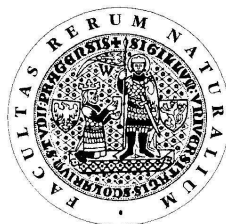


UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
Přírodovědecká fakulta

---

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Bc. Pavlína Králová

Využití chemického generování studené páry Hg pro  
speciační analýzu vybraných sloučenin rtuti pomocí HPLC  
a AAS

Using of Chemical Mercury Cold Vapor Generation for  
Speciation Analysis of Selected Mercury Compounds  
Employing HPLC and AAS

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Václav Červený, Ph.D.

Praha 2014

Tato diplomová práce vznikla v souvislosti s řešením GAČR 14-23532S a UNCE #42.

## Prohlášení

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

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

V Praze dne 15. května 2014.

## **Poděkování**

Chtěla bych tímto poděkovat svému školiteli RNDr. Václavu Červenému, Ph.D za odborné vedení, připomínky, ochotu, trpělivost a cenné rady, bez kterých by tato diplomová práce nevznikla. Poděkování patří také mému konzultantu RNDr. Jakubu Hraníčkoví, Ph.D. a mé rodině, která mě vždy morálně a finančně podporovala při studiu.

## ABSTRAKT

Cílem předkládané diplomové práce bylo ověřit použitelnost chemického generování studené páry rtuti jako derivatizačního kroku pro speciální analýzu vybraných sloučenin rtuti pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s atomovou absorpční spektrometrií při stanovení rtuti v reálných vzorcích povrchových vod.

Pro tuto diplomovou práci byly vybrány chlorid rtuťnatý, methylrtuť, ethylrtuť a fenylrtuť jako modelové analyty.

V první části práce byly optimalizovány pracovní podmínky chemického generování studené páry rtuti pro jednotlivé vybrané specie rtuti v režimu dávkování vzorku do proudu mobilní fáze. Za optimálních podmínek byly ve FIA proměřeny kalibrační závislosti pro stanovení jednotlivých specií a určeny základní charakteristiky metody.

Po optimalizaci chemického generování bylo přistoupeno k připojení separační kolony před tento derivatizační krok a v kombinované aparatuře HPLC - CVG - QTAAS byl optimalizován separační krok. Za optimálních podmínek byly opět proměřeny kalibrace a byly určeny základní charakteristiky metody včetně HPLC separace.

Na závěr byla navržená analytická metoda otestována na reálných vzorcích tekoucích povrchových vod. Kvůli nízkému obsahu specií rtuti v těchto vzorcích byla zjišťována výtěžnost metody tak, že vzorky vod byly spikovány a pomocí kalibračních závislostí bylo zjišťováno množství jednotlivých specií rtuti a získané výsledky byly diskutovány.

### **Klíčová slova:**

Rtuť, methylrtuť, ethylrtuť, fenylrtuť, speciální analýza, atomová absorpční spektrometrie, vysokoúčinná kapalinová chromatografie, chemické generování studené páry rtuti,  $\text{NaBH}_4$

## ABSTRACT

The aim of this diploma thesis was to verify the usability of the chemical generation of mercury cold vapor for speciation analysis of selected mercury compounds using high - performance liquid chromatography coupled within atomic absorption spectrometry in the determination of mercury in real tap water samples.

In this work, mercuric chloride, methylmercury, ethylmercury and phenylmercury were selected as model analytes.

In the first part, the working conditions of chemical generation of mercury cold vapor for each of the selected specie of mercury were optimized. Optimized equipment was used to measure the calibration dependence for each specie and the basic characteristics of the method were established.

After optimization of the chemical generation, HPLC column was connected prior this derivatization step and in resulted combined apparatus HPLC - CVG - QTAAS, the separation step was optimized . At optimized conditions, the calibration dependence was measured for each specie and the basic characteristics of the developed method including HPLC separation were established.

In conclusion, the proposed analytical method was tested on real flowing tap water samples. Because of low content of mercury species in these samples, the recovery of the method was established when comparing the signal of spiked real samples with calibration plot. Gained results were discussed.

### **Key words:**

Mercury, methylmercury, ethylmercury, phenylmercury, speciation analysis, atomic absorption spectrometry, high performance liquid chromatography, chemical mercury cold vapor generation, NaBH<sub>4</sub>

## Obsah

Seznam zkratk a symbolů.....	9
1. Úvod .....	11
1.1. Cíle diplomové práce .....	11
2. Teoretická část .....	12
2.1. Historie .....	12
2.2. Fyzikálně - chemické vlastnosti rtuti .....	12
2.3. Výskyt a výroba rtuti .....	13
2.4. Reaktivita sloučenin rtuti .....	13
2.4.1. Anorganické sloučeniny .....	13
2.4.2. Organokovové sloučeniny .....	14
2.5. Využití rtuti .....	14
2.6. Koloběh rtuti v životním prostředí .....	15
2.7. Toxicita rtuti a jejích sloučenin .....	16
2.7.1. Toxické účinky rtuti na rostliny .....	16
2.7.2. Toxické účinky rtuti na živočichy .....	16
2.7.3. Toxické účinky rtuti na člověka .....	17
2.7.3.1. Elementární rtuť a anorganické sloučeniny .....	17
2.7.3.2. Organokovové sloučeniny .....	17
2.7.4. Příklady otrav způsobených sloučeninami rtuti .....	18
2.8. Způsoby stanovení rtuti .....	18
2.8.1. Metoda stanovení celkového obsahu rtuti .....	18
2.8.2. Speciační analýza .....	19
2.8.2.1. Nechromatografické metody .....	19
2.8.2.2. Chromatografické metody .....	19
2.9. Techniky generování těkavých sloučenin pro potřeby stanovení AAS.....	20
2.9.1. Chemické generování těkavých sloučenin.....	20
2.9.2. Elektrochemické generování těkavých sloučenin .....	21
2.9.3. UV - fotochemické generování těkavých sloučenin.....	22
2.10. Statistické zpracování výsledků .....	22
2.10.1. Mez detekce a mez stanovitelnosti.....	22

2.10.2. Citlivost .....	23
2.10.3. Opakovatelnost .....	23
3. Experimentální část .....	24
3.1. Instrumentace .....	24
3.2. Použité chemikálie .....	25
3.3. Aparatura pro generování studené páry rtuti s využitím HPLC - CVG - QTAAS .....	26
4. Výsledky a diskuze .....	28
4.1. Optimalizace pracovních podmínek chemického generování .....	29
4.1.1. Koncentrace $K_2S_2O_8$ .....	29
4.1.2. Koncentrace HCl .....	31
4.1.3. Průtoková rychlost $K_2S_2O_8$ a HCl .....	32
4.1.4. Průtoková rychlost $NaBH_4$ .....	33
4.1.5. Průtoková rychlost nosného plynu .....	34
4.1.6. Teplota vyhřívání .....	35
4.2. Optimalizace složení mobilní fáze .....	36
4.2.1. Koncentrace pufru tvořeného kyselinou octovou a octanem amonným ....	37
4.2.2. Koncentrace pufru tvořeného kyselinou octovou a octanem sodným .....	38
4.2.3. pH pufru .....	39
4.2.4. Koncentrace 2-merkptoethanolu .....	40
4.2.5. Koncentrace ethanolu .....	41
4.2.6. Koncentrace acetonitrilu .....	42
4.2.7. Koncentrace methanolu .....	43
4.2.8. Optimální podmínky pro chemické generování studené páry rtuti .....	44
4.3. Kalibrace za podmínek optimálních pro chemické generování studené páry rtuti .....	44
4.4. Optimalizace separačního kroku .....	47
4.4.1. Koncentrace pufru .....	48
4.4.2. Koncentrace ethanolu .....	50
4.4.3. Koncentrace 2-merkptoethanolu .....	51
4.4.4. Gradient ethanolu .....	52
4.4.5. Teplota vyhřívání kolony .....	54

---

4.4.6. Průtoková rychlost mobilní fáze .....	56
4.4.7. Průtoková rychlost nosného plynu .....	57
4.4.8. pH pufru .....	59
4.4.9. Výměna chromatografické kolony .....	61
4.4.10. Shrnutí optimálních podmínek pro separaci vybraných specií rtuti .....	63
4.5. Kalibrace pro vybrané specie rtuti za podmínek optimálních pro HPLC - CVG - QTAAS .....	63
4.6. Analýza reálných vzorků .....	67
5. Závěr .....	70
Použitá literatura .....	72



## Seznam zkratek a symbolů

A	Absorbance
AAS	Atomová absorpční spektrometrie
AFS	Atomová fluorescenční spektrometrie
AMA - 254	Jednouúčelový atomový absorpční spektrometr pro stanovení rtuti
CHG	Chemické generování těžkých sloučenin (hydridů)
CNS	Centrální nervová soustava
CVG	Chemické generování studené páry
EcHG	Elektrochemické generování těžkých sloučenin (hydridů)
ET - AAS	AAS s elektrotermickou atomizací
EthHg <sup>+</sup>	Ethylrtuťný iont
FIA	Průtoková injekční analýza
GC	Plynová chromatografie
ICP - AES	Atomová emisní spektrometrie s iontově vázaným plazmatem
ICP - MS	Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem
HPLC	Vysokoučinná kapalinová chromatografie
LED	Dioda emitující světlo
LDR	Lineární dynamický rozsah
LLE	Extrakce kapaliny kapalinou
LOD	Mez detekce
LOQ	Mez stanovitelnosti
MeHg <sup>+</sup>	Methylrtuťný iont
MF	Mobilní fáze
m/v	Procento vyjadřující podíl hmotnosti látky obsažené v soustavě a objemu soustavy
PhHg <sup>+</sup>	Fenylrtuťný iont
PHG	Fotochemické generování těžkých sloučenin (hydridů)
ppb	koncentrace odpovídající jednotkám [ng.ml <sup>-1</sup> ]
ppm	koncentrace odpovídající jednotkám [μg.ml <sup>-1</sup> ]
QF - AAS	AAS s křemennými atomizátory

---

QTAAS	AAS s křemennou detekční trubicí
RHgX	Sloučenina tvořená uhlovodíkovým zbytkem, atomem rtuti a halogenu
RHgR'	Sloučenina tvořená dvěma uhlovodíkovými zbytky a atomem rtuti
RSD	Relativní směrodatná odchylka
s	Směrodatná odchylka
SFE	Superkritická fluidní extrakce
SPE	Extrakce tuhou fází
SPME	Mikroextrakce tuhou fází
T	Teplota
t	Čas
TMA - 254	Jednouúčelový atomový absorpční spektrometr pro stanovení rtuti
UCI	Univerzální chromatografický interface
v	Průtoková rychlost
V	Objem
v/v	Procento vyjadřující podíl objemu látky v soustavě a objemu soustavy
φ	Objemové procento

# 1. Úvod

Rtuť patří mezi nejdéle známé toxické prvky. Toxicita rtuti je závislá na formě, ve které se vyskytuje. Elementární rtuť není pro člověka zdraví škodlivá, výjimku tvoří vdechování jejích par. Mnohem nebezpečnější jsou organokovové sloučeniny rtuti, které mohou díky své rozpustnosti pronikat do živých tkání a akumulovat v nich. Nejčastěji vznikají organokovové sloučeniny rtuti působením bakterií na anorganické formy rtuti.

Z důvodu rozdílné toxicity látek obsahujících rtuť je potřeba získávat ze vzorků informace nejen o celkovém množství rtuti, ale také informace o obsahu jednotlivých specií. Proto se též vývoj analytických metod zaměřuje na speciální analýzu.

## 1.1. Cíle diplomové práce

Tato diplomová práce systematicky navazuje na studium chemického generování těkavých sloučenin pro potřeby atomové absorpční spektrometrie (AAS).

Byla vyvinuta a validována metoda speciální analýzy rtuti spojující pomocí chemického generování studené páry rtuti vysokoučinnou kapalinovou chromatografií s neobvyklou detekcí atomovým absorpčním spektrometrem.

Jedním z cílů této práce byla optimalizace jednotlivých parametrů chemického generování studené páry rtuti detekované pomocí atomového absorpčního spektrometru. Dalším cílem bylo nalezení vhodných podmínek HPLC separace jednotlivých specií rtuti a zjištění základních analytických charakteristik pro jednotlivé specie.

Tato diplomová práce navazuje na soustavný výzkum v oblasti speciální analýzy toxikologicky významných prvků a navazuje na předchozí závěrečné práce, zejména diplomovou práci Mgr. Ondřeje Linharta.

## 2. Teoretická část

### 2.1. Historie

Historie rtuti sahá až do roku 1100 před naším letopočtem, kdy ve starověké Číně těžili a využívali látku, kterou nazývali rumělka nebo také čínská červeň. V průběhu historie byla rtuť známá i pod jinými názvy. Kolem roku 400 před naším letopočtem ji nazval Aristoteles rychlé stříbro, později byla označována jako tekuté stříbro či vodní stříbro. Z tohoto posledního označení byl později odvozen symbol rtuti (Hg, hydrargyrum). Po více než tisíc let, až do roku 1500 našeho letopočtu, byla považována alchymisty za klíč k transmutacím obecných kovů na zlato.<sup>1,2</sup>

### 2.2. Fyzikálně - chemické vlastnosti rtuti

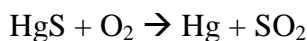
Rtuť je stříbřitě lesklý kov, který se jako jediný vyskytuje za normální teploty v kapalném stavu. V periodické tabulce se nachází ve II. B. skupině přechodných prvků společně se zinkem a kadmiem. Protonové číslo tohoto prvku je 80, relativní atomová hmotnost 200,59, teplota varu 357 °C a teplota tání - 38,9 °C. Elektronová konfigurace tohoto kovu je o 6 p elektronů nižší, než je elektronová konfigurace následujícího vzácného plynu, kterým je radon. Díky tenzi par 2,53 Pa při teplotě 25 °C je možné stanovovat rtuť pomocí atomové absorpční spektrometrie již při laboratorní teplotě. Tuto zvláštnost rtuti vystihuje dnes již hojně používaný pojem studená pára rtuti. Za této teploty je i kapalná rtuť na vzduchu stálá, pokrývá se vrstvou HgO až tehdy, blíží-li se teplota bodu varu.<sup>2,3</sup>

Rtuť se vyskytuje ve třech oxidačních stavech (0, +I, +II). Oxidační číslo 0 představuje elementární (kovová) rtuť, +I obsahuje tento prvek ve formě většinou dimerů rtuťných iontů ( $\text{Hg}_2^{2+}$ ) a +II ve formě rtuťnatých iontů ( $\text{Hg}^{2+}$ ). Sloučeniny obsahující rtuť v různých oxidačních stavech se vzájemně liší jak svými fyzikálně - chemickými vlastnostmi, tak i toxicitou.<sup>4</sup>

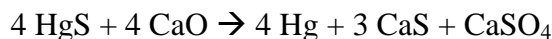
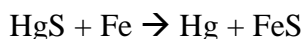
## 2.3. Výskyt a výroba rtuti

Koncentrace rtuti v zemské kůře se pohybuje v rozmezí od 0,05 do 0,10 mg.kg<sup>-1</sup>. Nejvýznamnější rudou je rumělka (cinabarit, HgS). Mezi další rudy rtuti, které již nejsou tak významnými zdroji, patří tilmannit (HgSe), coloradoit (HgTe), kalomel (Hg<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) a coccinit (Hg<sub>2</sub>I<sub>2</sub>). Příčinou výskytu tohoto prvku na Zemi mohou být přirozené nebo antropogenní procesy. Nejvýznamnějším přirozeným zdrojem Hg je zejména sopečná činnost, gejzíry, větrem nesený prach a zvětrávání přírodních ložisek. Většina emisí rtuti do životního prostředí je však antropogenního původu, zejména ze spalovacích, hutních a chemických procesů.<sup>5,6,7,8</sup>

Výroba rtuti se provádí pražením rumělky při 600 °C v proudu vzduchu za následné kondenzace par Hg. Tato reakce probíhá podle rovnice:



Další možností je zahřívání rud bohatých na rtuť se železným odpadem či páleným vápnem za následné destilace:<sup>8</sup>



## 2.4. Reaktivita a sloučeniny rtuti

Rtuť je za normálních podmínek na vzduchu stálá, ale snadno reaguje se sírou a halogeny. Dobře se rozpouští v koncentrované kyselině dusičné a horké koncentrované kyselině sírové za vzniku oxidů dusíku a síry, také reaguje s lučavkou královskou za vzniku chloridu rtuťnatého. S kovy tvoří amalgámy, které mohou být kapalné či pevné. Skupenství amalgámů závisí na množství rtuti a povaze druhého kovu.<sup>2,9</sup>

### 2.4.1. Anorganické sloučeniny

Mezi anorganické se řadí sloučeniny obsahující rtuťné (Hg<sub>2</sub><sup>2+</sup>) nebo rtuťnaté (Hg<sup>2+</sup>) ionty nejčastěji v kombinaci s aniontem chloru, síry nebo kyslíku a jsou označovány jako soli rtuti. Většina těchto sloučenin má podobu bílého prášku či krystalů, výjimku tvoří sulfid rtuťnatý, který je červený a po vystavení světlu černá.<sup>10</sup>

Většina sloučenin Hg<sup>+</sup> je obtížně rozpustná ve vodě, proto se nacházejí

hlavně v půdách a sedimentech ve formě nemnoha sloučenin. Naopak sloučeniny obsahující  $\text{Hg}^{2+}$  jsou ve vodě poměrně dobře rozpustné a tvoří komplexy nebo sloučeniny s anorganickými nebo organickými ligandy v závislosti na podmínkách prostředí.<sup>11</sup> Mezi nejvýznamnější sloučeniny patří chlorid rtuťnatý, chlorid rtuťný a sulfid rtuťnatý. Poměrně vysoká rozpustnost chloridu rtuťnatého  $28,6 \text{ g.l}^{-1}$  způsobuje velkou toxicitu této sloučeniny. Chlorid rtuťný (kalomel) je naopak málo rozpustný ve vodě (jeho rozpustnost je pouze  $2 \text{ g.l}^{-1}$ ), proto je méně toxický, než ostatní sloučeniny rtuti rozpustné ve vodě. Sulfid rtuťnatý (rumělka) je nerozpustný ve vodě, etanolu a zředěných minerálních kyselinách.<sup>12</sup>

#### 2.4.2. Organokovové sloučeniny

Organokovové sloučeniny obsahují jeden nebo dva uhlovodíkové zbytky, které jsou navázány na atom rtuti. Tímto způsobem vznikají sloučeniny  $\text{RHgX}$  a  $\text{RHgR}'$ , kde X označuje nejčastěji halogenid, sulfid, dusičnan či síran a symboly R a R' uhlovodíkové zbytky.<sup>4</sup>

V přírodě vznikají tyto sloučeniny přeměnou anorganických sloučenin rtuti obsažených například v řasách nebo humínových látkách pomocí methylace bakteriemi. Do této skupiny sloučenin patří methylrtuť. Další organokovové sloučeniny rtuti, jako ethylrtuť a fenylrtuť, jsou společně s methylrtutí považovány z hlediska chronické toxicity za toxicitější, než anorganická forma, jelikož dochází k jejich bioakumulaci v organismu.<sup>13,14</sup>

## 2.5. Využití rtuti

Rtuť je v dnešní době využívána v mnoha odvětvích od analytické chemie, přes průmysl, elektrotechniku až po zdravotnictví. Součástky obsahující rtuť se používají do spínačů, termostatů, kamer, do různých měřicích přístrojů nebo detektorů kouře. Rtuť se také používá při fotografování, výrobě svítidel (rtuťové lampy), baterií a jako antibakteriální složka nátěrových hmot. Další oblast využití je při výrobě průmyslových chemikálií, které se využívají jako konzervační látky (příkladem je thimerosal sloužící jako konzervační činidlo používané v různých vakcínách, kde zabraňuje bakteriální kontaminaci), různých činidel pro laboratorní experimenty nebo při zpracování kůží.<sup>15,16</sup>

V analytické chemii je rtuť využívána také jako součást elektrod. Kovová rtuť je základem rtuťové (visící nebo kapající) kapkové elektrody, tohoto uspořádání se využívá zejména v polarografii. Druhým typem elektrod obsahujících tento prvek jsou elektrody kalomelová a merkurosulfátová. Tento typ elektrod slouží jako referenční elektrody pro různá stanovení. Dále je možno využít celou škálu elektrod amalgámových.<sup>16</sup>

Ve zdravotnictví byla rtuť dříve hojně využívána jako náplň do teploměrů, ale z bezpečnostních důvodů je tento typ nahrazován méně nebezpečnými, např. digitálními. Již od poloviny 19. století je ve stomatologii využíván amalgám obsahující rtuť pro tvorbu zubních výplní. Zubní amalgám je tvořen slitinou stříbra, cínu a mědi, která se krátce před aplikací mísí se rtutí v poměru přibližně 1:1.<sup>17</sup>

## 2.6. Koloběh rtuti v životním prostředí

Koloběh rtuti začíná v půdě, kde je jejím hlavním zdrojem HgS (rumělka). Z půd je rtuť vyluhována do okolních řek a jezer, kde může docházet k přechodu do vodních organismů. Rtuť může být vypařena do atmosféry volně nebo v důsledku sopečné činnosti. V atmosféře je rtuť transportována vzduchem odkud se může znovu ukládat do půdy. Tento cyklus je neustále opakován, pouze minimální množství rtuti se ukládá do vodních organismů a vstupuje do potravního řetězce. Rovnováhu tohoto cyklu narušuje antropogenní činnost, která způsobuje zvyšování koncentrace rtuti v životním prostředí. Kontaminace vody je způsobena zejména vypouštěním odpadních vod z průmyslových zařízení či čistíren odpadních vod. Do ovzduší se rtuť dostává z těžby zlata, spalování uhlí a odpadu nebo z likvidace produktů obsahujících rtuť.<sup>18,19,20</sup>

Koloběh rtuti v jednotlivých segmentech životního prostředí závisí na mnoha faktorech: rozpustnost jednotlivých sloučenin, teplota, redoxní podmínky (koncentrace rozpuštěného kyslíku), koncentrace kovu a druh ligandu, iontová síla, pH, životní cyklus organismu a jeho obecné chování.<sup>4,20</sup>

V atmosféře se vyskytuje převážně elementární rtuť, v povrchových vodách a sedimentech v podobě Hg<sup>2+</sup> převážně navázaná na ligandy obsahující -SH skupinu. Iontové nebo komplexní sloučeniny se váží na pevné sedimenty. Ve vodách se také vyskytuje malé množství plynné rtuti (elementární rtuť a dimethylrtuť), která se vypařuje

do ovzduší.<sup>4</sup>

V důsledku bioakumulace organokovových sloučenin (zejména methylrtuti) do tkání živých organismů dochází k transportu těchto sloučenin výhradně prostřednictvím organismů. V mnoha evropských zemích využívají vědci např. ptáků jako bioindikátorů rtuti pomocí speciální analýzy klíčových orgánů (ledvin). Tento způsob výzkumu zahrnuje jak prostorovou, tak i časovou expozici rtutí, proto slouží jako cenný nástroj sledování (monitoringu) kontaminace životního prostředí.<sup>4,19,21</sup>

## **2.7. Toxicita rtuti a jejích sloučenin**

Toxické působení rtuti je závislé nejen na sloučenině, ve které se rtuť vyskytuje, dalším významným faktorem ovlivňujícím toxicitu je expozice.<sup>22</sup>

### *2.7.1. Toxické účinky rtuti na rostliny*

Hlavní cestou vstupu rtuti rozpuštěné ve vodě do vodních rostlin je adsorpce na kořeny a v menší míře také na povrch listů a oddenků. Její adsorpce je snižována přítomností sedimentu nebo humínových látek. Toxické působení rtuti na tyto rostliny se projevuje zejména v procesu fotosyntézy, kdy dochází ke snižování tvorby kyslíku o 50 % v temnostní fázi a až o 90 % ve světelné fázi. U suchozemských rostlin je hlavním zdrojem rtuť obsažená v půdě. U vyšších rostlin dochází v důsledku expozice rtuti ke snížení fotosyntézy, transpirace, absorpce vody a syntézy chlorofylu.<sup>23</sup>

### *2.7.2. Toxické účinky rtuti na živočichy*

Pro živočichy je mnohem toxičtější methylrtuť než anorganické sloučeniny rtuti. Její působení na obratlovce je zejména neurotoxické, embryotoxické a teratogenní. Hlavní příčinou je absence vnější bariéry, která by zabránila jejímu vstupu, a také detoxikačních systémů v organismu. U mořských ptáků se intoxikace projevuje těžkými neurotoxickými lézemi, u skotu, ovcí, prasat a drůbeže nedostatkem chuti k jídlu, úbytkem tělesné hmotnosti, ztrátou svalové koordinace, nestabilní chůzí a kulháním. Některé sloučeniny rtuti mohou způsobovat poruchy reprodukce, paralýzu, třes a smrt.<sup>23,24</sup>



### 2.7.3. Toxické účinky rtuti na člověka

Toxicita rtuti je způsobena zejména její vysokou afinitou k síře, proto dochází k jejímu navázání na thiolové skupiny bílkovin a enzymů což snižuje jejich funkčnost. Rtuť je také schopna se navázat na hemoglobin a albumin, čímž poškozuje krevní buňky, a také na buněčné membrány, u kterých může způsobovat inhibici transportu živin.<sup>22</sup>

#### 2.7.3.1. Elementární rtuť a anorganické sloučeniny

Elementární rtuť je nejméně toxickou formou, po jejím požití dochází k vyloučení bez vlivu na organismus. Problémem je její odpařování do ovzduší. K otravám parami rtuti dochází inhalací ve špatně odvětrávaných prostorech a mezi první příznaky akutní otravy patří dušnost. Dalšími projevy jsou poruchy centrální nervové soustavy (CNS), ledvin a poruchy dýchání. Při vysokých koncentracích může docházet k úmrtí v důsledku poškození plic. Při chronickém působení dochází k prostupu placentární bariéry a poškození plodu.<sup>22,25,26</sup>

Toxicita anorganických sloučenin je závislá na jejich rozpustnosti ve vodě, proto jsou obecně rtuťné sloučeniny méně toxické. Otrava se projevuje poruchami CNS, krvavými průjmy, žaludečními poruchami, chudokrevností, nadměrným sliněním, kovovou chutí v ústech nebo pálivou bolestí. Při kontaktu s kůží může docházet ke vzniku dermatitid a při otravách vysokými koncentracemi až ke smrti.<sup>26,27,28</sup>

#### 2.7.3.2. Organokovové sloučeniny

Z organokovových sloučenin je nejnebezpečnější methylrtuť, která vzniká z anorganických sloučenin působením anaerobních bakterií. Hlavním důvodem vysoké toxicity je její rozpustnost ve vodě i v tukové tkáni organismů, což umožňuje její bioakumulaci a při dlouhodobém příjmu může docházet k otravám. Pro člověka jsou jejím hlavním zdrojem potraviny, zejména ryby, u kterých dochází k hromadění methylrtuti rozpuštěné ve vodě. Hlavními projevy intoxikace jsou neurotoxicita, poškození ledvin, arytmie a kardiomyopatie (byl prokázán vliv otravy methylrtutí na zvýšení výskytu infarktu myokardu<sup>29</sup>). U dětí je otrava methylrtutí příčinou mentální retardace, dětské mozkové obrny a může způsobovat smrt. Otrava touto sloučeninou byla spojována se vznikem autismu u dětí, toto spojení se však neprokázalo.<sup>27,29,30,31</sup>

#### 2.7.4. Příklady otrav způsobených sloučeninami rtuti

Jedním ze známých případů otravy methylrtutí je tzv. nemoc Minamata. Tato tragická událost se odehrála kolem roku 1960 v Japonsku, kde došlo k otravám rybářů a jejich rodin v důsledku konzumace velkého množství ryb, které bioakumulovaly methylrtuť vypouštěnou do zátoky z chemické továrny. Následovalo dlouhodobé čištění zátoky a rybolov byl obnoven až v roce 1990.

K otravám organortuťnými sloučeninami docházelo také v Iráku a Guatemale, kde se tyto sloučeniny využívaly jako součást fungicidů na obilí určené k setbě, z něhož pak přecházely přímým zkrmením do vepřového masa, které bylo konzumováno obyvateli těchto států.

Otravy rtutí byly zaznamenány také v Amazonii. Domorodým obyvatelům sloužily jako hlavní zdroj bílkovin ryby, ve kterých docházelo k bioakumulaci rtuti uvolňované při těžbě zlata a také při kácení pralesů, kdy docházelo ke zvedání hladin řek, do kterých se uvolňovala rtuť přirozeně se vyskytující v půdě a byla dále přeměňována vodními organismy.<sup>32</sup>

## 2.8. Způsoby stanovení rtuti

Existují dva základní způsoby analýzy - stanovení celkového obsahu rtuti ve vzorku a speciální analýza vzorku. Ke stanovení míry toxicity určitého vzorku nestačí v dnešní době získat pouze informace o celkovém obsahu rtuti, ale je třeba informace o koncentraci jednotlivých specií obsažených ve vzorku, jelikož se liší závažností svých toxických účinků.

### 2.8.1. Metoda stanovení celkového obsahu rtuti

Ve většině českých a slovenských laboratoří se ke stanovení celkového obsahu rtuti používají přístroje TMA - 254 a AMA - 254. Tyto přístroje se využívají pro kapalně nebo pevně vzorky, které se naváží do lodičky. Ta je následně zavedena do pece, kde dochází ke spálení vzorku v proudu kyslíku a následně jsou spaliny vedeny přes katalyzátor až na amalgamátor, kde dochází k zachycení rtuti. Ohřevem amalgamátoru dochází k rychlému uvolňování prekoncentrované rtuti, která je následně vedena do kyvety, kde probíhá měření absorpance při vlnové délce 253,65 nm. Celková

koncentrace rtuti se vyhodnocuje pomocí kalibračních závislostí. Výhodou tohoto stanovení je absence předchozí úpravy a rozkladu vzorku.<sup>33,34,35</sup>

### 2.8.2. Speciační analýza

Termínem speciační analýza nebo speciace se označuje postup, jehož cílem je rozlišení nebo stanovení koncentrací jednotlivých fyzikálně - chemických forem prvku. Součet koncentrací těchto forem odpovídá celkové koncentraci prvku ve vzorku.<sup>36</sup>

Metody speciace rtuti lze rozdělit do dvou základních skupin na chromatografické metody (plynová chromatografie, kapalinová chromatografie a kapilární elektroforéza) a nechromatografické metody založené na různých fyzikálně - chemických vlastnostech jednotlivých specií rtuti.<sup>11,37</sup>

#### 2.8.2.1. Nechromatografické metody

Mezi nejrozšířenější nechromatografické techniky speciační analýzy se řadí různé typy extrakcí. Využívá se extrakce kapaliny kapalinou (LLE), extrakce tuhou fází (SPE), mikroextrakce tuhou fází (SPME), superkritická fluidní extrakce (SFE) a jiné metody extrakce, které nabízejí nové možnosti speciační analýzy.<sup>38</sup>

Další možností vzájemné izolace specií je komplexace, kdy dochází k tvorbě komplexu na základě reakce molekuly ligandu s molekulou příslušné chemické formy daného prvku. Vznikající komplexy jsou následně stanoveny pomocí vhodného detektoru (atomový absorpční spektrometr).<sup>39</sup>

V některých případech se využívá pro speciační analýzu selektivní tvorba hydridů, destilace nebo odpařování na základě různého bodu varu jednotlivých specií nebo také různé frakcionační metody.<sup>40</sup>

#### 2.8.2.2. Chromatografické metody

Mezi nejčastěji používané metody založené na moderních separačních technikách se řadí plynová chromatografie (GC) a vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) ve spojení s vhodným detektorem. V případě, kdy je pro separaci využita plynová chromatografie, je nutné převést všechny specie na těkavé tepelně stálé deriváty, nejčastěji se využívá alkylace pomocí Grignardových činidel. Kapalinová chromatografie přináší oproti plynové chromatografii několik výhod, jedná se zejména

o jednodušší přípravu vzorku a jednodušší spojení s prvkově selektivním detektorem. V kapalinové chromatografii se pro speciální rtuti využívá téměř výhradně uspořádání s obrácenými fázemi, kde jako stacionární fáze slouží C18 nebo C8 a mobilní fáze (MF) obsahující organický modifikátor (acetonitril, methanol, ethanol), chelatační nebo iontově - párové činidlo. Plynová chromatografie se nejčastěji využívá pro nepolární látky, těkavé a snadno derivatizovatelné látky. Kapalinová chromatografie se využívá pro polárnější látky a je vhodnější k separaci organických a anorganických specií rtuti. Nevýhodou oproti plynové chromatografii je nižší citlivost.<sup>41,42,43</sup>

## **2.9. Techniky generování těkavých sloučenin pro potřeby stanovení AAS**

Existují tři základní techniky generování těkavých sloučenin. Podle způsobu vzniku těkavé sloučeniny je lze rozdělit na fotochemické (PHG), elektrochemické (EchG) a chemické generování (CHG). Při generování těkavých sloučenin pro potřeby analytických stanovení obsahu prvků dochází nejčastěji ke vzniku hydridů.

Generování těkavých sloučenin se využívá ve spojení s různými analytickými detekčními technikami, např. AAS s elektrotermickými atomizátory (ET - AAS), AAS s křemennými atomizátory (QT - AAS), atomovou emisní spektrometrií s indukčně vázaným plazmatem (ICP - AES), hmotnostní spektrometrií s indukčně vázaným plazmatem (ICP - MS) či atomovou fluorescenční spektrometrií (AFS). Možnost využití generování těkavých sloučenin pro kvantitativní stanovení prvků ve spojení s AAS byla poprvé popsána v roce 1977.<sup>44,45</sup>

Výhodami spojení AAS s generováním těkavých sloučenin pro rutinní analýzu jsou elementární specifita a schopnost efektivně oddělit analyt od matrice ve velkém množství vzorků, dále pak vysoká citlivost stanovení, absence spektrálních interferencí, relativně nízké provozní náklady, jednoduchost, rychlost a schopnost analyzovat kapalné vzorky.

### *2.9.1. Chemické generování těkavých sloučenin*

Chemické generování je stále nejrozšířenější používanou technikou generování těkavých sloučenin díky své jednoduchosti, vysoké účinnosti, rychlosti a také díky nízkým provozním nákladům.

Chemické generování může být pro speciální analýzu využito jako derivatizační technika ve spojení s kapalinovou chromatografií tak, že zároveň může sloužit k zavádění vzorku v plynné fázi do atomizátoru umístěného v ose paprsku atomového absorpčního spektrometru.

K tvorbě těkavých sloučenin dochází působením redukčního činidla. Nejčastěji se využívá tetrahydridoboritan sodný ( $\text{NaBH}_4$ ) nebo chlorid cínatý ( $\text{SnCl}_2$ ). Někdy se také využívá tetrafenylboritan sodný<sup>46</sup>. Pro stabilizaci činidla se do roztoku přidává NaOH či KOH o koncentraci 0,1 – 1 mol.l<sup>-1</sup>.

Nevýhodami této techniky jsou možná kontaminace analytu z přidávaných roztoků redukčního a oxidačního činidla, produkce odpadů škodlivých životnímu prostředí a nestabilita činidla, kvůli které je nutné připravovat ho denně čerstvé. Je potřeba dbát na zvýšenou bezpečnost, jelikož dochází při reakci s  $\text{NaBH}_4$  k tvorbě vodíku. Rušivý vliv na generování má přítomnost analytu v nevhodné formě pro redukcí (obvykle nejvyšší oxidační stavy prvku), přítomnost jiných anorganických iontů nebo heterogenní fáze (uhlíkaté zbytky z biologického vzorku). Pro úpravu analytu do vhodné formy se používá oxidační činidlo, nejčastěji se jedná o peroxidisíran draselný ( $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ ) v kombinaci s následnou předredukcí pomocí L-cysteinu, thioglykolové kyseliny nebo HCl.<sup>47,48,49,50,51</sup>

V případě použití chemického generování pro stanovení rtuti za laboratorní teploty (za studena, protože na rozdíl od rtuti většina těkavých sloučenin potřebuje pro svou atomizaci zvýšenou teplotu 900 – 1000 °C) se vžil pojem generování studené páry (CVG).

### 2.9.2. Elektrochemické generování těkavých sloučenin

Další možností přípravy těkavých sloučenin je využití elektrochemického generování, kde dochází ke vzniku těkavých sloučenin průchodem elektrického proudu v prostředí roztoků velmi čistých minerálních kyselin. Výhodami tohoto způsobu generování je úspora redukčních činidel, dosažení nízkých mezí detekce a stanovitelnosti bez možnosti kontaminace vzorku nedostatečně čistým redukčním činidlem. Nevýhodou bývá naopak obvykle nižší účinnost elektrochemického generování těkavých sloučenin ve srovnání s generováním chemickým.

### 2.9.3. UV - fotochemické generování těkavých sloučenin

K tvorbě těkavých sloučenin dochází působením UV záření o vlnové délce 254 nm (případně při 186 nm dle konstrukce reaktoru) v prostředí nízkomolekulárních organických kyselin (HCOOH, CH<sub>3</sub>COOH). Těkavé sloučeniny jsou dále vedeny transportním systémem k atomizátoru, kde jsou detekovány pomocí AAS. V poslední době vývoj směřuje k co největší miniaturizaci fotochemického reaktoru s cílem dosažení nižší meze detekce. Tento typ reaktorů využívá světelné diody (LED).<sup>52,53</sup>

## 2.10. Statistické zpracování výsledků

Správné zpracování a vyhodnocení výsledků je pro kvalitu práce v laboratoři stejně důležité, jako samotné měření. Každé měření je zatíženo určitou chybou, která způsobuje odlišení výsledků od skutečné hodnoty a odlišnost výsledků mezi sebou.

Každé měření v této práci bylo prováděno ve třech opakováních a následně byla vypočtena střední hodnota, jako aritmetický průměr z naměřených hodnot. Pro každou trojici naměřených hodnot byla získána výběrová směrodatná odchylka, která je v grafech zobrazena ve formě chybových úseček.

### 2.10.1. Mez detekce a mez stanovitelnosti

Mezi základní charakteristiky metod stopové analýzy se řadí mez detekce a mez stanovitelnosti.

Mez detekce (LOD) je definována jako nejnižší koncentrace analytu, kterou je možné použitou analytickou metodou odlišit od signálu šumu slepého vzorku. Mez detekce odpovídá koncentraci analytu, která je dána trojnásobkem směrodatné odchylky ( $3s$ ) signálu slepého vzorku.

Mez stanovitelnosti (LOQ) je definována jako nejnižší koncentrace analytu, kterou je možné stanovit ve vzorku s určitou spolehlivostí, při použití dané analytické metody. Mez stanovitelnosti je koncentrace analytu, která odpovídá desetinásobku směrodatné odchylky ( $10s$ ) signálu slepého vzorku.

### *2.10.2. Citlivost*

Citlivost je vyjadřována jako změna měřeného signálu vůči změně koncentrace analytu ( $dS/dc$ ). Pro analytické metody, které se vyhodnocují pomocí kalibrací s lineárním průběhem, odpovídá v tomto úseku citlivost směrnici kalibrační přímky.

### *2.10.3. Opakovatelnost*

Opakovatelnost je v této práci vyjadřována relativní směrodatnou odchylkou (RSD) výsledků desetkrát opakovaných stanovení provedených v krátkém časovém intervalu, na stejném přístroji, ve stejné laboratoři, se stejným roztokem vzorku a stejným pracovníkem. Opakovatelnost nepřímo odpovídá náhodné chybě daného měření.<sup>54,55</sup>

## 3. Experimentální část

### 3.1. Instrumentace

Pro experimentální část této diplomové práce byly použity následující přístroje a zařízení:

- atomový absorpční spektrometr Varian SPECTR AA - 300A (Varian, Austrálie)
- výbojka s dutou katodou pro Hg (Photron, Austrálie), pro měření byl zvolen napájecí proud 0,5 mA, vlnová délka 253,7 nm a šířka spektrálního intervalu 0,5 nm
- křemenná detekční trubice ve tvaru „T” umístěná v optické ose atomového absorpčního spektrometru o délce optického ramene 170 mm, zúžená část uprostřed o délce 60 mm s vnitřním průměrem 6 mm a o průměru přívodního ramene 4 mm
- vysokoúčinný kapalinový chromatograf Thermo Scientific Dionex Ultimate 3000 Series, (Dionex, USA)
- zdroj elektrického proudu pro odporové vyhřívání přívodní křemenné trubice spojující separátor fází a detekční trubici LPS 303 (Amrel, Taiwan)
- peristaltické vícekanálové pumpy Masterflex (Cole Parmer, USA) pro čerpání roztoků NaBH<sub>4</sub> a K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> + HCl s tygonovými hadičkami
- průtok nosného plynu byl regulován průtokoměrem (Cole Parmer, USA) 0 – 100 ml.min<sup>-1</sup> a 0 – 1000 ml.min<sup>-1</sup>
- HPLC kolona, GEMINI, C18, 110 Å, 3µm, 150 x 2,4 mm (Phenomenex, USA)
- HPLC kolona, GEMINI, C18, 110 Å, 3µm, 150 x 4,6 mm (Phenomenex, USA)
- HPLC kolona, GEMINI, C18, 110 Å, 3µm, 250 x 3,0 mm (Phenomenex, USA)
- pro čerpání mobilní fáze byla též využita HPLC pumpa LKB 2150 (Bromma, Švédsko)
- dávkovací smyčka PEEK o objemu 100 µl (Rheodyne, USA)
- injekční stříkačka o objemu 10 ml (Hamilton, USA)
- injekční stříkačka o objemu 25 ml (Hamilton, USA)
- teflonové hadičky o různých vnitřních průměrech (Supelco)
- tygonové čerpací a spojovací hadičky o různých vnitřních průměrech



- pro navážení sypkých chemikálií byly použity analytické váhy typ RC 210D (Sartorius, USA)
- termočlánek

### 3.2. Použité chemikálie

- k přípravě všech roztoků byla použita deionizovaná voda připravená zařízením Milli Q<sub>PLUS</sub> (Millipore, USA)
- zásobní roztoky specií rtuti o koncentraci 500 ppm byly připraveny přesným navážením standardů a naředěním ethanolem nebo deionizovanou vodou
  - chlorid rtuťnatý (Sigma - Aldrich, Německo) v deionizované vodě
  - chlorid methylrtuťný (Sigma - Aldrich, Německo) v ethanolu
  - chlorid ethylrtuťný (Supleco, Německo) v ethanolu
  - chlorid fenylrtuťný (Supleco, Německo) v ethanolu
- mobilní fáze byla připravena smísením octanového pufru, 2-merkptoethanolu C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>OS a organické fáze (Sigma - Aldrich, Německo)
  - octanový pufr byl připraven z CH<sub>3</sub>COOH (99,8%, Sigma - Aldrich, Německo) a CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub> (Penta, ČR) nebo CH<sub>3</sub>COONa (Merck, Německo)
  - organická fáze byla tvořena ethanolem (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH, Sigma - Aldrich, Německo, Uvasol), methanolem (CH<sub>3</sub>OH, Sigma - Aldrich, Německo) nebo acetonitrilem (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>N, Sigma - Aldrich, Německo)
- pro přípravu roztoků redukčního činidla byly použity:
  - NaBH<sub>4</sub> (98 %, Acros Organics, Belgie)
  - NaOH (Lachema, n. p. Brno, ČR)
- pro přípravu roztoků oxidačního činidla byly použity:
  - K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> (Lachema, n. p. Brno, ČR)
  - HCl (37%, Merck, Německo)
- jako nosný plyn byl používán 99,998 % argon (Linde Technoplyn, ČR)

### 3.3. Aparatura pro generování studené páry rtuti s využitím HPLC - CVG - QTAAS

Aparatura pro optimalizaci chemického generování studené páry rtuti je znázorněna na Obr. 3.1.

System zajišťující přívod roztoků oxidačního činidla ( $K_2S_2O_8$ ), HCl a redukčního činidla ( $NaBH_4$ ) byl zajišťován multikanálovými peristaltickými pumpami a transportními teflonovými hadičkami. Mobilní fáze, do které byl dávkován vzorek, byla čerpána pomocí HPLC pumpy a procházela separační kolonou. Podle požadovaných podmínek byla regulována rychlost průtoku.

Separací kolona slouží k rozdělení jednotlivých specií rtuti na základě jejich odlišných interakcí se stacionární fází, kterou je kolona naplněna. V této diplomové práci byly používány HPLC kolony Gemini s nepolární stacionární fází. Separací kolona byla umístěna v termostatu vyhřívaném na 40 °C z důvodu snížení viskozity (zpětného tlaku).

Po rozdělení vybraných specií rtuti pomocí HPLC kolony došlo následně k on-line smíchání s oxidačním činidlem, kterým byl v této diplomové práci  $K_2S_2O_8$ . Za oxidačním činidlem byl k aparatuře připojen přívod nosného plynu.

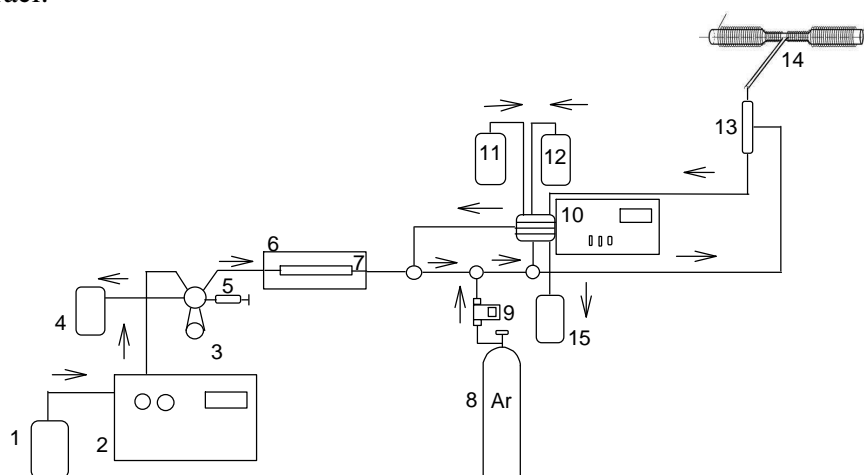
Základní úlohou nosného plynu je účinný transport analytu v mobilní fázi a následně ve formě studené páry rtuti do detekční trubice. Příslušný plyn je uchovávan v zásobních tlakových lahvích a rychlost jeho průtoku je možné regulovat podle potřeb analýzy pomocí průtokoměru s ventilem. V této diplomové práci byl používán argon.

Za nosným plynem byl připojen přívod roztoku redukčního činidla  $NaBH_4$  čerpaného rovněž peristaltickou pumpou. Působením  $NaBH_4$  docházelo v reakční cívice ke vzniku studené páry rtuti, která postupně přecházela četnými fázovými rozhraními do bublinek nosného plynu a vodíku, a výsledná plynná fáze byla společně s kapalinou vedena do separátoru fází, kde došlo k oddělení plynné a kapalné fáze. Kapalina byla pomocí peristaltické pumpy čerpána do odpadu a plynná fáze byla vedena pomocí nosného plynu do detekční trubice.

Pro detekci studené páry rtuti byla využita křemenná trubice ve tvaru „T“. Je tvořena dvěma na sebe kolmými částmi - přívodním ramenem a optickým ramenem, které je umístěno v ose optického měřicího paprsku. Detekční trubice včetně přívodního ramene byla vyhřívána nad teplotu okolí pomocí odporového drátu na teplotu 37,1 °C.

K odporovému vyhřívání přívodní trubice spojující separátor fází s detekční trubicí se v tomto případě využívá zdroj proudu. Hlavní úlohou vyhřívání detekční trubice je zabránit depozici vznikající páry rtuti na jejím povrchu společně s kondenzující vodní parou (vlhkostí). K tomuto účelu lze využít libovolný stabilizovaný zdroj dostupný v laboratoři.

Volné atomy (pára) rtuti v plynné fázi byly vedeny nosným plynem ze separátoru fází detekční trubicí do optického paprsku spektrometru, který se využívá k jejich detekci. Úbytek zářivého toku způsobený absorpcí analytem je úměrný jeho koncentraci.



**Obr. 3.1.** Schéma aparatury pro chemické generování studené páry rtuti ve spojení s HPLC a AAS pro speciální analýzu

1. zásobník mobilní fáze, 2. HPLC pumpa, 3. dávkovací smyčka, 4. odpad, 5. dávkovací zařízení, 6. termostat, 7. separační kolona, 8. nosný plyn, 9. průtokoměr,
10. peristaltická pumpa, 11. zásobník roztoku  $K_2S_2O_8$ , 12. zásobník roztoku  $NaBH_4$ ,
13. separátor fází, 14. detekční trubice, 15. odpad

## 4. Výsledky a diskuze

Tato diplomová práce je zaměřená na výzkum možností speciálního stanovení rtuti ve vodách, ve kterých se vyskytuje v několika různých formách, nejčastěji ve formě  $\text{HgCl}_2$  a  $\text{MeHg}^+$ . Dále byly zkoumány možnosti stanovení  $\text{EtHg}^+$  a  $\text{PhHg}^+$ , jejichž výskyt se předpokládá spíše v kontaminovaných tkáních živých organismů.

V první části práce byly hledány optimální podmínky chemického generování studené páry rtuti včetně optimalizace předřazeného oxidačního kroku pomocí  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ . Zvolené optimální kompromisní podmínky byly poté používány pro další experimenty. Výsledná citlivost stanovení byla ovlivněna koncentrací a průtokovou rychlostí roztoků oxidačního činidla ( $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ ),  $\text{HCl}$ , redukčního činidla ( $\text{NaBH}_4$ ) a průtokovou rychlostí nosného plynu. Posledním optimalizovaným parametrem chemického generování byla teplota přívodního ramene detekční trubice.

V druhé části práce byla provedena optimalizace separačního kroku. Před připojením separační kolony byl testován vliv koncentrace a druhu octanového pufru. První pufr byl připraven smícháním roztoků kyseliny octové a octanu amonného a druhý pufr byl připraven smícháním roztoků kyseliny octové s octanem sodným. Dále byl zkoumán vliv pH pufru, typ a koncentrace organické fáze a koncentrace komplexotvorného činidla (2-merkptoethanol) na citlivost stanovení. Před zapojením separační kolony byly proměřeny kalibrační závislosti pro jednotlivé specie rtuti v režimu průtokové injekční analýzy (FIA).

Po zapojení separační kolony bylo nutné provést optimalizaci složení mobilní fáze pro dosažení co nejlepšího rozlišení jednotlivých specií v chromatogramu. Mezi optimalizované parametry patřila koncentrace pufru, koncentrace ethanolu a koncentrace 2-merkptoethanolu. Z důvodu nedokonalého rozdělení jednotlivých specií bylo přistoupeno k využití různého gradientu obsahu ethanolu. Následně byly proměřeny vlivy pH pufru a průtokové rychlosti mobilní fáze a nosného plynu na výsledné stanovení. V této práci byly také testovány pro zlepšení separace různé separační kolony.

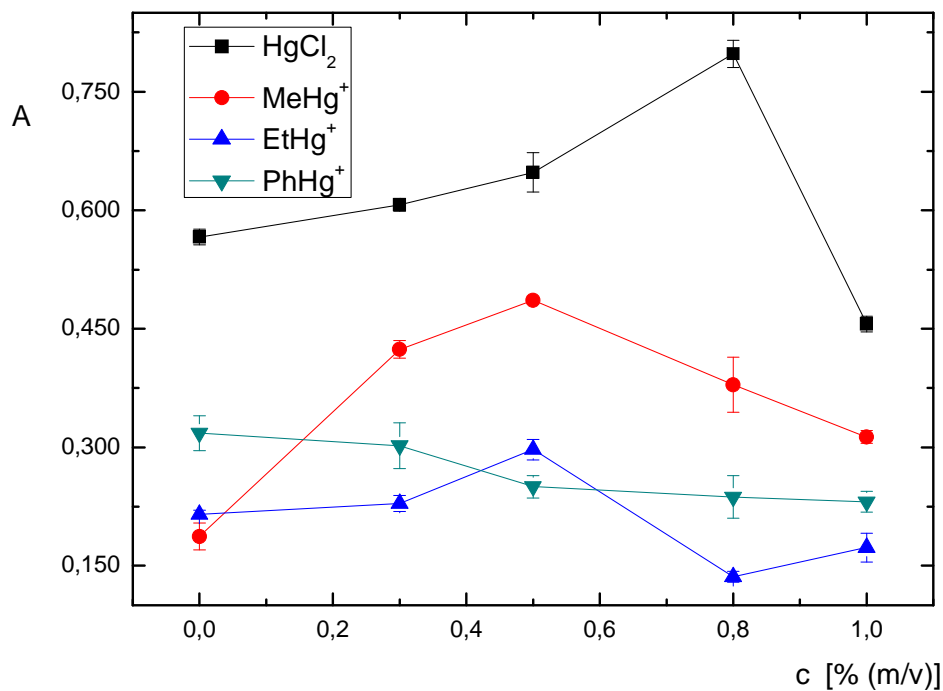
Za optimálních podmínek byly proměřeny kalibrační závislosti pro  $\text{HgCl}_2$ ,  $\text{MeHg}^+$ ,  $\text{EtHg}^+$  a  $\text{PhHg}^+$  a následně také reálné vzorky vod, různých vodních toků Západních Čech.

## 4.1. Optimalizace pracovních podmínek chemického generování

Hlavním cílem optimalizace chemického generování byla snaha získat co nejnižší hodnoty meze detekce a nejvyšší citlivost stanovení Hg metodou CVG - QTAAS.

### 4.1.1. Koncentrace $K_2S_2O_8$

Prvním zkoumaným parametrem byla koncentrace roztoku  $K_2S_2O_8$ , který byl používán jako oxidační činidlo na převedení rtuti ze všech specií na  $Hg^{2+}$ , v roztoku 10 % (v/v) HCl. Závislost absorbance byla proměřena v rozmezí koncentrací od 0 % (m/v) do 1 % (m/v)  $K_2S_2O_8$  a je vidět na Obr. 4.1. Na základě této závislosti byla zvolena optimální koncentrace 0,3 % (m/v), která byla používána pro všechna další měření. Tato hodnota byla zvolena jako kompromis, jelikož se koncentrace  $K_2S_2O_8$  odpovídající maximální absorbanci pro jednotlivé specie lišila. Nejvíce byla zohledněna fenylrtuť z důvodu nízké citlivosti stanovení  $PhHg^+$ , jelikož z daných specií má největší retenční čas a dochází u ní k největšímu rozmytí zóny analytu.

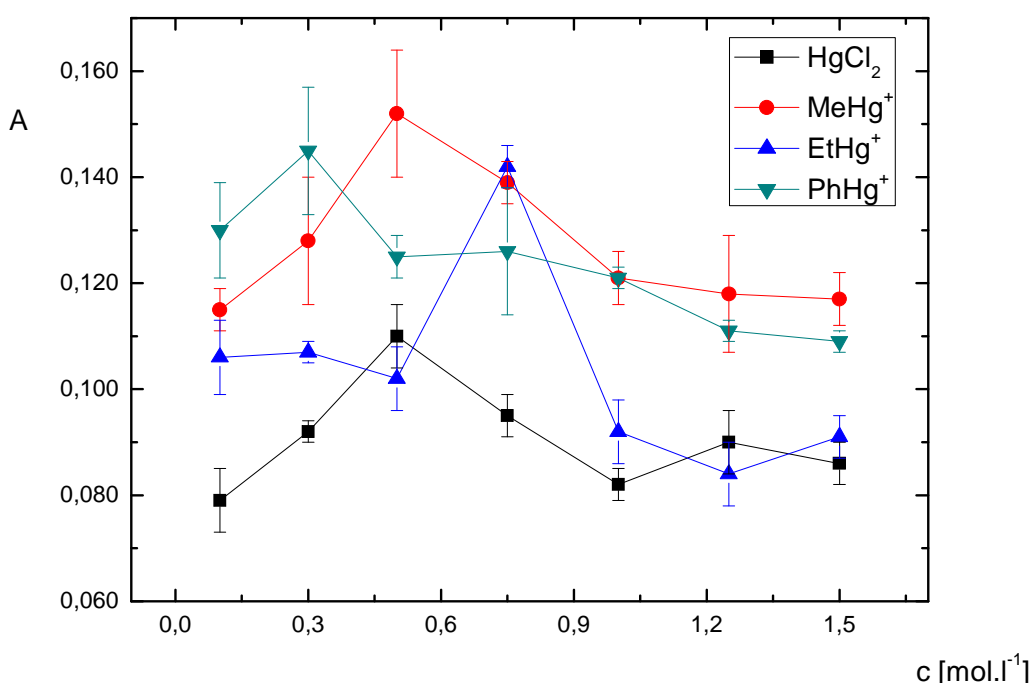


**Obr. 4.1.** Závislost absorbance na koncentraci  $K_2S_2O_8$

$v (Ar) = 60,0 \text{ ml.min}^{-1}$ ,  $v (MF) = 0,5 \text{ ml.min}^{-1}$ ,  $c (C_2H_5OH) = 40 \% (v/v)$ ,  
 $c (CH_3COONH_4) = 20 \text{ mmol.l}^{-1}$ ,  $c (C_2H_6OS) = 0,1 \% (v/v)$ ,  $v (HCl) = 1,5 \text{ ml.min}^{-1}$ ,  
 $c (HCl) = 0,5 \text{ mol.l}^{-1}$ ,  $v (NaBH_4) = 0,6 \text{ ml.min}^{-1}$ ,  $c (NaBH_4) = 1 \% (m/v)$ ,  
 $v (K_2S_2O_8) = 1,4 \text{ ml.min}^{-1}$ ,  $t = 31,9 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $V (\text{dávka. smyčky}) = 100 \text{ }\mu\text{l}$ ,  $c (HgCl_2) = 1 \text{ ppm}$ ,  
 $c (MeHg^+) = 1 \text{ ppm}$ ,  $c (EtHg^+) = 1 \text{ ppm}$ ,  $c (PhHg^+) = 1 \text{ ppm}$

#### 4.1.2. Koncentrace HCl

Dalším optimalizovaným parametrem byla koncentrace HCl v rozmezí od  $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$  do  $1,5 \text{ mol.l}^{-1}$ . Závislost absorbance na tomto parametru je uvedena na Obr. 4.2. Z této závislosti je patrné, že nejvyšší absorbance bylo dosaženo pro  $\text{HgCl}_2$  a  $\text{MeHg}^+$  při koncentraci  $0,5 \text{ mol.l}^{-1}$ , pro  $\text{EtHg}^+$  při koncentraci  $0,75 \text{ mol.l}^{-1}$  a pro  $\text{PhHg}^+$  při koncentraci  $0,3 \text{ mol.l}^{-1}$ . Jelikož nebyla koncentrace HCl, při které bylo dosaženo maximální absorbance Hg, pro všechny specie jednotná, bylo potřeba zvolit kompromisní hodnotu. Pro další měření byla zvolena koncentrace  $0,5 \text{ mol.l}^{-1}$ , při které dosahují nejvyšší absorbance specie, které se nejčastěji vyskytují ve vodách.

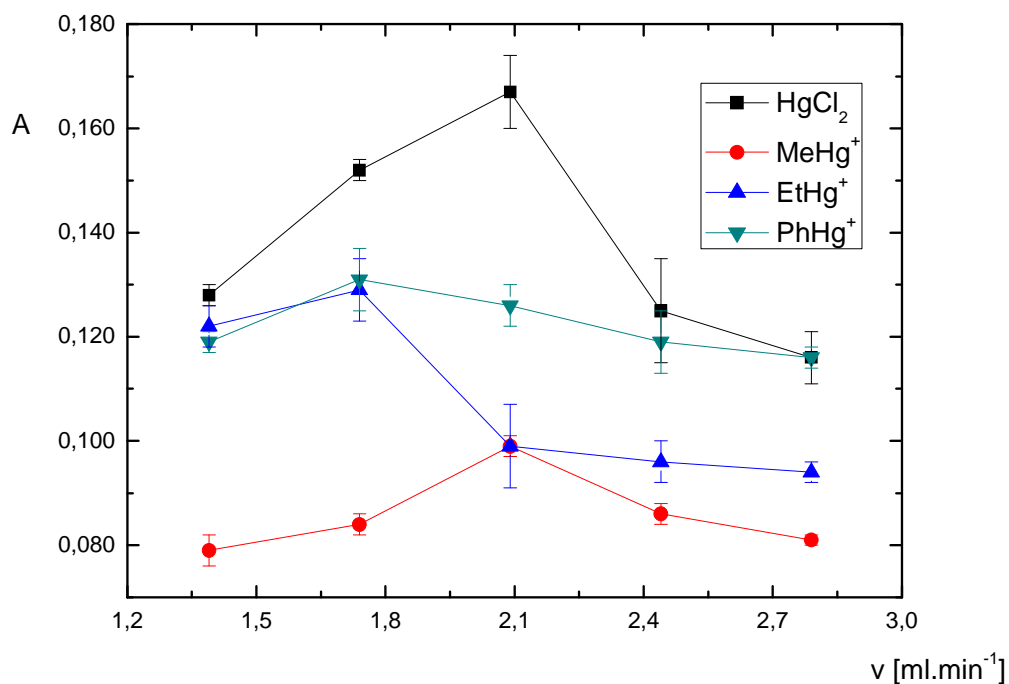


**Obr. 4.2.** Závislost absorbance na koncentraci HCl

$v(\text{Ar}) = 60,0 \text{ ml.min}^{-1}$ ,  $v(\text{MF}) = 0,5 \text{ ml.min}^{-1}$ ,  $c(\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}) = 40 \% (\text{v/v})$ ,  
 $c(\text{CH}_3\text{COONH}_4) = 20 \text{ mmol.l}^{-1}$ ,  $c(\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}) = 0,1 \% (\text{v/v})$ ,  $v(\text{HCl}) = 1,5 \text{ ml.min}^{-1}$ ,  
 $c(\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8) = 3 \% (\text{m/v})$ ,  $v(\text{NaBH}_4) = 0,6 \text{ ml.min}^{-1}$ ,  $c(\text{NaBH}_4) = 1 \% (\text{m/v})$ ,  
 $v(\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8) = 1,4 \text{ ml.min}^{-1}$ ,  $t = 31,9 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $V(\text{dávka. smyčky}) = 100 \text{ } \mu\text{l}$ ,  $c(\text{HgCl}_2) = 200 \text{ ppb}$ ,  
 $c(\text{MeHg}^+) = 200 \text{ ppb}$ ,  $c(\text{EtHg}^+) = 200 \text{ ppb}$ ,  $c(\text{PhHg}^+) = 200 \text{ ppb}$

#### 4.1.3. Průtoková rychlost $K_2S_2O_8$ a $HCl$

Pro zjednodušení aparatury byla vyzkoušena možnost použití oxidačního činidla i  $HCl$  v jednom roztoku, tj. přidávání pouze jednoho roztoku do reakční směsi. Roztok 3 % (m/v)  $K_2S_2O_8$  v 10 %  $HCl$  (v/v) byl smíchán s  $0,5 \text{ mol.l}^{-1}$   $HCl$  a byla optimalizována průtoková rychlost tohoto nového roztoku. Průtoková rychlost byla testována v rozmezí od  $1,4 \text{ ml.min}^{-1}$  do  $2,8 \text{ ml.min}^{-1}$ . Závislost absorbance na průtokové rychlosti roztoku je vidět na Obr. 4.3. Z této závislosti je patrné, že maximální absorbance pro jednotlivé specie bylo dosaženo při různých průtokových rychlostech, proto bylo potřeba zvolit takovou průtokovou rychlost, která bude určitým kompromisem. Pro další měření byla zvolena průtoková rychlost  $2,1 \text{ ml.min}^{-1}$ , jelikož při tomto průtoku bylo dosaženo maximální absorbance rtuti pro  $HgCl_2$  a  $MeHg^+$ , které se nejčastěji vyskytují ve vodách.



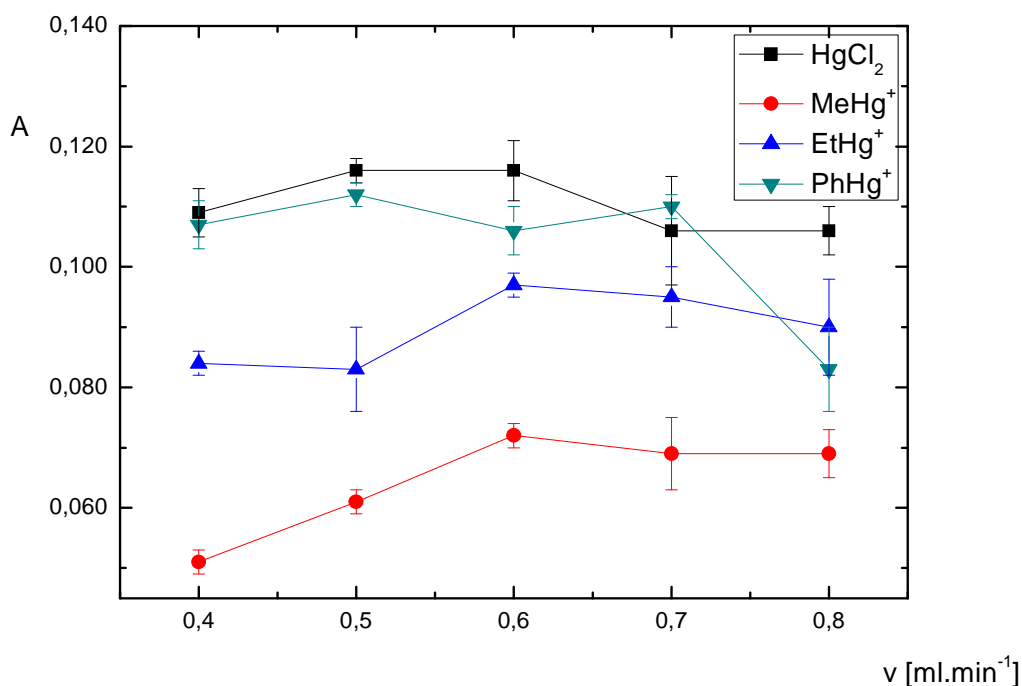
**Obr. 4.3.** Závislost absorbance na průtokové rychlosti společného roztoku  $K_2S_2O_8$  a  $HCl$

$$\begin{aligned}
 v(Ar) &= 60,0 \text{ ml.min}^{-1}, v(MF) = 0,5 \text{ ml.min}^{-1}, c(C_2H_5OH) = 40 \% (v/v), \\
 c(CH_3COONH_4) &= 20 \text{ mmol.l}^{-1}, c(C_2H_6OS) = 0,1 \% (v/v), c(K_2S_2O_8) = 3 \% (m/v), \\
 c(HCl) &= 0,5 \text{ mol.l}^{-1}, v(NaBH_4) = 0,6 \text{ ml.min}^{-1}, c(NaBH_4) = 1 \% (m/v), t = 31,9 \text{ }^\circ\text{C}, \\
 V(\text{dávky smyčky}) &= 100 \text{ } \mu\text{l}, c(HgCl_2) = 200 \text{ ppb}, c(MeHg^+) = 200 \text{ ppb}, \\
 c(EtHg^+) &= 200 \text{ ppb}, c(PhHg^+) = 200 \text{ ppb}
 \end{aligned}$$



#### 4.1.4. Průtoková rychlost $\text{NaBH}_4$

Následujícím optimalizovaným parametrem byla průtoková rychlost roztoku redukčního činidla ( $\text{NaBH}_4$ ), která byla testována v rozmezí od  $0,4 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$  do  $0,8 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ . Grafický záznam je na Obr. 4.4. Hodnota průtokové rychlosti zvolená pro další měření je kompromisem mezi hodnotami, při kterých bylo dosaženo maximální absorbance rtuti pro jednotlivé specie, jelikož se tyto průtokové rychlosti lišily. Byla zvolena průtoková rychlost  $0,6 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$  z důvodu, že při ní dosahuje maximální absorbance rtuti nejvíce specií, včetně  $\text{HgCl}_2$  a  $\text{MeHg}^+$ , které se nejčastěji vyskytují ve vodách.

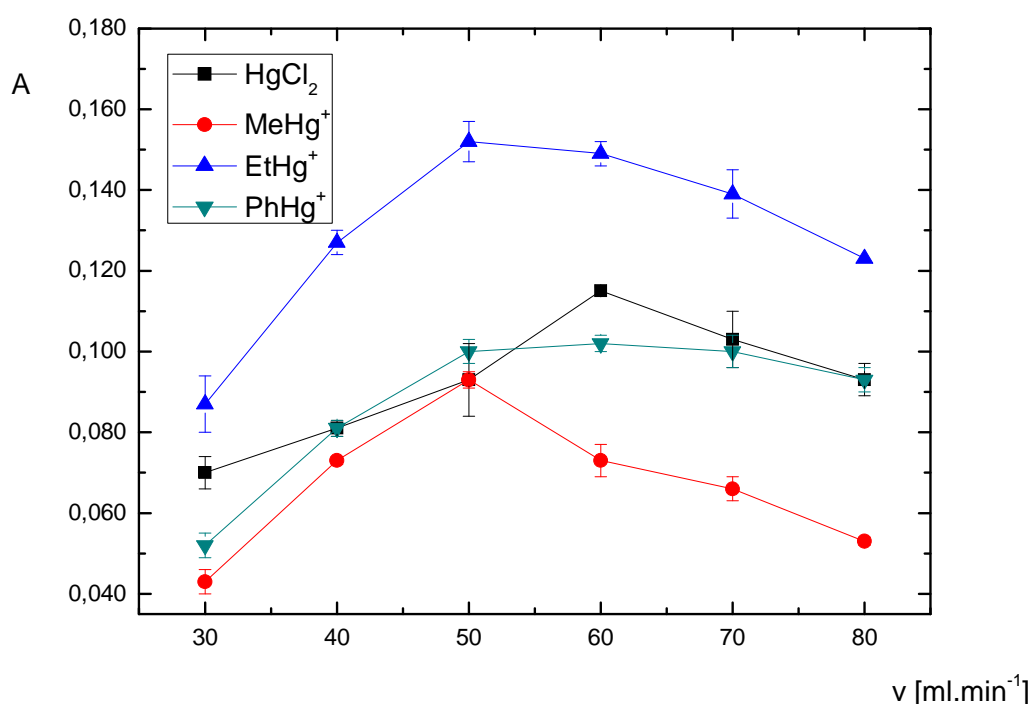


**Obr. 4.4.** Závislost absorbance na průtokové rychlosti  $\text{NaBH}_4$

$v$  (Ar) =  $60,0 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ ,  $v$  (MF) =  $0,5 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ ,  $c$  ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ ) = 40 % (v/v),  
 $c$  ( $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ ) =  $20 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $c$  ( $\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}$ ) = 0,1 % (v/v),  $c$  ( $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ ) = 3 % (m/v),  
 $c$  ( $\text{HCl}$ ) =  $0,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $v$  ( $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8 + \text{HCl}$ ) =  $2,1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ ,  $c$  ( $\text{NaBH}_4$ ) = 1 % (m/v),  
 $t = 31,9 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $V$  (dávka smyčky) =  $100 \mu\text{l}$ ,  $c$  ( $\text{HgCl}_2$ ) = 200 ppb,  $c$  ( $\text{MeHg}^+$ ) = 200 ppb,  
 $c$  ( $\text{EtHg}^+$ ) = 200 ppb,  $c$  ( $\text{PhHg}^+$ ) = 200 ppb

#### 4.1.5. Průtoková rychlost nosného plynu

V této diplomové práci byl jako nosný plyn využíván argon. Závislost absorbance rtuti na průtokové rychlosti nosného plynu byla proměřována v rozmezí od  $30 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$  do  $80 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ . Při nižší průtokové rychlosti docházelo k problémům díky nasávání kapaliny do transportního systému nosného plynu. Závislost absorbance na průtokové rychlosti argonu je znázorněna na Obr. 4.5. Pro další měření byla zvolena hodnota  $60 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ . Tato hodnota byla zvolena tak, aby bylo dosaženo určitého kompromisu mezi opakovatelností a citlivostí stanovení jednotlivých specií rtuti.

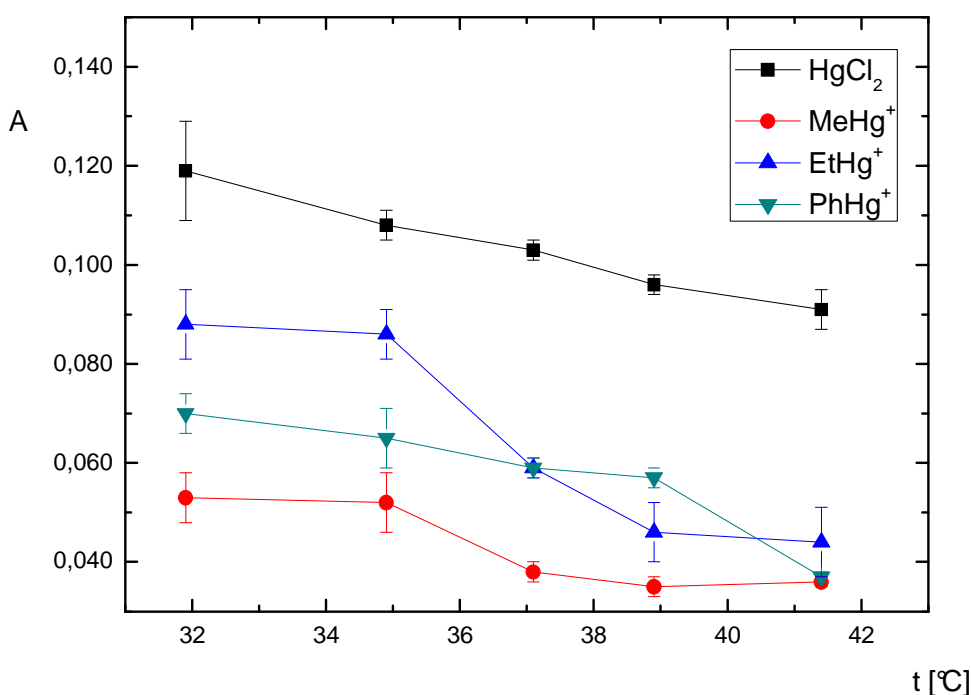


**Obr. 4.5.** Závislost absorbance na průtokové rychlosti nosného plynu

$v(\text{NaBH}_4) = 0,6 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ ,  $v(\text{MF}) = 0,5 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ ,  $c(\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}) = 40 \% (\text{v/v})$ ,  
 $c(\text{CH}_3\text{COONH}_4) = 20 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $c(\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}) = 0,1 \% (\text{v/v})$ ,  $c(\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8) = 3 \% (\text{m/v})$ ,  
 $c(\text{HCl}) = 0,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $v(\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8 + \text{HCl}) = 2,1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ ,  $c(\text{NaBH}_4) = 1 \% (\text{m/v})$ ,  
 $t = 31,9 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $V(\text{dávka smyčky}) = 100 \text{ }\mu\text{l}$ ,  $c(\text{HgCl}_2) = 200 \text{ ppb}$ ,  $c(\text{MeHg}^+) = 200 \text{ ppb}$ ,  
 $c(\text{EtHg}^+) = 200 \text{ ppb}$ ,  $c(\text{PhHg}^+) = 200 \text{ ppb}$

#### 4.1.6. Teplota vyhřívání

Posledním testovaným parametrem chemického generování studené páry rtuti byla teplota, na kterou bylo vyhříváno přívodní rameno detekční trubice. Důvodem vyhřívání je zamezení kondenzace vodní páry na vnitřním povrchu detekční trubice, v důsledku toho pak dochází ke ztrátám páry rtuti a signálu. Tento parametr byl proměřován v rozmezí od 31,9 °C do 41,4 °C pomocí termočlánku umístěného v přívodním rameni detekční trubice. Pro další měření byla použita teplota 37,1 °C, jelikož bylo při této teplotě dosaženo nejlepší opakovatelnosti a nízké variability jednotlivých měření. Graf závislosti je na Obr. 4.6.



**Obr. 4.6.** Závislost absorpance na teplotě vyhřívání přívodního ramene detekční trubice

$$\begin{aligned}
 &v(\text{Ar}) = 60,0 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}, v(\text{NaBH}_4) = 0,6 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}, v(\text{MF}) = 0,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}, \\
 &c(\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}) = 40 \% (\text{v/v}), c(\text{CH}_3\text{COONH}_4) = 20 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}, c(\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}) = 0,1 \% (\text{v/v}), \\
 &c(\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8) = 3 \% (\text{m/v}), c(\text{HCl}) = 0,5 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}, v(\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8 + \text{HCl}) = 2,1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}, \\
 &c(\text{NaBH}_4) = 1 \% (\text{m/v}), V(\text{dávky smyčky}) = 100 \mu\text{l}, c(\text{HgCl}_2) = 200 \text{ ppb}, \\
 &c(\text{MeHg}^+) = 200 \text{ ppb}, c(\text{EtHg}^+) = 200 \text{ ppb}, c(\text{PhHg}^+) = 200 \text{ ppb}
 \end{aligned}$$

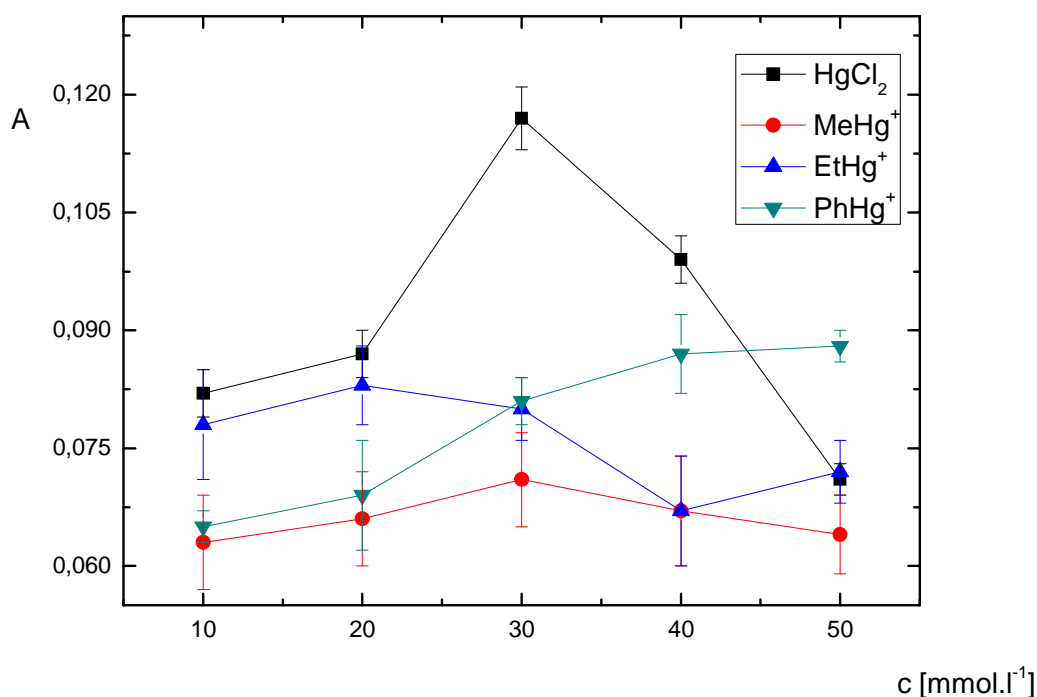
## 4.2. Optimalizace složení mobilní fáze

Dalším důležitým optimalizovaným parametrem bylo složení mobilní fáze. V této diplomové práci byl proměřován vliv složení a pH mobilní fáze na analytický signál.

Prvotní podmínky vycházely ze složení mobilní fáze optimální pro UV - fotochemické generování studené páry rtuti zjištěné v diplomové práci Mgr. Ondřeje Linharta. Mobilní fáze byla tvořena vodným pufrům octanu amonného a kyseliny octové o koncentraci octanového aniontu  $20 \text{ mmol.l}^{-1}$  a pH 6, ethanolem 40 % (v/v) a 0,1 % (v/v) 2-merkaptoethanolem. Následující pokusy ukázaly, že toto složení není pro chemické generování studené páry rtuti nejvhodnější.

#### 4.2.1. Koncentrace pufru tvořeného kyselinou octovou a octanem amonným

Vliv koncentrace pufru kyseliny octové a octanu amonného na velikost analytického signálu byl proměřován v rozmezí od 10 mmol.l<sup>-1</sup> do 50 mmol.l<sup>-1</sup>. Závislost absorbance na koncentraci octanového aniontu je zobrazena na Obr. 4.7. Z této závislosti je patrné, že nejvyššího signálu bylo pro většinu specií Hg dosaženo při koncentraci 30 mmol.l<sup>-1</sup>. Pouze signál vzorku obsahující PhHg<sup>+</sup> se vzrůstající koncentrací rosti v celém rozsahu koncentrací. Pro další měření byla použita koncentrace octanu amonného 30 mmol.l<sup>-1</sup>.



**Obr. 4.7.** Závislost absorbance na koncentraci octanového aniontu v pufru z octanu amonného a kyseliny octové

$$v (Ar) = 60,0 \text{ ml.min}^{-1}, v (NaBH_4) = 0,6 \text{ ml.min}^{-1}, v (MF) = 0,5 \text{ ml.min}^{-1},$$

$$c (C_2H_5OH) = 40 \% (v/v), t = 37,1 \text{ } ^\circ\text{C}, c (C_2H_6OS) = 0,1 \% (v/v),$$

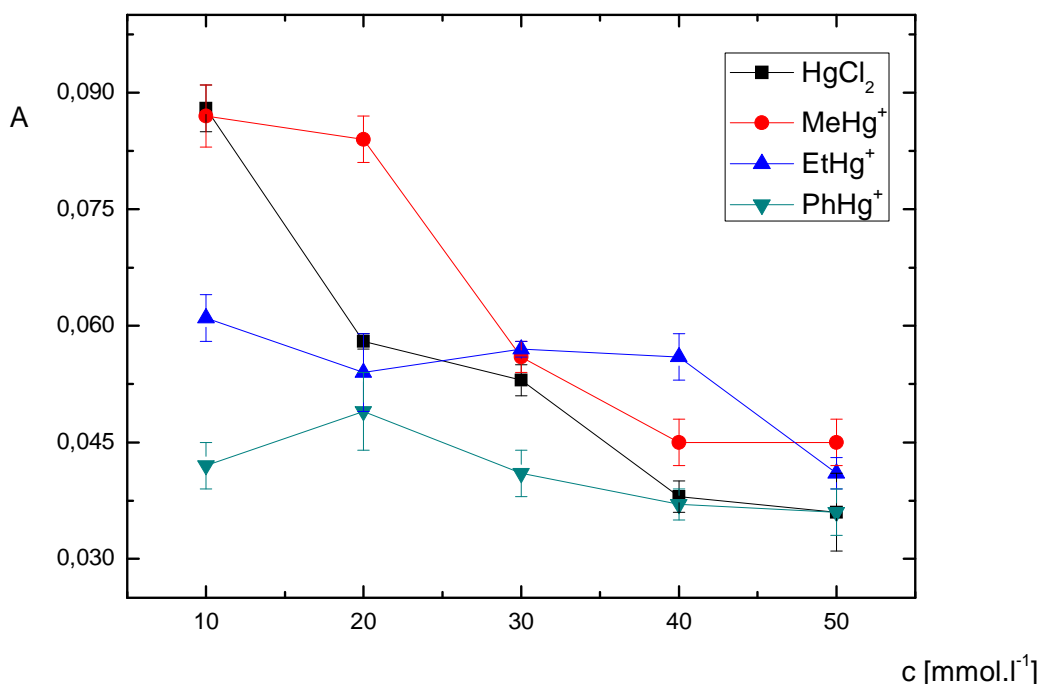
$$c (K_2S_2O_8) = 3 \% (m/v), c (HCl) = 0,5 \text{ mol.l}^{-1}, v (K_2S_2O_8 + HCl) = 2,1 \text{ ml.min}^{-1},$$

$$c (NaBH_4) = 1 \% (m/v), V (\text{dávka. smyčky}) = 100 \text{ } \mu\text{l}, c (HgCl_2) = 200 \text{ ppb},$$

$$c (MeHg^+) = 200 \text{ ppb}, c (EtHg^+) = 200 \text{ ppb}, c (PhHg^+) = 200 \text{ ppb}$$

#### 4.2.2. Koncentrace pufru tvořeného kyselinou octovou a octanem sodným

Druhý testovaný pufr byl tvořen kyselinou octovou a octanem sodným. Tento pufr byl testován v rozmezí od  $10 \text{ mmol.l}^{-1}$  do  $50 \text{ mmol.l}^{-1}$  a závislost naměřeného signálu na koncentraci octanového aniontu je na Obr. 4.8. Z tohoto grafu je patrné, že bylo v porovnání s pufrům obsahujícím octan amonný dosahováno pro stejné koncentrace nižšího signálu. Proto nebyl pufr obsahující octan sodný nadále používán a následné experimenty byly prováděny pouze s pufrům obsahujícím octan amonný.

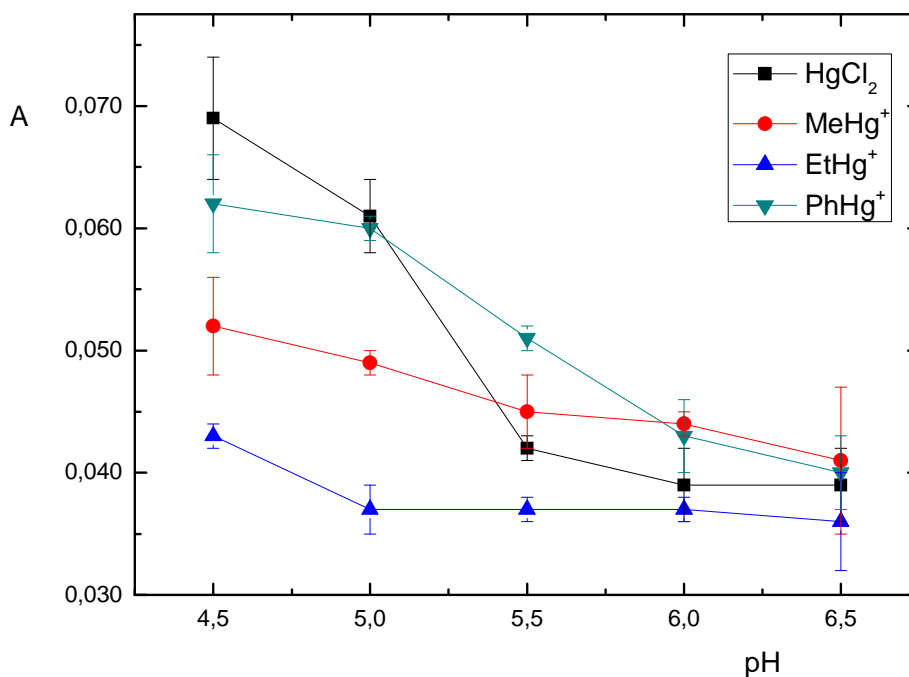


**Obr. 4.8.** Závislost absorbance na koncentraci octanového aniontu v pufru z octanu sodného a kyseliny octové

$$\begin{aligned}
 v(Ar) &= 60,0 \text{ ml.min}^{-1}, v(NaBH_4) = 0,6 \text{ ml.min}^{-1}, v(MF) = 0,5 \text{ ml.min}^{-1}, \\
 c(C_2H_5OH) &= 40 \% (v/v), t = 37,1 \text{ }^\circ\text{C}, c(C_2H_6OS) = 0,1 \% (v/v), \\
 c(K_2S_2O_8) &= 3 \% (m/v), c(HCl) = 0,5 \text{ mol.l}^{-1}, v(K_2S_2O_8 + HCl) = 2,1 \text{ ml.min}^{-1}, \\
 c(NaBH_4) &= 1 \% (m/v), V(\text{dávka smyčky}) = 100 \text{ }\mu\text{l}, c(HgCl_2) = 200 \text{ ppb}, \\
 c(MeHg^+) &= 200 \text{ ppb}, c(EtHg^+) = 200 \text{ ppb}, c(PhHg^+) = 200 \text{ ppb}
 \end{aligned}$$

### 4.2.3. pH pufru

Dalším parametrem ovlivňujícím účinnost chemického generování studené páry rtuti bylo pH roztoku pufru testované v rozmezí od 4,5 do 6,5. Tento rozsah byl zvolen proto, aby nedošlo k překročení hranic pH roztoku, který může být čerpán do separační kolony. Získaná závislost je zobrazena na Obr. 4.9. Nejvyššího signálu bylo dosaženo při pH 4,5 a tato hodnota byla použita pro další měření.

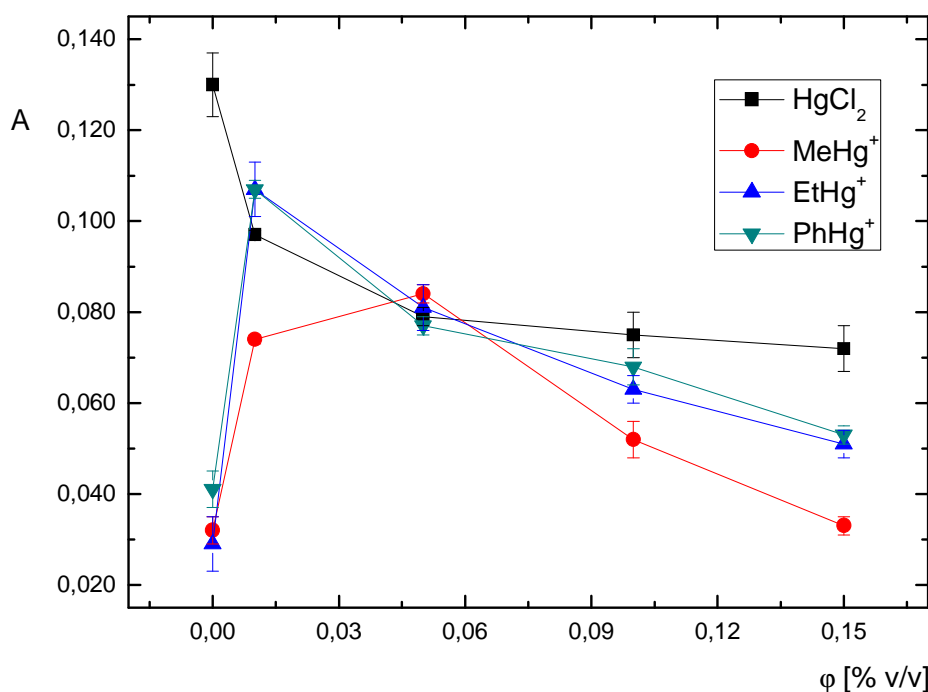


**Obr 4.9.** Závislost absorbance na pH pufru

$v(Ar) = 60,0 \text{ ml.min}^{-1}$ ,  $v(NaBH_4) = 0,6 \text{ ml.min}^{-1}$ ,  $v(MF) = 0,5 \text{ ml.min}^{-1}$ ,  
 $c(C_2H_5OH) = 40 \%$  (v/v),  $c(CH_3COONH_4) = 30 \text{ mmol.l}^{-1}$ ,  $t = 37,1 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  
 $c(C_2H_6OS) = 0,1 \%$  (v/v),  $c(K_2S_2O_8) = 3 \%$  (m/v),  $c(HCl) = 0,5 \text{ mol.l}^{-1}$ ,  
 $v(K_2S_2O_8 + HCl) = 2,1 \text{ ml.min}^{-1}$ ,  $c(NaBH_4) = 1 \%$  (m/v),  $V(\text{dávka smyčky}) = 100 \text{ }\mu\text{l}$ ,  
 $c(HgCl_2) = 200 \text{ ppb}$ ,  $c(MeHg^+) = 200 \text{ ppb}$ ,  $c(EtHg^+) = 200 \text{ ppb}$ ,  
 $c(PhHg^+) = 200 \text{ ppb}$

#### 4.2.4. Koncentrace 2-merkptoethanolu

Dalším důležitým parametrem ovlivňujícím generování studené páry rtuti je koncentrace komplexotvorného činidla. Vliv koncentrace 2-merkptoethanolu byl testován pro všechny 4 specie v rozmezí koncentrací od 0 % (v/v) do 0,15 % (v/v). Jak je patrné ze závislosti na Obr. 4.10., nejvhodnější je koncentrace 0,01 % (v/v). Tato koncentrace byla zvolena jako kompromis, protože při nulovém přídavku komplexotvorného činidla došlo k výraznému poklesu signálu u organortuťných sloučenin.

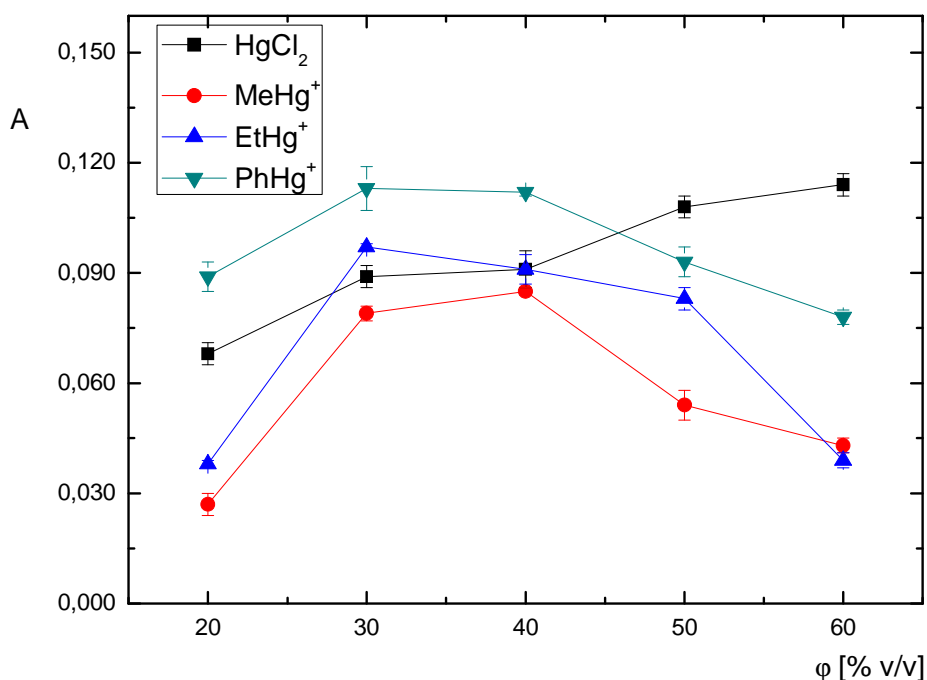


**Obr 4.10.** Závislost absorbance na koncentraci 2-merkptoethanolu  
 $v(Ar) = 60,0 \text{ ml.min}^{-1}$ ,  $v(NaBH_4) = 0,6 \text{ ml.min}^{-1}$ ,  $v(MF) = 0,5 \text{ ml.min}^{-1}$ ,  
 $c(C_2H_5OH) = 40 \text{ \% (v/v)}$ ,  $c(CH_3COONH_4) = 30 \text{ mmol.l}^{-1}$ ,  $t = 37,1 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  
 $c(K_2S_2O_8) = 3 \text{ \% (m/v)}$ ,  $c(HCl) = 0,5 \text{ mol.l}^{-1}$ ,  $v(K_2S_2O_8 + HCl) = 2,1 \text{ ml.min}^{-1}$ ,  
 $c(NaBH_4) = 1 \text{ \% (m/v)}$ ,  $V(\text{dávka smyčky}) = 100 \text{ }\mu\text{l}$ ,  $c(HgCl_2) = 200 \text{ ppb}$ ,  
 $c(MeHg^+) = 200 \text{ ppb}$ ,  $c(EtHg^+) = 200 \text{ ppb}$ ,  $c(PhHg^+) = 200 \text{ ppb}$



#### 4.2.5. Koncentrace ethanolu

Druh organické fáze přidávané do mobilní fáze má velký vliv na získaný analytický signál. V této diplomové práci byla testována mobilní fáze s přidavkem ethanolu, acetonitrilu a methanolu. Nejprve byly prováděny pokusy s mobilní fází obsahující ethanol v rozmezí koncentrací od 20 % (v/v) do 60 % (v/v). Při nízkých koncentracích ethanolu docházelo ke snížení odezvy detektoru a naopak pro koncentrace vyšší než 60 % (v/v) nebyla měření prováděna z důvodu vysoké viskozity mobilní fáze. Ze závislosti na Obr. 4.11. je patrné, že nejvhodnější koncentrací pro všechny specie rtuti je koncentrace 40 % (v/v).



**Obr 4.11.** Závislost absorbance na koncentraci ethanolu

$v (Ar) = 60,0 \text{ ml.min}^{-1}$ ,  $v (NaBH_4) = 0,6 \text{ ml.min}^{-1}$ ,  $v (MF) = 0,5 \text{ ml.min}^{-1}$ ,  $t = 37,1 \text{ }^\circ\text{C}$ ,

$c (CH_3COONH_4) = 30 \text{ mmol.l}^{-1}$ ,  $c (C_2H_6OS) = 0,1 \text{ } \%$  (v/v),  $c (K_2S_2O_8) = 3 \text{ } \%$  (m/v),

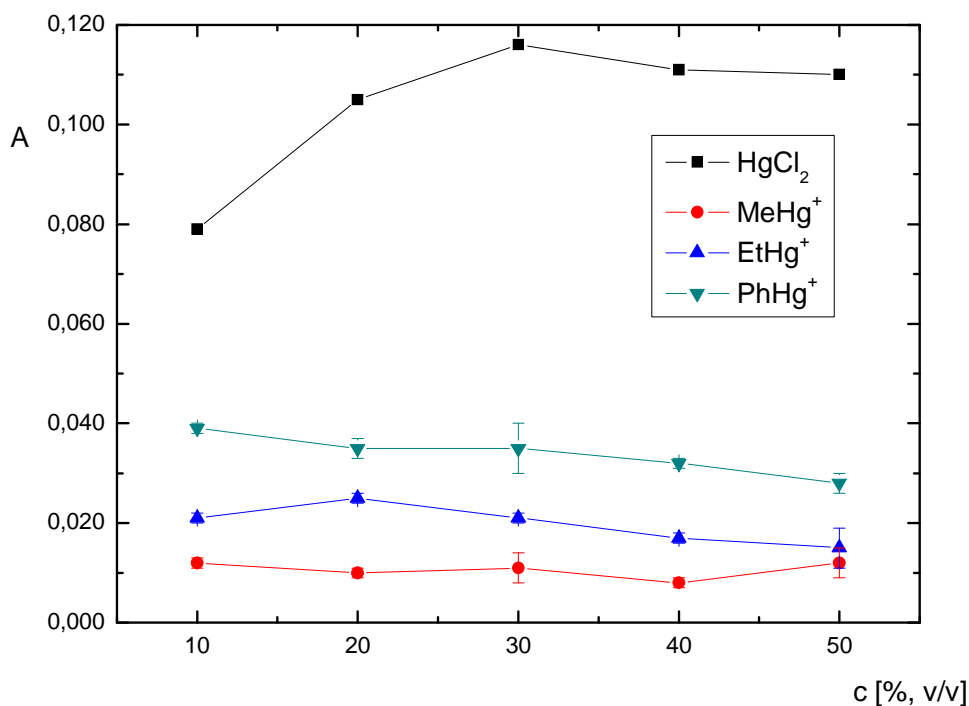
$c (HCl) = 0,5 \text{ mol.l}^{-1}$ ,  $v (K_2S_2O_8 + HCl) = 2,1 \text{ ml.min}^{-1}$ ,  $c (NaBH_4) = 1 \text{ } \%$  (m/v),

$V (\text{dávky smyčky}) = 100 \text{ } \mu\text{l}$ ,  $c (HgCl_2) = 200 \text{ ppb}$ ,  $c (MeHg^+) = 200 \text{ ppb}$ ,

$c (EtHg^+) = 200 \text{ ppb}$ ,  $c (PhHg^+) = 200 \text{ ppb}$

#### 4.2.6. Koncentrace acetonitrilu

Druhým testovaným druhem organické složky přidávané do mobilní fáze byl acetonitril v rozsahu koncentrací od 10 % (v/v) do 50 % (v/v). Z grafu na Obr. 4.12. je zřejmé, že acetonitril není vhodnou organickou složkou mobilní fáze pro chemické generování studené páry rtuti. Pro organortuťné sloučeniny je tento druh rozpouštědla nevhodný, jelikož dochází k výraznému poklesu signálu. Acetonitril proto nebyl nadále používán pro další měření.



**Obr 4.12.** Závislost absorbance na koncentraci acetonitrilu

$v (Ar) = 60,0 \text{ ml.min}^{-1}$ ,  $v (NaBH_4) = 0,6 \text{ ml.min}^{-1}$ ,  $v (MF) = 0,5 \text{ ml.min}^{-1}$ ,  $t = 37,1 \text{ }^\circ\text{C}$ ,

$c (CH_3COONH_4) = 30 \text{ mmol.l}^{-1}$ ,  $c (C_2H_6OS) = 0,1 \text{ } \%$  (v/v),  $c (K_2S_2O_8) = 3 \text{ } \%$  (m/v),

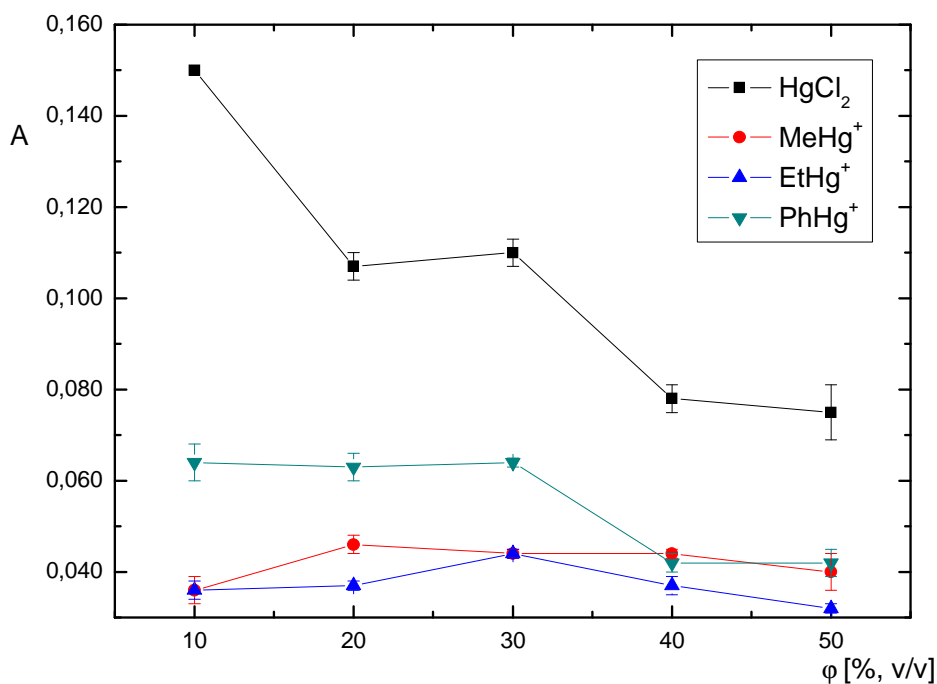
$c (HCl) = 0,5 \text{ mol.l}^{-1}$ ,  $v (K_2S_2O_8 + HCl) = 2,1 \text{ ml.min}^{-1}$ ,  $c (NaBH_4) = 1 \text{ } \%$  (m/v),

$V (\text{dávka smyčky}) = 100 \text{ } \mu\text{l}$ ,  $c (HgCl_2) = 200 \text{ ppb}$ ,  $c (MeHg^+) = 200 \text{ ppb}$ ,

$c (EtHg^+) = 200 \text{ ppb}$ ,  $c (PhHg^+) = 200 \text{ ppb}$

#### 4.2.7. Koncentrace methanolu

Na závěr byly provedeny pokusy s přidavkem methanolu, jako organické složky mobilní fáze. Mobilní fáze byla připravena s koncentrací methanolu od 10 % (v/v) do 50 % (v/v). Z grafické závislosti na Obr. 4.13. je patrné, že přidavek methanolu do mobilní fáze způsobuje výrazný pokles odezvy detektoru pro organortuťné sloučeniny, proto ani methanol nebyl pro další měření používán a jako nejvhodnější rozpouštědlo byl zvolen ethanol.



**Obr 4.12.** Závislost absorpance na koncentraci methanolu

$v(Ar) = 60,0 \text{ ml.min}^{-1}$ ,  $v(NaBH_4) = 0,6 \text{ ml.min}^{-1}$ ,  $v(MF) = 0,5 \text{ ml.min}^{-1}$ ,  $t = 37,1 \text{ }^\circ\text{C}$ ,

$c(CH_3COONH_4) = 30 \text{ mmol.l}^{-1}$ ,  $c(C_2H_6OS) = 0,1 \text{ } \%$  (v/v),  $c(K_2S_2O_8) = 3 \text{ } \%$  (m/v),

$c(HCl) = 0,5 \text{ mol.l}^{-1}$ ,  $v(K_2S_2O_8 + HCl) = 2,1 \text{ ml.min}^{-1}$ ,  $c(NaBH_4) = 1 \text{ } \%$  (m/v),

$V(\text{dávky smyčky}) = 100 \text{ } \mu\text{l}$ ,  $c(HgCl_2) = 200 \text{ ppb}$ ,  $c(MeHg^+) = 200 \text{ ppb}$ ,

$c(EtHg^+) = 200 \text{ ppb}$ ,  $c(PhHg^+) = 200 \text{ ppb}$

#### 4.2.8. Optimální podmínky pro chemické generování studené páry rtuti

Nalezené optimální podmínky pro chemické generování studené páry rtuti jsou shrnuty v Tab. 4.1.

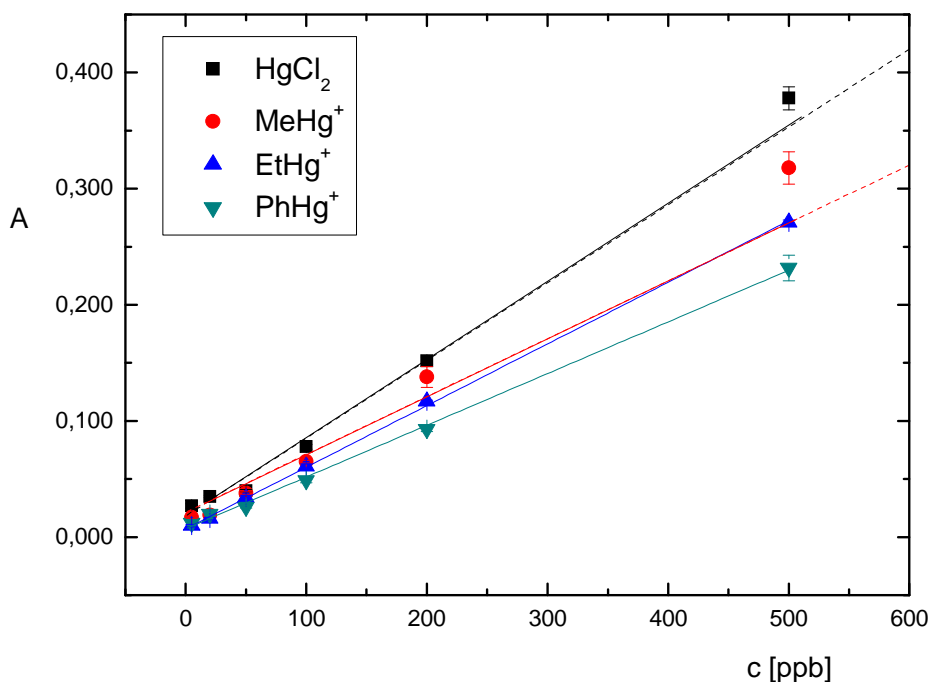
**Tab. 4.1.** Optimální podmínky pro CVG - QTAAS zjištěné v prostředí mobilní fáze

Parametr	Hodnota
Koncentrace $K_2S_2O_8$ [%, m/v]	3
Koncentrace HCl [ $mol.l^{-1}$ ]	0,5
Průtoková rychlost $K_2S_2O_8 + HCl$ [ $ml.min^{-1}$ ]	2,1
Průtoková rychlost roztoku $NaBH_4$ [ $ml.min^{-1}$ ]	0,6
Koncentrace roztoku $NaBH_4$ [%, m/v]	1
Průtoková rychlost argonu [ $ml.min^{-1}$ ]	60
Teplota vyhřívání přívodního ramene detekční trubice [ $^{\circ}C$ ]	37,1
Koncentrace ethanolu [%, v/v]	40
Složení pufru $CH_3COOH/CH_3COONH_4$ [ $mmol.l^{-1}$ ]	30/30
pH pufru	4,5
Koncentrace 2-merkptoethanolu [%, v/v]	0,01
Průtoková rychlost mobilní fáze [ $ml.min^{-1}$ ]	0,5

#### 4.3. Kalibrace za podmínek optimálních pro chemické generování studené páry rtuti v režimu průtokové injekční analýzy vyhodnocené z výšky a plochy FIA - píku

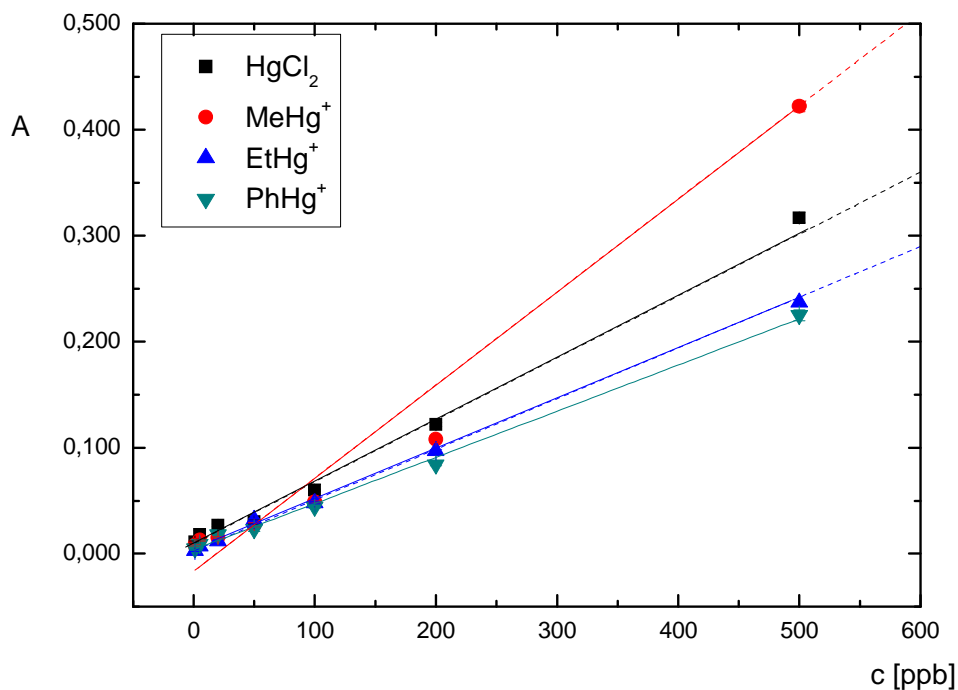
Po optimalizaci chemického generování bylo přistoupeno k proměření kalibračních závislostí pro jednotlivé specie v aparatuře neobsahující zapojenou kolonu. Z jednotlivých kalibračních závislostí byly zjištěny základní charakteristiky stanovení každé specie rtuti zvlášť za pomoci vyhodnocování výšky a plochy FIA - píku.

Kalibrační závislost pro jednotlivé specie rtuti byla proměřena v rozmezí od 1 ppb do 3000 ppb. Lineární části vyhodnocené z výšek pík jsou uvedeny na Obr. 4. 13. a lineární části vyhodnocené z ploch pík na Obr. 4.14.



**Obr 4.13.** Lineární část kalibrační závislosti pro stanovení vybraných specií rtuti vyhodnocená z výšky FIA - píku

$v(Ar) = 60,0 \text{ ml.min}^{-1}$ ,  $v(NaBH_4) = 0,6 \text{ ml.min}^{-1}$ ,  $v(MF) = 0,5 \text{ ml.min}^{-1}$ ,  $t = 37,1 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  
 $c(C_2H_5OH) = 40 \%$ ,  $c(CH_3COONH_4) = 30 \text{ mmol.l}^{-1}$ ,  $c(C_2H_6OS) = 0,1 \%$  (v/v),  
 $c(K_2S_2O_8) = 3 \%$  (m/v),  $c(HCl) = 0,5 \text{ mol.l}^{-1}$ ,  $v(K_2S_2O_8 + HCl) = 2,1 \text{ ml.min}^{-1}$ ,  
 $c(NaBH_4) = 1 \%$  (m/v),  $V(\text{dávky smyčky}) = 100 \mu\text{l}$



**Obr 4.14.** Lineární část kalibrační závislosti pro stanovení vybraných specií rtuti  
vyhodnocená z plochy FIA - píku

$$\begin{aligned}
 v(\text{Ar}) &= 60,0 \text{ ml.min}^{-1}, v(\text{NaBH}_4) = 0,6 \text{ ml.min}^{-1}, v(\text{MF}) = 0,5 \text{ ml.min}^{-1}, t = 37,1 \text{ }^\circ\text{C}, \\
 c(\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}) &= 40 \%, c(\text{CH}_3\text{COONH}_4) = 30 \text{ mmol.l}^{-1}, c(\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}) = 0,1 \ % \ (\text{v/v}), \\
 c(\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8) &= 3 \ % \ (\text{m/v}), c(\text{HCl}) = 0,5 \ \text{mol.l}^{-1}, v(\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8 + \text{HCl}) = 2,1 \ \text{ml.min}^{-1}, \\
 c(\text{NaBH}_4) &= 1 \ % \ (\text{m/v}), V(\text{dávka. smyčky}) = 100 \ \mu\text{l}
 \end{aligned}$$

Z jednotlivých kalibračních závislostí byly zjištěny základní charakteristiky stanovení pro jednotlivé specie rtuti, které jsou shrnuty v Tab. 4.2. Z uvedených kalibračních závislostí byly zjištěny meze detekce a meze stanovitelnosti. Nejnižší meze detekce a meze stanovitelnosti bylo dosaženo pro MeHg<sup>+</sup>. Naopak nejvyšší hodnoty byly získány pro PhHg<sup>+</sup>. Pro koncentraci 200 ppb byla také stanovena opakovatelnost vyjádřená jako RSD v procentech. Citlivost stanovení byla nejvyšší pro PhHg<sup>+</sup>.

**Tab. 4.2.** Základní charakteristiky vybraných specií rtuti metodou CVG - QTAAS

specie		HgCl <sub>2</sub>	MeHg <sup>+</sup>	EtHg <sup>+</sup>	PhHg <sup>+</sup>
Citlivost [ng.ml <sup>-1</sup> ]	plocha	0,00058	0,00088	0,00048	0,00044
	výška	0,00069	0,00050	0,00053	0,00045
LOD [ppb]	plocha	5	3	6	7
	výška	4	3	12	7
LOQ [ppb]	plocha	17	11	20	25
	výška	14	10	40	25
Opakovatelnost [%]	plocha	5,0	16,2	4,7	11,4
	výška	3,7	14,8	7,4	11,2
LDR [ppb]	plocha	17 - 1000	11 - 2000	20 - 1000	25 - 1000
	výška	14 - 1000	10 - 2000	40 - 500	25 - 1000
Korelační koeficient	plocha	0,9991	0,9965	0,9998	0,9984
	výška	0,9985	0,9943	0,9998	0,9992

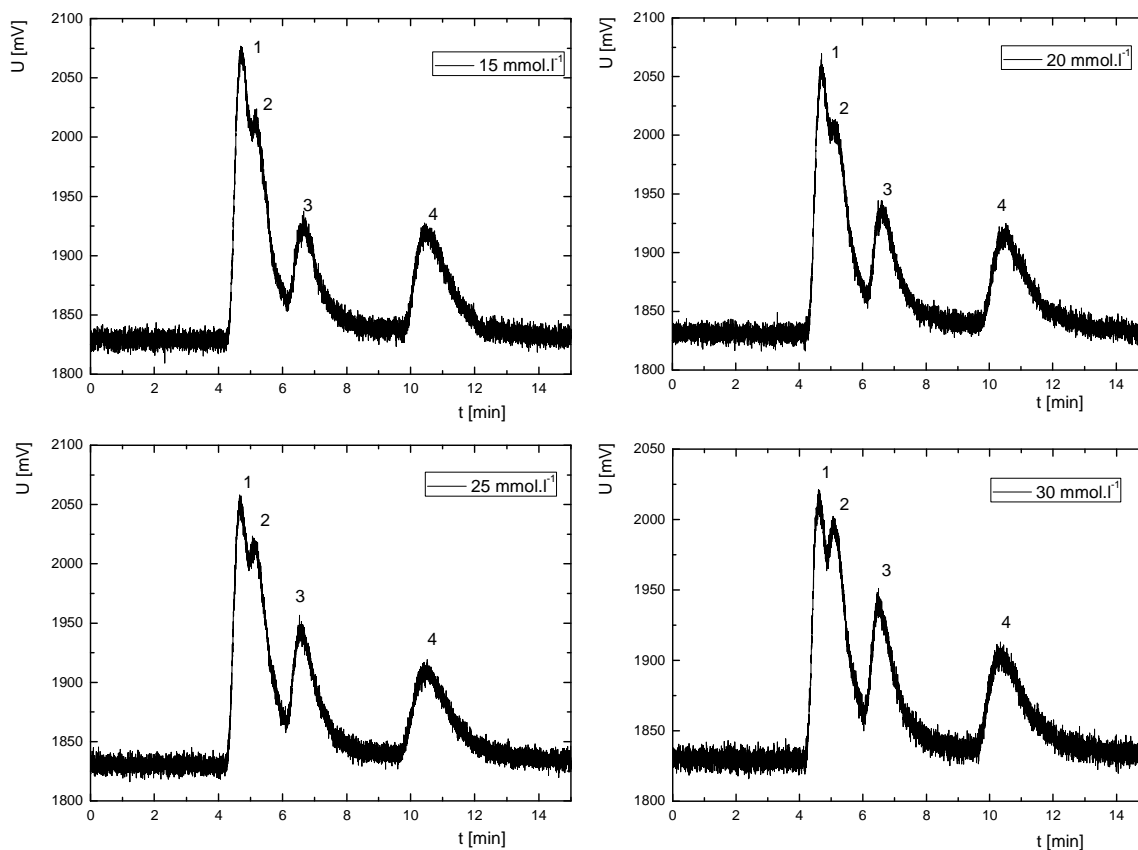
#### 4.4. Optimalizace separačního kroku

Po zjištění optimálních podmínek chemického generování studené pár rtuti a proměření jednotlivých základních analytických charakteristik bylo přistoupeno k zapojení HPLC kolony do aparatury a optimalizaci separačního kroku. Pro separaci jednotlivých specií rtuti byly v této diplomové práci použity separační kolony Gemini o různých rozměrech, obsahující reverzní fázi tvořenou částicemi C18 o rozměrech 3 μm.

Složení mobilní fáze vycházelo z optimalizace MF pro chemické generování. Tato MF byla nadále upravována tak, aby došlo k co nejlepšímu rozdělení jednotlivých specií. Testovanými parametry bylo složení pufru a jeho pH, koncentrace ethanolu, koncentrace 2-merkaptoethanolu, průtoková rychlost MF, průtoková rychlost nosného plynu a teplota vyhřívání kolony. Mobilní fáze a vzorky byly vždy ultrazvukovány po dobu 20 min, aby došlo k odstranění rozpuštěných plynů, které by mohly vést k zavzdušnění kolony. Z důvodu nedokonalého rozdělení Hg<sup>2+</sup> a MeHg<sup>+</sup> byly vyzkoušeny různé programy gradientu obsahu ethanolu v MF. Pro zlepšení separace byly vyzkoušeny kolony o různých rozměrech. Výchozí separační kolonou byla kolona Gemini (3μm, 150 x 2,4 mm). Pro optimalizaci separace byly využívány čtyři specie rtuti, anorganické ionty Hg<sup>2+</sup> a organokovové sloučeniny MeHg<sup>+</sup>, EtHg<sup>+</sup> a PhHg<sup>+</sup>. K záznamu signálu z AAS byl využíván univerzální chromatografický interface (UCI).

#### 4.4.1. Koncentrace pufru

Prvním optimalizovaným parametrem byla koncentrace pufru tvořeného octanem amonným a kyselinou octovou v MF. Vliv koncentrace tohoto pufru v MF byl zkoumán v rozmezí koncentrací od 15 mmol.l<sup>-1</sup> do 30 mmol.l<sup>-1</sup>. Grafy pro jednotlivé koncentrace jsou uvedeny na Obr. 4.15.



**Obr. 4.15.** Vliv koncentrace octanového pufru na separaci Hg<sup>2+</sup>, MeHg<sup>+</sup>, EtHg<sup>+</sup>, PhHg<sup>+</sup>

$v(Ar) = 60,0 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ ,  $v(\text{NaBH}_4) = 0,6 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ ,  $v(MF) = 0,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ ,  $t = 37,1 \text{ }^\circ\text{C}$ ,

$c(\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}) = 40 \%$ ,  $c(\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}) = 0,1 \%$  (v/v),  $c(\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8) = 3 \%$  (m/v),

$c(\text{HCl}) = 0,5 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ,  $v(\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8 + \text{HCl}) = 2,1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ ,  $t(\text{kolony}) = 40 \text{ }^\circ\text{C}$ ,

$c(\text{NaBH}_4) = 1 \%$  (m/v),  $V(\text{dávky smyčky}) = 100 \text{ } \mu\text{l}$ ,  $c(\text{HgCl}_2) = 200 \text{ ppb}$ ,

$c(\text{MeHg}^+) = 200 \text{ ppb}$ ,  $c(\text{EtHg}^+) = 200 \text{ ppb}$ ,  $c(\text{PhHg}^+) = 200 \text{ ppb}$ ,

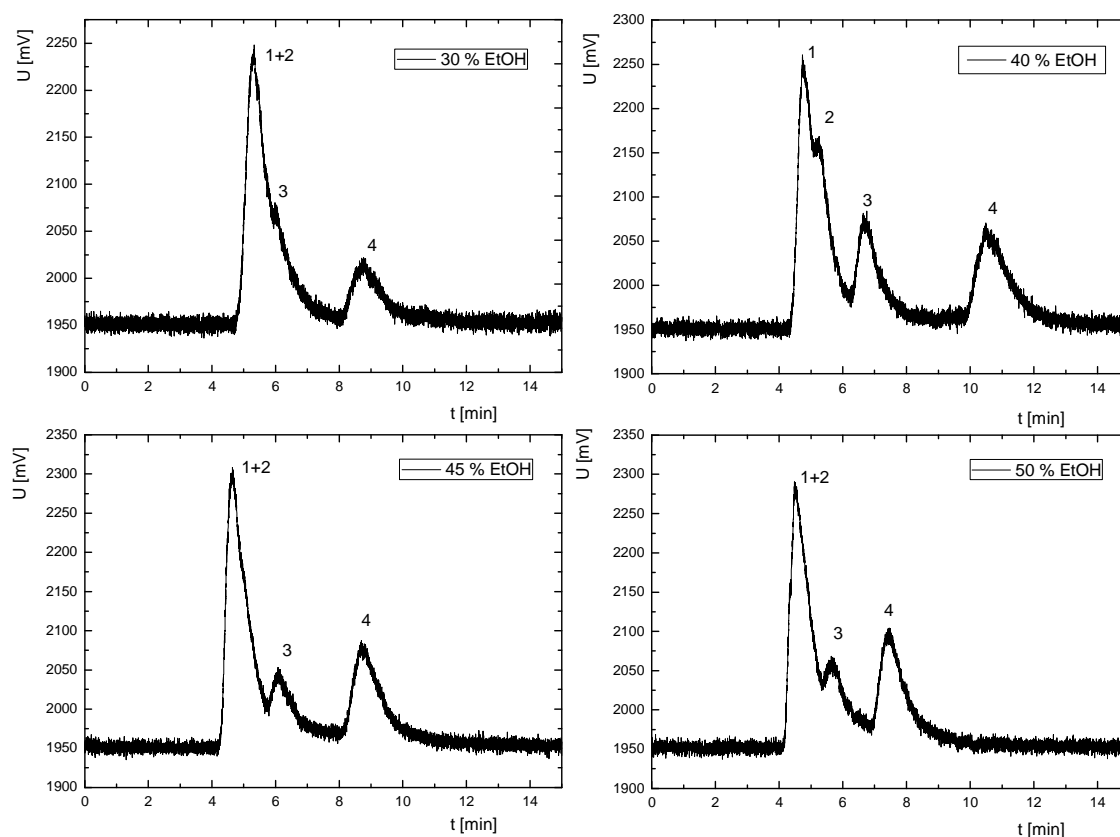
1 - Hg<sup>2+</sup>, 2 - MeHg<sup>+</sup>, 3 - EtHg<sup>+</sup>, 4 - PhHg<sup>+</sup>



Z uvedených závislostí vyplývá, že se snižující se koncentrací octanového pufru docházelo ke zhoršování rozlišení  $\text{Hg}^{2+}$  a  $\text{MeHg}^+$ . Nejlepšího rozlišení píků bylo dosaženo při koncentraci pufru  $30 \text{ mmol.l}^{-1}$ . Použití koncentrovanějších roztoků pufru vedlo ke snížení signálu a tedy zřejmě i účinnosti chemického generování studené páry rtuti. Protože výslednou separaci mohla svou iontovou silou ovlivnit také sůl, která byla součástí pufru, bylo přistoupeno k porovnání s analýzami, kde mobilní fáze obsahovala pufr tvořený kyselinou octovou a octanem sodným. Bylo prokázáno, že druh kationtu soli nemá vliv na separaci ve spojení s chemickým generováním studených par rtuti, proto byl i nadále používán octan amonný, jelikož při něm bylo dosahováno vyššího signálu.

#### 4.4.2. Koncentrace ethanolu

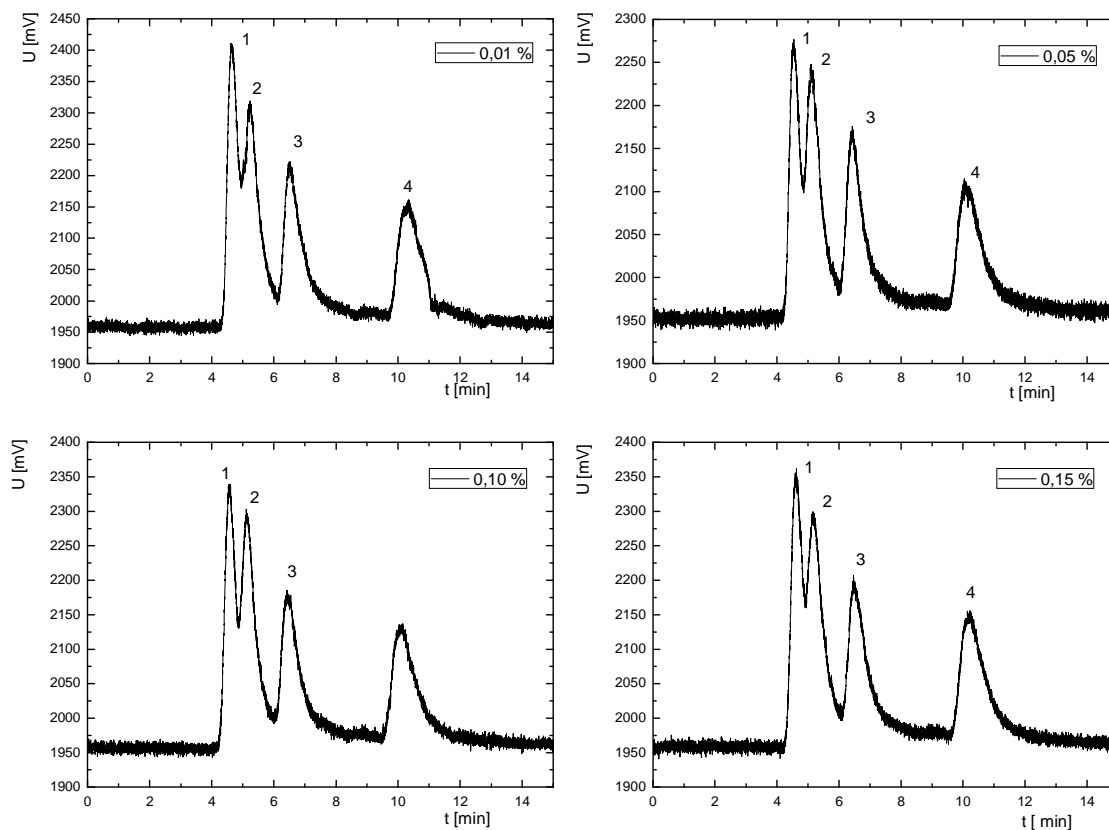
Po optimalizaci koncentrace pufru bylo přistoupeno k optimalizaci koncentrace ethanolu v mobilní fázi. Vliv koncentrace ethanolu byl testován v rozmezí od 30 % do 50 % (v/v). Nižší koncentrace ethanolu, např. 10 % (v/v) vedly ke znemožnění separace, jelikož byl chromatogram tvořen jedním směsným píkem o velké ploše. Kvůli vysoké viskozitě MF a tudíž příliš vysokému tlaku na koloně nebyly používány vyšší koncentrace ethanolu než 50 %. Z grafů na Obr. 4.16. je patrné, že nejlepší separace bylo dosaženo při koncentraci 40 % (v/v). Z důvodu poměrně vysoké viskozity MF i při této koncentraci bylo nutné separační kolonu vyhřívat. Pro prvotní pokusy byla použita teplota 40 °C.



**Obr. 4.16.** Vliv koncentrace ethanolu na separaci  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{MeHg}^+$ ,  $\text{EtHg}^+$ ,  $\text{PhHg}^+$   
 $v(\text{Ar}) = 60,0 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ ,  $v(\text{NaBH}_4) = 0,6 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ ,  $v(\text{MF}) = 0,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ ,  $t = 37,1 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  
 $c(\text{CH}_3\text{COONH}_4) = 30 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ,  $c(\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}) = 0,1 \text{ } \%$  (v/v),  $c(\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8) = 3 \text{ } \%$  (m/v),  
 $c(\text{HCl}) = 0,5 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ,  $v(\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8 + \text{HCl}) = 2,1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ ,  $c(\text{NaBH}_4) = 1 \text{ } \%$  (m/v),  
 $V(\text{dávky smyčky}) = 100 \text{ } \mu\text{l}$ ,  $t(\text{kolony}) = 40 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $c(\text{HgCl}_2) = 200 \text{ ppb}$ ,  
 $c(\text{MeHg}^+) = 200 \text{ ppb}$ ,  $c(\text{EtHg}^+) = 200 \text{ ppb}$ ,  $c(\text{PhHg}^+) = 200 \text{ ppb}$ ,  
 1 -  $\text{Hg}^{2+}$ , 2 -  $\text{MeHg}^+$ , 3 -  $\text{EtHg}^+$ , 4 -  $\text{PhHg}^+$

#### 4.4.3. Koncentrace 2-merkaptoethanolu

Dalším významným parametrem ovlivňujícím separaci je koncentrace komplexotvorného činidla. V této diplomové práci byl používán 2-merkaptoethanol v rozmezí od 0,01 % (v/v) do 0,15% (v/v). Na Obr. 4.17. je znázorněna závislost signálu jednotlivých specií rtuti na koncentraci 2-merkaptoethanolu v MF.



**Obr. 4.17.** Vliv koncentrace 2-merkaptoethanolu na separaci  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{MeHg}^+$ ,  $\text{EtHg}^+$ ,  $\text{PhHg}^+$

$v(\text{Ar}) = 60,0 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ ,  $v(\text{NaBH}_4) = 0,6 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ ,  $v(\text{MF}) = 0,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ ,  $t = 37,1 \text{ }^\circ\text{C}$ ,

$c(\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}) = 40\% \text{ (v/v)}$ ,  $c(\text{CH}_3\text{COONH}_4) = 30 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ,  $c(\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8) = 3\% \text{ (m/v)}$ ,

$c(\text{HCl}) = 0,5 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ,  $v(\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8 + \text{HCl}) = 2,1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ ,  $c(\text{NaBH}_4) = 1\% \text{ (m/v)}$ ,

$V(\text{dávky smyčky}) = 100 \text{ } \mu\text{l}$ ,  $t(\text{kolony}) = 40 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $c(\text{HgCl}_2) = 200 \text{ ppb}$ ,

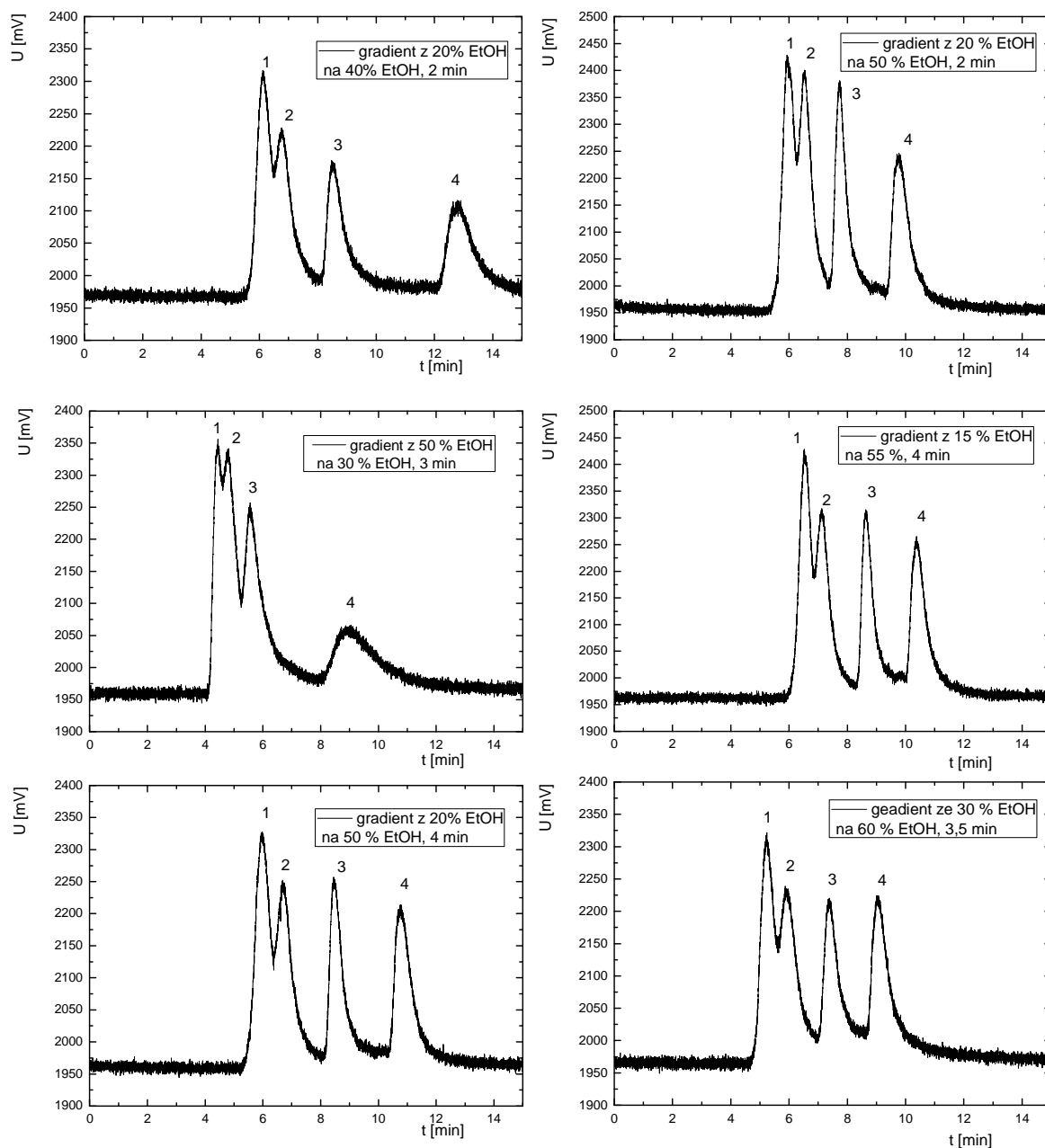
$c(\text{MeHg}^+) = 200 \text{ ppb}$ ,  $c(\text{EtHg}^+) = 200 \text{ ppb}$ ,  $c(\text{PhHg}^+) = 200 \text{ ppb}$ ,

1 -  $\text{Hg}^{2+}$ , 2 -  $\text{MeHg}^+$ , 3 -  $\text{EtHg}^+$ , 4 -  $\text{PhHg}^+$

Z porovnání těchto grafů vyplývá, že nejúčinnější separace bylo dosaženo při koncentraci 2-merkptoethanolu 0,05 % (v/v). Tato koncentrace byla nadále používána jako optimální.

#### 4.4.4. Gradient ethanolu

Z důvodu velmi nedokonalého rozdělení jednotlivých specií bylo přistoupeno k testování různých gradientů obsahu ethanolu v MF v průběhu separace. Nejprve byl testován gradient snižujícího se obsahu ethanolu, který bohužel nevedl ke zlepšení separačního kroku, naopak docházelo ke snížení rozlišení jednotlivých píků. Proto byl zvolen opačný gradient a byla testována metoda se zvyšující se koncentrací ethanolu v čase. Kromě počáteční a konečné koncentrace ethanolu byl také měněn čas, ve kterém docházelo k nástupu gradientu. Různé druhy gradientu jsou zobrazeny na Obr. 4.18. Porovnáním jednotlivých grafů na Obr. 4.18. je patrné, že nejlepší separace bylo dosaženo při gradientu nastupujícím ve čtvrté minutě o počáteční koncentraci 20 % (v/v) a konečné koncentraci 50 % (v/v) ethanolu.



**Obr. 4.18.** Vliv gradientu ethanolu na separaci  $Hg^{2+}$ ,  $MeHg^+$ ,  $EtHg^+$ ,  $PhHg^+$

$v(Ar) = 60,0 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ ,  $v(NaBH_4) = 0,6 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ ,  $v(MF) = 0,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ ,  $t = 37,1 \text{ }^\circ\text{C}$ ,

$c(CH_3COONH_4) = 30 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ,  $c(C_2H_6OS) = 0,1 \text{ } \%$  (v/v),  $c(K_2S_2O_8) = 3 \text{ } \%$  (m/v),

$c(HCl) = 0,5 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ,  $v(K_2S_2O_8 + HCl) = 2,1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ ,  $c(NaBH_4) = 1 \text{ } \%$  (m/v),

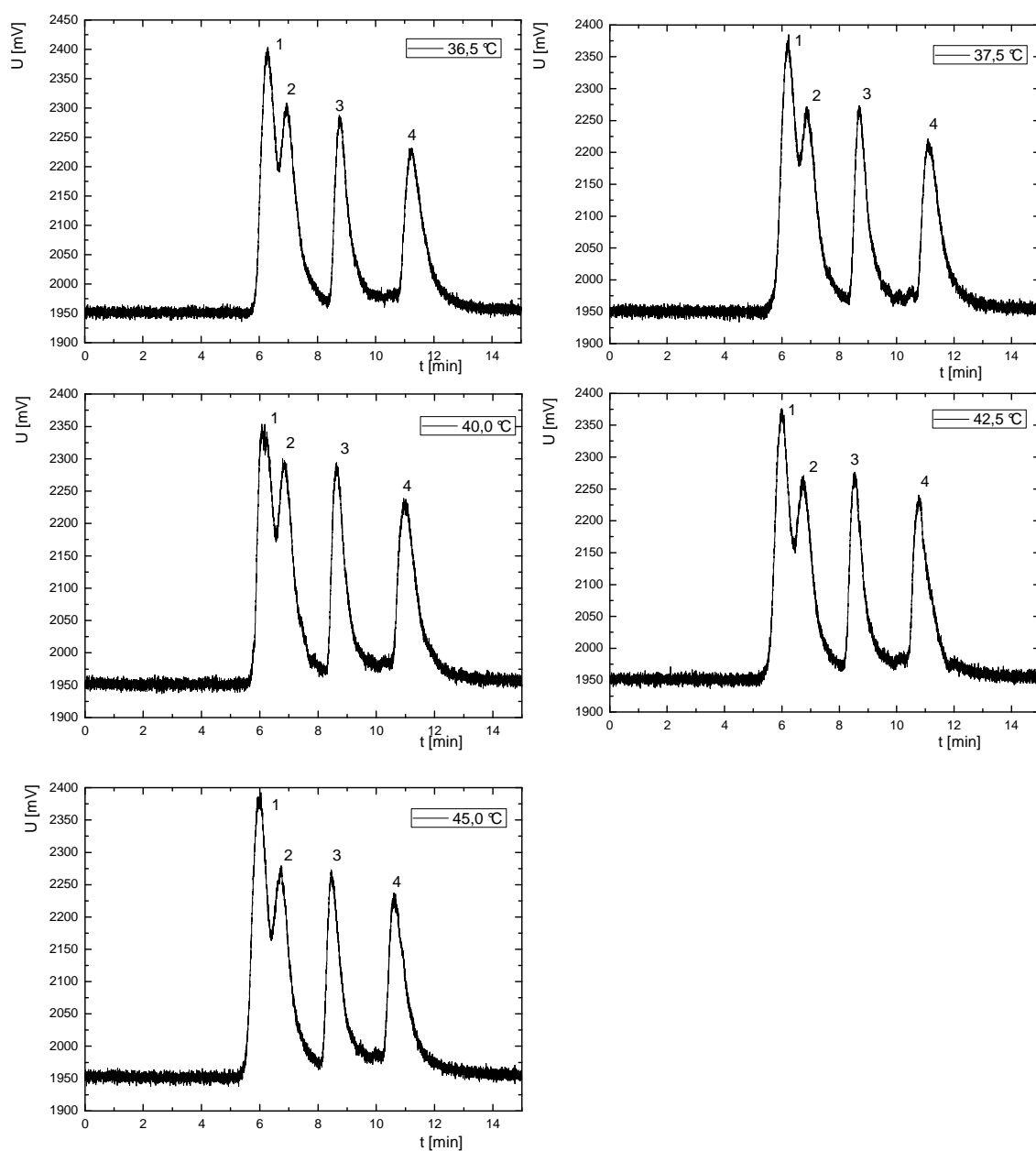
$V(\text{dáv. smyčky}) = 100 \text{ } \mu\text{l}$ ,  $t(\text{kolony}) = 40 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $c(HgCl_2) = 200 \text{ ppb}$ ,

$c(MeHg^+) = 200 \text{ ppb}$ ,  $c(EtHg^+) = 200 \text{ ppb}$ ,  $c(PhHg^+) = 200 \text{ ppb}$ ,

1 -  $Hg^{2+}$ , 2 -  $MeHg^+$ , 3 -  $EtHg^+$ , 4 -  $PhHg^+$

#### *4.4.5. Teplota vyhřívání kolony*

Z důvodu vysoké viskozity mobilní fáze bylo potřeba kvůli snížení tlaku na koloně vyhřívát kolonu pomocí termostatu. Z grafických závislostí na Obr. 4.19. je zřejmé, že teplota vyhřívání kolony neměla významný vliv na separaci jednotlivých specií, proto byla nadále používána teplota 40 °C. Nižší teplota nebyla volena z důvodu zvýšení viskozity mobilní fáze a nárůstu tlaku na koloně, který by bylo potřeba kompenzovat snížením průtokové rychlosti mobilní fáze a tím i časovým prodloužením celé analýzy.

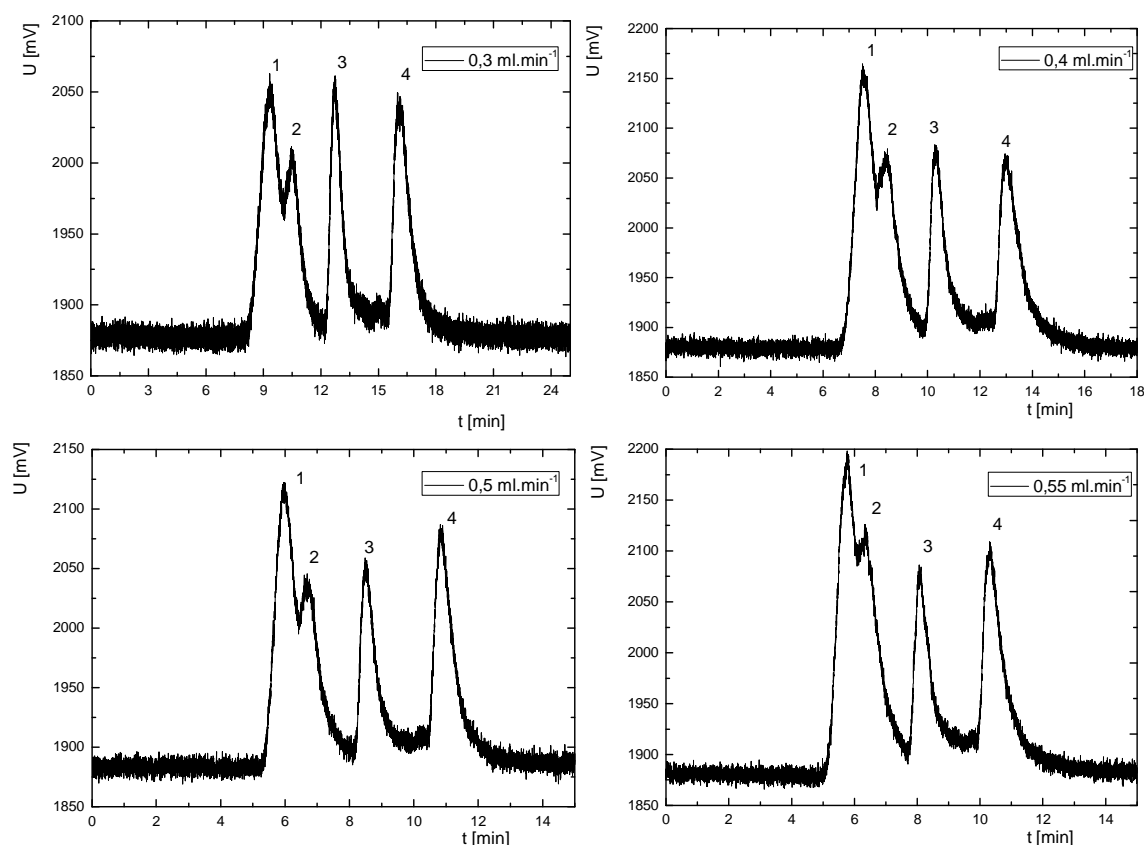


**Obr. 4.19.** Vliv teploty vyhřívání kolony na separaci  $Hg^{2+}$ ,  $MeHg^+$ ,  $EtHg^+$ ,  $PhHg^+$   
 $v(Ar) = 60,0 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ ,  $v(NaBH_4) = 0,6 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ ,  $v(MF) = 0,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ ,  $t = 37,1 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  
 $c(CH_3COONH_4) = 30 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ,  $c(C_2H_6OS) = 0,1 \text{ } \%$  (v/v),  $c(K_2S_2O_8) = 3 \text{ } \%$  (m/v),  
 $c(HCl) = 0,5 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ,  $v(K_2S_2O_8 + HCl) = 2,1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ ,  $c(NaBH_4) = 1 \text{ } \%$  (m/v),  
 $V(\text{dávky smyčky}) = 100 \text{ } \mu\text{l}$ ,  $c(HgCl_2) = 200 \text{ ppb}$ ,  $c(MeHg^+) = 200 \text{ ppb}$ ,  
 $c(EtHg^+) = 200 \text{ ppb}$ ,  $c(PhHg^+) = 200 \text{ ppb}$ , 1 -  $Hg^{2+}$ , 2 -  $MeHg^+$ , 3 -  $EtHg^+$ , 4 -  $PhHg^+$

#### 4.4.6. Průtoková rychlost mobilní fáze

Následujícím testovaným parametrem ovlivňujícím účinnost separace jednotlivých specií rtuti byla průtoková rychlost mobilní fáze. Průtoková rychlost byla proměřována v rozmezí od  $0,3 \text{ ml.min}^{-1}$  do  $0,55 \text{ ml.min}^{-1}$ . Tento parametr má vliv na retenční časy všech specií, bohužel však se snižující se průtokovou rychlostí MF nedochází ke zlepšení rozlišení jednotlivých píků, ale všechny píky se posouvají společně. Grafy pro jednotlivé průtokové rychlosti jsou uvedeny na obrázku 4.20. Při nižších průtokových rychlostech, jak je vidět na grafu znázorňujícím průtokovou rychlost  $0,3 \text{ ml.min}^{-1}$ , dochází k prodloužení celkové doby analýzy. Naopak při průtoku  $0,55 \text{ ml.min}^{-1}$  dochází k urychlení analýzy, ale se vzrůstající průtokovou rychlostí mobilní fáze dochází ke zvýšení tlaku na koloně až k maximálním hodnotám. Z tohoto důvodu byla i nadále zvolena jako ideální průtoková rychlost MF  $0,5 \text{ ml.min}^{-1}$ .





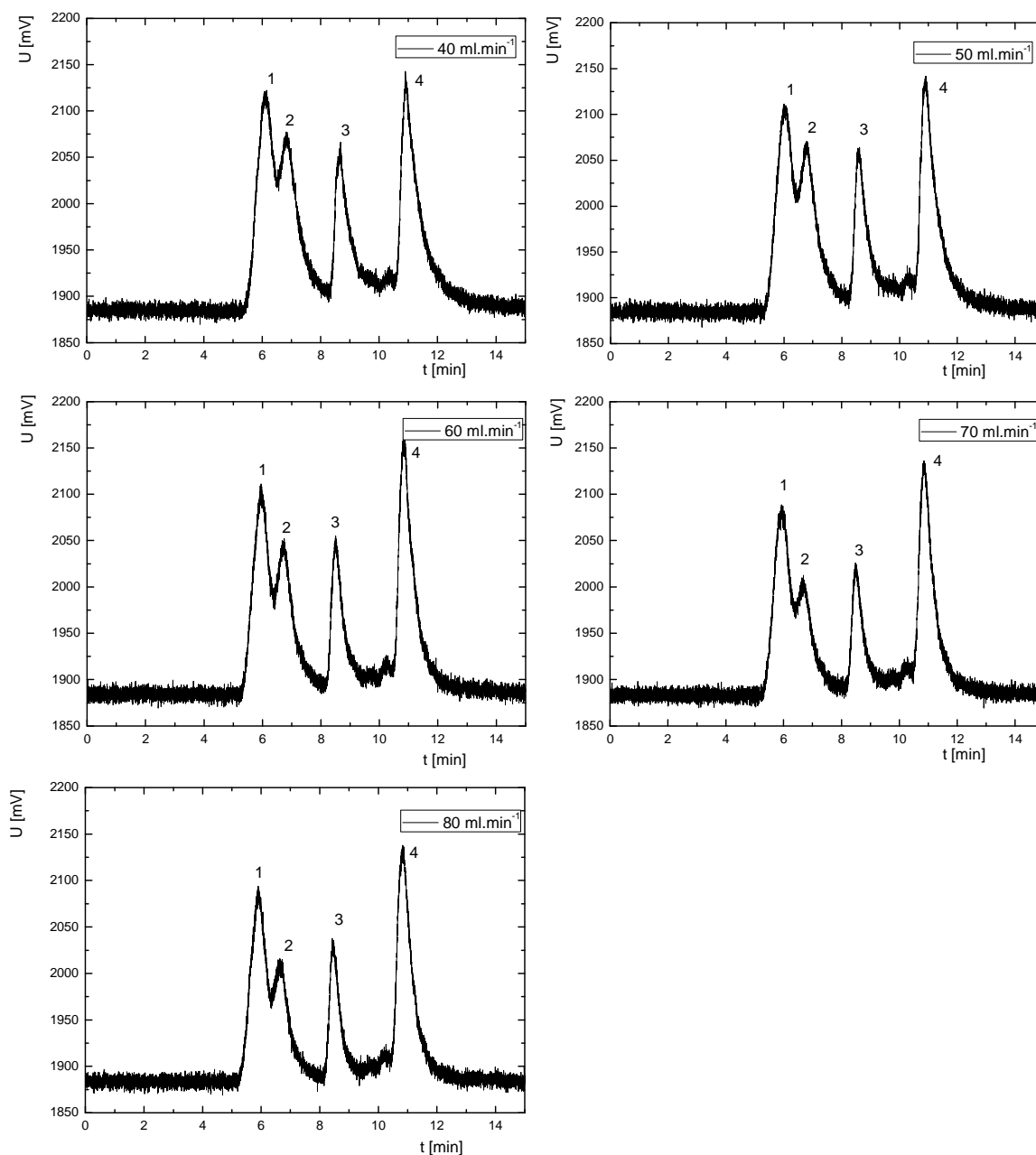
**Obr. 4.20.** Vliv průtokové rychlosti mobilní fáze na separaci  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{MeHg}^+$ ,  $\text{EtHg}^+$ ,  $\text{PhHg}^+$

$v(\text{Ar}) = 60,0 \text{ ml.min}^{-1}$ ,  $v(\text{NaBH}_4) = 0,6 \text{ ml.min}^{-1}$ ,  $c(\text{CH}_3\text{COONH}_4) = 30 \text{ mmol.l}^{-1}$ ,  
 $c(\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}) = 0,1 \text{ \% (v/v)}$ ,  $c(\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8) = 3 \text{ \% (m/v)}$ ,  $c(\text{HCl}) = 0,5 \text{ mol.l}^{-1}$ ,  $t = 37,1 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  
 $v(\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8 + \text{HCl}) = 2,1 \text{ ml.min}^{-1}$ ,  $c(\text{NaBH}_4) = 1 \text{ \% (m/v)}$ ,  $V(\text{dávky smyčky}) = 100 \text{ } \mu\text{l}$ ,  
 $t(\text{kolony}) = 40 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $c(\text{HgCl}_2) = 200 \text{ ppb}$ ,  $c(\text{MeHg}^+) = 200 \text{ ppb}$ ,  $c(\text{EtHg}^+) = 200 \text{ ppb}$ ,  
 $c(\text{PhHg}^+) = 200 \text{ ppb}$ , 1 -  $\text{Hg}^{2+}$ , 2 -  $\text{MeHg}^+$ , 3 -  $\text{EtHg}^+$ , 4 -  $\text{PhHg}^+$

#### 4.4.7. Průtoková rychlost nosného plynu

Vliv průtokové rychlosti nosného plynu byl zkoumán v rozmezí od 40 do 80  $\text{ml.min}^{-1}$ . Na Obr. 4.21. jsou znázorněny chromatogramy pro jednotlivé průtokové rychlosti. Přívod nosného plynu byl umístěn až za přívodem oxidačního činidla, proto se výrazně neprojevuje jeho vliv na retenční časy jednotlivých specií. Z jednotlivých chromatogramů je patrný trend snižující se velikosti signálu pro jednotlivé píky v závislosti na vzrůstající průtokové rychlosti nosného plynu. Se vzrůstající průtokovou rychlostí nosného plynu dochází k zúžení jednotlivých píků. Pro další analytická měření

byla zvolena průtoková rychlost  $60 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ .



**Obr. 4.21.** Vliv průtokové rychlosti nosného plynu na separaci  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{MeHg}^+$ ,  $\text{EtHg}^+$ ,

$\text{PhHg}^+$

$v(\text{NaBH}_4) = 0,6 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ ,  $v(\text{MF}) = 0,5 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ ,  $c(\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}) = 40\% \text{ (v/v)}$ ,  $t = 37,1 \text{ }^\circ\text{C}$ ,

$c(\text{CH}_3\text{COONH}_4) = 30 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $c(\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}) = 0,1 \text{ \% (v/v)}$ ,  $c(\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8) = 3 \text{ \% (m/v)}$ ,

$c(\text{HCl}) = 0,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $v(\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8 + \text{HCl}) = 2,1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ ,  $c(\text{NaBH}_4) = 1 \text{ \% (m/v)}$ ,

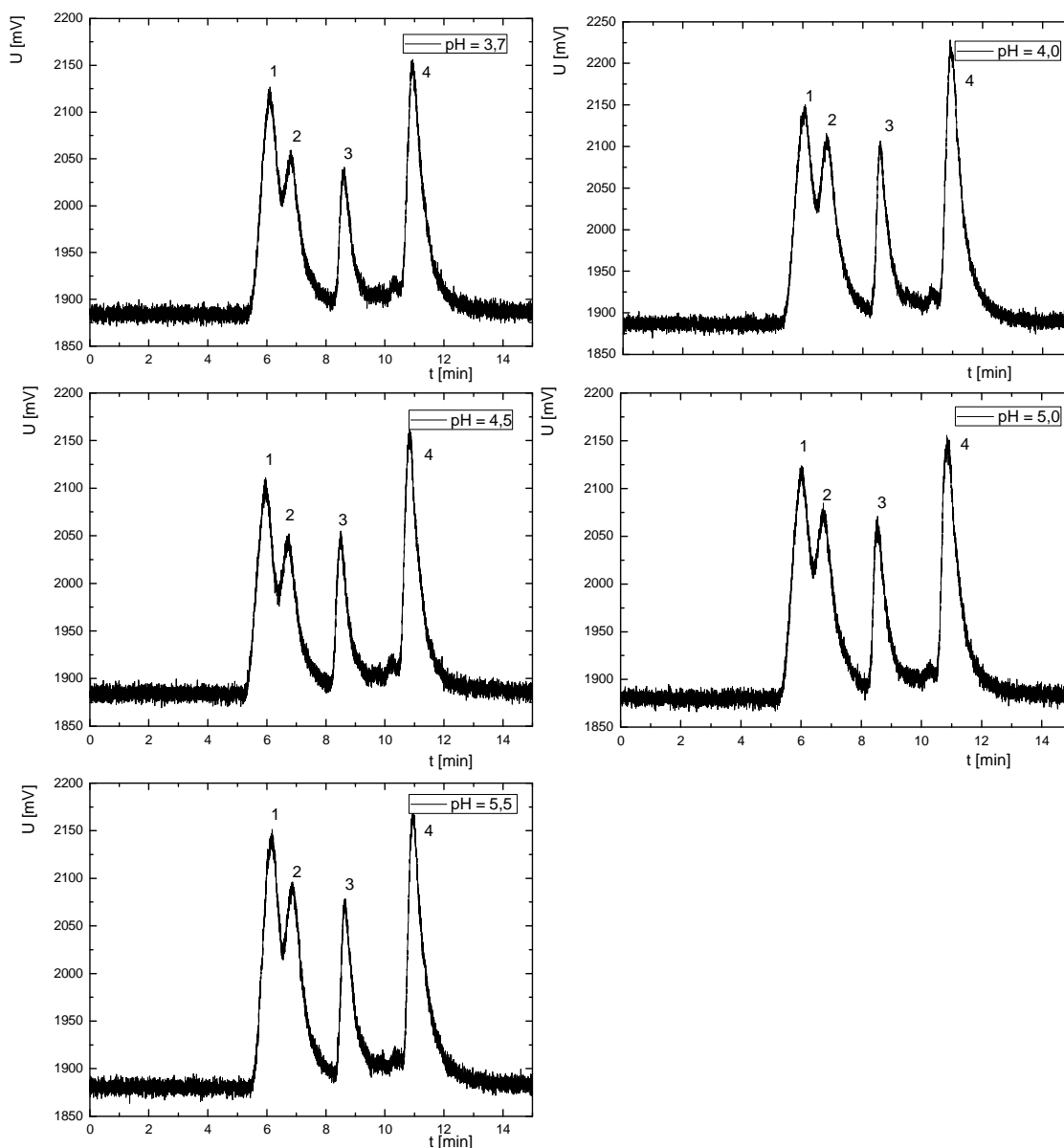
$V(\text{dáv. smyčky}) = 100 \text{ }\mu\text{l}$ ,  $t(\text{kolony}) = 40 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $c(\text{HgCl}_2) = 200 \text{ ppb}$ ,

$c(\text{MeHg}^+) = 200 \text{ ppb}$ ,  $c(\text{EtHg}^+) = 200 \text{ ppb}$ ,  $c(\text{PhHg}^+) = 200 \text{ ppb}$ , 1 -  $\text{Hg}^{2+}$ , 2 -  $\text{MeHg}^+$ ,

3 -  $\text{EtHg}^+$ , 4 -  $\text{PhHg}^+$

#### 4.4.8. *pH pufry*

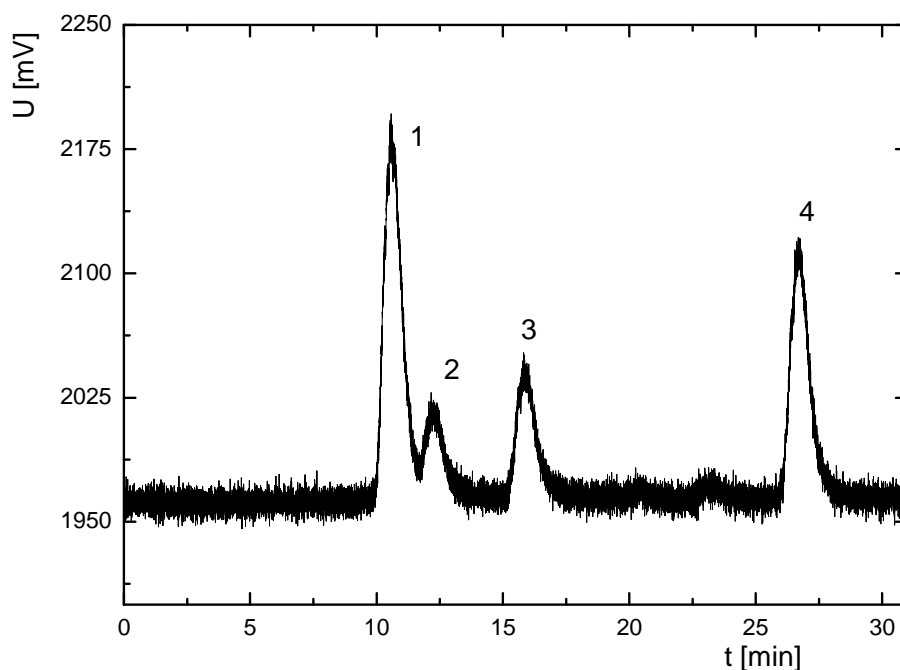
Jedním z dalších parametrů, který může ovlivnit retenční časy a výšky signálů pro jednotlivé specie je pH octanového pufry. Tento parametr byl testován v rozmezí pH od 3,7 do 5,5. Z chromatogramů na Obr. 4.22. je zřejmé, že pH octanového pufry nemá významný vliv na retenční časy jednotlivých specií, ale dochází ke změnám intenzity signálu pro jednotlivé specie. pH, při kterém bylo dosaženo nejvyššího signálu se pro jednotlivé specie různí, proto bylo zvoleno pH = 5, jako kompromis mezi dosaženým signálem jednotlivých specií.



**Obr. 4.22.** Vliv pH octanového pufru na separaci  $Hg^{2+}$ ,  $MeHg^+$ ,  $EtHg^+$ ,  $PhHg^+$   
 $v(Ar) = 60,0 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ ,  $v(NaBH_4) = 0,6 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ ,  $v(MF) = 0,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ ,  $t = 37,1 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  
 $c(CH_3COONH_4) = 30 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ,  $c(C_2H_6OS) = 0,1 \text{ } \%$  (v/v),  $c(K_2S_2O_8) = 3 \text{ } \%$  (m/v),  
 $c(HCl) = 0,5 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ,  $v(K_2S_2O_8 + HCl) = 2,1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ ,  $c(NaBH_4) = 1 \text{ } \%$  (m/v),  
 $V(\text{dáv}k. \text{ smyčky}) = 100 \text{ } \mu\text{l}$ ,  $t(\text{kolony}) = 40 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $c(HgCl_2) = 200 \text{ ppb}$ ,  
 $c(MeHg^+) = 200 \text{ ppb}$ ,  $c(EtHg^+) = 200 \text{ ppb}$ ,  $c(PhHg^+) = 200 \text{ ppb}$ ,  
 1 -  $Hg^{2+}$ , 2 -  $MeHg^+$ , 3 -  $EtHg^+$ , 4 -  $PhHg^+$

#### 4.4.9. Výměna chromatografické kolony

Z důvodu nedostatečné separace jednotlivých specií bylo přistoupeno k výměně chromatografické kolony. Byly testovány dvě kolony Gemini C18 o různých rozměrech. Jako první byla testována kolona Gemini C18 (3 $\mu$ m, 150 x 2,4 mm). Tato kolona neumožňovala dostatečně účinnou separaci vybraných specií, jelikož došlo k úplnému překrytí píku HgCl<sub>2</sub> a MeHg<sup>+</sup> a k posunu retenčního času EtHg<sup>+</sup> směrem k prvnímu píku. S touto kolonou nebyly nadále prováděny další pokusy a bylo přistoupeno k testování druhé kolony Gemini C18 (3 $\mu$ m, 250 x 3,0 mm). Již prvotní pokusy ukázaly, že na této koloně dochází k výraznému zlepšení separace jednotlivých specií. Nevýhodou této kolony je prodloužení doby analýzy, která se zdvojnásobila. Porovnáním ploch píků bylo zjištěno, že i přes pokles signálu na delší koloně byla zachována plocha píků jednotlivých specií. Na této koloně se neprojevil pozitivně gradient obsahu ethanolu, proto byla následující měření prováděna isokraticky při koncentraci 40 % (v/v). Pomocí této kolony byly proměřeny kalibrační závislosti a reálné vzorky za podmínek zjištěných při optimalizaci na koloně Gemini C18 (3 $\mu$ m, 150 x 4,6 mm). Jediným parametrem lišícím se oproti původní koloně je průtoková rychlost MF, která byla snížena z důvodu tlaku dosaženého na koloně. Jelikož je maximální tlak možný na delší koloně 160 bar, bylo možné používat průtok pouze 0,125 ml.min<sup>-1</sup>. Účinnost separačního kroku je znázorněna na Obr. 4.23.



**Obr. 4.23.** Separace pomocí kolony Gemini C18 (3 $\mu$ m, 250 x 3,0 mm)  
 $v(\text{Ar}) = 60,0 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ ,  $v(\text{NaBH}_4) = 0,6 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ ,  $v(\text{MF}) = 0,5 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ ,  $t = 37,1 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  
 $c(\text{CH}_3\text{COONH}_4) = 30 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $c(\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}) = 0,1 \%$  (v/v),  $c(\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8) = 3 \%$  (m/v),  
 $c(\text{HCl}) = 0,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $v(\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8 + \text{HCl}) = 2,1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ ,  $c(\text{NaBH}_4) = 1 \%$  (m/v),  
 $c(\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}) = 40\%$  (v/v),  $V(\text{dávky smyčky}) = 100 \mu\text{l}$ ,  $t(\text{kolony}) = 40 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  
 $c(\text{HgCl}_2) = 200 \text{ ppb}$ ,  $c(\text{MeHg}^+) = 200 \text{ ppb}$ ,  $c(\text{EtHg}^+) = 200 \text{ ppb}$ ,  $c(\text{PhHg}^+) = 200 \text{ ppb}$ ,  
 1 -  $\text{Hg}^{2+}$ , 2 -  $\text{MeHg}^+$ , 3 -  $\text{EtHg}^+$ , 4 -  $\text{PhHg}^+$

#### 4.4.10. Shrnutí optimálních podmínek pro separaci vybraných specií rtuti

Optimální podmínky pro HPLC separaci  $\text{HgCl}_2$ ,  $\text{MeHg}^+$ ,  $\text{EtHg}^+$  a  $\text{PhHg}^+$  ve spojení s chemickým generováním studené páry rtuti a AAS detekcí jsou shrnuty v Tab. 4.3.

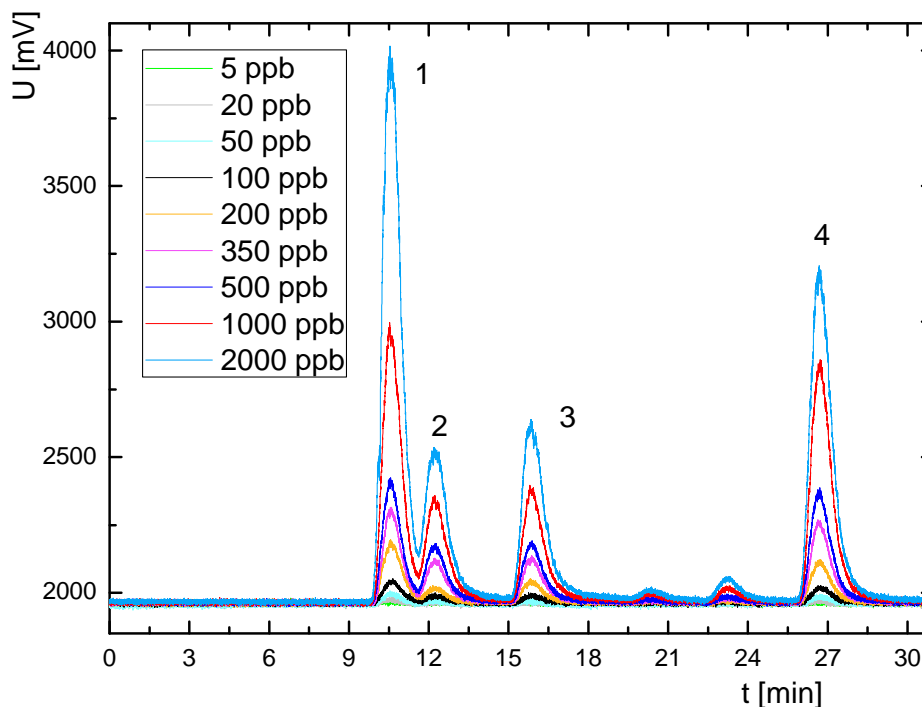
**Tab. 4.3.** Optimální podmínky pro separaci vybraných specií rtuti

Parametr	Hodnota
Koncentrace roztoku $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ [%, m/v]	3
Koncentrace roztoku HCl [ $\text{mol.l}^{-1}$ ]	0,5
Průtoková rychlost roztoku $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ + HCl [ $\text{ml.min}^{-1}$ ]	2,1
Průtoková rychlost roztoku $\text{NaBH}_4$ [ $\text{ml.min}^{-1}$ ]	0,6
Koncentrace roztoku $\text{NaBH}_4$ [%, m/v]	1
Průtoková rychlost argonu [ $\text{ml.min}^{-1}$ ]	60
Teplota vyhřívání detekční trubice [ $^{\circ}\text{C}$ ]	37,1
Koncentrace ethanolu [%, v/v]	40
Složení pufru $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONH}_4$ [ $\text{mmol.l}^{-1}$ ]	30/30
pH pufru	5,0
Koncentrace 2-merkptoethanolu [%, v/v]	0,05
Teplota vyhřívání kolony [ $^{\circ}\text{C}$ ]	40
Průtoková rychlost mobilní fáze [ $\text{ml.min}^{-1}$ ]	0,125

#### 4.5. Kalibrace pro vybrané specie rtuti za podmínek optimálních pro HPLC - CVG - QTAAS

Za podmínek zjištěných při optimalizaci chemického generování studené páry rtuti a při optimalizaci separačního kroku pro vybrané specie rtuti byly proměřeny

kalibrační závislosti. Na Obr. 4.24 jsou znázorněny chromatogramy různých koncentrací specií separujících se na koloně v pořadí  $\text{HgCl}_2$  -  $\text{MeHg}^+$  -  $\text{EtHg}^+$  -  $\text{PhHg}^+$ . Pro výpočet základních charakteristik byly použity plochy píků jednotlivých specií. Pro porovnání jsou v Tab. 4.4. uvedeny také hodnoty vypočítané z výšek píků.



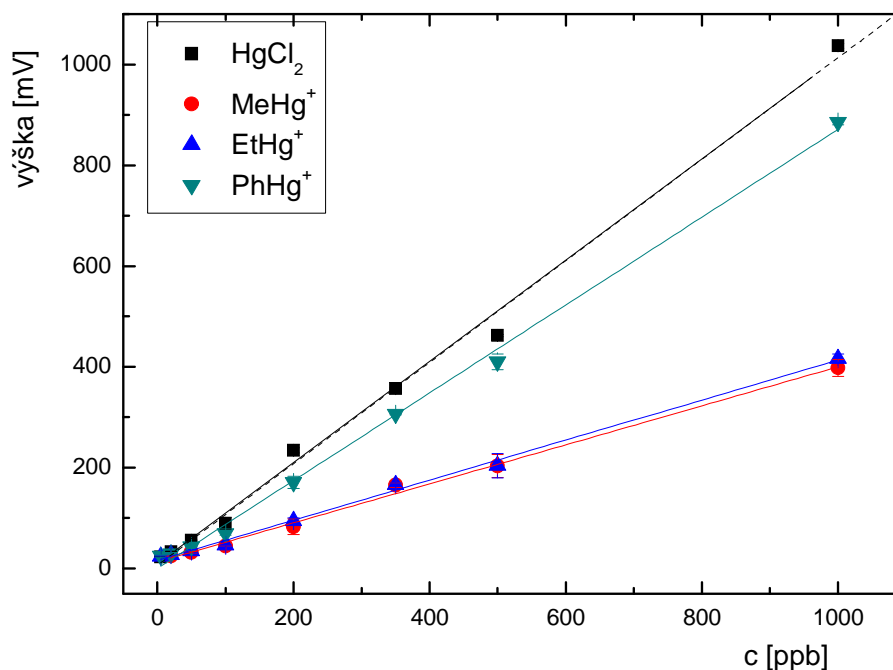
**Obr. 4.24.** Chromatogram vybraných specií rtuti o různých koncentracích

$v(\text{Ar}) = 60,0 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ ,  $v(\text{NaBH}_4) = 0,6 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ ,  $v(\text{MF}) = 0,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ ,  $t = 37,1 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  
 $c(\text{CH}_3\text{COONH}_4) = 30 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ,  $c(\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}) = 0,1 \text{ } \%$  (v/v),  $c(\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8) = 3 \text{ } \%$  (m/v),  
 $c(\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}) = 40 \%$  (v/v),  $c(\text{HCl}) = 0,5 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ,  $v(\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8 + \text{HCl}) = 2,1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ ,  
 $c(\text{NaBH}_4) = 1 \text{ } \%$  (m/v),  $V(\text{dávka smyčky}) = 100 \text{ } \mu\text{l}$ ,  $t(\text{kolony}) = 40 \text{ }^\circ\text{C}$ , 1 -  $\text{Hg}^{2+}$ ,  
 2 -  $\text{MeHg}^+$ , 3 -  $\text{EtHg}^+$ , 4 -  $\text{PhHg}^+$

Z Obr. 4.24. na kterém jsou zobrazeny chromatogramy pro různé koncentrace jednotlivých specií je patrné, že se  $\text{PhHg}^+$  kromě  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{MeHg}^+$  a  $\text{EtHg}^+$  rozkládá ještě na další dvě neznámé sloučeniny. Tyto sloučeniny nebylo možné identifikovat, jelikož nebyly k dispozici standardy těchto látek. Nelze obecně říci, kolik procent  $\text{PhHg}^+$  se rozkládá na danou specii. Přeměněné množství evidentně záleží na složení reálného vzorku. Vliv na získané hodnoty má také opakovatelnost metody pro jednotlivé specie, jelikož je u všech organortuňných sloučenin vyšší než 15 %.

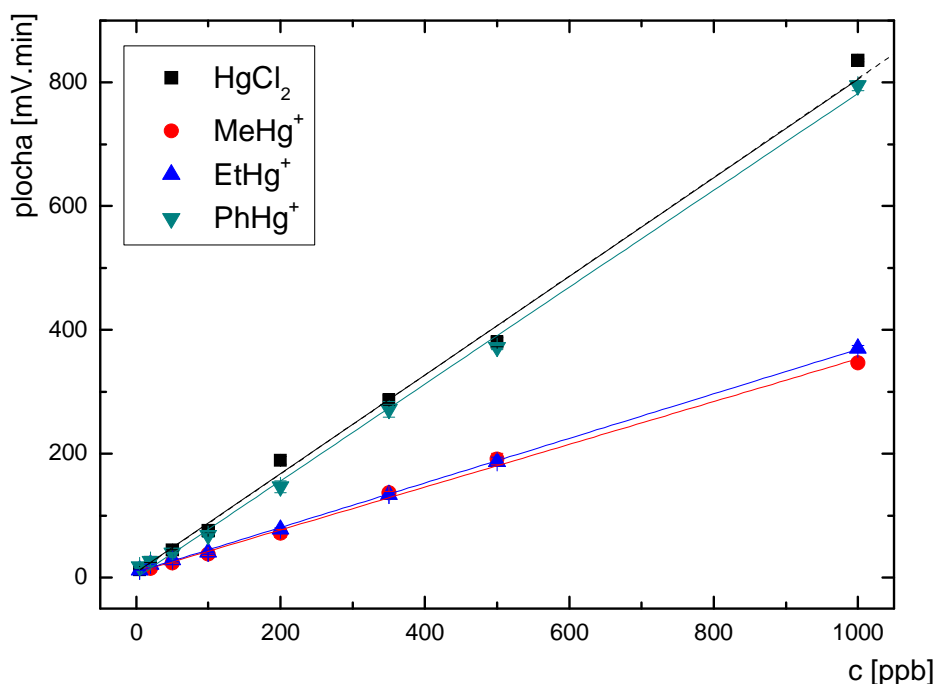


Na Obr. 4.25 je zobrazena lineární část kalibrační závislosti pro vybrané specie rtuti vyhodnocená z výšky píku a na Obr. 4.26. vyhodnocená z plochy píku. Z těchto závislostí byly získány meze detekce a meze stanovitelnosti. Opakovatelnost, vyjádřená jako relativní směrodatná odchylka v procentech, je nejnižší u stanovení  $\text{HgCl}_2$  a je rovna 4,9 %. Pro ostatní specie je opakovatelnost výrazně vyšší. Při analýze vzorků pro určení opakovatelnosti bylo zjištěno, že u všech organortuťných sloučenin dochází při pokojové teplotě přibližně po třech hodinách k jejich těkání do ovzduší, díky čemuž se v čase snižuje naměřený signál. Z tohoto důvodu byly při měření kalibrace ponechány jednotlivé vialky s kalibračními roztoky v lednici a vloženy do automatického dávkovače těsně před vlastní analýzou. Základní charakteristiky pro vybrané specie rtuti metodou HPLC - CVG - QTAAS jsou shrnuty v Tab. 4.4. Pro porovnání citlivosti této metody jsou v Tab. 4.5. uvedeny hodnoty meze detekce a meze stanovitelnosti pro UV - fotochemické generování studené páry rtuti ve spojení s RP - HPLC získané v diplomové práci Mgr. Ondřeje Linharta.



**Obr. 4.25.** Lineární část kalibrační závislosti pro vybrané specie rtuti vyhodnocená z výšky píku

$$\begin{aligned}
 v(\text{Ar}) &= 60,0 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}, v(\text{NaBH}_4) = 0,6 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}, v(\text{MF}) = 0,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}, \\
 c(\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}) &= 40\% \text{ (v/v)}, c(\text{CH}_3\text{COONH}_4) = 30 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}, c(\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}) = 0,1\% \text{ (v/v)}, \\
 t &= 37,1 \text{ }^\circ\text{C}, c(\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8) = 3\% \text{ (m/v)}, c(\text{HCl}) = 0,5 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}, V(\text{dávky smyčky}) = 100 \text{ } \mu\text{l}, \\
 v(\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8 + \text{HCl}) &= 2,1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}, c(\text{NaBH}_4) = 1\% \text{ (m/v)}, t(\text{kolony}) = 40 \text{ }^\circ\text{C}
 \end{aligned}$$



**Obr. 4.26.** Lineární část kalibrační závislosti pro vybrané specie rtuti vyhodnocená z plochy píku

$v (Ar) = 60,0 \text{ ml.min}^{-1}$ ,  $v (NaBH_4) = 0,6 \text{ ml.min}^{-1}$ ,  $v (MF) = 0,5 \text{ ml.min}^{-1}$ ,  
 $c (C_2H_5OH) = 40\% (v/v)$ ,  $c (CH_3COONH_4) = 30 \text{ mmol.l}^{-1}$ ,  $c (C_2H_6OS) = 0,1 \%$  (v/v),  
 $t = 37,1 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $c (K_2S_2O_8) = 3 \%$  (m/v),  $c (HCl) = 0,5 \text{ mol.l}^{-1}$ ,  $t (kolony) = 40 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  
 $v (K_2S_2O_8 + HCl) = 2,1 \text{ ml.min}^{-1}$ ,  $c (NaBH_4) = 1 \%$  (m/v),  $V (\text{dávka smyčky}) = 100 \text{ }\mu\text{l}$

**Tab. 4.4.** Základní charakteristiky vybraných specií rtuti metodou HPLC - CVG - QTAAS

specie		HgCl <sub>2</sub>	MeHg <sup>+</sup>	EtHg <sup>+</sup>	PhHg <sup>+</sup>
Citlivost [ng.ml <sup>-1</sup> ]	plocha	0,79830	0,34551	0,35996	0,78254
	výška	1,00740	0,38700	0,39760	0,87130
LOD [ppb]	plocha	9	10	4	6
	výška	3	2	14	8
LOQ [ppb]	plocha	28	32	12	20
	výška	8	7	46	25
Opakovatelnost [%]	plocha	4,9	16,0	21,0	17,3
	výška	3,0	17,1	18,2	17,4
LDR [ppb]	plocha	28 - 2000	32 - 1000	12 - 1000	20 - 1000
	výška	8 - 2000	7 - 1000	46 - 1000	25 - 1000
Korelační koeficient	plocha	0,9994	0,9980	0,9997	0,9988
	výška	0,9994	0,9981	0,9984	0,9985

**Tab. 4.5.** Porovnání meze detekce a meze stanovitelnosti pro chemické a UV - fotochemické generování studené páry rtuti ve spojení s RP - HPLC

		chemické generování		UV - fotochemické generování	
		plocha	výška	plocha	výška
HgCl <sub>2</sub>	LOD [ppb]	9	3	8	8
	LOQ [ppb]	28	8	27	28
MeHg <sup>+</sup>	LOD [ppb]	10	2	31	36
	LOQ [ppb]	32	7	103	119
EtHg <sup>+</sup>	LOD [ppb]	4	14	16	19
	LOQ [ppb]	12	46	54	63
PhHg <sup>+</sup>	LOD [ppb]	6	8	38	35
	LOQ [ppb]	20	25	127	117

#### 4.6. Analýza reálných vzorků

V této diplomové práci byly použity jako reálné vzorky vody z různých toků Západních Čech. Veškeré vzorky byly odebrány odpoledne den před analýzou a po celou dobu byly uchovávány v chladničce. Přehled vzorků je uveden v Tab. 4.6.

**Tab. 4.6.** Reálné vzorky

Název	Místo odběru	Datum	Čas	Poznámka
Úhlava	Tajanov u Klatov	23.2.2014	17:00	řeka
Lomeček	Klatovy	23.2.2014	17:15	vodní nádrž
Poleňka	Dolany u Klatov	23.2.2014	18:45	potok

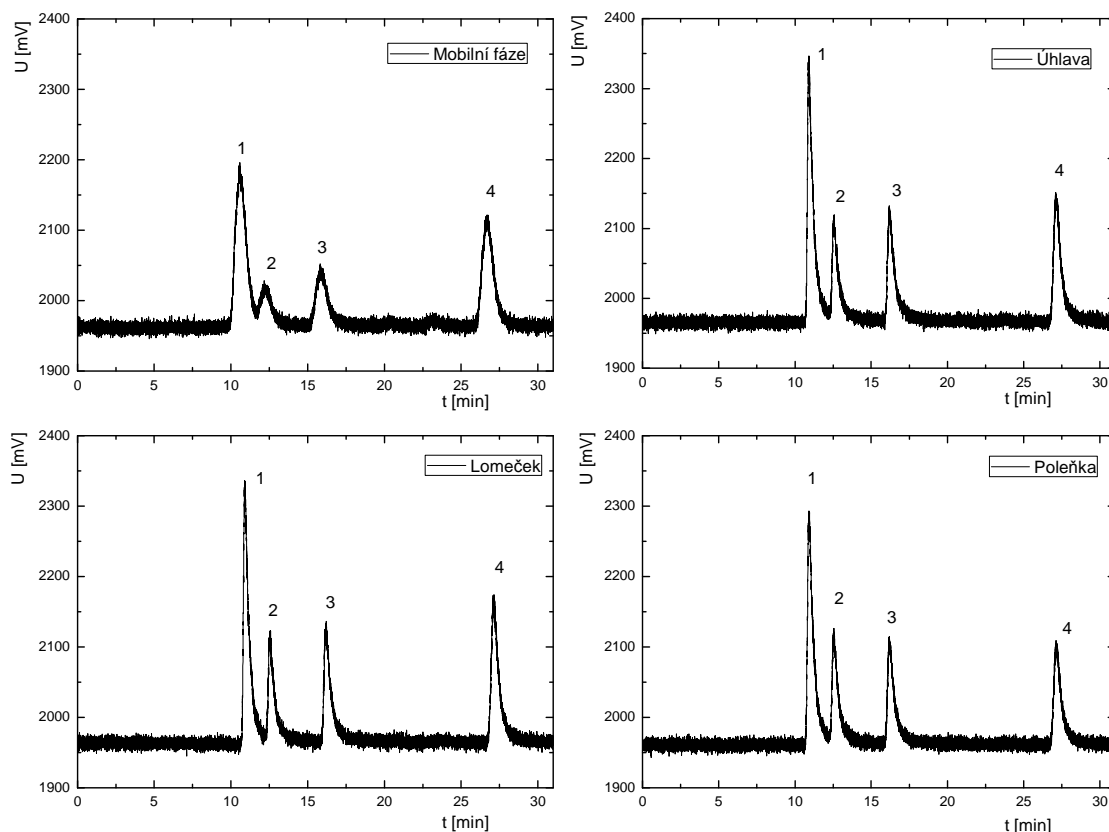
Před analýzou byly veškeré vzorky přefiltrovány. Nejprve byly analyzovány vzorky metodou HPLC - CVG - QTAAS bez přidavku jednotlivých specií rtuti. U všech analyzovaných vzorků byl zjištěn obsah jednotlivých specií pod mezí detekce, proto bylo přistoupeno k měření spikovaných vzorků. Všechny vzorky byly spikovány směsí obsahující HgCl<sub>2</sub>, MeHg<sup>+</sup>, EtHg<sup>+</sup> a PhHg<sup>+</sup> o koncentraci 200 ppb. Množství jednotlivých specií bylo vyhodnocováno pomocí kalibračních závislostí porovnáním ploch

jednotlivých specií. Tab. 4.7. shrnuje výtěžnosti jednotlivých specií získané porovnáním ploch píků ve spikované reálné matici vzorku s kalibračními závislostmi.

**Tab. 4.7.** Výtěžnost z ploch píků pro jednotlivé specie rtuti metodou RP - HPLC - CVG - QTAAS

Vzorek	Výtěžnost [%]			
	HgCl <sub>2</sub>	MeHg <sup>+</sup>	EtHg <sup>+</sup>	PhHg <sup>+</sup>
Úhlava	104,1 ± 1,4	107,1 ± 3,0	123,7 ± 1,0	69,0 ± 1,4
Lomeček	103,7 ± 2,0	115,1 ± 0,4	124,0 ± 1,1	77,1 ± 0,2
Poleňka	96,8 ± 0,1	118,6 ± 0,2	108,3 ± 2,8	62,0 ± 3,4

Na Obr. 4.27. jsou zobrazeny chromatogramy reálných vzorků s přidavkem 200 ppb každé specie a pro porovnání je přiložen chromatogram obsahující mobilní fázi s přidavkem 200 ppb každé specie. Ve vzorcích z Úhlavy a Lomečku bylo nalezeno více rtuti, než odpovídalo přidanému množství. Vyšší hodnoty mohou být způsobeny také interferencí solí přítomných ve vzorcích. U vzorku Poleňka byla výtěžnost pro HgCl<sub>2</sub> nižší než 100 %. Je možné, že došlo k přeměně části HgCl<sub>2</sub> na MeHg<sup>+</sup>. K tomuto jevu může docházet, jsou - li ve vzorku přítomny methanogenní bakterie. U tohoto vzorku došlo také k rozkladu PhHg<sup>+</sup> na ostatní specie. Nelze přesně určit, v jakém poměru se rozkládá na jednotlivé specie.



**Obr. 4. 27.** Chromatogramy reálných vzorků

$v(Ar) = 60,0 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ ,  $v(\text{NaBH}_4) = 0,6 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ ,  $v(MF) = 0,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ ,  $t = 37,1 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  
 $c(\text{CH}_3\text{COONH}_4) = 30 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ,  $c(\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}) = 0,1 \text{ } \%$  (v/v),  $c(\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8) = 3 \text{ } \%$  (m/v),  
 $c(\text{HCl}) = 0,5 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ,  $v(\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8 + \text{HCl}) = 2,1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ ,  $c(\text{NaBH}_4) = 1 \text{ } \%$  (m/v),  
 $c(\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}) = 40\%$  (v/v),  $V(\text{dávka smyčky}) = 100 \text{ } \mu\text{l}$ ,  $t(\text{kolony}) = 40 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  
 $c(\text{HgCl}_2) = 200 \text{ ppb}$ ,  $c(\text{MeHg}^+) = 200 \text{ ppb}$ ,  $c(\text{EtHg}^+) = 200 \text{ ppb}$ ,  $c(\text{PhHg}^+) = 200 \text{ ppb}$ ,  
 1 -  $\text{Hg}^{2+}$ , 2 -  $\text{MeHg}^+$ , 3 -  $\text{EtHg}^+$ , 4 -  $\text{PhHg}^+$

Z tohoto obrázku je zřejmé, že přítomnost mobilní fáze způsobuje rozšíření a zaoblení jednotlivých píků. Naopak píky vzorků bez mobilní fáze jsou vyšší a ostřejší. Z tohoto důvodů není možné vyhodnocovat výtěžnost vzorků z výšky píků.

## 5. Závěr

Předkládaná diplomová práce byla zaměřena na chemické generování studené páry rtuti a na speciální analýzu vybraných sloučenin rtuti ( $\text{HgCl}_2$ ,  $\text{MeHg}^+$ ,  $\text{EtHg}^+$  a  $\text{PhHg}^+$ ) pomocí HPLC s využitím atomového absorpčního spektrometru jako detektoru.

V první části byly optimalizovány parametry chemického generování studené páry rtuti. Optimalizovanými parametry byly koncentrace oxidačního činidla, kterým byl  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ , koncentrace  $\text{HCl}$ , průtoková rychlost  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$  a  $\text{HCl}$ , průtoková rychlost  $\text{NaBH}_4$ , průtok nosného plynu (argon) a teplota vyhřívání detekční trubice. Před zapojením separační kolony bylo také hledáno vhodné složení mobilní fáze. Nejprve bylo vybráno správné složení octanového pufru. V této práci byly testovány octan sodný a octan amonný, který se ukázal jako vhodnější pro chemické generování. Dále byla testována koncentrace octanu amonného a pH pufru, koncentrace komplexotvorného činidla (2-merkptoethanol) a typ a koncentrace organické složky. Pro chemické generování se jako nejvhodnější prokázal ethanol, naopak methanol a acetonitril vedly ke snížení signálu. Za optimálních podmínek chemického generování studené páry rtuti byly proměřeny kalibrační závislosti, ze kterých byly zjištěny základní analytické charakteristiky pro jednotlivé specie. Tyto hodnoty zjištěné z výšek a ploch píků byly následně porovnávány.

Ve druhé části diplomové práce byly testovány jednotlivé parametry ovlivňující separační krok jednotlivých specií. Testovanými parametry byly koncentrace pufru, ethanolu a 2-merkptoethanolu, teplota vyhřívání kolony, gradient ethanolu, průtoková rychlost mobilní fáze a nosného plynu a pH pufru. Jelikož nebyla separace jednotlivých specií na použité koloně dostatečná, bylo přistoupeno k testování jiných kolon, z nichž jedna výrazně zlepšovala separační krok. Nevýhodou této kolony bylo dvojnásobné prodloužení doby analýzy.

V poslední části této diplomové práce byly proměřeny v optimalizované aparatuře HPLC - CVG - QTAAS kalibrační závislosti, ze kterých byly zjištěny základní analytické charakteristiky pro jednotlivé specie. Porovnáním těchto hodnot z ploch a výšek píků s parametry získanými Mgr. Ondřejem Linhartem pro UV - fotochemické generování studené páry rtuti ve spojení s RP - HPLC bylo zjištěno, že je u chemického generování dosahováno mnohem nižších mezí detekce a stanovitelnosti. Navržená analytická metoda byla otestována na reálných vzorcích vod odebraných v různých tocích

Západních Čech. Při analýze reálných vzorků bylo zjištěno, že dochází k rozkladu  $\text{PhHg}^+$  na sloučeniny, které nebylo možné určit, jelikož nebyly k dispozici standardy těchto sloučenin.

Navržená metoda HPLC - CVG - QTAAS je vhodná pro speciální analýzu rtuti, ale je potřeba se nadále zabývat ještě určitými parametry. Jelikož není separace všech specií dokonalá, je potřeba vyzkoušet kolonu s menší velikostí částic. Dále je také potřeba se zaměřit na identifikaci sloučenin, na které se rozkládá  $\text{PhHg}^+$ , jelikož může rozklad této specie vést k mylnému vyhodnocení množství ostatních specií rtuti.

## Použitá literatura

1. Ozuah, P. O.: Mercury Poisoning, Curr Probi Pediatr, New York (2000)
2. Greenwood, N. N.; Earnshaw, A.: Chemistry of the elements, Second Edition, University of Leeds, Butterworth Heinemann, Oxford (1998)
3. Fišerová, A.: Anorganická chemie, Univerzita Jana Evangelisty Purkyně v Ústí nad Labem - Přírodovědecká fakulta, Ústí nad Labem (2012)
4. Houserová, P.; Janák, K.; Kubáň, P.; Pavlíčková, J.; Kubáň, V.: Chemické formy rtuti ve vodních ekosystémech - vlastnosti, úrovně, koloběh a stanovení, Chemické listy, **100**, 862 - 876 (2006)
5. Pirrone, N.; Cinnirella, S.; Feng, X.; Finkelman, R. B.; Friedli, H. R.; Leaner, J.; Mason, R.; Mukherjee, A. B.; Stracher, G. B.; Streets, D. G.; Telmer, K.: Global mercury emissions to the atmosphere from antropogenic and natural sources, Atmospheric Chemistry and Physics, **10**, 5951 - 5964 (2010)
6. Harrington, Ch. F.: The speciation of mercury and organomercury compounds by using high - performance liquid chromatography, Trends in analytical chemistry, **19**, nos. 2 + 3 (2000)
7. Černá, M.: Opatření mezinárodních institucí a České republiky k omezování rizika znečišťování životního prostředí rtutí, Chemické listy, **98**, 916 - 921 (2004)
8. Kameníček, J.; Šindelář, Z.; Pastorek, R.; Kašpárek, F.: Anorganická chemie, Univerzita Palackého v Olomouci - Přírodovědecká fakulta, Olomouc (2009)
9. Fara, M.: Specifika emisí rtuti ze zdrojů znečišťování ovzduší vzhledem k potřebám modelů rozptylu znečištění v ovzduší a posuzování potenciálních rizik v životním prostředí, Projekt Ministerstva životního prostředí VaV 740/4/03, Praha (2004)
10. Risher, J.; DeWoskin, R.: Toxicological profile for mercury, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Georgia (1999)
11. Leopold, K.; Foulkes, M.; Worsfold, P.: Methods for the determination and speciation of mercury in natural waters - A review, Analytica Chimica Acta, **663**, 127 - 138 (2010)
12. World Health Organization: Elemental mercury and inorganic mercury compounds: human health aspects, Geneva (2003)



13. Sanchez Uria, J. E.; Sanz - Medel, A.: Inorganic and methylmercury speciation in environmental samples, *Talanta*, **47**, 509 - 524 (1998)
14. Flores, É. L. M.; Paniz, J. N. G.; Flores, É. M. M.; Pozebon, D.; Dressler, V. L.: Mercury speciation in Urban Landfill Leachate by cold vapour generation atomic absorption spectrometry using ion exchange and amalgamation, *J. Braz. Chem. Soc.*, Vol. 20, No. 9, 1659 - 1666 (2009)
15. Segall, L.: Trends in mercury use in products: Summary of the interstate mercury education & reduction clearinghouse (IMERC) mercury - added products database, Northeast Waste Management Officials' Association (NEWMOA)/IMERC (2008)
16. Prchal, V.; Vyskočil, V.; Daňhel, A.; Barek, J.; Wang, J.: Využití visící rtuťové kapkové elektrody modifikované oktan - 1 - thiolem ve voltametrické analýze genotoxických environmentálních polutantů, *Chemické listy*, **105**, 217 - 224 (2011)
17. Tuček, M.; Bencko, V.; Krýsl, S.: Zdravotní rizika rtuti ze zubních amalgámů, *Chemické listy*, **101**, 1038 - 1044 (2007)
18. Lourie, B.: Mercury in the environment a primer, Pollution Probe, Toronto (2003)
19. Gustaitis, M. A.; Lazareva, E. V.; Bogush, A. A.; Shuvaeva, O. V.; Scherbakova, I. N.; Polyakova, E. V.; Badmaeva, Zh. O.; Anoshin, G. N.: Distribution of mercury and its species in the zone of sulfide mailing, *Doklady Earth Science*, Vol. 432, Part 2, 778 - 782 (2010)
20. Valavanidis, A.; Vlachogianni, T.: Metal pollution in ecosystems. Ecotoxicology studies and risk assessment in the marine environment, Department of chemistry, University of Athens, Athens (2010)
21. Kitowski, I.; Kowalski, R.; Komosa, A.; Lechowski, J.; Grzywaczewski, G.; Scibior, R.; Pitucha, G.; Chapowicki, M.: Diversity of total mercury concentrations in kidneys of birds from eastern Poland, *Ekológia*, **31**, 12 - 21 (2012)
22. Kafka, Z.; Punčochářová, J.: Těžké kovy v přírodě a jejich toxicita, *Chemické listy*, **96**, 611 - 617 (2002)
23. Boening, D. W.: Ecological effects, transport, and fate of mercury: a general review, *Chemosphere*, **40**, 1335 - 1351 (2000)

24. Zahir, F.; Rizwi, S. J.; Haq, S. K.; Hkan, R. H.: Low dose mercury toxicity and human health, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **20**, 351 - 360 (2005)
25. Ursinyova, M.; Uhnakova, I.; Serbin, R.; Masanova, V.; Husekova, Z.; Wsolova, L.: The relation between human exposure to mercury and toroid hormone status, *Biol. Trace Elem. Res.*, **148**, 281 - 291 (2012)
26. Magos, L.; Clarkson, T. W.: Overview of the clinical toxicity of mercury, *Annals of Clinical Biochemistry*, **43**, 257 - 268 (2006)
27. Holmes, P.; James, K. A. F.; Levy, L. S.: Is low - level environmental mercury exposure of concern to human health?, *Science of the Total Environment*, **408**, 171 - 182 (2009)
28. Boffetta, P.; Merler, E.; Vainio, H.: Carcinogenicity of mercury and mercury compounds, *Scand J Work Environ Health*, **19**, 1 - 7 (1993)
29. Guallar, E. et al.: Mercury, fish oils, and the risk of myocardial infarction, *N Engl J Med*, Vol. 347, No. 22, 1747 - 1754 (2002)
30. Wright, B.; Pearce, H.; Allgar, V.; Miles, J.; Whitton, C. et al.: A comparison of urinary mercury between children with autism spectrum disorders and control children, *PLoS ONE*, **7**, 1 - 6 (2012)
31. Castoidi, A. F.; Coccini, T.; Ceccatelli, S.; Marizo, L.: Neurotoxicity and molecular effects of methylmercury, *Brain Research Bulletin*, **55**, 197 - 203 (2001)
32. Gochfeld, M.: Cases of mercury exposure, bioavailability, and absorption, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **56**, 174 - 179 (2003)
33. Száková, J.; Koliňová, D.; Miholová, D.; Mader, P.: Single - purpose atomic absorption spectrometr AMA - 254 for mercury detremination and its performance anaylsis of agricultural and environmental materials, *Chemical Papers*, **58**, 311 - 315 (2004)
34. Khoshnamvand, M; Kaboodvandpour, S.; Ghiasi, F.: A comparative study of accumulated total mercury among white muscle, red muscle and liver tissues of common car pand silver carp from the Sanandaj Gheshlagh in Iran, *Chemosphere*, **90**, 1236 - 1241 (2013)
35. Houserová, P.; Hedbávný, J.; Matějčíček, D.; Kráčmar, S.; Sitko, J.; Kubáň, V.:

- Determination of total mercury in muscle, intestines, liver and kidney tissues of cormorant (*Phalacrocorax carbo*), great grebe (*Podiceps cristatus*) and Eurasian buzzard (*Buteo buteo*), *Vet. Med. - Czech*, **50**, 61 - 68 (2005)
36. Koplík, R.; Čurdová, E.; Mestek, O.: Speciace stopových prvků ve vodách, půdách, sedimentech a biologických materiálech, *Chemické listy*, **91**, 38 - 47 (1997)
37. Gao, Y.; Shi, Z.; Long, Z.; Wu, P.; Zheng, Ch.; Hou, X.: Determination and speciation of mercury in environmental and biological samples by analytical atomic spectrometry, *Microchemical Journal*, **103**, 1 - 14 (2012)
38. Vieira, M. A.; Grinberg, P.; Bobeda, C. R. R.; Reyes, M. N. M.; Campos, R. C.: Non - chromatographic atomic spectrometric methods in speciation analysis: A review, *Spectrochimica Acta Part B*, **64**, 459 - 476 (2009)
39. Gonzalez, A.; Cervera, M. L.; Armenta, S.; de la Guardia, M.: A review of non - chromatographic methods for speciation analysis, *Analytica Chimica Acta*, **636**, 129 - 157 (2009)
40. Gonzalez, A.; Armenta, S.; Cervera, M. L.; de la Guardia, M.: Non - chromatographic speciation, *Trends in Analytical Chemistry*, **29**, 260 - 268 (2010)
41. Castillo A.; Roig - Navarro, A. F.; Pozo, O. J.: Method optimization for the determination of four mercury species by micro - liquid chromatography - inductively coupled plasma mass spectrometry coupling in environmental water samples, *Analytica Chimica Acta*, **577**, 18 - 25 (2006)
42. Mališová, K.; Mestek, O.: Příprava vzorků biologického původu pro speciální analýzu rtuti pomocí plynové a kapalinové chromatografie, *Chemické listy*, **106**, 1034 - 1041 (2012)
43. Leermakers, M.; Baeyens, W.; Quevauviller, P.; Horvat, M.: Mercury in environmental samples: Speciation, artifacts and validation, *Trends in Analytical Chemistry*, **24**, 383 - 393 (2005)
44. Červený, V.; Rychlovský, P.; Hraníček, J.; Šíma, J.: Elektrochemické generování těkavých sloučenin pro potřeby spektrálních analytických metod, *Chemické listy*, **103**, 652 - 660 (2009)
45. Denkhaus, E.; Beck, F.; Bueschler, P.; Gerhard, R.: Electrolytic hydrid generation atomic absorption spectrometry for the determination of antimony, arsenic,

- selenium, and tin - mechanistic aspects and figures of merit, *Fresenius J. Anal. Chem.*, **370**, 735 - 743 (2001)
46. Dressler, V. L.; Marques Moreira Santos, C.; Goldschmidt Antes, F.; Stum Bentlin, F. R.; Pozebon, D.; Moraes Flores, E. M.: Total mercury, inorganic mercury and methyl mercury determination in red wine, *Food Anal. Methods*, **5**, 505 - 511 (2012)
47. Komárek, J.: *Atomová absorpční spektrometrie*, Masarykova univerzita v Brně, Brno (2004)
48. Ramalhosa, E.; Rio Segade, S.; Pereira, E.; Vale, C.; Duarte, A.: Simple methodology for methylmercury and inorganic mercury determinations by high - performance liquid chromatography - cold vapour atomic fluorescence spectrometry, *Analytica Chimica Acta*, **448**, 135 - 143 (2001)
49. Wu, L.; Long, Z.; Liu, L.; Zhou, Q.; Lee, Y.; Zheng, Ch.: Microwave - enhanced cold vapor generation for speciation analysis of mercury by atomic fluorescence spectrometry, *Talanta*, **94**, 146 - 151 (2012)
50. Rio - Segade, S.; Bendicho, C.: On - line high - performance liquid - chromatographic separation and cold vapor atomic absorption spectrometric determination of methylmercury and inorganic mercury, *Talanta*, **48**, 477 - 484 (1999)
51. da Silva, D. G.; Portugal, L. A.; Serra, A. M.; Ferreira, S. L. C.; Cerdá, V.: Determination of mercury in rice by MSFIA and cold vapour atomic fluorescence spectrometry, *Food Chemistry*, **137**, 159 - 163 (2013)
52. Guo, X.; Sturgeon, R. E.; Mester, Z.; Gardner, G. J.: UV Vapour generation for determination of selenium by heated quartz tube atomic absorption spectrometry, *Analytical Chemistry*, **75**, 2092 - 2099 (2003)
53. Sturgeon, R. E.; Luong, V.: Photo - and thermo - chemical vapor generation of mercury, *J. Anal. At. Spectrom.*, **28**, 1610 - 1619 (2013)
54. Eckschlager, K.; Kozubek, E.: *Chemometrie*, Vysoká škola báňská - Technická univerzita Ostrava, Ostrava (2008)
55. Pohanka, M.: *Základy statistiky laboratorních experimentů*, Vojenské zdravotnické listy, ročník LXXIX, **2**, 60 - 63 (2010)