyty	Postup mineralizace	Metoda stanovení
63	Mořské tkáň	iAs ^{III} , MAs, DMAs, AsB, arsenocukry	0,3 g mořské tkáň + 1 ml vodného 25% roztoku TMAH + 2 ml vody Poté extrakce po dobu 30 min. (10 min. do 50°C a 20 min. na 50°C)	ETA - AAS HG - AAS
64	Rybí tkáň	Celkový As, iAs ^{III} , iAs ^V , MAs, DMAs	0,3 g rybí tkáň + 0,3 ml 25% vodného TMAH, poté mikrovlnný rozklad při 50°C	ETA - AAS
65	Rybí tkáň	iAs ^{III} , iAs ^V , MAs, DMAs, AsB, Arsenocholin	0,10 - 0,13 g vzorku + 10 ml 5% vodného roztoku TMAH, poté mikrovlnný rozklad při teplotě 50°C	HPLC – ICP -MS
67	Rostlinné materiály	Celkový As, iAs ^{III} , iAs ^V , MAs, DMAs	0,15 g rostlinného materiálu + 9,5 ml 10% TMAH, poté mikrovlnný rozklad při 90°C	Iontovýmienná chromatografie- ICP - MS

2. Experimentální část

2.1. Použité chemikálie

- deionizovaná voda připravená zařízením ULTRAPURE (Watrex, USA)
- Tetrahydridoboritan sodný, purum, $\geq 97,0\%$ (Borohydrid sodný, čistý) Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- Hydroxid draselný, chemicky čistý, Lach-Ner (Neratovice, ČR)
- L-cystein hydrochlorid monohydrát, pro biochemii Merck (Darmstadt, Německo), kat. č. 102839
- Antifoam B emulze, 10% vodná emulze, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- Tris(hydroxymethyl)aminomethan hydrochlorid, $\geq 99,0\%$ Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- Ortho-fosforečná kyselina, 85% Suprapur®, Merck (Darmstadt, Německo)
- Ortho-fosforečná kyselina, 85% p.a., Lachema (Brno, ČR)
- Tetramethylamonium hydroxid, 25% vodný roztok Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- certifikovaný referenční materiál DOLT-4 National Research Council Canada (Ontario, Kanada)
- HCl, 37% p.a, Merck (Darmstadt, Německo)
- pH pufr, $4,01 \pm 0,02$, Mettler-Toledo (Greifensee, Švýcarsko)
- pH pufr, $7,0 \pm 0,02$, Mettler-Toledo (Greifensee, Švýcarsko)
- Chromosorb WAW-DMCS 45/60, OV-3, Supelco (Bellefonte, PA)
- Triton® X-100, SERVA Electrophoresis (Heidelberg, Německo), kat. č. 37240
- argon 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)

2.2. Pracovní roztoky a jejich příprava

- Příprava 0,75 mol.l⁻¹ Tris pufu: rozpuštění 29,55 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan hydrochloridu a doplnění destilovanou vodou na konečný objem 250 ml, poté úprava pH na 6 pomocí 10% roztoku hydroxidu draselného (chemicky čistý, Lach-Ner, Neratovice, ČR).
- Použitá redukční činidla:
1% NaBH₄ stabilizovaný 0,1% KOH pro generování hydridů se zapojením sušících trubic
1% NaBH₄ stabilizovaný 0,1% KOH v 0,01% Antifoam B emulzi pro generování hydridů ze suspenze kuřecích jater

2.3. Standardní roztoky arsenu

Sériovým ředěním níže uvedených zásobních roztoků deionizovanou vodou byly připraveny příslušné koncentrace (200, 100, 0,5, 1, 2 a 3 ng.ml⁻¹) jednotlivých forem arsenu popř. jejich směsné standardní roztoky:

- Zásobní roztok 1000 μg.l⁻¹, iAs^{III}
připraven z As₂O₃, Lachema (Brno, ČR) (rozpuštěného v 1 ml 10% KOH)
- Zásobní roztok 1000 μg.l⁻¹ MAs^V,
připraven z Na₂-CH₃AsO₃.6H₂O, Chem. Service (West Chester, PA, USA)
- Zásobní roztok 1000 μg.l⁻¹ DMAs^V,
připraven z H(CH₃)₂AsO₂, Strem Chemicals, Inc. (Newburyport, MA, USA)
- Zásobní roztok 500 μg.l⁻¹ TMs^VO
připraven z (CH₃)₃AsO; (University of British Columbia)
- Zásobní roztok 500 μg.l⁻¹ AsB
připraven z Arsenobetain, ≥ 99,0%, p.a., Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)

2.4. Použitý materiál

- křemenná U-trubice, vnitřní průměr 2,5 mm, tloušťka stěny 1 mm
- odporový drát Ni80-CR20, Omega Engineering (Stamford, CT, USA)
- skleněný minihomogenizátor s kulatým dnem, objem 30 ml, průměr 25 mm
- pistilka s třecí částí z PTFE, délka 270 mm

- korková zátka
- skelná vata
- neutrální silikon sanitární, INVA Building Materials (Frýdek-Místek, ČR)
- 7 ml čiré vialky, Supelco (Bellefonte, PA, USA)
- PTFE víčka na 7 ml čiré vialky, Supelco (Bellefonte, PA, USA)
- Dewarova nádoba, vnitřní průměr 135 mm, objem 4,3 l
KGW - Isotherm (Karlsruher, Německo)

2.5. Sušící trubice

- sušící trubice, vnitřní průměr 2,184 mm, vnější průměr 2,742 mm, délka 310 mm, MD-110-12FP, Perma Pure inc. (Toms River, NJ, USA)
- sušící trubice, vnitřní průměr 1,524 mm, vnější průměr 1,829 mm, délka 610 mm, MD-070-24F-2, Perma Pure inc. (Toms River, NJ, USA)
- PTFE trubice, vnitřní průměr 1,5 mm, vnější průměr 3,38 mm, délka 610 mm

2.6. Přístrojové vybavení

- atomový absorpční spektrometr AAnalyst 800
Perkin-Elmer (Massachusetts, USA)
- arsenová bezelektrodová výbojka (EDL systém 2)
napájení při 376 mA, vlnové délce 193,7 při šířce štěrby 0,7 mm
Perkin-Elmer (Shelton, CT, USA)
- software WinLab 32, Perkin-Elmer (Massachusetts, USA)
- systém flow injection (systém peristaltických pump s injekčním ventilem), FIAS 400, Perkin Elmer (Massachusetts, USA)
- laboratorní transformátor, EA-PS 3065-10B
Elektro-Automatik (Viersen, Německo)
- multiatomizátor, délka 120 mm, vnitřní průměr 7 mm
- hadičky PTFE, vnitřní průměr 1,0 mm, VICI[®] (Waterbury, Houston, TX)
- hadičky Tygon, vnitřní průměr 0,89 mm
Ismatec (Weirtheim-Mondfeld, Německo)
- hadičky Tygon, vnitřní průměr 1,42 mm

Ismatec (Weirtheim-Mondfeld, Německo)

- hadičky Tygon, vnitřní průměr 1,14 mm
Ismatec (Weirtheim-Mondfeld, Německo)
- hadičky Tygon, vnitřní průměr 1,85 mm
Ismatec (Weirtheim-Mondfeld, Německo)
- T-konektory, 0,75 a 1 mm, VICI[®] (Waterbury, Houston, TX)
- průtokoměr pro vodík, FMA – 2604A, Omega Engineering, Inc.
(Stamford, CT, USA)
- průtokoměr pro vzduch, FMA – 2604A, Omega Engineering, Inc.
(Stamford, CT, USA)
- průtokoměr pro helium, 32915-84, Cole-Parmer Instrument Company
(Vernor Hills, Illinois, USA)
- stojanová vrtačka, 660 ot./min., Einhell-UNICORE s.r.o. (Karlovy Vary, ČR)

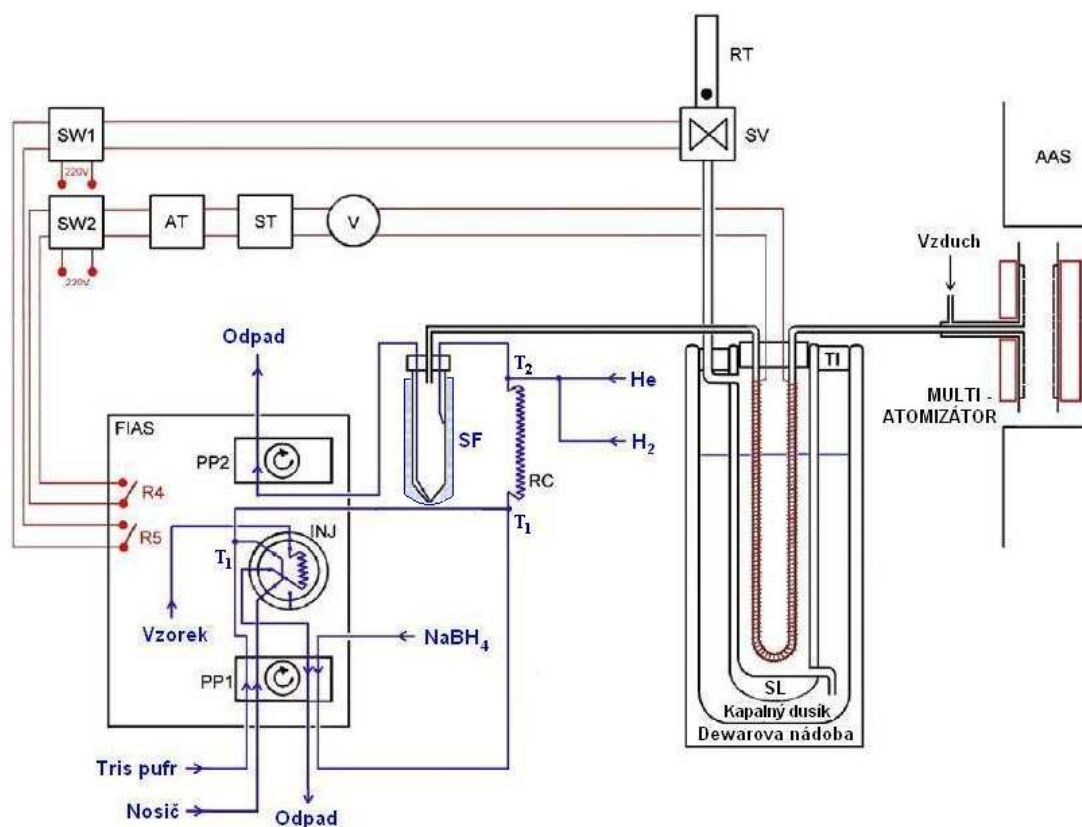
Další přístroje:

- analytické váhy, přesnost 0,01 g, Sartorius (Göttingen, Německo)
- pH metr, Seven easy pH, Mettler Toledo (Greifensee, Švýcarsko)
- elektroda InLab[®] 413 pH, Mettler Toledo (Greifensee, Švýcarsko)
- magnetická míchačka, IKA[®] lab disc [WHITE] (Staufen, Německo)
- zařízení pro mineralizaci, digestion system 12, 1009 Digester, Tecator
FOSS NIRSystems, Inc. (Laurel, MD, USA)

2.7. Systémy pro generování hydridů

2.7.1 Automatizovaný systém generování hydridů

Použitý systém pro speciaci a generování hydridů, vyvinutý dříve na UIACH byl detailně popsán v předchozí referenci.⁴⁹ Systém je postaven na modulu FIAS 400, ovládaném obslužným softwarem spektrometru WinLab 32. Schéma systému použitého pro experimenty se sušícími trubicemi je znázorněno na obr. 2.1.



Obr. 2.1 Schéma automatizovaného systému generování a kryogenního záchytu; modrou čarou znázorněny cesty kapalin, červeně vyznačeny vodiče a některé části elektrických zařízení a elektricky vyhřívaná píčka pro multiatomizátor; PP1, PP2 - peristaltické pumpy FIAS, INJ - injekční ventil (smýčka 500 μ l), RC - reakční cívka, SF - separátor fází v ledové lázni, SL - skleněná láhev s vakuovanou dvojitou stěnou, TI - tepelná izolace, R4, R5 - spínače FIAS, SW1, SW2 - vypínače, AT - autotransformátor, ST - oddělovací transformátor, V - voltmetr, SV - selenoidový ventil, RT - trubice rotametru pro sledování výpusti plynu, T₁ - T - konektor s otvory 0,75 mm, T₂ - T - konektor s otvory 1 mm

Vzorek byl pomocí injekčního ventilu (500 μ l smýčka) dávkován do proudu nosného média - deionizované vody. Tímto proudem nosného média byl unášen do prvního T - konektoru (s otvory 0,75 mm viz. obr. 2.1, T₁), kde byl smícháván s Tris pufrém a poté do druhého T - konektoru (s otvory 0,75 mm viz. obr. 2.1, T₁), do něhož byl čerpán zároveň redukční roztok (viz. 2.2). Takto smíchaný roztok redukčního činidla, Tris pufru a vzorku byl čerpán přes reakční cívku 1000 mm dlouhou o objemu 790 μ l do dalšího T-konektoru (s otvory 1 mm viz. obr. 2.1, T₂), do kterého byl přiváděn nosný plyn - helium společně s vodíkem. Stálé průtoky zmíněných plynů byly udržovány pomocí hmotnostních průtokoměrů (viz. 2.6). Průtok pro helium byl 75 ml.min⁻¹. a pro vodík 15 ml.min⁻¹. Reakční směs byla poté čerpána až do separátoru fází, kde byla oddělena plynná fáze (hydridy arsenu) od fáze kapalné. Plynná fáze vstupovala přes tzv. kryogenní past (viz. 2.7.2) do multiatomizátoru, zatímco zbylá kapalná fáze byla ze

separátoru odčerpána pomocí peristaltické pumpy 2. Separátor fází s nuceným odtahem byl sestaven z 50 ml polypropylenové baňky se šroubovacím uzávěrem s dvěma vstupními otvory 1/16“ a jedním otvorem 1/8“. Reakční směs byla přiváděna do separátoru fází pomocí PTFE hadičky, která byla mírně zatočena tak, aby přivádějící směs nestříkala volně do prostoru separátoru fází, ale aby naopak stékala po jeho stěně. Tímto byla docílena minimalizace vzniku aerosolu. Protože během generování vzniká významné množství vodní páry, které může vstupovat do U-trubice a způsobit tak její ucpání, byl separátor fází ponořen do ledové lázně (viz. obr. 2.1), čímž docházelo ke kondenzaci vodní páry a zároveň k jejímu snížení během generování.

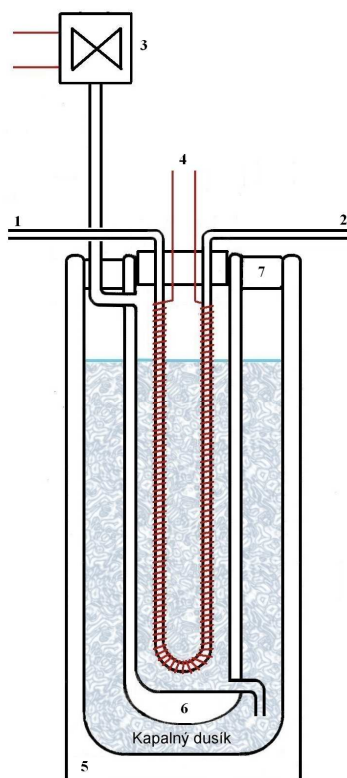
Činidla byla čerpána rychlostí $1,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ pomocí Tygonových hadiček o různých vnitřních průměrech: pro čerpání činidel hadička s vnitřním průměrem 0,89 mm, na odtah kapalin z injekčního ventilu byla použita hadička s vnitřním průměrem 1,42 mm a pro odtah zbylé směsi ze separátoru fází byly použity dvě stejné hadičky vnitřního průměru 1,85 mm.

Pro experiment s kuřecími játry byl použit podobný automatizovaný systém jako u experimentů se sušícími trubicemi. Při generování však nebyl použit injekční ventil, a vzorek společně s nosným médiem – deionizovanou vodou byl dávkován manuálně pipetou do kanálu pro vzorek za použití pipetovací špičky, která byla nasazená na Tygonovou hadičku. Manuální dávkování bylo při tomto experimentu provedeno z důvodu, aby se předešlo ucpání injekčního ventilu suspenzí měřených mineralizátů kuřecích jater. Množství nadávkovaného vzorku v jednom cyklu bylo $500 \mu\text{l}$ a poté byl vzorek vypláchnut $1000 \mu\text{l}$ deionizované vody. Pro čerpání činidel a vzorku byly použity Tygonové hadičky na peristaltickou pumpu 1 s vnitřním průměrem 1,14 mm. Další použité Tygonové hadičky na peristaltickou pumpu 2, PTFE hadičky, reakční cívka, T-konektory, separátor fází v ledové lázni a průtoky plynů byly stejné jako u výše zmíněných experimentů se sušícími trubicemi.

2.7.2 Kryogenní past

Kryogenní past byla tvořena křemenou U-trubicí o vnitřním průměru 2,5 mm s tloušťkou stěny 1 mm, která byla rovnoměrně omotána odporovým drátem Ni80/Cr20 o délce 2,8 m a celkovém odporu 15Ω . U-trubice byla naplněna chromatografickou náplní. Po naplnění byla do obou konců U-trubice vložena skelná vata, aby se zabránilo

vysypání náplně. Poté byla takto připravená U-trubice sušena heliem po dobu několika hodin. Odporový drát byl ovinut po celé délce náplně a dosahoval přibližně 50 mm pod ohyb výstupní/vstupní části U-trubice. Horní část U-trubice byla poté společně s přívodním kabelem na ohřátí zalepena do korkové zátky pomocí neutrálního sanitárního silikonu a poté byla vlepena do speciální skleněné láhve s vakuovanou dvojitou stěnou (40 mm vnitřní průměr, 300 mm hluboká). Přechod kapalného dusíku z vnějšího do vnitřního prostoru skleněné láhve byl řízen automaticky za pomoci selenoidového ventilu, který byl napojen na výpusť skleněné láhve a byl ovládán počítačem. Při měření byla takto popsaná U-trubice vložena do Dewarovy nádoby o objemu 4,3 l naplněné kapalným dusíkem a pro zajištění izolace byla tato nádoba přikryta polyetylenovým pěnovým víkem. Konstrukce celé kryogenní pasti je znázorněna na obr. 2.2.

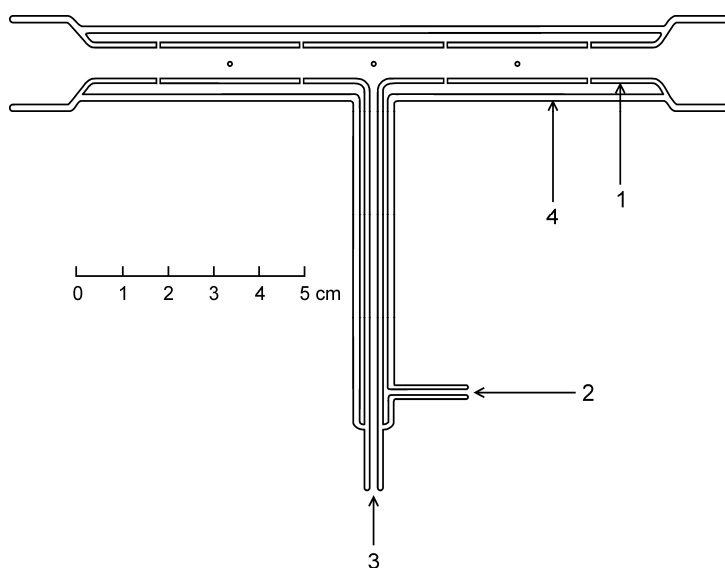


Obr. 2.2 Konstrukce kryogenní pasti; 1 – vstup nosného plynu s analytem ze separátoru fází, 2 – výstup nosného plynu s analytem k atomizátoru, 3 – počítačem ovládaný selenoidový ventil, 4 – elektrické vyhřívání pasti, 5 – Dewarova nádoba, 6 – skleněná láhev s vakuovanou dvojitou stěnou, 7 – polyetylenové pěnové víko

Kryogenní past byla použita jak u experimentů se sušícími trubicemi, tak u experimentů s kuřecími játry. Optimální napětí a proud pro ohřev U-trubice byl u obou zmíněných experimentů 32 V a 2,2 A. Ohřev U-trubice byl zajištěn pomocí laboratorního transformátoru.

2.7.3 Multiatomizátor

Atomizace vygenerovaných hydridů arsenu byla provedena v multiatomizátoru s optickou trubicí 120 mm dlouhou, s vnitřním průměrem 7 mm se 14-ti otvory, které mají průměr mezi 0,1 a 1 mm. Schéma multiatomizátoru je na obr. 2.3.⁴⁸ Vodorovná část multiatomizátoru byla zahřívána pomocí elektricky vyhřívané pícky na teplotu 900°C. Do multiatomizátoru byl přiváděn z vnější části vzduch o průtoku 35 ml.min⁻¹, jehož stálý průtok byl udržován hmotnostním průtokoměrem.⁴⁹ Na spojení U-trubice s multiatomizátorem byla použita PTFE hadička o vnitřním průměru 1 mm.



Obr. 2.3 Schéma multiatomizátoru; 1 – vnitřní trubice, 2 – vstup pro vzduch, 3 – vstup nosného plynu s analytem, 4 – vnější trubice

2.7.4 Měřicí cyklus pro experiment se sušícími trubicemi

Měřicí cyklus byl kontrolován pomocí jednotky FIAS 400, jehož program je ukázán v tab. 2.1. Programy byly pro oba experimenty různé a to z důvodu použití rozdílné metody generování.

Tab. 2.1 Program FIAS pro automatizovaný HG-CT-AAS

Krok	Čas (s)	Pumpa 1 (ot.min ⁻¹)	Pumpa 2 (ot.min ⁻¹)	Pozice inj. ventilu	Selenoidový ventil	Ohřev U-trubice	Pozn.
P*	30	45	100	plnění	otevřený	vypnuto	plnění smyčky
1	60	45	0	nástřík	otevřený	vypnuto	generování arsanů a
2	90	0	0	nástřík	otevřený	vypnuto	transport arsanů
3	18	0	0	nástřík	uzavřený	zapnuto	předehřátí U-trubice
4	32	0	0	plnění	uzavřený	zapnuto	ohřev U-trubice
5	7	0	0	plnění	uzavřený	vypnuto	přestávka v ohřevu
6	19	0	0	plnění	uzavřený	zapnuto	ohřev U-trubice
7	35	0	70	nástřík	uzavřený	zapnuto	ochlazení U-trubice
8	80	0	70	nástřík	otevřený	vypnuto	přípr. na další cyklus
Celkový čas: 371 s							

V kroku P – plnění smyčky (viz. tab. 2.1) je smyčka naplněna vzorkem. V kroku 1 je vzorek dávkován do proudu nosiče – deionizované vody při vypnuté pumpě 2, která odtahuje kapaliny ze separátoru fází do odpadu. V kroku 2 dochází k dokončení generování arsanů ze směsi a k jejich transportu do U-trubice. V případě všech zmíněných kroků je ohřev U-trubice vypnutý a selenoidový ventil je otevřený. Hladina kapalného dusíku uvnitř skleněné láhve, ve kterém se U-trubice nachází je stejná jako vně skleněné láhve v Dewarově nádobě a U-trubice má teplotu kapalného dusíku. V kroku 3 se selenoidový ventil uzavře a začíná ohřev U-trubice. Kapalným dusíkem je vytlačeno jeho vznikajícím plynem ze skleněné láhve do Dewarovy nádoby. Postupným ohřevem U-trubice dochází k uvolnění a zároveň k separaci arsanů na chromatografické náplni U-trubice v závislosti na jejich bodu varu a arsany postupně přecházejí do multiatomizátoru. V kroku 5 je ohřev U-trubice krátce přerušeno na 7 s a to z důvodu

lepšího rozlišení dimethyl- a trimethylarsanu. V následujících krocích 6 a 7 ohřev U-trubice pokračuje pro odstranění vodní páry z U-trubice. V posledním kroku se selenoidový ventil otevře a kapalný dusík se zpátky přemístí do prostoru U-trubice a tím dojde k jejímu ochlazení opět na teplotu kapalného dusíku. Během kroku 7 a 8 je zreagovaná směs současně odtahována ze separátoru fází peristaltickou pumpou 2 do odpadu. Po vychlazení U-trubice (po ukončení kroku 8) je systém opět připraven na další cyklus. Celkový čas analýzy je 371 s.⁴⁹

2.7.5 Měřicí cyklus pro experiment s kuřecími játry

Měřicí cyklus byl stejně jako u suších trubic kontrolován jednotkou FIAS 400, jehož program je ukázán v tab. 2.2.

Tab. 2.2 Program FIAS pro automatizovaný HG-CT-AAS

Krok	Čas (s)	Pumpa 1 (ot.min ⁻¹)	Pumpa 2 (ot.min ⁻¹)	Selenoidový ventil	Ohřev U-trubice	Pozn.
P	2	0	100	otevřený	vypnuto	-
1	70	35	0	otevřený	vypnuto	generování arsanů a
2	90	0	0	otevřený	vypnuto	transport arsanů
3	18	0	0	uzavřený	zapnuto	předehřátí U-trubice
4	32	0	0	uzavřený	zapnuto	ohřev U-trubice
5	7	0	0	uzavřený	vypnuto	přestávka v ohřevu
6	19	0	0	uzavřený	zapnuto	ohřev U-trubice
7	35	0	70	uzavřený	zapnuto	ochlazení U-trubice
8	80	0	70	otevřený	vypnuto	příprava na další cyklus
Celkový čas: 353 s						

V kroku P (viz. tab. 2.2) se spustila na dobu 2 s peristaltická pumpa 2 a selenoidový ventil byl uzavřen a poté otevřen v rámci přípravy před měřením. Rychlost čerpání redukčního roztoku a Tris pufru (viz. 2.2), stejně tak jako vzorku a destilované vody, byla 1 ml.min⁻¹. Další kroky 1 - 8 jsou stejné jako při experimentech se sušícími trubicemi, liší se pouze 1. krokem - rychlostí a délkou čerpání činidel a vzorku. Celkový čas analýzy pro tento experiment byl 353 s.

2.8 Statistické zpracování naměřených dat

2.8.1 Vyhodnocení plochy píků

Výsledky signálů (píky) byly zaznamenávány v počítačovém softwaru WinLab 32 a poté exportovány jako textové soubory. Integrace a vyhodnocení bylo provedeno v programu Microsoft® Excel 2003.

Z výsledků minimálně tří paralelních měření za stejných podmínek byla odhadnuta správná hodnota 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.

Metrologickou charakteristikou přesnosti výsledků, tj. charakteristikou náhodné chyby je směrodatná odchylka:

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

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 je relativní směrodatná odchylka vyjádřená jako:⁷²

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

U obou experimentů byly také kromě výše uvedených statistických parametrů počítány kombinované standardní nejistoty, a to podle níže uvedených funkčních závislostí.

Funkční závislost aditivního charakteru

$$u_c(y(p, q, r, \dots)) = k \cdot \sqrt{u^2(p) + u^2(q) + \dots} \quad (2.4)$$

kde k je konstanta (1), p , q jsou hodnoty, které nabývají příslušných směrodatných odchylek $u(p, q)$.

Funkční závislost multiplikativního charakteru

$$u_c = y \cdot k \cdot \sqrt{\left(\frac{u(p)}{p}\right)^2 + \left(\frac{u(q)}{q}\right)^2 + \dots} \quad (2.5)$$

kde k je konstanta (1), $u(p)/\bar{p}$ atd. vyjadřují nejistoty vstupních parametrů vyjádřené ve formě relativní směrodatné odchylky.⁷³

2.9 Sušící trubice

Byly testovány tyto typy trubic:

- PTFE trubice, vnitřní průměr 1,5 mm, vnější průměr 3,38 mm, délka 610 mm,
- sušící trubice 1, vnitřní průměr 2,2 mm, vnější průměr 2,75 mm, délka 310 mm,
- sušící trubice 2, vnitřní průměr 1,5 mm, vnější průměr 1,8 mm, délka 610 mm.

Trubice byly postupně zapojeny mezi separátor fází a kryogenní jednotku. U sušících trubic byl použit jako sušící plyn dusík o průtoku 2 l/min, který se přiváděl do vnějšího

plášťe sušící trubice v protiproudu plynného vzorku. Bylo proměřeno uspořádání bez trubice, kdy výstup ze separátoru fází byl připojen přímo na vstup U-trubice za pomoci PTFE hadičky o délce 170 mm a vnitřním průměru 1,6 mm, jejíž začátek byl ve volném prostoru separátoru fází v jeho přibližně $\frac{3}{4}$ výšky a dále zapojení s výše uvedenými typy trubic.

2.10 Postupy přípravy vzorků kuřecích jater

2.10.1 Homogenizace kuřecích jater

Do skleněného minihomogenizátoru s kulatým dnem o objemu 30 ml a průměru 25 mm bylo odváženo 5 g kuřecích jater, buď čerstvě zakoupených v místním obchodě, popř. mražených jater, která byla den před analýzou ponechána k rozmrznutí v ledničce. Takto odvážená játra byla homogenizována pomocí pistilky s třecí částí z PTFE, jejíž dřík byl upnut do pohonu stojanové vrtačky. Homogenizace byla provedena po nalití ledem chlazené destilované vody do minihomogenizátoru pohybem a otáčením pistilky 10x nahoru a dolů při 660 otáčkách za minutu. Poté se zhomogenizovaná játra kvantitativně převedla do 50 ml ledem chlazené odměrné baňky s předem naváženým množstvím 0,25 g Tritonu X-100 (výsledná koncentrace Tritonu X-100 v 50 ml odměrné baňce byla 0,5%). Nakonec byla odměrná baňka doplněna chlazenou destilovanou vodou po rysku. Takto byla připravena 10% suspenze zhomogenizovaných jater v 0,5% Tritonu X-100.⁵⁰

2.10.2 Kyselá mineralizace

K 250 μ l 10% suspenzi zhomogenizovaných jater v 0,5% Tritonu X-100, který byl předem míchán 30 min. na magnetickém míchadle nebo k 0,1 g CRM DOLT-4 byly přidány 3 ml kyseliny fosforečné Suprapur[®] o koncentraci 2 mol.l⁻¹ (suspenze zhomogenizovaných jater byla odebírána z promíchávaného roztoku). Poté byla provedena mineralizace v uzavřených skleněných vialkách o objemu 7 ml s PTFE víčkem, které byly po těsném dotažení víčka vloženy do zkumavek. Zkumavky byly zality destilovanou vodou. Voda sahala do výšky asi 1 cm nad víčko vialky. Horní část zkumavek byla poté potažena teflonovou páskou s malým otvorem pro únik vznikající

vodní páry. Vzorke byly mineralizovány přes noc za teploty 90°C. Po skončení mineralizace byly vialky vyjmuty ze zkumavek a ponechány ke zchladnutí při laboratorní teplotě po dobu minimálně 30 min. Poté se provedla neutralizace připravených mineralizátů 10 mol.l⁻¹ NaOH, pH okolo 6 bylo zkontrolováno pH papírkem. Nakonec byly zneutralizované mineralizáty kvantitativně převedeny do odměrných baněk a byly doplněny deionizovanou vodou na objem 50 ml.⁶²

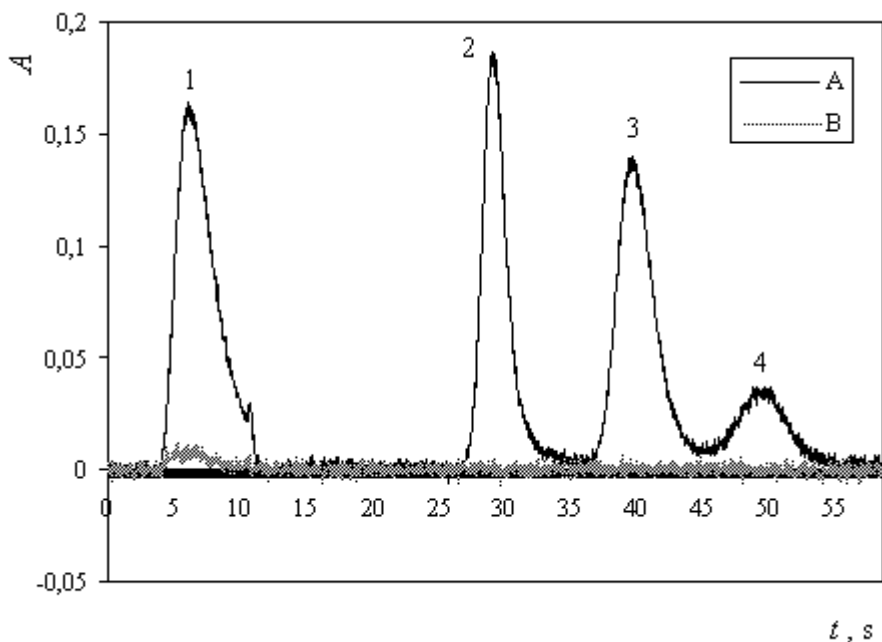
2.10.3 Zásaditá mineralizace

K 2,5 ml 10% suspenzi zhomogenizovaných jater v 0,5% Tritonu X-100, které byly předem míchány 30 min na magnetickém míchadle nebo k 0,1 g CRM DOLT-4 bylo přidáno 2,5 ml 10% vodného roztoku TMAH (suspenze zhomogenizovaných jater byla odebírána z promíchávaného roztoku). Následná mineralizace byla provedena v uzavřených skleněných vialkách o objemu 7 ml s PTFE víčkem, které byly po těsném dotažení víčka vloženy do zkumavek. Zkumavky byly zality destilovanou vodou. Voda sahala do výšky asi 1 cm nad víčko vialky. Horní část zkumavek byla poté potažena teflonovou páskou s malým otvorem pro únik vznikající vodní páry. Teplota zásadité mineralizace byla 50 – 60°C a probíhala po dobu 1 hodiny s občasným promícháním. Po skončení mineralizace byly vialky vyjmuty ze zkumavek a ponechány ke zchladnutí při laboratorní teplotě po dobu 30 min. Takto připravené mineralizáty byly kvantitativně převedeny do odměrných baněk, částečně zředěny deionizovanou vodou a poté byly neutralizovány 1 mol.l⁻¹ HCl, pH okolo 6 bylo zkontrolováno pH papírkem. Nakonec byly zneutralizované mineralizáty doplněny deionizovanou vodou na objem 50 ml.

3. Výsledky a diskuze

3.1 Selektivní generování substituovaných hydridů

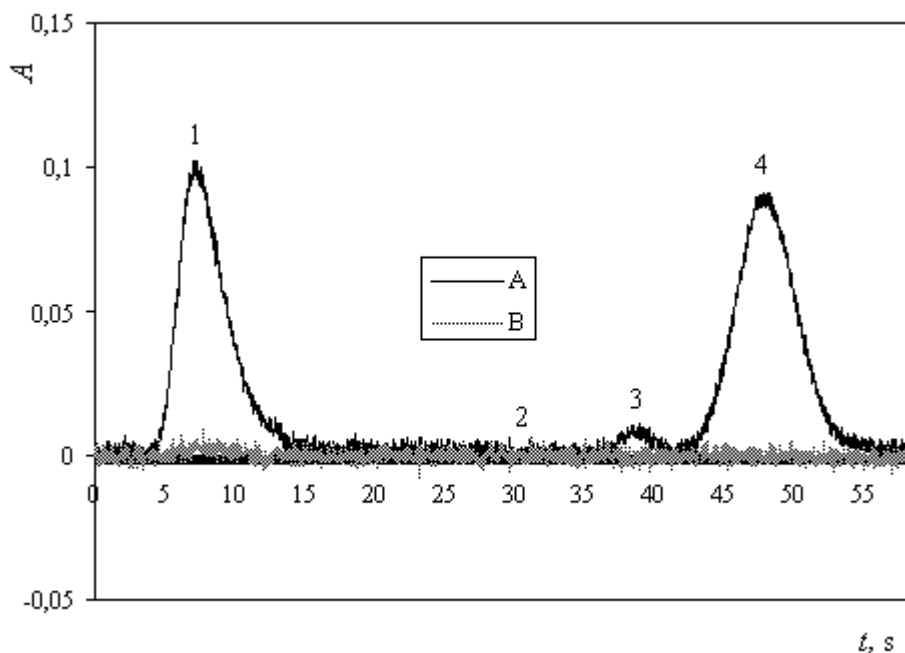
Pokud není uvedeno jinak, bylo stanovení iAs, MAs, DMAs provedeno po předchozí předredukci 2% L-cysteinem (předredukce byla provedena 1 hod. před analýzou vzorků) a TMA^VO byl stanoven bez této předredukce. Pomocí metody HG-CT-AAS byly získány chromatogramy s píky, které odpovídaly jednotlivým hydridům arsenu v pořadí iAs, MAs, DMAs a TMA^VO. Ukázkový záznam měření pro směsný standardní roztok (iAs^{III}, MAs^V, DMAs^V a TMA^VO) o koncentraci 1 ng.ml⁻¹ po předchozí předredukci je znázorněn na obr. 3.1.



Obr. 3.1 Ukázkový záznam měření; A – směsný standard iAs^{III}, MAs^V, DMAs^V, TMA^VO o koncentraci 1 ng.ml⁻¹ v 2% L-cysteinu, B – slepý pokus v 2% L-cysteinu, 1 – iAs, 2 – MAs, 3 – DMAs, 4 – TMA^VO

Z obr. 3.1 je patrné, že hodnota slepého pokusu u methylovaných forem se blížila nule naopak u iAs byla plocha píku slepého pokusu nepatrně vyšší. Zvýšená hodnota slepého pokusu byla porovnána jen pro iAs, kde odpovídala přibližně koncentraci 0,04 ng.ml⁻¹. Výška píku TMA^VO v porovnání s ostatními píky byla znatelně nižší, což bylo způsobeno použitím předredukčního činidla 2% L-cysteinu. TMA^VO se pomocí

redukčního činidla borohydridu sodného redukuje na $(\text{CH}_3)_3\text{As}$, který je těkavý a částečně se uvolní ještě před analýzou, proto je nutné jej stanovit bez předchozí předredukce viz. obr. 3.2.



Obr. 3.2 Ukázkový záznam měření; A – směsný standard iAs^{III} , MAs^{V} , DMAs^{V} , $\text{TMA}^{\text{V}}\text{O}$ o koncentraci $1 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ bez 2% L-cysteinu, B – slepý pokus bez 2% L-cysteinu, 1 – iAs , 2 – MAs , 3 – DMAs , 4 – $\text{TMA}^{\text{V}}\text{O}$

Na obr. 3.2 je uveden záznam stejného výše uvedeného směšného standardního roztoku (iAs , MAs , DMAs a $\text{TMA}^{\text{V}}\text{O}$) o koncentraci $1 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ bez předchozí předredukce. Protože byl použit směsný standardní roztok arsenu, jsou na chromatogramu kromě $\text{TMA}^{\text{V}}\text{O}$ přítomny i další píky iAs a DMAs . Jak je z obr. 3.2 patrné, stanovení MAs^{V} a DMAs^{V} bez předredukce nemá význam, protože použitím Tris pufru (pH 6) se generují bez předredukce pouze třímocné formy As. Lze si však všimnout, že DMAs^{V} bez této předredukce poskytuje 5% signál. U roztoku iAs dochází k částečné oxidaci a z tohoto důvodu je iAs generován v přítomnosti Tris pufru se sníženou účinností, což se projeví na nižší ploše píku. Protože mineralizačními postupy docházelo k oxidaci iAs^{III} na iAs^{V} , nebylo rozlišováno oxidační číslo As.

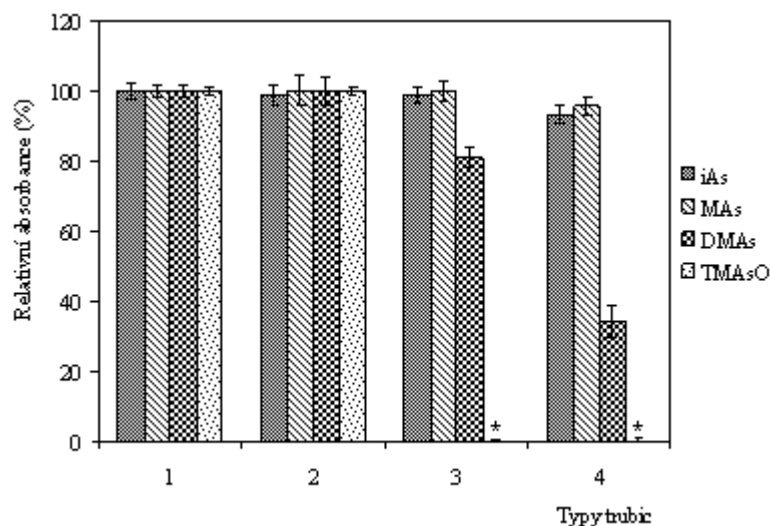
U všech vzorků byly odečítány slepé pokusy včetně slepých pokusů u mineralizátů.

3.2 Ztráty forem arsenu v sušících trubicích Perma Pure

Pro testování ztrát jednotlivých hydridů, resp. trimethylarsanu byly porovnány plochy píků pro zapojení bez trubice s uspořádáním s PTFE trubicí a s postupným zapojením výše zmíněných typů sušících trubic 1 a 2 (viz. 2.9). Rozměry PTFE trubice byly zvoleny tak, aby odpovídaly rozměrům sušící trubice 2. Měření bylo provedeno na směsném standardním roztoku o koncentraci 2 ng.ml^{-1} , který obsahoval tyto formy arsenu: iAs^{III} , MAs^{V} , DMAs^{V} a $\text{TMA}^{\text{V}}\text{O}$.

Na obr. 3.3 jsou znázorněny procentuální relativní absorbance jednotlivých forem arsenu o zmíněné koncentraci 2 ng.ml^{-1} oproti uspořádání bez trubice.

Při průchodu vygenerovaných arsanů PTFE trubicí nedošlo k žádným signifikantním ztrátám. U sušící trubice 1 o délce 310 mm byly pozorovány ztráty u dimethylarsanu - úbytek průchodem zmíněné sušící trubice byl 19,3%, u trimethylarsanu byla ztráta 100% (citlivost byla pod mezí detekce). U arsenovodíku a monomethylarsanu nebyly zaznamenány žádné ztráty. U sušící trubice 2 o délce 610 mm byly pozorované ztráty u všech vygenerovaných arsanů, u arsenovodíku ztráta činila 6,7%, monomethylarsanu ubylo 4,2%, větší ztráty byly u dimethylarsanu – 65,9% a stejná ztráta trimethylarsanu jako u předchozí sušící trubice 1 – 100% (citlivost byla pod mezí detekce).



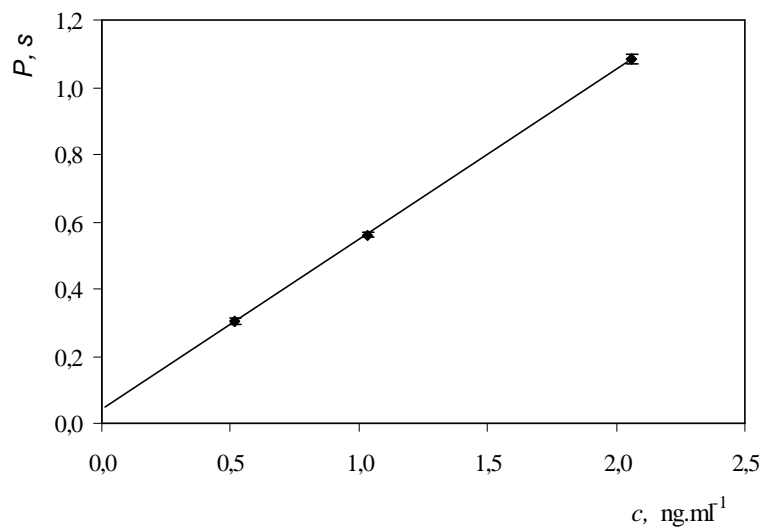
Obr. 3.3 Porovnání procentuální relativní absorbance uspořádání bez trubice s uspořádáním se zapojením různých typů trubic; 1 – zapojení bez trubice, 2 – zapojení s PTFE trubicí (délka 610 mm), 3 – zapojení se sušící trubicí 1 (délka 310mm), 4 – zapojení se sušící trubicí 2 (délka 610mm), * < LOD

Experimentem se sušícími trubicemi bylo zjištěno, že průchodem některých metylsubstituovaných arsenovodíků sušícími trubicemi dochází k jejich značným ztrátám. Ztráty v obou sušících trubicích se projeví u dimethylarsanu a především u trimethylarsanu, jehož ztráta byla 100%. U arsenovodíku a monomethylarsanu nebyly zaznamenány žádné nebo velmi malé ztráty. Na PTFE trubicí stejných rozměrů žádné ztráty pozorovány nebyly, můžeme tedy vyloučit vliv delšího transportu hydridů.

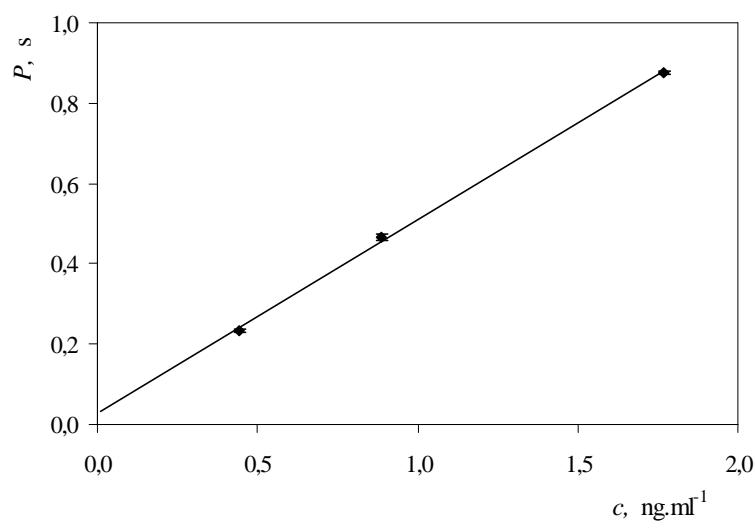
Bylo zjištěno, že sušící trubice Perma Pure nejsou pro sušení vygenerovaných hydridů arsenu vhodné, protože dochází k jejich velkým ztrátám. Proto tyto sušící trubice nebyly dále při diplomové práci použity. Zmíněné ztráty u sloučenin arsenu dosud nebyly publikovány. Zjištěné a uveřejněné ztráty byly pouze u monomethylrtuti.⁵⁴

3.3 Kalibrační závislosti iAs, MAs, DMAs a TMA^VO a meze detekce

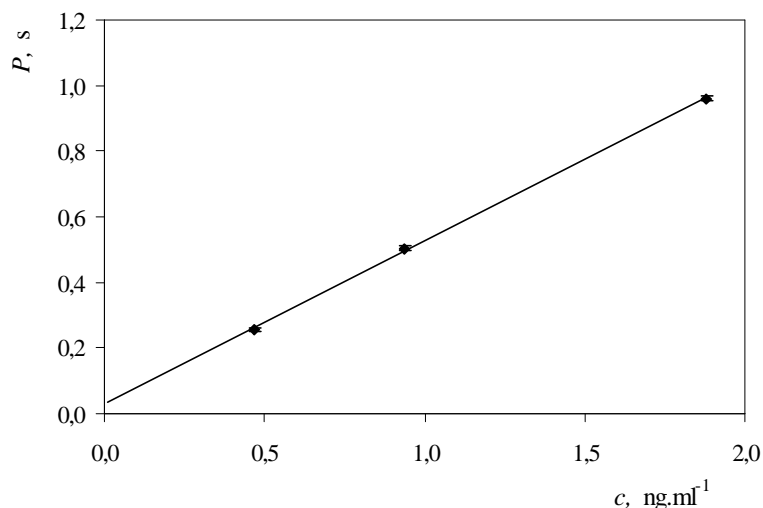
Byly proměřeny kalibrační závislosti směsných standardních roztoků (iAs, MAs, DMAs a TMA^VO) o koncentracích: 0,5; 1 a 2 ng.ml⁻¹. Kalibrační křivky pro jednotlivé formy As jsou zobrazeny na obr. 3.4 a, b, c, d.



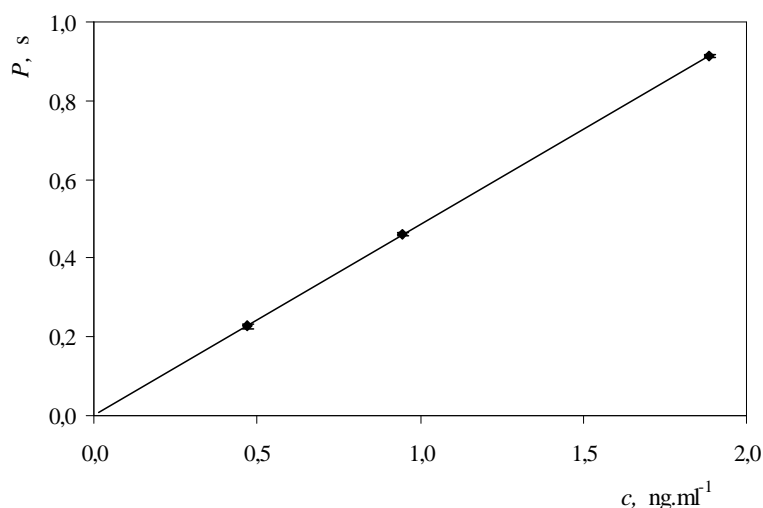
Obr. 3.4a Kalibrační závislost iAs; směrnice $a = 0,5073$, korelační koeficient $R^2 = 1$, $c(\text{iAs}) = 0,5; 1; 2$ ng·ml⁻¹; 3 měření pro každou koncentraci



Obr. 3.4b Kalibrační závislost MAs; směrnice $a = 0,4821$, korelační koeficient $R^2 = 0,9988$, $c(\text{MAs}) = 0,5; 1; 2$ ng·ml⁻¹; 3 měření pro každou koncentraci



Obr. 3.4c Kalibrační závislost DMAs; směrnice $a = 0,4981$, korelační koeficient $R^2 = 0,9997$, $c(\text{DMAs}) = 0,5; 1; 2 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$; 3 měření pro každou koncentraci



Obr. 3.4d Kalibrační závislost TMA^{VO}; směrnice $a = 0,4849$, korelační koeficient $R^2 = 0,9999$, $c(\text{TMA}^{\text{VO}}) = 0,5; 1; 2 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$; 3 měření pro každou koncentraci

Z uvedených kalibračních křivek je patrné, že pro všechny formy As byla obdržena dobrá linearita kalibrační křivky až do $2 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ a nedocházelo k jejímu zakřivení. Citlivost MAs, DMAs a TMA^{VO} porovnaná vzhledem k iAs byla minimálně 95% (MAs 95%, DMAs 98% a TMA^{VO} 96%).

Detekční limit (LOD) byl zjištěn pro všechny formy As (iAs, MAs, DMAs, TMA^{VO}) proměřením osmi slepých pokusů. Byl počítán jako trojnásobek směrodatné

odchylky σ plochy slepých pokusů. Pro výpočty LOD byly použity směrnice kalibračních křivek (viz. obr. 3.4 a, b, c, d). Vypočítané detekční limity pro jednotlivé formy As jsou uvedeny v tab. 3.1.

Tab. 3.1 Detekční limity pro iAs, MAs, DMAs, TMA^VO; a – směrnice kalibrační křivky, σ – směrodatná odchylka slepého pokusu, LOD – detekční limit, 8 měření slepých pokusů

Forma arsenu	a ml·s·ng ⁻¹	σ s	LOD ng·ml ⁻¹
iAs	0,5073	0,0041	0,02
MAs	0,4821	0,0016	0,01
DMAs	0,4981	0,0022	0,01
TMA ^V O	0,4849	0,0032	0,03

3.4 Kyselá mineralizace kuřecích jater

3.4.1 Testování čistoty kyselin

Aby bylo možné použít kyselinu fosforečnou na minealizaci, měla by mít tato kyselina takovou čistotu, aby při měření poskytovala co nejmenší odezvu stanovovaného analytu. Z uvedeného důvodu byly proměřeny dvě různé kyseliny fosforečné o různé čistotě:

- Ortho-fosforečná kyselina, 85% Suprapur[®], Merck (Darmstadt, Německo)
- Ortho-fosforečná kyselina, 85% p.a., Lachema (Brno, ČR)

Měření bylo provedeno na slepých pokusech, které byly připraveny podle stejného mineralizačního postupu uvedeného viz. 2.10.2. Namísto suspenze kuřecích jater bylo použito 250 μ l deionizové vody a slepé pokusy nebyly podrobeny mineralizaci. Objem (3 ml) a koncentrace (2 mol.l⁻¹) použitých kyselin byly stejné jako při kyselé mineralizaci. Všechny zmíněné roztoky byly ještě před doplněním na konečný objem zneutralizovány (viz. 2.10.2). Také byl proměřen slepý pokus tvořený pouze deionizovanou vodou.

Tab. 3.2 Porovnání signálů slepých vzorků; P_{iAs} – integrovaná absorbance, s_{iAs} – směrodatná odchylka, s_r – relativní směrodatná odchylka v procentech, 4 měření pro každý vzorek

Proměřené roztoky	P_{iAs} s	s_{iAs} s	s_r iAs %
Deionizovaná voda	0,018	0,002	11,8
Deionizovaná voda s H_3PO_4 Suprapur [®]	0,029	0,002	6,1
Deionizovaná voda s H_3PO_4 Lachema	0,814	0,006	0,8

V tab. 3.2 jsou ukázány jednotlivé integrované absorbance slepých pokusů pro iAs , ostatní formy byly ve všech případech menší než LOD. Je zřejmé, že čistota Orthofosforečné kyseliny, 85% p.a., Lachema není dostačující, protože pomocí metody HG – CT - AAS byla zjištěna integrovaná absorbance iAs pro tuto kyselinu 0,814 s, což podle změřené kalibrační křivky (směrnice $a = 0,438$, korelační koeficient $R^2 = 0,9993$) odpovídá koncentraci iAs 93 ng.ml^{-1} . Naopak integrovaná absorbance 85% Orthofosforečné kyseliny Suprapur[®] byla znatelně nižší a blížila se k hodnotě slepého pokusu, který byl tvořen pouze deionizovanou vodou. Integrované absorbance ostatních forem MAs a DMAs byly ve zmíněných kyselinách pod mezí detekce. Z výše uvedeného vyplývá, že pro kyselou mineralizaci je nutná vysoce čistá Orthofosforečná kyselina 85% Suprapur[®], Merck (Darmstadt, Německo), která byla použita pro veškeré další kyselé mineralizace.

3.4.2 Ověření vhodnosti postupu kyselé mineralizace pro speciální analýzu

Bylo zjišťováno, zda-li během mineralizace nedochází ke ztrátám některých forem arsenu nebo ke změnám speciace. Integrovaná absorbance mineralizátu o výsledné koncentraci 1 ng.ml^{-1} , připraveného kyselou mineralizací dle postupu (viz. 2.10.2) (tvořen pouze deionizovanou vodou v 0,5% Tritonu X-100 se standardním přídatkem 1 ng.ml^{-1} všech forem As) byla porovnána s integrovanou absorbancí připraveného směšného standardního roztoku As o stejné koncentraci. Integrované absorbance standardního roztoku a mineralizátu jsou uvedeny v tab. 3.3.

Tab. 3.3 Plochy píkù iAs, MAs, DMAs a TMA^sVO standardního směsného roztoku a mineralizátu o koncentraci 1 ng·ml⁻¹; *P* – integrovaná absorbance, *r* – výtěžek (%), 3 měření pro každý vzorek

Formy As	Směsný standardní roztok As	Mineralizát	<i>r</i> %
	<i>P</i> s	<i>P</i> s	
iAs	0,529 ± 0,009	0,533 ± 0,004	100,8 ± 1,8
MAs	0,408 ± 0,012	0,410 ± 0,008	100,5 ± 3,4
DMAs	0,443 ± 0,012	0,461 ± 0,007	104,1 ± 3,0
TMA ^s VO	0,451 ± 0,004	0,474 ± 0,002	105,1 ± 1,0

Z tab. 3.3 vyplývá, že plochy píkù iAs, MAs, DMAs a TMA^sVO standardního roztoku a mineralizátu se významně neliší a pro všechny formy As byly obdrženy výtěžky kolem 100%. Na základě dosažených výsledků lze konstatovat, že během kyselé mineralizace nedochází ke ztrátám nebo přeměně uvedených forem As. Proto byla dále kyselá mineralizace použita pro analýzu CRM DOLT-4 a kuřecích jater.

Detekční limit pro mineralizáty byl vypočítán jako trojnásobek směrodatné odchylky plochy slepých pokusů. Mez stanovitelnosti byla vypočítána jako desetinásobek směrodatné odchylky plochy slepých pokusů. Níže uvedená tab. 3.4 ukazuje LOD a LOQ pro jednotlivé formy As.

Tab. 3.4 Detekční limity a meze stanovitelnosti pro iAs, MAs, DMAs, TMA^sVO; *a* – směrnice kalibrační křivky, σ – směrodatná odchylka slepého pokusu, LOD – detekční limit, LOQ – mez stanovitelnosti, 8 měření slepých pokusů

Forma arsenu	<i>a</i> ml·s·ng ⁻¹	σ s	LOD ng·ml ⁻¹	LOD* ng·g ⁻¹	LOQ* ng·g ⁻¹
iAs	0,4682	0,0025	0,02	7,9	25,0
MAs	0,4354	0,0021	0,01	7,2	25,0
DMAs	0,4528	0,0027	0,02	8,8	30,0
TMA ^s VO	0,4189	0,0022	0,02	8,0	25,0

* pro navážku vzorku 0,1g viz. 2.10.2

3.4.3 Analýza CRM DOLT-4 po kyselé mineralizaci

Kyselá mineralizace byla provedena na CRM DOLT-4 podle postupu viz. 2.10.2. K mineralizátům byly přidávány standardní přídatky všech forem arsenu (iAs, MAs, DMAs a TMA^VO), koncentrace každé formy byla 1 ng.ml⁻¹. Standardní přídatky byly přidány celkem do čtyř mineralizátů. Do mineralizátu 1 a 2 byl standardní přídatek přidán po mineralizaci, naopak do mineralizátu 3 a 4 se standardní přídatek přidal před mineralizací. Mineralizát 1 a 2 byl také proměřen bez standardního přídatku. Společně s mineralizáty byly také proměřeny kalibrační křivky jejichž směrnice a korelační koeficienty jsou uvedeny v tab. 3.5.

Tab. 3.5 Směrnice a korelační koeficienty kalibračních křivek iAs, MAs, DMAs a TMA^VO v rozmezí koncentrací 0,5; 1 a 2 ng.ml⁻¹, *a* – směrnice kalibrační křivky, 3 - 4 měření pro každou koncentraci, 3 - 4 měření slepých pokusů

Forma arsenu	<i>a</i> ml·s·ng ⁻¹	Korelační koeficient
iAs	0,4682	0,9974
MAs	0,4354	1
DMAs	0,4528	1
TMA ^V O	0,4189	0,9988

Ze změřených kalibračních závislostí byla poté vypočítána koncentrace jednotlivých forem arsenu v CRM DOLT – 4.

Tab. 3.6 Integrované absorbance mineralizátů; *P* – integrovaná absorbance, 3 - 4 měření pro každý vzorek, 3 - 4 měření slepých pokusů

Č. vz.	Standardní přídatek 1 ng.ml ⁻¹	<i>P</i> _{iAs} S	<i>P</i> _{MAs} S	<i>P</i> _{DMAs} S	<i>P</i> _{TMA^VO} S
1	bez	0,018 ± 0,005	0,034 ± 0,002	0,815 ± 0,047	0,186 ± 0,003
	po mineralizaci	0,617 ± 0,018	0,491 ± 0,027	1,263 ± 0,057	0,668 ± 0,021
2	bez	0,012 ± 0,002	0,034 ± 0,002	0,796 ± 0,007	0,169 ± 0,012
	po mineralizaci	0,535 ± 0,011	0,441 ± 0,020	1,189 ± 0,033	0,604 ± 0,023

Č. vz.	Standardní přídavek 1 ng.ml ⁻¹	P_{iAs} S	P_{MA_s} S	P_{DMA_s} S	$P_{TMA_s^V O}$ S
3	před mineralizací	0,578 ± 0,009	0,463 ± 0,011	1,245 ± 0,029	0,614 ± 0,014
4	před mineralizací	0,586 ± 0,018	0,452 ± 0,014	1,212 ± 0,019	0,599 ± 0,023
5*	-	0,568 ± 0,010	0,429 ± 0,003	0,457 ± 0,007	0,426 ± 0,023

* Směsný standardní roztok As o koncentraci 1 ng.ml⁻¹

Z uvedených integrovaných absorbancí pro jednotlivé mineralizáty z tab. 3.6 lze konstatovat, že hodnoty integrovaných absorbancí u mineralizátů 1 a 2 s přídavky po mineralizaci se značně nelišily od integrovaných absorbancí mineralizátů 3 a 4 do kterých byl přidán standardní přídavek před mineralizací. Z tab. 3.6 na základě integrovaných absorbancí mineralizátů 1 a 2 bez přídavku je zřejmé, že CRM DOLT-4 obsahuje především DMA_s a TMA_s^VO.

Z naměřených dat byly následně vypočítány výtěžky pro jednotlivé formy As, které jsou uvedeny v tab.3.7.

Tab. 3.7 Výtěžky mineralizátů s CRM DOLT-4; r – výtěžek (%), 3 -4 měření pro každý mineralizát a 3 - 4 měření slepých pokusů

Mineralizáty	Standardní přídavek 1 ng.ml ⁻¹	r_{iAs} %	r_{MA_s} %	r_{DMA_s} %	$r_{TMA_s^V O}$ %
1	po mineralizaci	105,5 ± 3,8	106,5 ± 6,4	98,0 ± 16,2	113,1 ± 7,9
2	po mineralizaci	92,1 ± 2,5	94,9 ± 4,7	86,0 ± 7,5	102,1 ± 8,2
3	před mineralizací	99,1 ± 2,5	100,0 ± 2,7	96,2 ± 12,4	102,3 ± 7,0
4	před mineralizací	100,5 ± 3,7	97,4 ± 3,4	88,9 ± 11,4	98,8 ± 8,1

Porovnáním výtěžků mineralizátů 1 a 2 (standardní přídavek 1 ng.ml⁻¹ přidán po mineralizaci) s výtěžky mineralizátů 3 a 4 (standardní přídavek 1 ng.ml⁻¹ přidán před mineralizací) je z tab. 3.7 patrné, že výtěžky iAs, MA_s a TMA_s^VO se pohybovaly kolem

100% s výjimkou DMAs, u kterého byly obdrženy nepatrně nižší výtěžky (86,0% a 88,9%) pro mineralizáty 2 a 4. Z uvedených výsledků lze konstatovat, že provedení kyselé mineralizace proběhlo beze ztrát u všech forem arsenu.

Dosazením integrovaných absorbancí do kalibračních závislostí, jejichž směrnice a korelační koeficienty jsou uvedeny viz. tab. 3.5 byly vypočítány koncentrace iAs, MAs, DMAs a TMA^VO v CRM DOLT-4.

Tab. 3.8 Hmotnostní koncentrace iAs, MAs, DMAs a TMA^VO; w – hmotnostní koncentrace, LOQ – mez stanovitelnosti; 3 – 4 měření pro každý mineralizát a 3 – 4 měření slepých pokusů

Mineralizáty	w_{iAs} ng .g ⁻¹	w_{MAs} ng .g ⁻¹	w_{DMAs} ng .g ⁻¹	$w_{TMA^V O}$ ng .g ⁻¹
1	< LOQ	34 ± 11	798 ± 126	183 ± 15
2		34 ± 11	795 ± 57	169 ± 34

Bylo zjištěno, že CRM DOLT – 4 obsahuje převážně DMAs a také TMA^VO a v menší koncentraci také MAs. Koncentrace DMAs v DOLT – 4 se pohybovala kolem 800 ng.g⁻¹ a u TMA^VO byla koncentrace nižší viz. tab. 3.8. Koncentrace iAs byla pod mezí stanovitelnosti.

3.4.4 Analýza kuřecích jater po kyselé mineralizaci

Kyselá mineralizace byla dále provedena na reálné matrici – kuřecích játrech po jejich předchozí homogenizaci viz. 2.10.1 dle již výše uvedeného postupu viz. 2.10.2.

Byly připraveny mineralizáty kuřecích jater, do nichž byl po mineralizaci přidán standardní přídavek 1 ng.ml⁻¹ a také mineralizáty se standardním přídávkem 1 ng.ml⁻¹, který byl přidán před mineralizací. Standardní přídavky byly před a po mineralizaci přidány z toho důvodu, aby se zkontroloval proces mineralizace s matricí (kuřecí játra) a zjistilo se, jestli použitím mineralizace uvedené matrice nedochází ke ztrátám některých forem As. Připraveny byly vždy dva mineralizáty se standardním přídávkem před mineralizací a dva mineralizáty se standardním přídávkem po mineralizaci. Společně s mineralizáty byla proměřena kalibrační křivka o koncentracích 0,5; 1 a 2 ng.ml⁻¹, z které byly zjištěny příslušné směrnice a korelační koeficienty viz. tab. 3.9.

Tab. 3.9 Směrnice a korelační koeficienty kalibračních křivek iAs, MAs, DMAs a TMA^VO v rozmezí koncentrací 0,5; 1 a 2 ng.ml⁻¹, *a* – směrnice kalibrační křivky, 3 měření pro každou koncentraci, 3 měření slepých pokusů

Forma arsenu	<i>a</i> ml·s·ng ⁻¹	Korelační koeficient
iAs	0,5459	1
MAs	0,4674	0,9996
DMAs	0,4771	0,9994
TMA ^V O	0,4737	1

Koncentrace iAs, MAs, DMAs a TMA^VO v kuřecích játrech byly pod mezí detekce. Porovnáním integrovaných absorbancí standardních přídavek přidaných před a po mineralizaci bylo zjištěno, že během mineralizace kuřecích jater došlo ke ztrátám MAs a TMA^VO, jejichž integrovaná absorbance u mineralizátů 3 a 4 ve srovnání s mineralizáty 1 a 2 se snížila na polovinu viz. tab. 3.10.

Tab. 3.10 Integrované absorbance mineralizátů; *P* – integrovaná absorbance, 3 měření pro každý mineralizát a 6 měření slepých pokusů

Č. vz.	Standardní přídavek 1 ng.ml ⁻¹	<i>P</i> _{iAs} S	<i>P</i> _{MAs} S	<i>P</i> _{DMAs} S	<i>P</i> _{TMA^VO} S
1	bez	0,011 ± 0,001	0,001 ± 0,005	0,000 ± 0,004	0,006 ± 0,003
	po mineralizaci	0,672 ± 0,008	0,504 ± 0,008	0,554 ± 0,015	0,514 ± 0,012
2	bez	0,012 ± 0,003	0,001 ± 0,002	0,000 ± 0,003	0,006 ± 0,006
	po mineralizaci	0,711 ± 0,017	0,492 ± 0,008	0,542 ± 0,001	0,518 ± 0,004
3	před mineralizací	0,659 ± 0,011	0,295 ± 0,016	0,528 ± 0,013	0,281 ± 0,004
4	před mineralizací	0,500 ± 0,009	0,233 ± 0,015	0,433 ± 0,017	0,196 ± 0,009
5*	-	0,559 ± 0,009	0,438 ± 0,008	0,487 ± 0,01	0,453 ± 0,007

* Směsný standardní roztok As o koncentraci 1 ng.ml⁻¹

Stejně jako u analýzy CRM, byly u kuřecích jater vypočítány výtěžky pro jednotlivé formy As, které jsou uvedeny v tab. 3.11.

Tab. 3.11 Výtěžky mineralizátů z kuřecích jater; r – výtěžek (%), 3 měření pro každý mineralizát a 6 měření slepých pokusů

Mineralizáty	Standardní přídavek 1 ng.ml^{-1}	r_{iAs} %	r_{MAs} %	r_{DMAs} %	r_{TMAAs^VO} %
1	po mineralizaci	$118,2 \pm 2,4$	$114,8 \pm 3,0$	$113,8 \pm 4,0$	$112,1 \pm 3,2$
2	po mineralizaci	$125,0 \pm 3,7$	$112,1 \pm 2,8$	$111,3 \pm 2,4$	$113,0 \pm 2,4$
3	před mineralizací	$115,8 \pm 2,8$	$67,1 \pm 4,0$	$108,4 \pm 3,6$	$60,7 \pm 2,0$
4	před mineralizací	$87,4 \pm 2,2$	$53,0 \pm 3,7$	$88,9 \pm 4,1$	$41,9 \pm 2,6$

Již zmíněná předchozí ztráta MAs a $TMAAs^VO$ vlivem kyselé mineralizace se projevila také na výtěžcích uvedených forem u mineralizátů 3 a 4, jak je patrné z tab. 3.11. Poloviční výtěžky byly obdrženy pro MAs a DMAs u mineralizátů 3 a 4. Nižší výtěžky byly také pozorovány u mineralizátu 4 pro iAs (87,4%) a DMAs (88,9%).

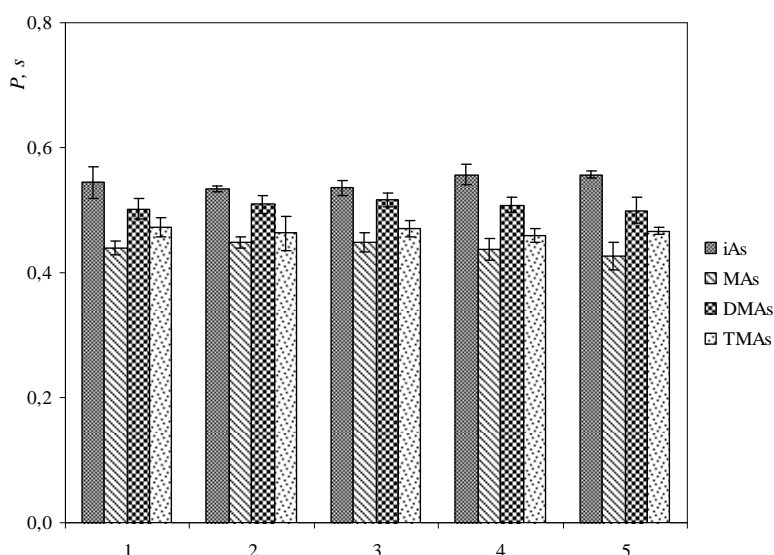
Z uvedeného vyplývá, že kyselá mineralizace kuřecích jater nebyla příliš optimální, jak by se dalo očekávat podle výsledků viz. 3.4.2, protože kyselou mineralizací došlo k cca 50% ztrátám MAs a $TMAAs^VO$. U ostatním forem As (iAs, DMAs) nebyly ztráty natolik zřetelné.

Metoda kyselé mineralizace byla časově náročná, pracná a navíc získané výsledky neposkytovaly dobré výtěžky. Z uvedeného důvodu byla vyzkoušena zásaditá mineralizace s TMAH viz. další kapitola.

3.5 Zásaditá mineralizace kuřecích jater

3.5.1 Ověření vhodnosti postupu zásadité mineralizace pro speciální analýzu

Stejně jako u kyselé mineralizace bylo u zásadité mineralizace zjišťováno, zda-li jejím provedením nedochází ke ztrátám či přeměně některých forem arsenu. Zkouška zásadité mineralizace byla provedena na mineralizátech ve kterých byla matrice – kuřecí játra, nahrazena deionizovanou vodou v 0,5% Tritonu X-100 a celý postup zásadité mineralizace byl proveden dle postupu viz. 2.10.3. K mineralizátům byl pro kontrolu procesu přidán standardní přídavek $1 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ všech forem As pro jednu dvojici mineralizátů před mineralizací a pro druhou dvojici byl přidán přídavek po mineralizaci. Výsledky měření jsou ukázány na obr. 3.5.



Obr. 3.5 Porovnání směsného standardního roztoku s mineralizačními roztoky o koncentracích $1 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$; 1 – směsný standardní roztok $1 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$, 2 – mineralizát s přídavkem $1 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ před mineralizací, 3 – mineralizát s přídavkem $1 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ před mineralizací, 4 – mineralizát s přídavkem $1 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ po mineralizaci, 5 - mineralizát s přídavkem $1 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ po mineralizaci, 5 výsledků měření pro směsný standardní roztok $1 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ a 3 měření pro každý mineralizát

Z obr. 3.5 je zřejmé, že použitím zásadité mineralizace nedochází ke ztrátám ani jedné formy As. Z uvedeného důvodu byla tato mineralizace dále použita na CRM DOLT-4 a reálnou matrici – kuřecí játra.

3.5.2 Analýza CRM DOLT – 4 po zásadité mineralizaci

Zásaditá mineralizace byla provedena na CRM DOLT – 4 podle postupu uvedeného viz. 2.10.3. Byly připraveny celkem 4 mineralizáty, z nichž jedna dvojice byla se standardním přídávkem všech forem As (iAs, MAs, DMAs a TMA^VO) o koncentraci 1 ng.ml⁻¹, který byl přidán před mineralizací, zatímco u druhé dvojice mineralizátů byl standardní přídavek všech forem As o stejné koncentraci přidán po mineralizaci. Současně byla s mineralizáty proměřena kalibrační křivka směsných standardních roztoků (iAs, MAs, DMAs a TMA^VO) o koncentracích 0,5; 1, 2, 3 ng.ml⁻¹. Pro určení směrnice a korelačních koeficientů nebyla použita koncentrace 3 ng.ml⁻¹ u všech forem As, protože v této oblasti koncentrace docházelo k zakřivení kalibračních křivek. Směrnice a korelační koeficienty kalibračních křivek pro jednotlivé formy As jsou uvedeny v tab. 3.12. Kalibrační křivka byla použita pro výpočet koncentrací jednotlivých forem As v CRM DOLT - 4.

Tab. 3.12 Směrnice a korelační koeficienty kalibračních křivek iAs, MAs, DMAs a TMA^VO v rozmezí koncentrací 0,5; 1 a 2 ng.ml⁻¹, *a* – směrnice kalibrační křivky, 3 – 4 měření pro každou koncentraci, 6 měření slepých pokusů

Forma arsenu	<i>a</i> ml·s·ng ⁻¹	Korelační koeficient
iAs	0,5333	1
MAs	0,5014	0,9997
DMAs	0,5121	0,9997
TMA ^V O	0,4694	0,9999

Hodnoty integrovaných absorbancí všech forem As jsou uvedeny viz. níže tab. 3.13

Tab. 3.13 Integrované absorbance mineralizátů; *P* – integrovaná absorbance, 3 měření pro každý mineralizát a 6 měření slepých pokusů

Č. vz.	Standardní přídavek 1ng.ml ⁻¹	<i>P</i> _{iAs} s	<i>P</i> _{MAs} s	<i>P</i> _{DMAs} s	<i>P</i> _{TMA^VO} s
1	bez	0,005 ± 0,004	0,024 ± 0,001	0,492 ± 0,026	0734 ± 0,023
	po mineralizaci	0,574 ± 0,008	0,477 ± 0,005	0,907 ± 0,003	1,141 ± 0,030

Č. vz.	Standardní přídavek 1 ng.ml ⁻¹	P_{iAs} s	P_{MAs} s	P_{DMAs} s	$P_{TMAs^V O}$ s
2	bez	0,017 ± 0,003	0,028 ± 0,003	0,513 ± 0,015	0,788 ± 0,009
	po mineralizaci	0,539 ± 0,019	0,453 ± 0,004	0,908 ± 0,013	1,179 ± 0,014
3	před mineralizací	0,561 ± 0,010	0,438 ± 0,012	0,874 ± 0,029	1,076 ± 0,037
4	před mineralizací	0,557 ± 0,001	0,444 ± 0,015	0,916 ± 0,021	1,113 ± 0,020
5*	-	0,545 ± 0,010	0,431 ± 0,016	0,497 ± 0,012	0,446 ± 0,003

* Směsný standardní roztok As o koncentraci 1 ng.ml⁻¹

Výtěžky u většiny forem nedosáhly 100% jako tomu bylo při kyselé mineralizaci CRM DOLT – 4 viz 3.4.3. Nižších výtěžků bylo dosaženo u DMAs a TMAs^VO, jejichž hodnoty se pohybovaly v rozmezí 71 - 91%. Zatímco u iAs a MAs byly výtěžky vyšší a to v rozmezí 96 - 105%. Z uvedených výsledků v tab. 3.14 lze konstatovat, že provedení zásadité mineralizace není zcela optimální, protože během mineralizace dochází k menším ztrátám především DMAs a TMAs^VO.

Tab. 3.14 Výtěžky mineralizátů CRM DOLT - 4; r – výtěžek (%), 3 měření pro každý mineralizát a 6 měření slepých pokusů

Mineralizáty	Standardní přídavek 1 ng.ml ⁻¹	r_{iAs} %	r_{MAs} %	r_{DMAs} %	$r_{TMAs^V O}$ %
1	po mineralizaci	104,4 ± 2,5	105,1 ± 4,1	83,5 ± 5,6	91,3 ± 8,5
2	po mineralizaci	95,8 ± 3,9	98,6 ± 3,8	79,5 ± 4,4	87,7 ± 3,8
3	před mineralizací	100,9 ± 2,8	95,6 ± 4,6	74,7 ± 8,6	70,6 ± 10,0
4	před mineralizací	100,2 ± 2,1	97,0 ± 5,1	83,2 ± 7,6	78,9 ± 7,2

Hmotnostní koncentrace jednotlivých forem As zjištěných v CRM DOLT – 4 jsou uvedeny níže viz. tab. 3.15. Bohužel stejně jako při stanovení CRM při kyselé mineralizaci, nemohly být zjištěné hodnoty hmotnostních koncentrací porovnány

s certifikovanými hodnotami DOLT – 4, protože tyto hodnoty nebyly v době sepisování práce k dispozici.

Tab. 3.15 Hmotnostní koncentrace iAs, MAs, DMAs a TMA^VO v CRM DOLT-4; w – hmotnostní koncentrace, LOQ - mez stanovitelnosti; 3 měření pro každý mineralizát a 6 měření slepých pokusů

Mineralizáty	w_{iAs} ng .g ⁻¹	w_{MAs} ng .g ⁻¹	w_{DMAs} ng .g ⁻¹	$w_{TMA^V O}$ ng .g ⁻¹
1	< LOQ	28 ± 7	476 ± 65	781 ± 82
2		31 ± 10	471 ± 41	796 ± 39

Z výše uvedené tab. 3.15 je patrné, že koncentrace iAs v CRM byla pod mezí stanovitelnosti a hodnoty MAs se pohybovaly těsně nad její mezí. Podle analýzy CRM DOLT – 4 po zásadité mineralizaci bylo zjištěno, že CRM obsahuje především DMAs a TMA^VO, ale také menší množství MAs.

3.5.3 Zásaditá mineralizace kuřecích jater

Kuřecí játra byla nejdříve zhomogenizována dle postupu 2.10.1 a poté byla provedena jejich mineralizace viz. 2.10.3. Z kuřecích jater byly připraveny mineralizáty se standardním přídávkem všech forem As (iAs, MAs, DMAs a TMA^VO) o koncentraci 1 ng.ml⁻¹. Tento standardní přídavek byl do jedné dvojice mineralizátů přidán po mineralizaci a do druhé dvojice byl přidán před mineralizací. Také byla proměřena kalibrační křivka o koncentracích (iAs, MAs, DMAs a TMA^VO) 0,5; 1, 2 ng.ml⁻¹, jejíž směrnice a korelační koeficienty jsou uvedeny viz. 3.3.

Integrované absorbance pro jednotlivé mineralizáty jsou uvedeny v tab. 3.16.

Tab. 3.16 Integrované absorbance mineralizátů; P – integrovaná absorbance, 3 měření pro každý vzorek a 5 - 6 měření slepých pokusů

Č. vz.	Standardní přídavek 1 ng.ml ⁻¹	P_{iAs} s	P_{MAs} s	P_{DMAs} s	$P_{TMA^V O}$ s
1	bez	0,000 ± 0,002	0,001 ± 0,007	0,001 ± 0,004	0,003 ± 0,004
	po mineralizaci	0,533 ± 0,010	0,424 ± 0,015	0,474 ± 0,017	0,443 ± 0,012

Č. vz.	Standardní přídavek 1 ng.ml ⁻¹	P_{iAs} s	P_{MA_s} s	P_{DMA_s} s	$P_{TMA_s^V O}$ s
2	bez	0,000 ± 0,003	0,001 ± 0,003	0,000 ± 0,002	0,000 ± 0,007
	po mineralizaci	0,528 ± 0,014	0,422 ± 0,016	0,463 ± 0,018	0,431 ± 0,002
3	před mineralizací	0,557 ± 0,010	0,436 ± 0,020	0,480 ± 0,014	0,428 ± 0,002
4	před mineralizací	0,540 ± 0,022	0,402 ± 0,010	0,472 ± 0,006	0,421 ± 0,002
5*	-	0,561 ± 0,006	0,467 ± 0,009	0,503 ± 0,007	0,462 ± 0,00

* Směsný standardní roztok As o koncentraci 1 ng.ml⁻¹

V kuřecích játrech byla koncentrace všech forem As pod mezí detekce stejně jako tomu bylo při použití kyselé mineralizace viz. 3.4.4. Z tab. 3.16 lze dále zjistit, že hodnoty ploch pík byly podobné a že nedocházelo vlivem zásadité mineralizace k úbytkům některých forem. Zmíněná skutečnost se odrazila také na dobrých výtěžcích jednotlivých mineralizátů viz. tab. 3.17.

Tab. 3.17 Výtěžky mineralizátů kuřecích jater; r – výtěžek (%), 3 měření pro každý mineralizát a 5 - 6 měření slepých pokusů

Mineralizáty	Standardní přídavek 1 ng.ml ⁻¹	r_{iAs} %	r_{MA_s} %	r_{DMA_s} %	$r_{TMA_s^V O}$ %
1	po mineralizaci	95,0 ± 2,1	90,6 ± 4,0	94,0 ± 3,9	95,2 ± 2,7
2	po mineralizaci	94,1 ± 2,7	90,1 ± 3,9	92,0 ± 3,8	93,3 ± 1,6
3	před mineralizací	99,3 ± 2,2	93,1 ± 4,9	95,2 ± 3,2	92,2 ± 1,8
4	před mineralizací	96,3 ± 4,1	85,9 ± 3,2	93,6 ± 2,0	90,8 ± 1,8

Podle výtěžků z tab. 3.17 bylo zjištěno, že při zásadité mineralizaci nedochází ke ztrátám jednotlivých forem As, což se projevilo na dobrých výtěžcích, jejichž hodnoty se pohybovaly v rozmezí 91 – 99%.

3.5.4 Porovnání kyselé a zásadité mineralizace CRM DOLT - 4

Porovnáním kyselé a zásadité mineralizace CRM DOLT – 4 bylo zjištěno, že nalezené koncentrace DMAs a TMA^VO byly u obou mineralizačních postupů rozdílné. Průměrné koncentrace všech forem As (iAs, MAs, DMAs a TMA^VO) mineralizátů 1 a 2 po kyselé a zásadité mineralizaci jsou uvedeny v tab. 3.18.

Tab. 3.18 Koncentrace CRM; w – hmotnostní koncentrace (ng.g⁻¹), LOQ – mez stanovitelnosti

CRM	Cert.konc. celkového As ng.g ⁻¹	w ^{iAs} ng.g ⁻¹	w ^{MAs} ng.g ⁻¹	w ^{DMAs} ng.g ⁻¹	w ^{TMA^VO} ng.g ⁻¹	w ^{AsB} ng.g ⁻¹	Pozn.
DOLT-2	16 600 ± 1100	7,1 ± 1,5*	42 ± 7	1240 ± 260	NS	6090 ± 320	Ref. ⁷⁴
DOLT-3	8400 ± 100	80 ± 20*	-	480 ± 10	NS	7200 ± 100	Ref. ⁷⁵
DOLT-4	9660 ± 620	< LOQ	34 ± 16	797 ± 138	176 ± 37	NZ	Tato DP Kyselá mineral.
DOLT-4	9660 ± 620	< LOQ	30 ± 12	474 ± 77	789 ± 91	NZ	Tato DP Zásaditá mineral.

* pouze As^V, NS nestanoven, NZ není známo

Zjištěné koncentrace jednotlivých forem As nemohly být přímo porovnány s certifikovanými hodnotami, protože v době sepisování této diplomové práce nebyla provedena speciální analýza CRM DOLT-4. Očekává se, že výsledky speciální analýzy pro uvedený CRM budou publikovány během roku 2010. Z uvedeného důvodu byly vyhledány speciální analýzy starších CRM, DOLT-2 a DOLT-3, které byly porovnány s výsledky speciální analýzy As zjištěné měřením v této diplomové práci.

Z tab. 3.18 je vidět značný rozdíl koncentrací DMAs a TMA^sVO u kyselé a zásadité mineralizace v CRM DOLT - 4. Použitím kyselé mineralizace byla zaznamenána vyšší koncentrace u DMAs (797ng.g⁻¹) naopak u zásadité mineralizace byla koncentrace této formy As poloviční (474ng.g⁻¹). Důvodem rozdílu je pravděpodobně horší výtěžnost DMAs u zásadité mineralizace viz. 3.5.2. U TMA^sVO byla situace opačná, protože vyšší koncentrace byla zjištěna u zásadité mineralizace (789ng.g⁻¹), ale použitím kyselé mineralizace byla koncentrace této formy zřetelně nižší (176ng.ml⁻¹).

Na základě publikovaných hodnot CRM lze předpokládat vysoký obsah arsenobetainu v DOLT-4, cca 7 mg.kg⁻¹ a cca 1 mg.kg⁻¹ ostatních specií arsenu, které lze reakcí s borohydridem převést na příslušný hydrid a stanovit jej. Ze získaných výsledků analýzy CRM je nutné ověřit, zda vlivem zásadité mineralizace nedochází ke konverzi arsenobetainu, přítomného v CRM na TMA^sVO viz. uvedená kapitola níže. To by vysvětlilo různý obsah TMA^sVO zjištěný pomocí obou mineralizačních postupů.

3.5.5 Zásaditá mineralizace standardního roztoku arsenobetainu

Byl proměřen standardní zásobní roztok arsenobetainu o koncentraci 1 ng.ml⁻¹ a to z důvodu předpokladu, že dochází k přeměně arsenobetainu přítomného v CRM DOLT-4 na TMA^sVO viz. uvedné výsledky 3.5.4. Pro arsenobetain byly připraveny dva totožné mineralizáty. Bylo použito 500 µl standardního roztoku arsenobetainu o koncentraci 100 ng.ml⁻¹ a 2,5 ml 0,5% Tritonu X-100 a postup celé mineralizace včetně neutralizace a konečného objemu mineralizátu byl proveden dle postupu viz. 2.10.3. Společně s mineralizáty byl proměřen roztok arsenobetainu o koncentraci 1 ng.ml⁻¹ připravený pouze v deionizované vodě. Integrované absorpce a vypočtené koncentrace pro TMA^sVO jsou ukázány v tab. 3.19.

Tab. 3.19 Porovnání integrované absorpce standardního roztoku arsenobetainu a jeho mineralizátů; *P* – integrovaná absorpce, *c* – molární koncentrace (ng.ml⁻¹), LOD – mez detekce

Proměřené roztoky a mineralizáty	<i>P</i> _{TMA^sVO} s	<i>c</i> _{TMA^sVO} ng.ml ⁻¹	konverze na TMA ^s VO %
Arsenobetain	0,004 ± 0,005	< LOD	-
Mineralizát 1	0,050 ± 0,002	0,099 ± 0,003	11
Mineralizát 2	0,037 ± 0,150	0,073 ± 0,308	8,1

Plocha píku směsného standardního roztoku arsenobetainu o koncentraci 1 ng.ml^{-1} , jak by se dalo očekávat, byla velmi nízká a to $0,004 \text{ s}$, tudíž výsledná koncentrace byla pod mezí detekce. Plochy píků mineralizátů 1 a 2 obsahující stejnou výslednou koncentraci arsenobetainu jako směsný standardní roztok (1 ng.ml^{-1}) byly vyšší ve srovnání se standardním roztokem arsenobetainu. Plocha píku pro mineralizát 1 byla $0,050 \text{ s}$ a pro mineralizát 2 $0,037 \text{ s}$. Dosazením zmíněných integrovaných absorbancí do kalibrační křivky pro $\text{TMA}^{\text{V}}\text{O}$ viz. obr. 3.4 d byla v mineralizátu 1 zjištěna koncentrace $0,099 \text{ ng.ml}^{-1}$ a v mineralizátu 2 $0,072 \text{ ng.ml}^{-1}$. Porovnáním integrovaných absorbancí vzhledem ke standardnímu roztoku $\text{TMA}^{\text{V}}\text{O}$ o koncentraci 1 ng.ml^{-1} bylo zjištěno, že během zásaditého mineralizačního postupu dochází k cca 10% konverzi arsenobetainu na $\text{TMA}^{\text{V}}\text{O}$. U ostatních forem nebyla během zásadité mineralizace zjištěna žádná konverze.

Protože dochází ke konverzi arsenobetainu vlivem zásadité mineralizace na $\text{TMA}^{\text{V}}\text{O}$, není možné zmíněnou mineralizaci s TMAH použít ve vzorcích s obsahem AsB.

4. Závěr

Prvním cílem diplomové práce bylo ověření vhodnosti použití sušících trubic s nafionovou membránou, pro speciální analýzu arsenu metodou HG – CT - AAS. Sušící trubice mají při generování velký význam, protože během generování dochází ke vzniku vodní páry, která způsobuje problémy nejenom při kolekcii vymrazováním. Bohužel bylo zjištěno, že jejich použitím při speciální analýze arsenu dochází ke značným ztrátám především methylsubstituovaných hydridů arsenu. Tento dosud nepublikovaný poznatek bude mít zřejmě významný dopad na další používání těchto trubic v analytické atomové spektrometrii, včetně přehodnocení některých dosud publikovaných dat. V budoucnu je potřeba ověřit vhodnost použití membránových trubic i pro analýzy methylovaných specií dalších prvků.

Druhá část práce byla zaměřena na mineralizační postupy, které jsou nezbytnou součástí analýzy biologických vzorků. Použitím dvou rozličných mineralizačních přístupů: kyselá mineralizace s kyselinou fosforečnou a zásaditá mineralizace s TMAH bylo zjištěno, že ani jeden mineralizační postup není zcela optimální. Při kyselá mineralizaci docházelo především ke ztrátám TMAAs^{VO} , u zásaditá mineralizace byla zjištěna 10% konverze arsenobetainu, běžně se vyskytujícího v biologických vzorcích, na TMAAs^{VO} . Pro další použití je třeba modifikovat postup zásaditá mineralizace tak, aby k přeměně arsenobetainu buďto nedocházelo, nebo aby byl naopak převeden kompletně. Je třeba také ověřit chování dalších specií (arsenocholin, arsenocukry), kde je problémem zejména dosažitelnost standardních látek.

Seznam použité literatury

1. Gomez-Caminero, A.; Howe, P.; Hughes, M.; Kenyon, E.; Lewis, D.R.; Moore, M.; Ng, J.; Aitio, A.; Becking, G.: *Environmental Health Criteria 224: Arsenic and Arsenic Compounds*. 2. vyd. Geneva, World Health Organization 2001.
2. Bencko, V.; Cikrt, M.; Lener, J.: *Toxické kovy v životním a pracovním prostředí člověka*. Praha, Grada Publishing 1995.
3. Irgolic, K. J.: Determination of total arsenic and arsenic compounds in drinking water. In: *Arsenic Exposure and Health*. Chappel, W.R.; Abernathy, C.O.; Cothorn, C.R. (ed.). Northwood: Science and Technology Letters, 1994, p. 51 - 60.
4. Harper, T.R.; Kingham, N.W.: Removal of arsenic in wastewater using chemical precipitation methods. *Water Environment Research* 64 (1992).
5. British Geological Survey: Arsenic in groundwaters across the world. Dostupné z URL: <<http://www.bgs.ac.uk/arsenic/bphase2/Reports/ChapWorldReview.pdf>> [cit. 28.1.2010]
6. The world Bank: Towards a more effective operational response. Arsenic contamination of groundwater in South and East Asian Countries. Dostupné z URL: <http://siteresources.worldbank.org/INTSAREGTOPWATRES/Resources/ArsenicVoII_WholeReport.pdf> [cit. 28.1.2010]
7. Nabi, A. H.; Rahman, M. M.; Islam, L. N.: Evaluation of Biochemical Changes in Chronic Arsenic Poisoning among Bangladeshi Patients. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 2, 385-393 (2005).
8. Mandal, B. K.; Suzuki, K. T.: Arsenic round the world: a review. *Talanta* 58, 201-235 (2002).
9. Vyhláška č. 252/2004 Sb., kterou se stanoví hygienické požadavky na pitnou a teplou vodu a četnost a rozsah kontroly pitné vody. Dostupné z URL: <<http://www.tzb-info.cz/t.py?i=341&t=15>> [cit. 28.4.2010]
10. US EPA: National Primary Drinking Water Regulations. Dostupné z URL: <<http://www.epa.gov/fedrgstr/EPA-WATER/2001/January/Day-22/w1668.htm>> [cit.28.2.2010]
11. Majer, V.; Veselý, J.: Čistota vodních toků. *Vesmír* 75, 497 (1996).
12. Leermakers, M.; Baeyens, W.; De Gieter, M.; Smedts, B.; Mert, C.; De Bisschop, H.C.; Morabito, R.; Quevauviller Ph.: Toxic arsenic compounds in environmental samples: Speciation and validation. *Trends in Analytical Chemistry* 25, 1-10 (2006).
13. Francesconi, K. A.; Kuehnelt, D.: Determination of arsenic species: a critical review of methods and applications, 2000-2003. *Analyst* 129, 373-395 (2004).
14. Gong, Z.; Lu, X.; Ma, M.; Watt, C.; Le, X. C.: Arsenic speciation analysis. *Talanta* 58, 77-96 (2002).

15. Musil, S.: On-line předredukce pětimocných sloučenin arsenu kyselinou thioglykolovou pro speciální analýzu atomovou absorpční spektrometrií se selektivním generováním hydridů a kolekcí vymrazováním. *Diplomová práce*, Univerzita Karlova, Praha 2007.
16. Leal, L.O.; Forteza, R.; Cerdá, V.: Speciation analysis of inorganic arsenic by a multisyringe flow injection system with hydride generation–atomic fluorescence spectrometric detection. *Talanta* 69, 500-508 (2006).
17. Welz, B.; Sperling M.: *Atomic Absorption Spectrometry*. Weinheim, WILEY-VCH 1999.
18. Gonzalez, A.; Cervera, M.L.; Armenta, S.; Guardia, M.: A review of non-chromatographic methods for speciation analysis. *Analytica Chimica Acta* 636, 129-157 (2009).
19. Vahter, M.: Mechanisms of arsenic biotransformation. *Toxicology* 181-182, 211-217 (2002).
20. Le, X.C.; Ma M.; Cullen, W.R.; Aposhian, H.V.; Lu, X.; Zheng, B.: Determination of monomethylarsonous acid, a key arsenic methylation intermediate, in human urine. *Environmental Health Perspectives* 108, 1015-1018 (2000).
21. Del Razo, L.M.; Styblo, M.; Cullen W.R.; Thomas D.J.: Determination of trivalent methylated arsenicals in biological matrices. *Toxicology and Applied Pharmacology* 174, 282-293 (2001).
22. Mandal, B.K.; Ogra, Y.; Suzuki, K.T.: Identification of dimethylarsinous and monomethylarsonous acids in human urine of the arsenic-affected areas in West Bengal, India. *Chemical Research in Toxicology* 14, 371-378 (2001).
23. Aposhian, H.V.; Gurzau, E.S.; Le, X.C.; Gurzau, A.; Healy, S.M.; Lu, X.; Ma, M.; Yip, L.; Zakharyan, R.A.; Maiorino, R.M.; Dart, R.C.; Tircus, M.G.; Gonzales-Ramirez, D.; Morgan, D.L.; Avram, D.; Aposhian, M.M.: Occurrence of monomethylarsonous acid in urine of humans exposed to inorganic arsenic. *Chemical Research in Toxicology* 13, 693-697 (2000).
24. Valenzuela, O.L.; Borja-Aburto, V.H.; Garcia-Vargas, G.G.; Cruz-Gonzalez, M.B.; Garcia-Montalvo, E.A.; Calderon-Aranda, E.S.; Del Razo, L.M.: Urinary trivalent methylated arsenic species in a population chronically exposed to inorganic arsenic. *Environmental Health Perspectives* 113, 250-254 (2005).
25. Devesa, V.; Del Razo, L.M.; Adair, B.; Drobná, Z.; Waters, S.B.; Hughes, M.F.; Stýblo, 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).
26. Yu, R.C.; Hsu, K.-H.; Chen, C.-J.; Froines, J.R.: Arsenic methylation capacity and skin cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 9, 1259-1262 (2000).
27. Hopenhayn-Rich, C.; Biggs, M. L.; Smith, A.H.; Kalman, D.A.; Moore, L.E.: Methylation study of a population environmentally exposed to arsenic in drinking water. *Environmental Health Perspectives* 104, 620-628 (1996).

28. Vahter, M.: Variation in human metabolism of arsenic. Oxford, Elsevier 1999.
29. Kurttio, P.; Komulainen, H.; Hakala, E.; Kahelin, H.; Pekkanen, J.: Urinary excretion of arsenic species after exposure to arsenic present in drinking water. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 34, 297-305 (1998).
30. Hsu, K.-H.; Froines, J. R.; Chen, C.-J.: Studies of arsenic ingestion from drinking-water in northeastern Taiwan: Chemical speciation and urinary metabolites. New York, Chapman & Hall (1997).
31. Concha, G.; Nermell, B.; Vahter, M.: Metabolism of inorganic arsenic in children with chronic high arsenic exposures in northern Argentina. *Environmental Health Perspectives* 106, 355-359 (1998).
32. Chen Y.C.; Guo, Y.L.; Su, H.J.; Hsueh, Y.M.; Smith, T.J.; Ryan, L.M.; Lee, M.S.; Chao, S.C.; Lee, J.Y.; Christiani, D.C.: Arsenic methylation and skin cancer risk in southwestern Taiwan. *Journal of Occupational and Environmental Medicine* 45, 241-248 (2003).
33. Del Razo, L.M.; Garcia-Vargas, G.G.; Vargas, H.; Albores, A.; Gonsabatt, M.E.; Montero, R.; Ostrosky-Wegman, P.; Kelsh, M.; Cebrian, M.E.: Altered profile of urinary arsenic metabolites in adults with chronic arsenicism. A pilot study. *Archives of Toxicology* 71, 211-217 (1997).
34. Chen, C. J.; Chiou, H.-Y.; Chiang, M.-H.; Lin, L. J.; Tai, T.-Y.: Dose-response relationship between ischemic heart disease mortality and long-term arsenic exposure. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 16, 504-510 (1996).
35. Engel, R. R.; Hopenhayn-Rich, C.; Recheveur, O.; Smith, A. H.: Vascular effects of chronic arsenic exposure: A review. *Epidemiologic Reviews* 10, 184-209 (1994).
36. Thomas, D. J.; Goyer, R. A.: Effects of arsenic, lead and cadmium on the cardiovascular system. New York, Academic Press (1995).
37. Tseng C.H.; Chong C.-K.; Chen C.J.; Lin B.J.; Tai T.-Y.: Abnormal peripheral microcirculation in seemingly normal subjects living in blackfoot-disease-hyperendemic villages in Taiwan. *International Journal of Microcirculation* 15, 21-27 (1995).
38. Chen, C. J.; Hsueh, Y. M.; Lai, M.; Shyu, M. P.; Chen, S. Y.; Wu, M. M.; Kuo, T. L.; Tai, T. Y.: Increased prevalence of hypertension and long-term arsenic exposure. *Journal of Hypertension*, 25, 53-60 (1995).
39. Lai, M.; Hsueh, Y. M.; Chen, C. J.; Shyu, M. P.; Chen, S. Y.; Kuo, T. L.; Wu, M. M.; Tai, T. Y.: Ingested inorganic arsenic and prevalence of diabetes mellitus. *American Journal of Epidemiology* 139, 484-492 (1994).
40. Rahman, M.; Tondel, M.; Ahmad, S. A.; Axelson, O.: Diabetes mellitus associated with arsenic exposure in Bangladesh. *American Journal of Epidemiology* 148, 198-203 (1998).
41. Rahman, M.; Tondel, M.; Chowdhury, I. A.; Axelson, O.: Relations between exposure to arsenic, skin lesions, and glucosuria. *Occupational and Environmental Medicine* 56, 277-281 (1999).

42. Tseng, C. H.; Tai, T. Y.; Chong, C. K.; Tseng, C. P.; Lai, M. S.; Lin, B. J.; Chiou, H. Y.; Hsueh, Y. M.; Hsu, K. H.; Chen, C. J.: Long-term arsenic exposure and incidence of non-insulin-dependent diabetes mellitus: a cohort study in arseniasis-hyperendemic villages in Taiwan. *Environmental Health Perspectives* 108, 847-851 (2000).
43. Wang, S.-L.; Chio, J.-M.; Chen, C.-J.; Tseng, C.-H.; Chou, W.-L.; Wang, C.-C.; Wu, T.-N.; Chang, L.-W.: Prevalence of non-insulin dependent diabetes mellitus and related vascular diseases in southwestern arseniasis-endemic and nonendemic areas in Taiwan. *Environmental Health Perspectives* 111, 155-159 (2003).
44. Černohorský, T.; Fara, M.; Kolihová, D.; Mestek, O.; Plško, E.; Spěváčková, V.; Sysalová, J.; Száková, J.: *Atomová absorpční spektrometrie I, Základní kurz*. Spektroskopická společnost Jana Marka Marci, Praha (2003).
45. Dočekal, B. a. k.: *Atomová absorpční spektrometrie, Sborník přednášek z kurzu*. Ing. Václav Helán - 2 THETA 2003.
46. 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).
47. Dědina, J.; Fara, M.; Kolihová, D.; Korečková, J.; Musil, J.; Plško, E.; Sychra, V.: *Vybrané metody analytické atomové spektrometrie*. Praha, Česká spektroskopická společnost 1987.
48. Matoušek, T.; Dědina, J.; Selecká, A.: Multiple microflame quartz tube atomizer - further development towards the ideal hydride atomizer for atomic absorption spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 57, 451-462 (2002).
49. Matoušek, T.; Hernández-Zavala, A.; Svoboda, M.; Langrová, L.; Adair, B. M.; Drobná, Z.; Thomas, D. J.; Stýblo, M.; Dědina, J.: Oxidation State Specific generation of Arsines from Methylated Arsenicals Based on L- Cysteine Treatment in Buffered Media for Speciation Analysis by Hydride Generation – Automated Cryotrapping - Gas Chromatography-Atomic Absorption Spectrometry with the Multiatomizer. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 63, 396-406 (2008).
50. Hernández-Zavala, A.; Matoušek, T.; Drobná, Z.; Paul, D. S.; Walton, F.; Adair, B. M.; Dědina, J.; Thomas, D. J.; Stýblo, M.: Speciation analysis of arsenic in biological matrices by automated hydride generation-cryotrapping-atomic absorption spectrometry with multiple microflame quartz tube atomizer (multiatomizer). *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 23, 342-351 (2008).
51. Musil, S.; Matoušek, T.: On-line pre-reduction of pentavalent arsenicals by thioglycolic acid for speciation analysis by selective hydride generation–cryotrapping–atomic absorption spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 63, 685-691 (2008).
52. Hernández-Zavala, A.; Valenzuela, O. L.; Matoušek, T.; Drobná, Z.; Dědina, J.; García-Vargas G.G.; Thomas, D. J.; Del Razo, L. M.; Stýblo, M.: Speciation of Arsenic in Exfoliated Urinary Bladder Epithelial Cells from Individuals Exposed to Arsenic in Drinking Water. *Environmental Health Perspectives* 116, 1656-1660 (2008).

53. Dědina, J.; Tsalev, D. L.: *Hydride generation atomic absorption spectrometry*. Chichester, Wiley 1995.
54. Howard, A. G.: (Boro)Hydride Techniques in Trace Element Speciation. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 12, 267-272 1997.
55. Stoichev, T.; Rodriguez Martin-Doimeadios, R. C.; Amouroux, D.; Donard, O. F. X.: Improvement of analytical performances for mercury speciation by on-line derivatization, cryofocussing and atomic fluorescence spectrometry. *Talanta* 62, 433-438 (2004).
56. Chromservis s.r.o.: Sušičky plynů Perma Pure na bázi Nafionu. Dostupné z URL <[Http://Www.Detekceplynu.Cz/Nafion.Htm](http://www.Detekceplynu.Cz/Nafion.Htm)> [cit. 28.2.2010]
57. Perma Pure LLC: Our technology: Dostupné z URL. <[Http://Www.Permapure.Com/Company/Our-Technology/](http://www.Permapure.Com/Company/Our-Technology/)> [cit.28.2.2010]
58. Corns, W. T.; Ebdon, L.; Hill, S. J.; Skockwell, P. B.: Effects of moisture on the cold vapour determination of mercury and its removal by use of membrane dryer tubes. *Analyst* 117, 717-720 (1992).
59. Sundin, N. G.; Tyson, J. F.: The use of nafion dryer tubes for moisture removal in flow injection chemical vapor generation atomic absorption spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 50, 369-375 (1995).
60. Corns, W. T.; Stockwell, P. B.; Ebdon, L.; Hill, S. J.: Development of an atomic fluorescence spectrometer for the hydride-forming elements. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 8, 71-77 (1993).
61. Pavelka, J.; Spěváčková, V.; Fara, M.; Kolihová, D.; Sysalová, J.; Kubáň, V.; Hoenig, M.; Kučera, J.; Piško, E.; Dědina, J.; Černohorský, T.: *Kurz atomové absorpční spektroskopie (pro pokročilé)*. Praha, Spektroskopická společnost Jana Marci 1996.
62. Hughes, M. F.; Devesa, V.; Adair, B. M.; Styblo, M.; Kenyon, E. M.; Thomas, D. J.: Tissue dosimetry, metabolism and excretion of pentavalent and trivalent monomethylated arsenic in mice after oral administration. *Toxicology and Applied Pharmacology* 208, 186-197 (2005).
63. Karadjova, I. B.; Petrov, P. K.; Serafimovski, I.; Stafilov, T.; Tsalev, D. L.: Arsenic in marine tissues — The challenging problems to electrothermal and hydride generation atomic absorption spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 62, 258-268 (2007).
64. Serafimovski, I.; Karadjova, I. B.; Stafilov, T.; Tsalev, D. L.: Determination of total arsenic and toxicologically relevant arsenic species in fish by using electrothermal and hydride generation atomic absorption spectrometry. *Microchemical Journal* 83, 55-60 (2006).
65. Ackley, K. L.; B'Hymer, C.; Sutton, K. L.; Caruso, J. A.: Speciation of arsenic in fish tissue using microwave-assisted extraction followed by HPLC-ICP-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 14, 845-850 (1999).

66. Sanz, E.; Munos-Olivas, R.; Cámara, C.: A rapid and novel alternative to conventional sample treatment for arsenic speciation in rice using enzymatic ultrasonic probe. *Analytica Chimica Acta* 535, 227-235 (2005).
67. Quaghebeur, M.; Rengel, Z.; Smirk, M.: Arsenic speciation in terrestrial plant material using microwaveassisted extraction, ion chromatography and inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 18, 128-134 (2003).
68. Ribeiro, A. S.; Curtius, A. J.; Pozebon, D.: Determination of As, Cd, Ni and Pb in human hair by electrothermal atomic absorption spectrometry after sample treatment with tetramethylammonium hydroxide. *Microchemical Journal* 64, 105-110 (2000).
69. Giacomelli, M. B. O.; Lima, M. C.; Stupp, V.; Miguel de Carvalho Júnior, R.; Borba da Silva, J. B.; Barrera, P. J.: Determination of As, Cd, Pb and Se in DORM-1 dogfish muscle reference material using alkaline solubilization and electrothermal atomic absorption spectrometry with Ir+Rh as permanent modifiers or Pd+Mg in solution. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 57, 2151-2157 (2002).
70. Martins, P.; Pozebon, D.; Dressler, V. L.; Kemieciki, G. A.: Determination of trace elements in biological materials using tetramethylammonium hydroxide for sample preparation. *Analytica Chimica Acta* 470, 195-204 (2002).
71. Pozebon, D.; Dressler, V. L.; Curtius, A. J.: Determination of trace elements in biological materials by ETV-ICP-MS after dissolution or slurry formation with tetramethylammonium hydroxide. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 13, 1101-1105 (1998).
72. Eckschlager, K.: *Chemometrie I, II*. Praha, Katedra anorganické chemie PŘF UK 1994.
73. Stanovení nejistoty analytického měření. Praha, EURACHEM 1999.
74. Wahlen, R.; McSheehy, S.; Scriver, C.; Mester, Z.: Arsenic speciation in marine certified reference materials Part 2. The quantification of water-soluble arsenic species by high-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 876-882 (2004).
75. Reyes, L. H.; Guzmán Mar, J. L.; Mizanur Rahman, G. M.; Seyber, B.; Fahrenholz, T.; Skip Kingston, H. M.: Simultaneous determination of arsenic and selenium species in fish tissues using microwave-assisted enzymatic extraction and ion chromatography–inductively coupled plasma mass spectrometry. *Talanta* 78, 983-990 (2009).