Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta
Katedra analytické chemie

Doktorský studijní program: Analytická chemie

Autoreferát disertační práce

Vývoj instrumentace a metodologie pro prvkovou a speciační analýzu arsenu založenou na generování hydridů a na detekci atomovou fluorescenční spektrometrií

Mgr. Karel Marschner

Školitel: prof. RNDr. Jiří Dědina, CSc., DSc.
Školitel-konzultant: RNDr. Stanislav Musil, Ph.D.
Doc. RNDr. Petr Rychlovský, CSc.

Praha, (2017)

Tato disertační práce vznikla za finanční podpory Grantové agentury České republiky (projekty: 14-23532S a 17-04329S), Ústavu analytické chemie Akademie Věd České republiky, v. v. i. (projekt RVO: 68081715), Ministerstva školství mládeže a tělovýchovy (program Kontakt II, projekty: LH12040 and LH15174) a Univerzity Karlovy (projekt SVV).

Tato disertační práce byla vypracována na detašovaném pracovišti Ústavu analytické chemie Akademie Věd České republiky, v. v. i., detašované pracoviště – oddělení stopové prvkové analýzy, Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4.

Obsah

Seznam zkratek a symbolů ... - 4 -
Abstrakt (CZ) ... - 5 -
1 Úvod ... - 6 -
2 Cíle práce ... - 8 -
3 Materiál a metodika ... - 9 -
3.1 Přístroje ... - 9 -
3.2 Chemikálie ... - 9 -
3.3 Hydridové generátory ... - 10 -
3.3.1 Uspořádání průtokové injekční analýzy ... - 10 -
3.3.2 Dávkové uspořádání ... - 10 -
3.4 Atomizátor ... - 11 -
4 Výsledky a diskuse ... - 12 -
4.1 Optimalizace podmínek generování v uspořádání průtokové injekční analýzy ... - 12 -
4.2 Postkolonové generování hydridů pro speciační analýzu arsenu ... - 12 -
4.3 Generování neodpovídajících substituovaných arsanů ... - 13 -
4.4 Generování arsanu z arsenocukrů ... - 15 -
5 Závěr ... - 17 -
6 Použitá literatura ... - 18 -
Curriculum vitae ... - 22 -
Seznam publikací ... - 23 -

Seznam zkratek a symbolů

AFS	atomová fluorescenční spektrometrie
As-sugar-gly	3-[5'-deoxy-5'-(dimethylarsinoyl)-β-ribofuranosyloxy]-2-hydroxypropylenglykol
As-sugar-PO_4	3-[5'-deoxy-5'-(dimethylarsinoyl)-β-ribofuranosyloxy]-2-hydroxypropyl 2,3-hydroxypropylfosfát
As-sugar-SO_3	3-[5'-deoxy-5'-(dimethylarsinoyl)-β-ribofuranosyloxy]-2-hydroxypropansulfonová kyselina
As-sugar-SO_4	3-[5'-deoxy-5'-(dimethylarsinoyl)-β-ribofuranosyloxy]-2-hydroxypropylhydrogensulfát
CD	vzdálenost kapiláry
CT	kryogenní past
DIW	deionizovaná voda
$DMAs^V$	dimethylarseničnan
EDL	bezelektrodová výbojka
FIGS	flame-in-gas shield atomizátor
GLS	separátor fází
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HG	generování hydridů
i.d.	vnitřní průměr
iAs^{III}	arsenitan
iAs^V	arseničnan
ICP-MS	hmotnostní spektrometr s indukčně vázaným plazmatem
L-cys	L-cystein
LOD	mez detekce
MAs^V	methylarseničnan
MDF	miniaturní difúzní plamen
OH	pozorovací výška
PP1/PP2	peristaltické čerpadlo
RC	reakční cívka
THB	tetrahydridoboritan
$TMAs^VO$	oxid trimethylarseničný

Abstrakt (CZ)

Předkládaná disertační práce je zaměřena na speciační analýzu arsenu pomocí generování hydridů s detekcí atomovou fluorescenční spektrometrií.

Generování hydridů z toxikologicky závažných sloučenin arsenu bylo optimalizováno tak, aby bylo dosaženo 100% účinnosti. Toto experimentální uspořádání bylo následně využito pro speciační analýzu arsenu v lidské moči pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s detekcí atomovou fluorescenční spektrometrií. Přesnost vyvinuté metody byla ověřena pomocí analýz vzorků lidské moči, shromážděných od pěti jedinců, srovnáním s nezávislou referenční metodou.

Detailně byl studován vliv reakce tetrahydridoboritanu v kyselém prostředí na přerušení As–C vazby u methylovaných sloučenin arsenu. Výrazná demethylace byla pozorována v prostředí HCl, H_2SO_4 a $HClO_4$, zatímco během generování hydridů z prostředí CH_3COOH nebo TRIS pufru po předredukci L-cysteinem žádná demethylace pozorována nebyla. Tento jev ohrožuje přesnost speciační analýzy arsenu, která je založena na generování substituovaných arsanů. Na druhou stranu ale umožňuje generovat arsany z mnohem složitějších sloučenin arsenu, což bylo demonstrováno generováním těkavých arsanů z arsenocukrů.

Klíčová slova: Arsen, specie arsenu, atomová fluorescenční spektrometrie, generování hydridů.

1 Úvod

Stanovení arsenu a jeho specií je nezbytné z důvodu jejich zastoupení v přírodě a jejich vlivu na lidské zdraví. Nejvíce toxické jsou anorganické specie, arsenitan (iAs^{III}) a arseničnan (iAs^{V}). V případě savců jsou anorganické formy postupně metabolizovány na methylové specie, methylarseničnan (MAs^{V}), dimethylarseničnan ($DMAs^{V}$) a oxid trimethylarseničný ($TMAs^{V}O$), které se vyznačují mnohem nižší toxicitou.[1,2,3,4] Z tohoto důvodu není informace o celkovém obsahu arsenu dostačující.

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) ve spojení s hmotnostním spektrometrem s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS) je robustní a nejpoužívanější metoda pro speciační analýzu arsenu.[5] Selektivita a citlivost může být zvýšena, pokud se využije chemické generování hydridů (HG) k zavádění vzorku do ICP-MS v plynném skupenství, pomocí reakce okyseleného vzorku s roztokem tetrahydridoboritanu (THB). To také umožňuje nahradit ICP-MS detektor atomovým fluorescenčním detektorem (AFS). Spojení HPLC–HG–AFS poté dosahuje srovnatelných, či dokonce nižších mezí detekce (LOD) než HPLC–ICP-MS.[6] Toto postkolonové HG může být využito pouze pro stanovení specií, které lze reakcí převést na těkavé hydridy [iAs^{III}, iAs^{V}, MAs^{V}, $DMAs^{V}$, $TMAs^{V}O$ a arsenocukry (přestože účinnost generování z nich je nízká)]. Tuto nevýhodu lze ale odstranit zařazením on-line mineralizačního kroku, to ale vede k příliš komplikovanému uspořádání a také k horšímu chromatografickému rozlišení.[7,8,9,10,11]

Mimo postkolonového HG existují ještě další dva přístupy ke speciační analýze založené na HG: selektivní HG a generování substituovaných hydridů. Selektivní HG je založené na rozdílné účinnosti konverze jednotlivých specií na hydrid, např. generování trojmocných a pětimocných specií arsenu silně závisí na pH. V silně kyselém prostředí se arsan tvoří jak z iAs^{III}, tak i z iAs^{V}, zatímco při vyšším pH vzniká arsan pouze z iAs^{III}.[12,13,14] Jiný příklad rozdílné účinnosti konverze na hydrid využil Musil *et al.*,[15] který použil HCl o vysoké koncentraci k potlačení generování z methylovaných specií (hlavně $DMAs^{V}$), a tedy k selektivnímu stanovení anorganických specií (iAs^{III} + iAs^{V}). Hlavní výhodou selektivního HG je, že nepotřebuje žádnou další instrumentaci ani změnu experimentálního uspořádání.[16]

Generování substituovaných hydridů lze použít v případech, kdy jednotlivé specie jsou převedeny na různé alkyl substituované hydridy, např. iAs^{III} a iAs^{V} jsou převedeny na AsH_3, MAs^{V} je převeden na CH_3AsH_2, $DMAs^{V}$ je převeden na $(CH_3)_2AsH$ a $TMAs^{V}O$ je převeden na $(CH_3)_3As$. Vygenerovaná směs arsanů je poté zakoncentrována kolekcí vymrazováním v kryogenní pasti (CT). Následně po skončení generování jsou arsany

postupně uvolněny na základě rozdílných teplot varu.[17,18,19,20,21,22] Teploty varu pro arsan, methylarsan, dimethylarsan a trimethylarsan jsou následující –55, 2, 36 a 70 °C. Tento explicitní vztah mezi hydridově aktivní specií a výsledným hydridem, např. mezi MAs^{V} a CH_3AsH_2, je nezbytnou podmínkou pro zajištění přesných výsledků speciační analýzy. Doposud se předpokládalo, že reakce HG je selektivní, nedochází k přerušení As–C vazby (u methylovaných specií), a že jsou jednotlivé specie převedeny pouze na odpovídající arsany.[23]

2 Cíle práce

Předkládaná disertační práce obsahuje výsledky obsažené ve třech odborných článcích (dva již byly publikovány a jeden je v recenzním řízení) zveřejněných v prestižních časopisech zaměřených na atomovou spektrometrii a analytickou chemii. Disertační práce je zaměřena na speciační analýzu arsenu založenou na generování hydridů a představuje významný pokrok v této oblasti.

Teoretická část stručně pojednává o toxicitě arsenu a jeho specií, dále pak o generování těkavých specií pro potřeby analytické atomové spektrometrie. Důraz je zvláště kladen na chemické generování hydridů pomocí reakce hydridotvoroného prvku (zvláště arsenu) s tetrahydridoboritanem v kyselém prostředí a na detekci atomovou fluorescenční spektrometrií s atomizací v plamenových atomizátorech

Cíle disertační práce lze shrnout následovně:

1) Vyvinout generátor hydridů, který je schopen převést kvantitativně čtyři arsenové specie (anorganické a methylové) na plynné arsany, bez jakéhokoliv kroku předredukce.
2) Spojit vyvinutý hydridový generátor (z bodu 1) s vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií a toto spojení využít pro speciační analýzu arsenu v reálných vzorcích.
3) Studovat mechanismus přerušení As–C vazby během reakce tetrahydridoritanu v kyselém prostředí s methylovými sloučeninami arsenu.
4) Studovat možnosti generování arsanů z komplexnějších sloučenin arsenu (arsenocukry).

3 Materiál a metodika

3.1 Přístroje

Laboratorně sestavený atomový fluorescenční spektrometr byl použit při všech atomově fluorescenčních měřeních. Přístroj vybaven bezelektrodovou výbojkou (EDL, systém 2, Perkin-Elmer, USA). Napájecí proud pro EDL byl 340 mA a byl pulzně šířkově modulován (50 %) s frekvencí 40 Hz. Záření z EDL bylo zaostřeno nad vertikální osu atomizátoru pomocí bikonvexní křemenné čočky (průměr 50 mm s ohniskovou vzdáleností 42 nm při 193 nm). V kolmém směru bylo pomocí dalších dvou plankonvexních čoček (o průměrech 17 a 22 mm, obě s ohniskovou vzdáleností 21 mm při 193nm) zaostřeno fluorescenční záření z atomizátoru na interferenční filtr (193 nm, šířka v polovině maxima 18.7 nm, CVI Melles Griot, USA) a detekováno fotonásobičem (PMT-MH 1922, 165–320 nm, Perkin-Elmer Optoelectronics, USA)

HPLC–ICP-MS měření byla prováděna pomocí HPLC systému Agilent 1200 (USA) připojeného k Agilent 7700x ICP-MS (USA).

MS^2 spektra sloučenin arsenu byla zaznamenána pomocí HCT-Ultra ETD II hmotnostního spektrometru (Bruker, USA) s ionizací elektrosprejem (napětí na konci kapiláry 102.3 V) v pozitivním módu.

3.2 Chemikálie

Deionizovaná voda (DIW, <0,2 μS cm^{-1}, Ultrapur, Watrex, USA) byla použita pro přípravu veškerých roztoků. Zásobní roztok iAs^V o koncentraci 1000 mg As L^{-1} (Merck, Německo) byl použit pro přípravu pracovních roztoků. Zásobní roztoky iAs^{III}, MAs^V, $DMAs^V$ a $TMAs^VO$ o koncentraci 1000 mg As L^{-1} byly připraveny rozpuštěním následujících chemikálií v DIW: As_2O_3 (Lachema, Česká republika); $Na_2CH_3AsO_3{\cdot}6H_2O$ (Chem. Service, USA); $(CH_3)_2As(O)OH$ (Strem Chemicals, Inc., USA); $(CH_3)_3AsO$ byl získán od Dr. Williama Cullena (University of British Columbia, Kanada). Roztok THB byl připravován každodenně z $NaBH_4$ (Fluka, Německo) v 0.1% KOH (Lach-Ner, Česká republika). HCl (p.a., Merck, Německo), H_2SO_4 (Merck, Německo), $HClO_4$ (p.a., Merck, Německo), HNO_3 (Sigma-Aldrich, Německo), CH_3COOH (Lachema, Česká republika) a tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS) pufr byl použit pro HG. TRIS pufr byl připraven z Trizma® hydrochlorid (Sigma, Německo) - pH bylo upraveno na hodnotu 6,00 pomocí

roztoku KOH (Lach-Ner, Česká republika). L-cystein (L-cys) hydrochlorid monohydrát (Merck, Německo) pro předredukci specií arsenu byl přidán ke standardům/vzorkům minimálně 1 h před analýzou. Mobilní fáze pro iontově párovou chromatografii:4.7 mmol l^{-1} tetrabutylammonium hydroxid (Fluka, Německo), 2 mmol l^{-1} kyselina malonová (Sigma-Aldrich, Německo) v 4% methanolu (Sigma-Aldrich, Německo), pH upraveno na 5,85 pomocí roztoku KOH. Mobilní fáze pro aniontově výměnou chromatografii: 20 mmol l^{-1} fosfátového pufru (připraveného z KH_2PO_4 (Merck, Německo) a K_2HPO_4 (Xenon Lodz, Polsko)), pH bylo upraveno na hodnotu 6,00 pomocí roztoku KOH. Pevné 3 mm perličky NaOH (Lach-Ner, Česká republika) byly použity jako plnivo pro sušicí trubici.[24]

3.3 Hydridové generátory

V této práci byly použity dva základní typy hydridového generátoru: dávkový a průtoková injekční analýza.

3.3.1 Uspořádání průtokové injekční analýzy

V experimentálním uspořádání průtokové injekční analýzy byla použita dvě peristaltická čerpadla (PP1 a PP2). Standard arsenu byl dávkován do kanálu s DIW a poté smíchán s proudem kyseliny (případně pufru), následně smíchán s roztokem THB a vzniklá směs reagovala v reakční cívce (RC). V separátoru fází (GLS) byla oddělena plynná a kapalná fáze. Z GLS byla plynná fáze vymývána nosným argonema po průchodu sušicí byla smíchána s dalšími plamenovými plyny (argon a vodík) a odvedena do atomizátoru. Kapalná fáze byla odčerpávána do odpadu pomocí PP2.

V případě postkolonového HG byl kanál s DIW nahrazen výstupem z HPLC. Pokud je výslovně uvedeno, roztok THB byl zaváděn dvěma kanály. První kanál roztoku THB byl míchán s okyseleným standardem a následovala první RC, poté byl přiveden roztok THB druhým kanálem a následovala druhá RC. Směs poté pokračovala do GLS.

3.3.2 Dávkové uspořádání

V dávkovém uspořádání byl nejprve do GLS načerpán standard a kyselina pomocí PP1. Nosný plyn (argon nebo helium) byl vháněn do kanálu s kyselinou, který byl zaveden na dno GLS tak, aby nosný plyn procházel reakční směsí. Roztok THB byl čerpán pomocí

PP2 a zaveden na dno GLS. Jiným kanálem zavedeným také až na dno GLS byla odsávána kapalné fáze po skončení generování. Poté byl GLS vypláchnout DIW, která byla přivedena manuálně injekční stříkačkou spojenou (T-spojem) s kanálem pro kyselinu.

Pokud je výslovně uvedeno, roztok THB byl míchán s dalším kanálem kyseliny čerpané pomocí PP2. Roztok THB byl poté částečně hydrolyzován v hydrolyzační cívce (HC). Výstup z GLS byl spojen se sušicí trubicí.

Dávkový generátor mohl pracovat dvěma způsoby: v přímém přenosu nebo v kolekčním módu. V metodě přímého přenosu (nosný plyn je argon) byl výstup ze sušicí trubice spojen s plamenovými plyny a pokračoval dále do atomizátoru. V kolekčním módu byl výstup ze sušicí trubice spojen s CT a nosný plyn byl helium.

3.4 Atomizátor

V této práci byl použit miniaturní difúzní plamen (MDF) jako atomizátor. MDF se skládá z vertikální křemenné trubice [6 mm vnitřní průměr (i.d). a 8,5 mm vnější průměr (o.d.)] s bočním přívodem (2 mm i.d. a 3,75 mm o.d.), který sloužil pro přívod plynů.

4 Výsledky a diskuse

4.1 Optimalizace podmínek generování v uspořádání průtokové injekční analýzy

Byly optimalizovány podmínky HG pro iAs^{III}, iAs^{V}, MAs^{V} a $DMAs^{V}$ tak, aby bylo v uspořádání průtokové injekční analýzy dosaženo stejné účinnosti generování pro všechny specie bez předredukce. Byly optimalizovány všechny relevantní parametry HG, tj. koncentrace HCl (ovlivňuje pH reakční směsi), koncentrace roztoku THB a objem reakční cívky (ovlivňuje čas reakce). Optimální koncentrace HCl a roztoku THB byly 2 mol l^{-1} a 2,5%. Bylo zjištěno, že optimální objem RC je 8,9 ml.

Za předpokladu, že iAs^{III} se v optimalizované aparatuře generuje s účinností 100 %,[25] účinnosti HG pro iAs^{V}, MAs^{V} a $DMAs^{V}$ jsou 100 ± 1 %, 103 ± 2 % a 100 ± 2 %. Doposud v literatuře nebyl popsán takový generátor hydridů, který by v uspořádání průtokové injekční analýzy převedl iAs^{III}, iAs^{V}, MAs^{V} a $DMAs^{V}$ na těkavé arsany se stejnou účinností (z prostředí kyseliny, bez jakékoliv předredukce).

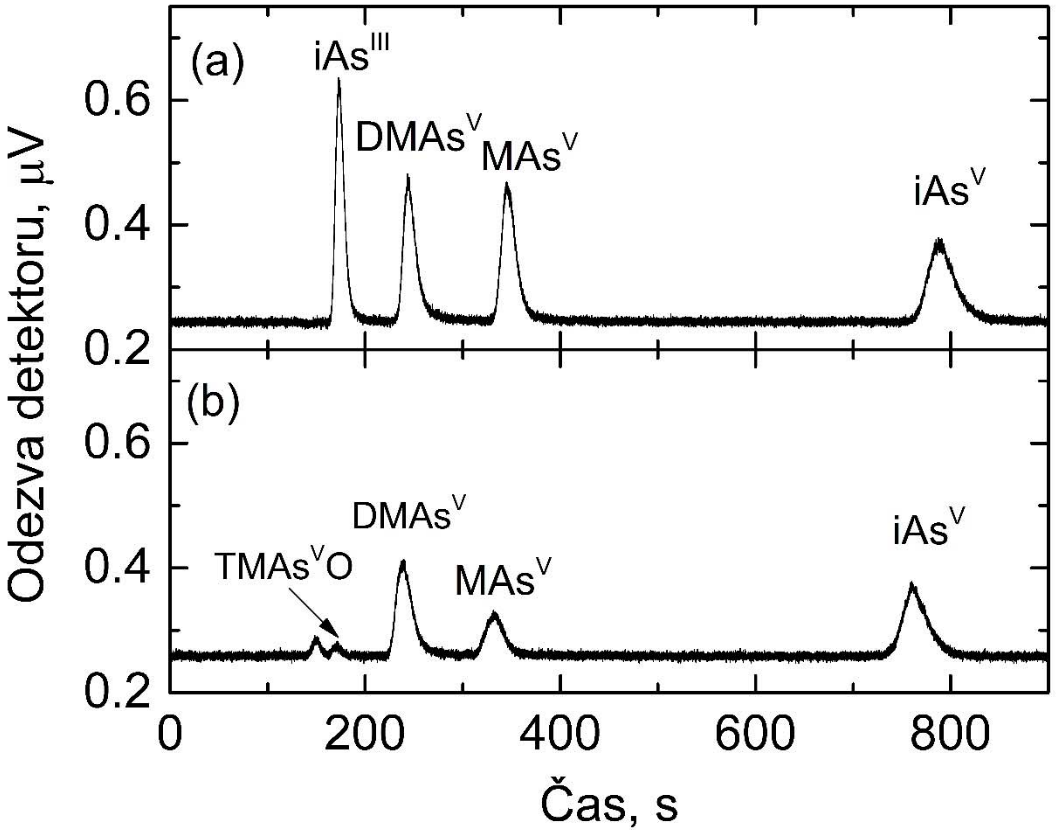
4.2 Postkolonové generování hydridů pro speciační analýzu arsenu

Nově sestrojený generátor hydridů (viz 4.1) byl připojen k HPLC. Separace specií arsenu z vodných standardů byla úspěšná jak pro iontově párovou, tak i pro aniontově výměnnou chromatografii. Nicméně v případě analýzy reálných vzorků (moči) pomocí iontově párové chromatografie chromatografická separace jednotlivých specií nedostatečná. Aby byly potlačeny matriční efekty, vzorek musel být desetkrát naředěn. Naopak v případě aniontově výměnné chromatografie bylo dosaženo dostatečného chromatografického rozlišení pro jednotlivé specie i pro neředěné vzorky (obr. 1).

Jelikož účinnost HG byla 100 % pro všechny formy, citlivost (vyjádřená pomocí plochy píku) byla pro všechny specie stejná. Relativní hodnota směrnice byla pro iAs^{III}, iAs^{V} a MAs^{V} 99 ± 2 %, 102 ± 4 % a 100 ± 3 %, když byla citlivost $DMAs^{V}$ zvolena jako referenční hodnota. Díky tomu bylo možné kvantifikovat ostatní specie pomocí kalibrace pro $DMAs^{V}$.

Absolutní LOD pro iAs^{III}, iAs^{V}, MAs^{V}, and $DMAs^{V}$ byly 2,0; 4,8; 2,9 a 2,8 pg As. Tyto LOD jsou mnohem nižší než doposud publikované pro HPLC−HG−AFS instrumentaci[26,27,28] a jsou srovnatelné s HPLC−ICP-MS (typicky od 0.3 do 24 pg As).[29] Přesnost vyvinuté metody byla ověřena analýzou standardního referenčního materiálu

(NIST 2669, úroveň I arsenové specie v zmrzlé lidské moči) a pomocí analýzy pěti reálných vzorků lidské moči referenční metodou HG–CT–AFS.



Obr. 1 HPLC–HG–AFS chromatogram (a) smíšeného standardu specií arsenu v DIW (5 ng ml^{-1} každé specie), (b) standardního referenčního materiálu moči (NIST 2669 úrověň 1) s 3% H_2O_2; aniontově výměnná chromatografie s kolonou PRP-X100. Převzato a upraveno se svolením z Marschner, K. *et al. Analytical Chemistry*, **88**, 4041−4047 (2016). Copyright 2016 American Chemical Society.

4.3 Generování neodpovídajících substituovaných arsanů

V dávkovém uspořádání bylo studováno generování neodpovídajících těkavých arsanů (s nižším stupněm methylace) při HG methylovaných specií arsenu (MAs^{V}, DMAs^{V} a TMAs^{V}O) v kyselém prostředí za analytických podmínek. Zvláštní důraz byl kladen na generování z prostředí HCl, které je nejčastěji využíváno pro HG.[30]

Závislost demethylace (generování methylsubstituovaných arsanů s menším počtem

methylových skupin než výchozí specie) pro MAs^V, $DMAs^V$ a $TMAs^VO$ byla studována v koncentračním rozsahu HCl od 0,05 do 6,0 mol l^{-1}. Použití nižší koncentrace HCl pro generování MAs^V vedlo ke generování vyšší frakce neodpovídacího arsanu (AsH_3) vzniklého na úkor CH_3AsH_2. Při koncentraci 0,05 mol l^{-1} HCl, 28 ± 2 % MAs^V bylo převedeno na AsH_3 místo na CH_3AsH_2. Závislosti pro $DMAs^V$ a $TMAs^VO$ vykazovaly podobný trend jako pro MAs^V. V případě $DMAs^V$ a $TMAs^VO$ bylo až 37 ± 1 % a 50 ± 2 % převedeno na neodpovídající arsany.

Byl také studován vliv demethylace MAs^V, $DMAs^V$ a $TMAs^VO$ na koncentraci roztoku THB v rozmezí 0,25 až 4 %. Maximální hodnoty generování neodpovídajících arsanu pro všechny specie bylo v rozmezí 1 až 2% roztoku THB. Rozsah demethylace byl v pořadí $TMAs^VO > DMAs^V > MAs^V$, což může souviset s počtem As–C vazeb v původní molekule.

Tato pozorování potvrdila, že v prostředí HCl je THB (nebo některý jeho hydrolytický meziprodukt) schopen přerušit As–C vazbu. Hydrolýza THB může být částečně kontrolována, pokud je roztok THB smíchán s roztokem HCl v HC předtím, než je přiveden do GLS. Bylo zjištěno, že částečnou hydrolýzou THB může být demethylace kompletně potlačena.

Demethylace specií arsenu během HG byla také studována pro prostředí $HClO_4$, H_2SO_4, HNO_3, CH_3COOH a TRIS (pH 6,0) pufru po předredukci 2% L-cys. Generování z prostředí $HClO_4$ a H_2SO_4 vedlo k většímu rozsahu demethylace než v případě HCl. Žádná demethylace nebyla pozorována případě generování z prostředí CH_3COOH nebo TRIS pufru po předredukci 2% L-cys. Neobvyklá situace nastala v případě generování z prostředí HNO_3, protože výrazná demethylace byla pozorována pouze v případě $TMAs^VO$, který se demethyloval pouze na $(CH_3)_2AsH$.

Demethylace specií arsenu při HG neohrožuje přesnost speciační analýzy při postkolonovém HG, protože odezva detektoru je nezávislá na methylaci výsledného arsanu. Nicméně přesnost speciační analýzy založené na generování substituovaných arsanů v prostředí HCl je ohrožena demethylací. Tato metoda speciační analýzy s použitím HCl jako reakčního media byla použita v následujících publikovaných pracích.[31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41]

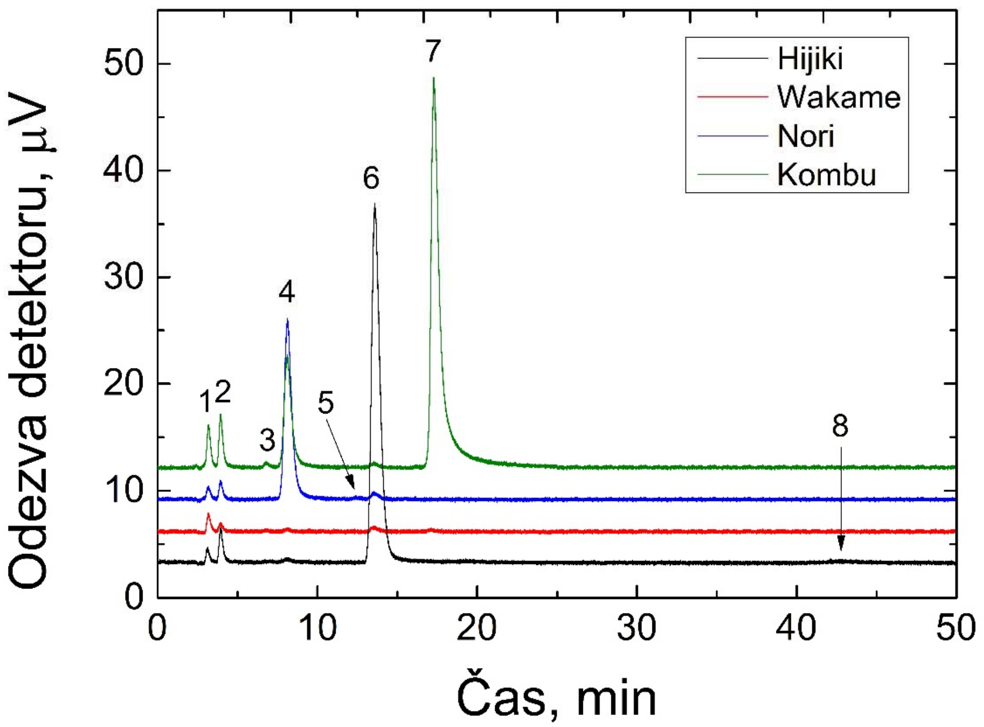
4.4 Generování arsanu z arsenocukrů

Byla studována možnost HG z arsenocukrů s cílem dosáhnout co nejvyšší účinnosti generování a pokud možno použít tuto metodu pro speciační analýzu arsenu pomocí HPLC-HG-AFS.

Nejprve bylo studováno HG z As-sugar-PO_4 (názvy všech arsenocukrů jsou uvedeny v Seznamu zkratek a symbolů) v dávkovém uspořádání a bylo dosaženo nejvyšší účinnosti generování při generování z prostředí 1 mol l^{-1} H_2SO_4 a 1% roztoku THB. Účinnost generování za těchto podmínek dosahovala 68 ± 1 %, zatímco z prostředí 1 mol l^{-1} HCl byla maximální účinnost generování 35 ± 1 %.

Poté byla studována možnost HG z As-sugar-PO_4 v uspořádání průtokové injekční analýzy. Optimální podmínky byly 1,5 mol l^{-1} H_2SO_4 a 1% roztok THB. Za těchto podmínek byla účinnost HG 19 ± 1 %, zatímco při generování z 1,0 mol l^{-1} HCl a 2% roztoku THB byla účinnost HG 16,3 ± 0,2%. Účinnost generování v uspořádání průtokové injekční analýzy byla výrazně nižší než v dávkovém uspořádání. Ke zvýšení účinnosti HG byl zkonstruován nový generátor hydridů (se dvěma přívody roztoku THB). To vedlo ke zvýšení účinnosti HG z As-sugar-PO_4 na 29 ± 3 %.

Tento nový generátor hydridů byl připojen k HPLC a použit pro postkolonové HG (obr. 2). Extrakty mořských řas byly analyzovány metodou HPLC–HG–AFS a porovnáním s HPLC–ICP-MS byla stanovena účinnost HG pro As-sugar-gly, As-sugar-PO_4, As-sugar-SO_3 a As-sugar-SO_4 takto: 13 ± 1 %, 28 ± 2 %, 31 ± 3 % a 17 ± 1 %. Stanovené absolutní LOD byly 41; 9,5; 13 and 19 pg As pro As-sugar-gly, As-sugar-PO_4, As-sugar-SO_3 a As-sugar-SO_4. Tyto LOD jsou srovnatelné s LOD pro HPLC–UV-rozklad–HG–AFS stanovenými jinými autory.[42,43,44]



Obr. 2 HPLC–HG–AFS chromatogram extraktů mořských řas; podmínky HG: 1,5 mol l^{-1} H_2SO_4, dva přívody 1% roztoku THB; 1 – As-sugar-gly, 2 –$DMAs^V$, 3 –MAs^V, 4 – As-sugar-PO_4, 5 – neidentifikovaná specie, 6 – iAs^V, 7 – As-sugar-SO_3, 8 – As-sugar-SO_4

5 Závěr

Předkládaná disertační práce je zaměřena na HG arsenových specií. Přináší signifikantní a doposud nepublikovaný pokrok v oblasti generování hydridů ale také analytickou aplikaci vyvinutých metod. Dva články obsažené v této disertaci byly publikovány v prestižních vědeckých časopisech a jeden článek je v recenzním řízení. Získané výsledky byly také předneseny na vědeckých konferencích a to formou plakátových sdělení (3) nebo přednášek (11). Veškeré cíle definované v úvodu práce byly splněny.

Byl sestrojen generátor v uspořádání průtokové injekční analýzy, který umožnil generovat iAs^{III}, iAs^{V}, MAs^{V} a $DMAs^{V}$ se 100% účinností generování.

Vyvinutý generátor hydridů byl úspěšně použit pro speciační analýzu arsenu ve vzorcích lidské moči pomocí postkolonového generování. Díky získaným stejným účinnostem generování (a tím stejným citlivostem) mohly být všechny čtyři specie kvantifikovány na základě kalibračního grafu jediné z nich. To výrazně zkracuje čas analýzy, který je potřeba pro sestrojení kalibrace. Metoda byla ověřena analýzou standardního referenčního materiálu a srovnávací analýzou reálných vzorků.

Byl detailně studován vliv podmínek HG methylovaných specií arsenu na strukturu výsledného arsanu. Byla pozorována výrazná demethylace u MAs^{V}, $DMAs^{V}$ a $TMAs^{V}O$ během reakce roztoku THB s HCl, H_2SO_4 a $HClO_4$. Výsledky nasvědčují tomu, že demethylace je způsobena specifickými hydrolytickými produkty THB. Tento jev ohrožuje přesnost speciační analýzy arsenu založené na generování substituovaných arsanů.

Na základě předchozích výsledků byla studována možnost generování arsanů z arsenocukrů. Tato možnost byla ověřena a byly optimalizovány experimentální podmínky HG jak v dávkovém uspořádání, tak v uspořádání průtokové injekční analýzy. Jelikož standardy arsenocukrů nejsou komerčně dostupné, nelze prozatím tuto metodu použít na analýzu reálných vzorků. Nicméně stanovené účinnosti HG byly srovnatelné či vyšší než doposud publikované v odoborné literatuře.[45,46]

6 Použitá literatura

1. Hughes, M. F.: Arsenic toxicity and potential mechanisms of action. *Toxicology Letters,* **133**, 1-16 (2002).

2. Hayakawa, T.; Kobayashi, Y.; Cui, X.; Hirano, S.: A new metabolic pathway of arsenite: arsenic-glutathione complexes are substrates for human arsenic methyltransferase Cyt19. *Archives of Toxicology,* **79**, 183-191 (2005).

3. Rehman, K.; Naranmandura, H.: Arsenic metabolism and thioarsenicals. *Metallomics,* **4**, 881-892 (2012).

4. Challenger, F.: Biological Methylation. *Chemical Reviews,* **36**, 315-361 (1945).

5. Francesconi, K. A.; Kuehnelt, D.: Determination of arsenic species: A critical review of methods and applications, 2000-2003. *Analyst,* **129**, 373-395 (2004).

6. Chen, Y. W.; Belzile, N.: High performance liquid chromatography coupled to atomic fluorescence spectrometry for the speciation of the hydride and chemical vapour-forming elements As, Se, Sb and Hg: A critical review. *Analytica Chimica Acta,* **671**, 9-26 (2010).

7. Atallah, R. H.; Kalman, D. A.: On-line photo-oxidation for the determination of organoarsenic compounds by atomic-absorption spectrometry with continuous arsine generation. *Talanta,* **38**, 167-173 (1991).

8. Bin, H.; Gui-bin, J.; Xiao-bai, X.: Arsenic speciation based on ion exchange high-performance liquid chromatography hyphenated with hydride generation atomic fluorescence and on-line UV photo oxidation. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry,* **368**, 803-808 (2000).

9. Howard, A. G.; Hunt, L. E.: Coupled photooxidation-hydride AAS detector for the HPLC of arsenic compounds. *Analytical Chemistry,* **65**, 2995-2998 (1993).

10. Tsalev, D. L.; Sperling, M.; Welz, B.: Speciation determination of arsenic in urine by high-performance liquid chromatography-hydride generation atomic absorption spectrometry with on-line ultraviolet photooxidation. *Analyst,* **123**, 1703-1710 (1998).

11. Tsalev, D. L.; Sperling, M.; Welz, B.: On-line UV-photooxidation with peroxodisulfate for automated flow injection and for high-performance liquid chromatography coupled to hydride generation atomic absorption spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy,* **55**, 339-353 (2000).

12. Anderson, R. K.; Thompson, M.; Culbard, E.: Selective reduction of arsenic species by continuous hydride generation. Part I. Reaction media. *Analyst,* **111**, 1143-1152 (1986).

13. Devesa, V.; Maria Del Razo, L.; Adair, B.; Drobna, Z.; Waters, S. B.; Hughes, M. F.; Styblo, M.; Thomas, D. J.: Comprehensive analysis of arsenic metabolites by pH-specific hydride generation atomic absorption spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry,* **19**, 1460-1467 (2004).

14. Feldman, C.: Improvements in the arsine accumulation-helium glow detector procedure for determining traces of arsenic. *Analytical Chemistry,* **51**, 664-669 (1979).

15. Musil, S.; Pétursdóttir, Á. H.; Raab, A.; Gunnlaugsdóttir, H.; Krupp, E.; Feldmann, J.: Speciation without Chromatography Using Selective Hydride Generation: Inorganic Arsenic in Rice and Samples of Marine Origin. *Analytical Chemistry,* **86**, 993-999 (2014).

16. Dědina, J.: Generation of Volatile Compounds for Analytical Atomic Spectroscopy. In: *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. Meyers, R.A. (ed.). Chichester: John Wiley and Sons Ltd., 2010, p. 1-39.

17. Braman, R. S.; Foreback, C. C.: Methylated Forms of Arsenic in the Environment. *Science,* **182**, 1247-1249 (1973).

18. Howard, A. G.; Salou, C.: Cysteine enhancement of the cryogenic trap hydride AAS determination of dissolved arsenic species. *Analytica Chimica Acta,* **333**, 89-96 (1996).

19. Matoušek, T.; Currier, J. M.; Trojánková, N.; Saunders, R. J.; Ishida, M. C.; Gonzalez-Horta, C.; Musil, S.; Mester, Z.; Stýblo, M.; Dědina, J.: Selective hydride generation-cryotrapping-ICP-MS for arsenic speciation analysis at picogram levels: analysis of river and sea water reference materials and human bladder epithelial cells. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry,* **28**, 1456-1465 (2013).

20. Matoušek, T.; Hernandez-Zavala, A.; Svoboda, M.; Langrová, L.; Adair, B. M.; Drobná, Z.; Thomas, D. J.; Stýblo, M.; Dědina, J.: Oxidation state specific generation of arsines from methylated arsenicals based on L-cysteine treatment in buffered media for speciation analysis by hydride generation-automated cryotrapping-gas chromatography-atomic absorption spectrometry with the multiatomizer. *Spectrochimica Acta, Part B: Atomic Spectroscopy,* **63B**, 396-406 (2008).

21. Musil, S.; Matoušek, T.; Currier, J. M.; Stýblo, M.; Dědina, J.: Speciation Analysis of Arsenic by Selective Hydride Generation-Cryotrapping-Atomic Fluorescence Spectrometry with Flame-in-Gas-Shield Atomizer: Achieving Extremely Low Detection Limits with Inexpensive Instrumentation. *Analytical Chemistry,* **86**, 10422-10428 (2014).

22. Braman, R. S.; Johnson, D. L.; Foreback, C. C.; Ammons, J. M.; Bricker, J. L.: Separation and determination of nanogram amounts of inorganic arsenic and methylarsenic compounds. *Analytical Chemistry,* **49**, 621-625 (1977).

23. D'Ulivo, A.; Dedina, J.; Mester, Z.; Sturgeon, R. E.; Wang, Q. Q.; Welz, B.: Mechanisms of chemical generation of volatile hydrides for trace element determination (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry,* **83**, 1283-1340 (2011).

24. Taurková, P.; Svoboda, M.; Musil, S.; Matoušek, T.: Loss of di- and trimethylarsine on Nafion membrane dryers following hydride generation. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry,* **26**, 220-223 (2011).

25. Van Elteren, J. T.; Das, H. A.; Bax, D.: Radiotracer Examination of Gas-Liquid Separators Used in Arsenic Speciation by Hydride Generation - AAS. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry-Articles,* **174**, 133-144 (1993).

26. Bohari, Y.; Astruc, A.; Astruc, M.; Cloud, J.: Improvements of hydride generation for the speciation of arsenic in natural freshwater samples by HPLC-HG-AFS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry,* **16**, 774-778 (2001).

27. Moreno E.; Cámara, C.; Corns, W. T.; Bryce, D. W.; Stockwell, P. B.: Arsenic speciation in beverages by direct injection-ion chromatography hydride generation atomic fluorescence spectrometry. *Journal of Automated Methods and Management in Chemistry,* **22**, 33-39 (2000).

28. Wei, C.; Liu, J.: A new hydride generation system applied in determination of arsenic species with ion chromatographyGÇôhydride generation-atomic fluorescence spectrometry (ICGÇôHG-AFS). *Talanta,* **73**, 540-545 (2007).

29. Komorowicz, I.; Barałkiewicz, D.: Arsenic and its speciation in water samples by high performance liquid chromatography inductively coupled plasma mass spectrometry-Last decade review. *Talanta,* **84**, 247-261 (2011).

30. Dědina, J.; Tsalev, D. L.: *Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry.* Chichester, John Wiley & Sons, Inc. (1995).

31. Drobná, Z.; Waters, S. B.; Devesa, V.; Harmon, A. W.; Thomas, D. J.; Stýblo, M.: Metabolism and toxicity of arsenic in human urothelial cells expressing rat arsenic (+3 oxidation state)-methyltransferase. *Toxicology and Applied Pharmacology,* **207**, 147-159 (2005).

32. Hughes, M. F.; Devesa, V.; Adair, B. M.; Styblo, M.; Kenyon, E. M.; Thomas, D. J.: Tissue dosimetry, metabolism and excretion of pentavalent and trivalent monomethylated arsenic in mice after oral administration. *Toxicology and Applied Pharmacology,* **208**, 186-197 (2005).

33. Wen, W.; Wen, J.; Lu, L.; Liu, H.; Yang, J.; Cheng, H.; Che, W.; Li, L.; Zhang, G.: Metabolites of arsenic and increased DNA damage of p53 gene in arsenic plant workers. *Toxicology and Applied Pharmacology,* **254**, 41-47 (2011).

34. Devesa, V.; Adair, B. M.; Liu, J.; Waalkes, M. P.; Diwan, B. A.; Styblo, M.; Thomas, D. J.: Arsenicals in maternal and fetal mouse tissues after gestational exposure to arsenite. *Toxicology,* **224**, 147-155 (2006).

35. Valenzuela, O. L.; Borja-Aburto, V. H.; Garcia-Vargas, G. G.; Cruz-Gonzalez, M. B.; Garcia-Montalvo, E. A.; Calderon-Aranda, E. S.; Del Razo, L. M.: Urinary Trivalent Methylated Arsenic Species in a Population Chronically Exposed to Inorganic Arsenic. *Environmental Health Perspectives,* **113**, 250-254 (2005).

36. Hernandez-Zavala, A.; Valenzuela, O. L.; Matoušek, T.; Drobná, Z.; Dědina, J.; Garcia-Vargas, G. G.; Thomas, D. J.; Del Razo, L. M.; Stýblo, M.: Speciation of Arsenic in Exfoliated Urinary Bladder Epithelial Cells from Individuals Exposed to Arsenic in Drinking Water. *Environmental Health Perspectives,* **116**, 1656-1660 (2008).

37. Sun, G. F.; Xu, Y. Y.; Li, X.; Jin, Y. P.; Li, B.; Sun, X. C.: Urinary arsenic metabolites in children and adults exposed to arsenic in drinking water in Inner Mongolia, China. *Environmental Health Perspectives,* **115**, 648-652 (2007).

38. Calatayud, M.; Bralatei, E.; Feldmann, J.; Devesa, V.; Vélez, D.: Transformation of Arsenic Species during in Vitro Gastrointestinal Digestion of Vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* **61**, 12164-12170 (2013).

39. Calatayud, M.; Vázquez, M.; Devesa, V.; Vélez, D.: In Vitro Study of Intestinal Transport of Inorganic and Methylated Arsenic Species by Caco-2/HT29-MTX Cocultures. *Chemical Research in Toxicology,* **25**, 2654-2662 (2012).

40. Calatayud, M.; Vélez, D.; Devesa, V.: Metabolism of Inorganic Arsenic in Intestinal Epithelial Cell Lines. *Chemical Research in Toxicology,* **25**, 2402-2411 (2012).

41. Zhao, R.; Zhao, M.; Wang, H.; Taneike, Y.; Zhang, X.: Arsenic speciation in moso bamboo shoot – A terrestrial plant that contains organoarsenic species. *Science of The Total Environment,* **371**, 293-303 (2006).

42. Garcia-Salgado, S.; Quijano, M. A.; Bonilla, M. M.: Arsenic speciation in edible alga samples by microwave-assisted extraction and high performance liquid chromatography coupled to atomic fluorescence spectrometry. *Analytica Chimica Acta,* **714**, 38-46 (2012).

43. Schaeffer, R.; Soeroes, C.; Ipolyi, I.; Fodor, P.; Thomaidis, N. S.: Determination of arsenic species in seafood samples from the Aegean Sea by liquid chromatography-(photo-oxidation)-hydride generation-atomic fluorescence spectrometry. *Analytica Chimica Acta,* **547**, 109-118 (2005).

44. Simon, S.; Tran, H.; Pannier, F.; Potin-Gautier, M.: Simultaneous determination of twelve inorganic and organic arsenic compounds by liquid chromatography-ultraviolet irradiation-hydride generation atomic fluorescence spectrometry. *Journal of Chromatography A,* **1024**, 105-113 (2004).

45. Schmeisser, E.; Goessler, W.; Kienzl, N.; Francesconi, K. A.: Volatile Analytes Formed from Arsenosugars: Determination by HPLC-HG-ICPMS and Implications for Arsenic Speciation Analyses. *Analytical Chemistry,* **76**, 418-423 (2004).

46. Regmi, R.; Milne, B.; Feldmann, J.: Hydride generation activity of arsenosugars and thioarsenicals. *Anal Bioanal Chem,* **388**, 775-782 (2007).

Curriculum vitae

Mgr. Karel Marschner

Adresa

Spartakiádní 17/271

Ústí nad Labem

Česká republika, 400 10

karel.marschner@gmail.com

Vzdělání

2013 – současnost	Ph.D.	Analytická chemie, Katedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Praha, Česká republika.
2011 – 2013	Mgr.	Analytická chemie, Katedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Praha, Česká republika (diplomová práce: *Optimalizace podmínek generování a atomizace arsanů pro speciační analýzu metodou atomové fluorescenční spektrometrie*).
2008 – 2011	Bc.	Chemie v přírodních vědách Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Praha, Česká republika (bakalářská práce: *Elektrochemické generování těkavé sloučeniny thallia*).

Jazykové schopnosti

Angličitna – (B2, FCE – First Certificate in English v roce 2016)

Ocenění

2013 Spektroskopická společnost Jana Marka Marci, Praha: Nejlepší diplomová práce v oboru spektrometrických metod - 3.místo.

Stáže

Duben – červenec 2015 (3 měsíce) Universidade Federal de Santa Maria, Depto. de Química, Santa Maria, Brazílie, (prof. E. M. M. Flores)

Seznam publikací

Odborné články

- Marschner K., Musil S., Mikšík I., Dědina J.: Hydride generation from arsenosugars. zasláno do *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*.

- Marschner, K.; Musil, S.; Dědina, J.: Demethylation of Methylated Arsenic Species during Generation of Arsanes with Tetrahydridoborate(1−) in Acidic Media. *Analytical Chemistry*, **88**, 6366−6373 (2016).

- Marschner, K.; Musil, S.; Dědina, J.: Achieving 100% Efficient Postcolumn Hydride Generation for As Speciation Analysis by Atomic Fluorescence Spectrometry. *Analytical Chemistry*, **88**, 4041−4047 (2016).

- Marschner, K.; Musil, S.; Dědina, J.: Flame-in-gas-shield and miniature diffusion flame hydride atomizers for atomic fluorescence spectrometry: optimization and comparison. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, **109**, 16–23 (2015).

Abstrakty z konferencí:

Prezentující autor je podtržen.

- Musil S., Marschner K., Matoušek T., Dědina J.: Selective Hydride Generation of Inorganic Arsenic for Fast screening of Samples of Marine Origin. In *Colloquium Spectroscopicum Internationale - CSI XL*, Book of Abstracts, Pisa, Itálie, 11.–16.6.2017, p. PP37. (plakátové sdělení)

- Marschner K., Musil S., Dědina J.: Cleavage of As–C Bond during Chemical Hydride Generation. In *Colloquium Spectroscopicum Internationale - CSI XL*, Book of Abstracts, Pisa, Italy, 11.–16.6.2017, p. OL169. (přednáška)

- Marschner K., Matoušek T., Musil S.: Selektivní generování arsanu s ICP-MS detekcí pro rychlou analýzu anorganického arsenu ve vzorcích mořského původu. In: *Workshop SPECIAČNÍ ANAlÝZA 2017*, Skalka u Ježova, 22.–25.5.2017, p. 32, ISBN 978-80-88195-02-3. (přednáška)

- Marschner K., Musil S., Dědina J.: Speciační analýzu arsenu založena na generování arsanů a detekcí atomovou fluorescenční spektrometrií. In: *Workshop SPECIAČNÍ ANAlÝZA 2017*, Skalka u Ježova, 22.–25.5.2017, p. 31, ISBN 978-80-88195-02-3. (přednáška)

- Marschner K., Musil S., Rychlovský P., Dědina J.: Hydride generation of ‘arsenosugars’ from algae samples. In: *15th Workshop on Progress in Trace Metal Speciation for Environmental Analytical Chemistry, TraceSpec 2016*, Book of abstracts, Gdańsk, Polsko, 4.–7.9.2016, p. 100, ISBN 978-83-62984-36-7. (plakátové sdělení)

- Musil S., Marschner K., Dědina J.: Hydride generation and atomic fluorescence spectrometry as a sensitive tool for speciation analysis of arsenic. In: *15th Workshop on Progress in Trace Metal Speciation for Environmental Analytical Chemistry, TraceSpec 2016*, Book of abstracts, Polsko, 4.–7.9.2016, p. 12, ISBN 978-83-62984-36-7. (přednáška)

- Marschner K., Musil S., Rychlovský P., Dědina J.: Arsenic speciation by hydride generation coupled with atomic fluorescence spectrometry. In: *Proceedings of the 12th Intern tional Students Conference "Modern Analytical Chemistry"*, Praha, 22.–23. 9.2016, p. 31–36, ISBN 978-80-7444-044-1. (přednáška)

Dědina J., Kratzer J., Musil S., Marschner K., Matoušek T., Svoboda M.: Volatile species generation and atomization for atomic absorption and atomic fluorescence: New developments. In: *Beijing Conference and Exhibition on Instrumental Analysis - BCEIA 2015*, Beijing, Čína, 27.–30.10.2015, p. 290–291. (přednáška)

- Marschner K., Musil S., Rychlovský P., Dědina J.: Efficient post HPLC column generation of arsanes for speciation analysis. In: *Colloquium Spectroscopicum Internationale - CSI XXXIX*, Book of Abstracts, Figueira da Foz, Portugalsko, 30.8.–3.9.2015, p. OP24. (přednáška)

- Dědina J., Kratzer J., Musil S., Marschner K., Matoušek T., Svoboda M., Mester Z., Sturgeon R.E., Talába M., Dvořák P.: Volatile species generation and atomization for atomic absorption and atomic fluorescence: new developments. In: *Colloquium Spectroscopicum Internationale - CSI XXXIX*, Book of Abstracts, Figueira da Foz, Portugalsko, 30.8.–3.9.2011, p. KL9. (přednáška)

- Marschner K., Musil S., Rychlovský P., Dědina J.: Efficient generation of arsanes coupled with HPLC or with cryotrapping for speciation analysis of arsenic. In: *11th International Students Conference "Modern Analytical Chemistry"*, Praha, 23.–24.9.2015, p. 123–129, ISBN 978-80-7444-036-6. (přednáška)

- Marschner K., Musil S., Rychlovský P., Dědina J.: Arsenic speciation analysis by post-separation hydride generation and atomic fluorescence detection. In: *13th Rio Symposium on Atomic Spectrometry*, Merida, Mexiko, 19.–24.10.2014, p. 133. (plakátové sdělení)

- Marschner K., Musil S., Rychlovský P., Dědina J.: Arsenic Speciation Analysis by HPLC Postcolumn Hydride Generation and Detection by Atomic Fluorescence Detection. In: *10th International Students Conference "Modern Analytical Chemistry"*, Praha, 22.–23.9.2014, p. 74–77, ISBN 978-80-7444-030-4. (přednáška)

- Marschner K., Musil S., Rychlovský P., Dědina J.: Arsenic speciation analysis based on selective hydride generation and atomic fluorescence detection. In: *European Symposium on Atomic Spectrometry ESAS 2014 & 15th Czech – Slovak Spectroscopic Conference*, Praha, 16.–21.3.2014, p. 107. ISBN 978-80-905704-1-2. (přednáška)

Charles University, Faculty of Science
Department of analytical chemistry

Doctoral study programme: Analytical chemistry

Summary of the Doctoral thesis

Development of Instrumentation and Methodology for Elemental and Speciation Analysis of Arsenic Based on Hydride Generation and on Atomic Fluorescence Spectrometric Detection

Mgr. Karel Marschner

Supervisor: prof. RNDr. Jiří Dědina, CSc., DSc.

Supervisor-consultant: RNDr. Stanislav Musil, Ph.D.

Doc. RNDr. Petr Rychlovský, CSc.

Praha, (2017)

The presented work was financially supported by the Czech Science Foundation (grant no. 14-23532S and 17-04329S), by the Institute of the Analytical Chemistry of the Czech Academy of Sciences, v. v. i. (project no. RVO: 68081715), by the Ministry of education and sports of the Czech Republic (program Kontakt II, project no. LH12040 and LH15174), and by the Charles University (project SVV).

This dissertation thesis was elaborated at the Institute of Analytical Chemistry of the Czech Academy of Sciences, v. v. i., Detached workplace – Department of Trace Element Analysis, Vídeňská 1083, 142 20 Prague 4, Czech Republic.

Table of Content

List of Symbols and Abbreviations ... - 4 -

Abstract (EN) ... - 5 -

1 Introduction ... - 6 -

2 Aims of the Study ... - 8 -

3 Material and Methods ... - 9 -

3.1 Instruments ... - 9 -

3.2 Chemicals ... - 9 -

3.3 Hydride Generators ... - 10 -

3.3.1 Flow Injection Hydride Generator ... - 10 -

3.3.2 Batch Hydride Generator ... - 11 -

3.4 Atomizer ... - 11 -

4 Results and Discussion ... - 12 -

4.1 Optimization of Hydride Generation of Arsenic Species in Flow Injection Mode- 12 -

4.2 The Post-column Hydride Generation for As Speciation Analysis ... - 12 -

4.3 Generation of Non-corresponding Substituted Arsanes ... - 13 -

4.4 Generation of Arsanes from Arsenosugars ... - 15 -

5 Conclusion ... - 17 -

6 References ... - 18 -

Curriculum Vitae ... - 22 -

A List of Publications ... - 23 -

List of Symbols and Abbreviations

AFS	atomic fluorescence spectrometry
As-sugar-gly	3-[5'-deoxy-5'-(dimethylarsinoyl)-β-ribofuranosyloxy]-2-hydroxypropylene glycol
As-sugar-PO_4	3-[5'-deoxy-5'-(dimethylarsinoyl)-β-ribofuranosyloxy]-2-hydroxypropyl 2,3-hydroxypropyl phosphate
As-sugar-SO_3	3-[5'-deoxy-5'-(dimethylarsinoyl)-β-ribofuranosyloxy]-2-hydroxypropanesulfonic acid
As-sugar-SO_4	3-[5'-deoxy-5'-(dimethylarsinoyl)-β-ribofuranosyloxy]-2-hydroxypropyl hydrogen sulfate
CD	capillary distance
CT	cryogenic trap
DIW	deionized water
$DMAs^V$	dimethylarsinate
EDL	electrodeless discharge lamp
FIGS	flame-in-gas shield
GLS	gas-liquid separator
HC	hydrolysis coil
HPLC	high performance liquid chromatography
HG	hydride generation
i.d.	inner diameter
iAs^{III}	arsenite
iAs^V	arsenate
ICP-MS	inductively coupled plasma mass spectrometer
L-cys	L-cysteine
LOD	limits of detection
MAs^V	methylarsonate
MDF	miniature diffusion flame
OH	observation height
PP1/PP2	peristaltic pumps
RC	reaction coil
THB	tetrahydridoborate(1–)
$TMAs^VO$	trimethylarsine oxide

Abstract (EN)

The presented dissertation is devoted to hydride generation from arsenic species and its application for speciation analysis based on atomic fluorescence detection.

Hydride generation from toxicologically relevant arsenic species was optimized in order to achieve a 100% efficiency. The resulted experimental setup was subsequently used for speciation analysis of arsenic in human urine by high performance liquid chromatography with detection by atomic fluorescence spectrometry. The accuracy of the developed method was verified by comparative analyses of human urine samples collected from five individuals with an independent reference method.

The cleavage of As–C bond during the reaction of methylated arsenic species with tetrahydridoborate(1–) (THB) in acidic media was studied in detail. Pronounced demethylation of methylated arsenic species was found during the reaction of THB with HCl, H_2SO_4, and $HClO_4$ while hydride generation from CH_3COOH or TRIS buffer after prereduction with L-cysteine resulted in the exclusive formation of the corresponding hydrides. Firstly, this phenomenon can endanger the accuracy of arsenic speciation which is based on hydride generation of substituted arsanes. Secondly, the more complex arsenic species can be converted to the hydride. That was demonstrated on hydride generation of arsenosugars.

Keywords: Arsenic, arsenic species, atomic fluorescence spectrometry, hydride generation.

1 Introduction

Determination of arsenic species is an important task due to their abundances in the environment and impact on human health. The inorganic arsenic species, arsenite (iAs^{III}) and arsenate (iAs^{V}), are the most toxic. Mammalians methylate the inorganic arsenic to methylarsonate (MAs^{V}), dimethylarsinate ($DMAs^{V}$), and trimethylarsine oxide ($TMAs^{V}O$) which are much less toxic.[1,2,3,4] Therefore, there is an interest in speciation analysis of arsenic.

High performance liquid chromatography (HPLC) connected to an inductively coupled plasma mass spectrometer (ICP-MS) is a powerful and the most common method for determination of arsenic species.[5] The selectivity and sensitivity can be further improved by incorporating chemical hydride generation (HG) performed by the reaction of acidified sample with solution of tetrahydridoborate(1−) (THB). This also makes possible to replace the ICP-MS by an atomic fluorescence (AFS) detector to achieve the same or even lower LODs.[6] This post-column HG can be used only for determination of species which are capable to form hydrides [iAs^{III}, iAs^{V}, MAs^{V}, $DMAs^{V}$, $TMAs^{V}O$, and arsenosugars (even though the HG efficiency is with low)]. This disadvantage can be eliminated by incorporating an on-line digestion device after the separation step but the corresponding experimental setup becomes more complicated and also the chromatographic resolution is worse.[7,8,9,10,11]

There are two other approaches of speciation analysis based on HG: selective HG and generation of substituted hydrides. The selective HG is based on selective conversion of arsenic species to hydrides, *e.g.* the distinguishing between trivalent and pentavalent arsenic species is based on the fact that the corresponding HG efficiency strongly depends on pH. In strong acidic media arsane is generated from both iAs^{III} and iAs^{V} while at higher pH, only iAs^{III} is converted to arsane.[12,13,14] A different example of pH dependent HG was demonstrated by Musil *et al.* [15] who used high concentration of HCl to suppress generation from methylated species (mainly $DMAs^{V}$) in rice samples for selective determination of inorganic arsenic (iAs^{III} + iAs^{V}). The main advantage of selective HG is that it does not require any separation step or any modification of the experimental setup.[16]

The generation of substituted hydrides is possible when various analyte species can be converted to the corresponding various volatile hydrides, *e.g.* iAs^{III} and iAs^{V} are converted to AsH_3, MAs^{V} is converted to CH_3AsH_2, $DMAs^{V}$ is converted to $(CH_3)_2AsH$, and $TMAs^{V}O$ is converted to $(CH_3)_3As$. The generated mixture of arsanes is then collected

in a cryogenic trap (CT). After the generation step is completed the arsanes are subsequently volatilized gradually according to their different boiling points.[17,18,19,20,21,22] The corresponding boiling points are –55, 2, 36, and 70 °C for arsane, methylarsane, dimethylarsane, and trimethylarsane, respectively. The explicit relation between a hydride active species and its corresponding arsane, for example between MAs^{V} and CH_3AsH_2, is a necessary condition for reaching accurate results of the speciation analysis. It has been generally assumed that an As−C bond (in methylated species) is not cleaved during the HG under analytical conditions and that arsenic species are converted only to their corresponding arsanes only.[23]

2 Aims of the Study

The presented dissertation summarizes the results contained in three original research papers (two were published and one has been submitted) in prestigious international scientific journals in the field of analytical atomic spectrometry and analytical chemistry. The dissertation is focused on speciation analysis of arsenic based on hydride generation. It presents an important progress in this field.

The theoretical part briefly describes arsenic species and their toxicities and all volatile species useful for analytical atomic spectrometry. A special focus is taken on chemical hydride generation by means of the reaction between hydride forming elements (especially of arsenic) with solution of THB in acidic media and on detection by AFS with flame atomization.

The general objectives of this thesis were following:

1) to develop a simple hydride generator which converts four arsenic species (inorganic and methylated) quantitatively to arsanes without any prereduction step,
2) to connect the developed hydride generator to high performance liquid chromatography and use it to speciation analysis of arsenic in real samples,
3) to study the mechanism of cleavage of As–C bond during hydride generation from methylated arsenic species by the reaction with tetrahydridoborate(1−) in acidic media.
4) to study the possibility of forming volatile arsanes from more complex arsenic species (arsenosugars).

3 Material and Methods

3.1 Instruments

A laboratory assembled research grade atomic fluorescence spectrometer has been used for all atomic fluorescence measurement. The instrument was equipped with an arsenic electrodeless discharge lamp (EDL, system 2, Perkin-Elmer, USA). The operating current for EDL was 340 mA and the feeding power was square-wave modulated on frequency of 40 Hz. The radiation from the EDL was focused above the vertical axis of the atomizer by a biconvex quartz lens (diameter of 50 mm with focus length of 42 mm at 193 nm). Another two plano-convex lenses (diameter of 17 and 22 mm with focus length of 21 mm at 193nm) were used to focus the fluorescence radiation from the atomizer to the interference filter (193 nm, full width at half maximum 18.7 nm, CVI Melles Griot, USA) and it was collected at an angle 90°. Photomultiplier PMT-MH 1922 (solar blind 165–320 nm) from Perkin-Elmer Optoelectronics (USA) was used as the detector of fluorescence radiation.

The HPLC–ICP-MS measurements were performed by means of HPLC system Agilent 1200 (USA) connected to Agilent 7700x ICP-MS (USA).

The MS^2 spectra of arsenic species were performed by HCT-Ultra ETD II Mass Spectrometer (Bruker, USA) with electrospray ionization (capillary exit voltage was 102.3 V) in a positive mode.

3.2 Chemicals

Deionized water (DIW, <0.2 μS cm^{-1}, Ultrapur, Watrex, USA) was used for the preparation of all solutions. A 1000 mg L^{-1} arsenic standard solution (Merck, Germany) was used as iAs^{V} stock standard solution. Stock solutions of 1000 mg L^{-1} As were prepared for iAs^{III}, MAs^{V}, $DMAs^{V}$, and $TMAs^{V}O$ species in DIW using following compounds: As_2O_3 (Lachema, Czech Republic); $Na_2CH_3AsO_3{\cdot}6H_2O$ (Chem. Service, USA); $(CH_3)_2As(O)OH$ (Strem Chemicals, Inc., USA); $(CH_3)_3AsO$ was obtained by courtesy of Dr. William Cullen (University of British Columbia, Canada). The solution of THB was prepared fresh daily from $NaBH_4$ (Fluka, Germany) in 0.1% KOH (Lach-Ner, Czech Republic). HCl (p.a., Merck, Germany), H_2SO_4 (suprapure, Merck, Germany), $HClO_4$ (p.a., Merck, Germany), HNO_3 (semiconductor grade, Sigma-Aldrich, Germany), CH_3COOH

(Lachema, Czech Republic), and tris(hydroxymethyl)aminomethane (TRIS) buffer were used for HG. TRIS buffer was prepared from Trizma® hydrochloride (Sigma, Germany) - pH was adjusted to 6.00 by KOH (Lach-Ner, Czech Republic). L-cysteine (L-cys) hydrochloride monohydrate (Merck, Germany) for prereduction of pentavalent arsenic species was added to the arsenic standard/sample 1 h prior analysis. Mobile phase for ion pair chromatography was 4.7 mmol L^{-1} tetrabutylammonium hydroxide (Fluka, Germany), 2 mmol L^{-1} malonic acid (Sigma-Aldrich, Germany) in 4% methanol (Sigma-Aldrich, Germany), pH was adjusted to 5.85 by KOH. Mobile phase for anion exchange chromatography was 20 mmol L^{-1} phosphate buffer (from KH_2PO_4 (Merck, Germany) and K_2HPO_4 (Xenon Lodz, Poland)), pH adjusted to 6.00. Solid NaOH (Lach-Ner, Czech Republic) in the form of 3 mm pearls was used as a filling of a NaOH dryer.[24]

3.3 Hydride Generators

In principle, two different types of hydride generators were used for generation of arsanes in this work: flow injection and batch.

3.3.1 Flow Injection Hydride Generator

The experimental setup of the flow injection hydride generator used two peristaltic pumps (PP1 and PP2). The arsenic standard was carried by DIW and mixed with acid or buffer solution, followed by mixing with THB solution in the reaction coil (RC). The gaseous phase was separated from the liquid phase in the gas-liquid separator (GLS). The gaseous phase formed in GLS was transported by a flow of gas consisting of the argon carrier through NaOH dryer, then merged with a supplementary argon flow (flame argon) and a hydrogen flow (flame hydrogen) to the atomizer. Liquid waste was removed by the PP2 into the waste.

In the post-column mode of HG, the injection valve and the channel for DIW was replaced by the outlet from the chromatography column. When explicitly stated, THB solution was introduced to the generator by two channels. THB introduced by the first channel was mixed in a T-junction with the acidified sample. The reacting mixture flew to the first RC which was connected downstream to another T-junction where the additional THB was introduced. The mixture followed to a second RC connected to the GLS unit.

3.3.2 Batch Hydride Generator

In the batch mode, the acid solution together with arsenic standard solution was pumped by the pump PP1. A carrier gas (argon or helium) merged the acid channel downstream the standard introduction point. The mixture was then introduced to the bottom of the GLS so that carrier gas could bubble through the reacting mixture. The acid channel was provided with an additional T-junction upstream the GLS that served for cleaning of the GLS with DIW manually by a syringe. Another channel was used to remove liquid waste from the GLS manually by a syringe. The solution of THB was then pumped by the pump PP2 and it was introduced to the bottom of the GLS below the liquid level.

If explicitly stated, the THB flow was mixed with the other acid flow, pumped by the second channel of the pump PP2. THB was thus partially decomposed (hydrolysed) in a hydrolysis coil (HC) downstream the point of mixing the THB flow with the other acid flow. The output of the gases from the GLS was connected to the dryer.

The batch generator was operated either in the direct transfer mode or in the collection one. In the direct transfer mode, the carrier gas was argon and the gas output from the dryer was merged with flame gases and flew to the atomizer. In the set-up with the CT collection mode the carrier gas was helium.

3.4 Atomizer

The miniature diffusion flame (MDF) was used as an atomizer in this work. MDF consisted of a vertical quartz tube [6 mm inner diameter (i.d.) and 8.5 mm outer diameter (o.d.)] with a side inlet (2 mm i.d. and 3.75 mm o.d.) serving to introduce gases.

4 Results and Discussion

4.1 Optimization of Hydride Generation of Arsenic Species in Flow Injection Mode

The optimization of conditions of HG of iAs^{III}, iAs^{V}, MAs^{V}, and $DMAs^{V}$ in order to achieve the equal generation efficiency for all these species without any pre-reduction step in the flow injection mode was carried out. The relevant parameters of HG, *i.e.* HCl concentration (controlling pH of the reaction mixture), concentration of THB solution and the volume of the RC (controlling the reaction time), were optimized. The optimal concentration of HCl and THB solution were 2 mol L^{-1} and 2.5%, respectively. It was found that optimal volume of the RC was 8.9 mL.

Assuming that the arsane is generated from iAs^{III} quantitatively in the optimized apparatus[25], the HG efficiencies of iAs^{V}, MAs^{V}, and $DMAs^{V}$ under these optimal conditions were estimated as 100 ± 1%, 103 ± 2%, and 100 ± 2%, respectively. This is for the first time that the equal hydride generation efficiency of iAs^{III}, iAs^{V}, MAs^{V}, and $DMAs^{V}$ in the flow injection mode (from acid medium without any pre-reduction step) has been reached.

4.2 The Post-column Hydride Generation for As Speciation Analysis

The optimized conditions of HG were used for speciation analysis of arsenic by HPLC–HG–AFS. The separation of arsenic species in aqueous standard solution was successful when using ion pair chromatography as well as anion exchange chromatography. However, in the case of ion pair chromatography the resolution of arsenic species in undiluted urine samples was unsatisfactory and required ten times sample dilution to suppress the matrix effect. On the other hand, the anion exchange chromatography worked satisfactorily, with excellent resolution of As species peaks even for undiluted samples (Figure 1).

Due to achieved 100% HG efficiency, the sensitivity evaluated from peak area was equal for all four species, the relative slopes of iAs^{III}, iAs^{V}, and MAs^{V} (referred to $DMAs^{V}$) were 99 ± 2%, 102 ± 4%, and 100 ± 3%, respectively. Therefore, the calibration of $DMAs^{V}$ could be used for quantification of other species.

The absolute LODs for iAs^{III}, iAs^{V}, MAs^{V}, and $DMAs^{V}$ were 2.0, 4.8, 2.9, and 2.8

pg, respectively. These LODs are much lower than those reported for other HPLC−HG−AFS instruments[26,27,28] and they are comparable with those reported for the HPLC−ICP-MS (typically from 0.3 to 24 pg).[29] The accuracy of the developed method was verified by analysis of standard reference material (NIST 2669, level I Arsenic species in frozen human urine) and by comparative analyses of five real samples of human urine of five individuals using also HG–CT–AFS as a reference method.

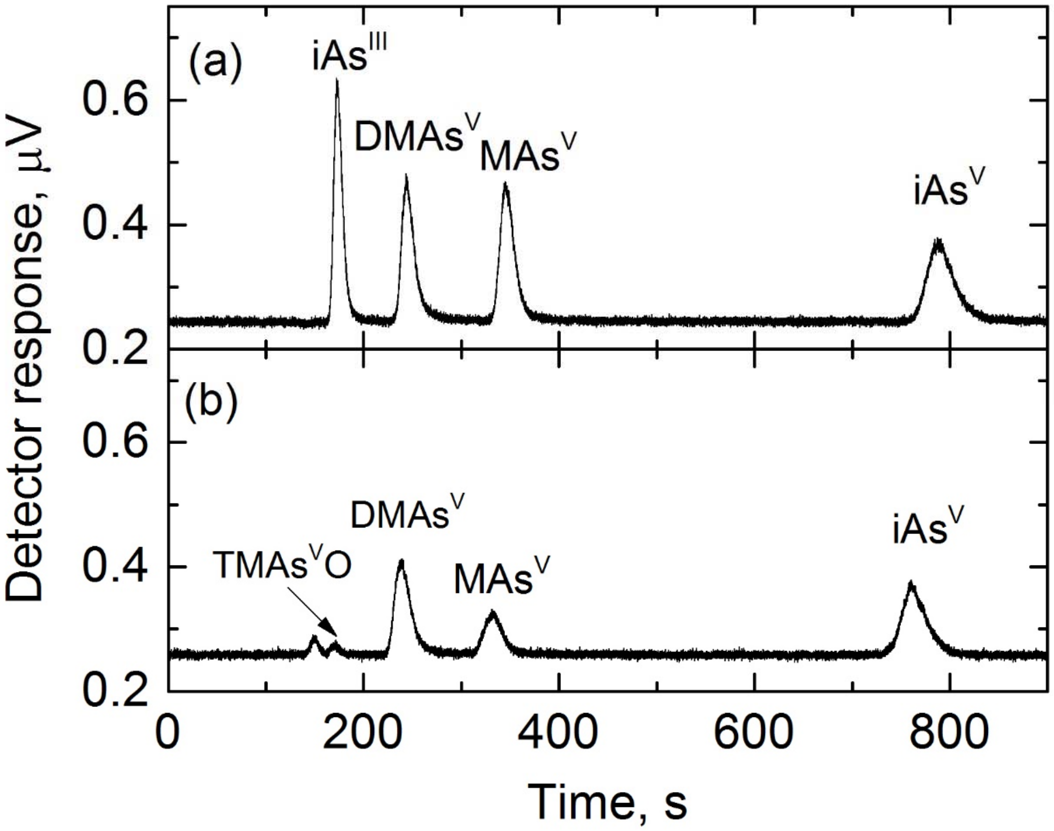


Figure 1 HPLC–HG–AFS chromatograms of (a) aqueous arsenic standards (5 ng mL^{-1} each), (b) urine standard reference material (NIST 2669 level I) with 3% H_2O_2; anion exchange chromatography with PRP-X100 column. Reprinted with permission from Marschner, K. *et al. Analytical Chemistry*, **88**, 4041−4047 (2016). Copyright 2016 American Chemical Society.

4.3 Generation of Non-corresponding Substituted Arsanes

The formation of non-corresponding (less methylated) volatile products of HG of methylated arsenic species (MAs^V, $DMAs^V$, and $TMAs^VO$) in acidic media under

analytical conditions in the batch mode was studied. The mainl focus was on HCl medium because it is the most often used acid for HG of arsenic species.[30]

The dependence of demethylation (generation of methylsubstituted arsanes with lower degree of methylation) of MAs^V, $DMAs^V$, and $TMAs^VO$ on HCl concentration was studied in the range of 0.05 to 6.0 mol L^{-1}. Using lower concentration of HCl for HG of MAs^V leads to higher fraction of non-corresponding arsane (AsH_3) formed at the expense of CH_3AsH_2. At the concentration of 0.05 mol L^{-1} HCl, 28 ± 2% of MAs^V is converted to AsH_3 instead of CH_3AsH_2. The dependences for $DMAs^V$and $TMAs^VO$ showed a similar trend as that for MAs^V. The yield of non-corresponding arsanes (at maximum) for $DMAs^V$ and $TMAs^VO$ was 37 ± 1% and 50 ± 2%, respectively.

The dependence of demethylation of MAs^V, $DMAs^V$, and $TMAs^VO$ on THB solution concentration was also studied in the range of 0.25 to 4%. The maximum conversion to non-corresponding arsane was at 1–2% THB. The extent of demethylation for arsenic species was again in order $TMAs^VO$ > $DMAs^V$ > MAs^V, which can be attributed to the number of As–C bonds in the original species.

The above observations indicate that in the presence of HCl, THB (or some of its hydrolysis intermediates) can cleave As–C bond. THB hydrolysis can be, to a certain extent, controlled when THB is on-line mixed with HCl solution in the HC before the mixture is pumped into the GLS. It was found that the demethylation for all species can be even completely suppressed by partial hydrolysis of THB.

The demethylation of arsenic species during HG was studied also in media of $HClO_4$, H_2SO_4, HNO_3, CH_3COOH, and from TRIS (pH 6.0) buffer after treatment with 2% L-cys. It was found that the demethylation of arsenic species was even greater in the medium of $HClO_4$ and H_2SO_4. In CH_3COOH or from TRIS buffer medium after L-cys prereduction of arsenic standard, no demethylation was observed for all species. An unusual situation was observed in the case of HNO_3 because the demethylation of MAs^V and $DMAs^V$ during HG was insignificant. However, in the case of $TMAs^VO$ the demethylation to the $(CH_3)_2AsH$ was observed.

The demethylation of arsenic species during HG does not bring any risk of incorrect results of the post-column HG since the resulting sensitivity does not depend on the degree of methylation of the resulting hydride. However, in the case of arsenic speciation analysis based on generation of substituted hydrides, the demethylation can endanger accuracy of arsenic speciation when HCl is employed as HG medium. This method of speciation analysis using HCl as the medium for HG has been used in a number

of the following published works.[31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41]

4.4 Generation of Arsanes from Arsenosugars

The possibility of HG from arsenosugars was investigated with the aim to achieve as high HG efficiency as possible and test the feasibility of this derivatization approach for speciation analysis by HPLC-HG-AFS.

At first, HG activity of As-sugar-PO_4 (complete name of arsenosugars are shown in the List of Symbols and Abbreviations) was studied in the batch mode and it was found that 1 mol L^{-1} H_2SO_4 and 1% THB solution was optimal. HG efficiency under these conditions was 68 ± 1% while in HCl medium the maximum achieved HG efficiency was 35 ± 1%.

The HG activity of As-sugar-PO_4 was also studied in the flow injection mode. The optimal conditions were 1.5 mol L^{-1} H_2SO_4 and 1% THB. The corresponding HG efficiency was 19 ± 1% while for 1.0 mol L^{-1} HCl and 2% THB the efficiency was 16.3 ± 0.2%. The HG efficiency achieved in the flow injection mode was dramatically lower than in the batch mode. Therefore a new design of hydride generator with two inlets of THB was constructed. This approach increased the HG efficiency of As-sugar-PO_4 in the flow injection mode to 29 ± 3%.

The developed hydride generator was connected to HPLC for post-column HG (Figure 2). The seaweed extracts were analyzed by HPLC–HG–AFS and from comparison with HPLC–ICP-MS the HG efficiencies for As-sugar-gly, As-sugar-PO_4, As-sugar-SO_3, and As-sugar-SO_4, were determined as 13 ± 1%, 28 ± 2%, 31 ± 3%, and 17 ± 1%, respectively. The determined absolute LOD were 41, 9.5, 13, and 19 pg for As-sugar-gly, As-sugar-PO_4, As-sugar-SO_3, and As-sugar-SO_4, respectively. These LOD are comparable to HPLC–UV-decomposition–HG–AFS approaches determined by other authors.[42,43,44]

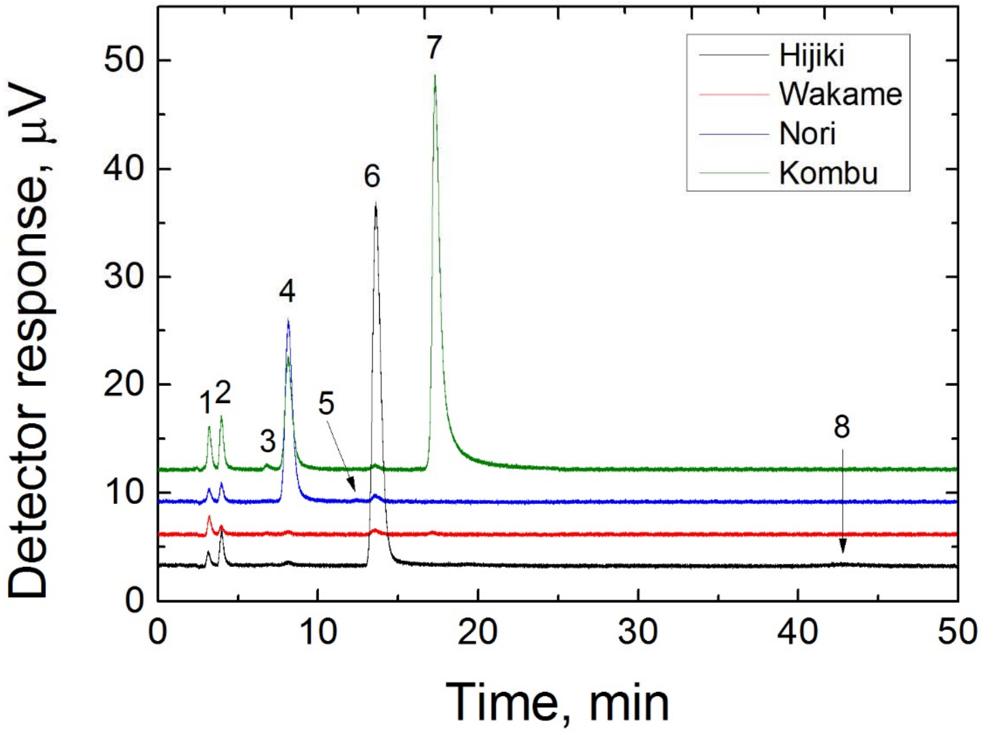


Figure 2 HPLC–HG–AFS chromatograms of four seaweed samples; HG conditions: 1.5 mol L^{-1} H_2SO_4, two inlets of 1% THB; 1 – As-sugar-gly, 2 – $DMAs^V$, 3 – MAs^V, 4 – As-sugar-PO_4, 5 – unknown, 6 – iAs^V, 7 – As-sugar-SO_3, 8 – As-sugar-SO_4

5 Conclusion

The presented thesis is focused on HG of arsenic species. It brings a significant and previously unpublished progress in this field but also an analytical application of developed method. Two papers included in the thesis were published in the prestigious international scientific journal and one paper has been submitted. The achieved results were also presented at the conferences in the form of poster presentations (3) or as lectures (11). All objectives defined in the introduction part have been accomplished and are summarized in the following paragraphs.

The flow injection hydride generator which allows to generate iAs^{III}, iAs^{V}, MAs^{V}, and $DMAs^{V}$ with 100% efficiency was developed.

The developed hydride generator was successfully applied for post-column HG of arsenic species and used for determination of arsenic species in human urine samples. Due to equal HG efficiency of all four arsenic species the single species calibration could be used. That reduces the time for the calibration process. The feasibility of this method was confirmed by analysis of a standard reference material and by comparative analysis of real samples.

The influence of conditions of HG from methylated arsenic species on the structure of their volatile form was studied in detail. A pronounced demethylation of MAs^{V}, $DMAs^{V}$, and $TMAs^{V}O$ during the reaction with THB in HCl, H_2SO_4, and $HClO_4$ media was observed. The demethylation appeared to be due to the action of specific hydrolytic products of $NaBH_4$. This behavior jeopardizes the accuracy of speciation analysis of arsenic employing generation of substituted arsanes.

Following the previous results, the possibility of generation of arsanes from arsenosugars was verified and optimized in the flow injection and batch modes. Unfortunately, the lack of available standards makes this analysis currently impossible. Achieved HG efficiencies for As-sugars are similar or even better than those published up to now.[45,46]

6 References

1. Hughes, M. F.: Arsenic toxicity and potential mechanisms of action. *Toxicology Letters,* **133**, 1-16 (2002).

2. Hayakawa, T.; Kobayashi, Y.; Cui, X.; Hirano, S.: A new metabolic pathway of arsenite: arsenic-glutathione complexes are substrates for human arsenic methyltransferase Cyt19. *Archives of Toxicology,* **79**, 183-191 (2005).

3. Rehman, K.; Naranmandura, H.: Arsenic metabolism and thioarsenicals. *Metallomics,* **4**, 881-892 (2012).

4. Challenger, F.: Biological Methylation. *Chemical Reviews,* **36**, 315-361 (1945).

5. Francesconi, K. A.; Kuehnelt, D.: Determination of arsenic species: A critical review of methods and applications, 2000-2003. *Analyst (Cambridge, United Kingdom),* **129**, 373-395 (2004).

6. Chen, Y. W.; Belzile, N.: High performance liquid chromatography coupled to atomic fluorescence spectrometry for the speciation of the hydride and chemical vapour-forming elements As, Se, Sb and Hg: A critical review. *Analytica Chimica Acta,* **671**, 9-26 (2010).

7. Atallah, R. H.; Kalman, D. A.: On-line photo-oxidation for the determination of organoarsenic compounds by atomic-absorption spectrometry with continuous arsine generation. *Talanta,* **38**, 167-173 (1991).

8. Bin, H.; Gui-bin, J.; Xiao-bai, X.: Arsenic speciation based on ion exchange high-performance liquid chromatography hyphenated with hydride generation atomic fluorescence and on-line UV photo oxidation. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry,* **368**, 803-808 (2000).

9. Howard, A. G.; Hunt, L. E.: Coupled photooxidation-hydride AAS detector for the HPLC of arsenic compounds. *Analytical Chemistry,* **65**, 2995-2998 (1993).

10. Tsalev, D. L.; Sperling, M.; Welz, B.: Speciation determination of arsenic in urine by high-performance liquid chromatography-hydride generation atomic absorption spectrometry with on-line ultraviolet photooxidation[dagger]. *Analyst,* **123**, 1703-1710 (1998).

11. Tsalev, D. L.; Sperling, M.; Welz, B.: On-line UV-photooxidation with peroxodisulfate for automated flow injection and for high-performance liquid chromatography coupled to hydride generation atomic absorption spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy,* **55**, 339-353 (2000).

12. Anderson, R. K.; Thompson, M.; Culbard, E.: Selective reduction of arsenic species by continuous hydride generation. Part I. Reaction media. *Analyst,* **111**, 1143-1152 (1986).

13. Devesa, V.; Maria Del Razo, L.; Adair, B.; Drobna, Z.; Waters, S. B.; Hughes, M. F.; Styblo, M.; Thomas, D. J.: Comprehensive analysis of arsenic metabolites by pH-specific hydride generation atomic absorption spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry,* **19**, 1460-1467 (2004).

14. Feldman, C.: Improvements in the arsine accumulation-helium glow detector procedure for determining traces of arsenic. *Analytical Chemistry,* **51**, 664-669 (1979).

15. Musil, S.; Pétursdóttir, Á. H.; Raab, A.; Gunnlaugsdóttir, H.; Krupp, E.; Feldmann, J.: Speciation without Chromatography Using Selective Hydride Generation: Inorganic Arsenic in Rice and Samples of Marine Origin. *Analytical Chemistry,* **86**, 993-999 (2014).

16. Dědina, J.: Generation of Volatile Compounds for Analytical Atomic Spectroscopy. In: *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. Meyers, R.A. (ed.). Chichester: John Wiley and Sons Ltd., 2010, p. 1-39.

17. Braman, R. S.; Foreback, C. C.: Methylated Forms of Arsenic in the Environment. *Science,* **182**, 1247-1249 (1973).

18. Howard, A. G.; Salou, C.: Cysteine enhancement of the cryogenic trap hydride AAS determination of dissolved arsenic species. *Analytica Chimica Acta,* **333**, 89-96 (1996).

19. Matoušek, T.; Currier, J. M.; Trojánková, N.; Saunders, R. J.; Ishida, M. C.; Gonzalez-Horta, C.; Musil, S.; Mester, Z.; Stýblo, M.; Dědina, J.: Selective hydride generation-cryotrapping-ICP-MS for arsenic speciation analysis at picogram levels: analysis of river and sea water reference materials and human bladder epithelial cells. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry,* **28**, 1456-1465 (2013).

20. Matoušek, T.; Hernandez-Zavala, A.; Svoboda, M.; Langrová, L.; Adair, B. M.; Drobná, Z.; Thomas, D. J.; Stýblo, M.; Dědina, J.: Oxidation state specific generation of arsines from methylated arsenicals based on L-cysteine treatment in buffered media for speciation analysis by hydride generation-automated cryotrapping-gas chromatography-atomic absorption spectrometry with the multiatomizer. *Spectrochimica Acta, Part B: Atomic Spectroscopy,* **63B**, 396-406 (2008).

21. Musil, S.; Matoušek, T.; Currier, J. M.; Stýblo, M.; Dědina, J.: Speciation Analysis of Arsenic by Selective Hydride Generation-Cryotrapping-Atomic Fluorescence Spectrometry with Flame-in-Gas-Shield Atomizer: Achieving Extremely Low Detection Limits with Inexpensive Instrumentation. *Analytical Chemistry,* **86**, 10422-10428 (2014).

22. Braman, R. S.; Johnson, D. L.; Foreback, C. C.; Ammons, J. M.; Bricker, J. L.: Separation and determination of nanogram amounts of inorganic arsenic and methylarsenic compounds. *Analytical Chemistry,* **49**, 621-625 (1977).

23. D'Ulivo, A.; Dedina, J.; Mester, Z.; Sturgeon, R. E.; Wang, Q. Q.; Welz, B.: Mechanisms of chemical generation of volatile hydrides for trace element determination (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry,* **83**, 1283-1340 (2011).

24. Taurková, P.; Svoboda, M.; Musil, S.; Matoušek, T.: Loss of di- and trimethylarsine on Nafion membrane dryers following hydride generation. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry,* **26**, 220-223 (2011).

25. Van Elteren, J. T.; Das, H. A.; Bax, D.: Radiotracer Examination of Gas-Liquid Separators Used in Arsenic Speciation by Hydride Generation - AAS. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry-Articles,* **174**, 133-144 (1993).

26. Bohari, Y.; Astruc, A.; Astruc, M.; Cloud, J.: Improvements of hydride generation for the speciation of arsenic in natural freshwater samples by HPLC-HG-AFS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry,* **16**, 774-778 (2001).

27. Moreno E.; Cámara, C.; Corns, W. T.; Bryce, D. W.; Stockwell, P. B.: Arsenic speciation in beverages by direct injection-ion chromatography hydride generation atomic fluorescence spectrometry. *Journal of Automated Methods and Management in Chemistry,* **22**, 33-39 (2000).

28. Wei, C.; Liu, J.: A new hydride generation system applied in determination of arsenic species with ion chromatographyGÇôhydride generation-atomic fluorescence spectrometry (ICGÇôHG-AFS). *Talanta,* **73**, 540-545 (2007).

29. Komorowicz, I.; Barałkiewicz, D.: Arsenic and its speciation in water samples by high performance liquid chromatography inductively coupled plasma mass spectrometry-Last decade review. *Talanta,* **84**, 247-261 (2011).

30. Dědina, J.; Tsalev, D. L.: *Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry.* Chichester, John Wiley & Sons, Inc. (1995).

31. Drobná, Z.; Waters, S. B.; Devesa, V.; Harmon, A. W.; Thomas, D. J.; Stýblo, M.: Metabolism and toxicity of arsenic in human urothelial cells expressing rat arsenic (+3 oxidation state)-methyltransferase. *Toxicology and Applied Pharmacology,* **207**, 147-159 (2005).

32. Hughes, M. F.; Devesa, V.; Adair, B. M.; Styblo, M.; Kenyon, E. M.; Thomas, D. J.: Tissue dosimetry, metabolism and excretion of pentavalent and trivalent monomethylated arsenic in mice after oral administration. *Toxicology and Applied Pharmacology,* **208**, 186-197 (2005).

33. Wen, W.; Wen, J.; Lu, L.; Liu, H.; Yang, J.; Cheng, H.; Che, W.; Li, L.; Zhang, G.: Metabolites of arsenic and increased DNA damage of p53 gene in arsenic plant workers. *Toxicology and Applied Pharmacology,* **254**, 41-47 (2011).

34. Devesa, V.; Adair, B. M.; Liu, J.; Waalkes, M. P.; Diwan, B. A.; Styblo, M.; Thomas, D. J.: Arsenicals in maternal and fetal mouse tissues after gestational exposure to arsenite. *Toxicology,* **224**, 147-155 (2006).

35. Valenzuela, O. L.; Borja-Aburto, V. H.; Garcia-Vargas, G. G.; Cruz-Gonzalez, M. B.; Garcia-Montalvo, E. A.; Calderon-Aranda, E. S.; Del Razo, L. M.: Urinary Trivalent Methylated Arsenic Species in a Population Chronically Exposed to Inorganic Arsenic. *Environmental Health Perspectives,* **113**, 250-254 (2005).

36. Hernandez-Zavala, A.; Valenzuela, O. L.; Matoušek, T.; Drobná, Z.; Dědina, J.; Garcia-Vargas, G. G.; Thomas, D. J.; Del Razo, L. M.; Stýblo, M.: Speciation of Arsenic in Exfoliated Urinary Bladder Epithelial Cells from Individuals Exposed to Arsenic in Drinking Water. *Environmental Health Perspectives,* **116**, 1656-1660 (2008).

37. Sun, G. F.; Xu, Y. Y.; Li, X.; Jin, Y. P.; Li, B.; Sun, X. C.: Urinary arsenic metabolites in children and adults exposed to arsenic in drinking water in Inner Mongolia, China. *Environmental Health Perspectives,* **115**, 648-652 (2007).

38. Calatayud, M.; Bralatei, E.; Feldmann, J.; Devesa, V.; Vélez, D.: Transformation of Arsenic Species during in Vitro Gastrointestinal Digestion of Vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* **61**, 12164-12170 (2013).

39. Calatayud, M.; Vázquez, M.; Devesa, V.; Vélez, D.: In Vitro Study of Intestinal Transport of Inorganic and Methylated Arsenic Species by Caco-2/HT29-MTX Cocultures. *Chemical Research in Toxicology,* **25**, 2654-2662 (2012).

40. Calatayud, M.; Vélez, D.; Devesa, V.: Metabolism of Inorganic Arsenic in Intestinal Epithelial Cell Lines. *Chemical Research in Toxicology,* **25**, 2402-2411 (2012).

41. Zhao, R.; Zhao, M.; Wang, H.; Taneike, Y.; Zhang, X.: Arsenic speciation in moso bamboo shoot – A terrestrial plant that contains organoarsenic species. *Science of The Total Environment,* **371**, 293-303 (2006).

42. Garcia-Salgado, S.; Quijano, M. A.; Bonilla, M. M.: Arsenic speciation in edible alga samples by microwave-assisted extraction and high performance liquid chromatography coupled to atomic fluorescence spectrometry. *Analytica Chimica Acta,* **714**, 38-46 (2012).

43. Schaeffer, R.; Soeroes, C.; Ipolyi, I.; Fodor, P.; Thomaidis, N. S.: Determination of arsenic species in seafood samples from the Aegean Sea by liquid chromatography-(photo-oxidation)-hydride generation-atomic fluorescence spectrometry. *Analytica Chimica Acta,* **547**, 109-118 (2005).

44. Simon, S.; Tran, H.; Pannier, F.; Potin-Gautier, M.: Simultaneous determination of twelve inorganic and organic arsenic compounds by liquid chromatography-ultraviolet irradiation-hydride generation atomic fluorescence spectrometry. *Journal of Chromatography A,* **1024**, 105-113 (2004).

45. Schmeisser, E.; Goessler, W.; Kienzl, N.; Francesconi, K. A.: Volatile Analytes Formed from Arsenosugars: Determination by HPLC-HG-ICPMS and Implications for Arsenic Speciation Analyses. *Analytical Chemistry,* **76**, 418-423 (2004).

46. Regmi, R.; Milne, B.; Feldmann, J. +.: Hydride generation activity of arsenosugars and thioarsenicals. *Anal Bioanal Chem,* **388**, 775-782 (2007).

Curriculum Vitae

Mgr. Karel Marschner

Address

Spartakiádní 17/271

Ústí nad Labem

Czech Republic, 400 10

karel.marschner@gmail.com

Education

2013 – today	Ph.D.	Analytical chemistry, Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Charles University, Prague, Czech Republic.
2011 – 2013	Mgr. (MSc.)	Analytical chemistry, Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Charles University, Prague, Czech Republic (Master thesis: *Optimization of generation and atomization of arsines for speciation analysis by atomic fluorescence spectrometry*).
2008 – 2011	Bc.	Chemistry on Faculty of Science, Charles University, Prague, Czech Republic (Bachelor thesis: *Possibilities of electrochemical generation of volatile compound of thallium*).

Language skill

English – (B2, FCE – First Certificate in English in 2016)

Awards

2013 Spectroscopic Society of Ioannes Marcus Marci, Prague: The best Master thesis in the field of spectroscopy competition - 3.prize.

International visits

April – July 2015 (3 months) Universidade Federal de Santa Maria, Depto. de Química, Santa Maria, Brazil, (prof. E. M. M. Flores)

A List of Publications

Peer reviewed manuscripts:

- Marschner K., Musil S., Mikšík I., Dědina J.: Hydride generation from arsenosugars submitted to *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*.

- Marschner, K.; Musil, S.; Dědina, J.: Demethylation of Methylated Arsenic Species during Generation of Arsanes with Tetrahydridoborate(1−) in Acidic Media. *Analytical Chemistry*, **88**, 6366−6373 (2016).

- Marschner, K.; Musil, S.; Dědina, J.: Achieving 100% Efficient Postcolumn Hydride Generation for As Speciation Analysis by Atomic Fluorescence Spectrometry. *Analytical Chemistry*, **88**, 4041−4047 (2016).

- Marschner, K.; Musil, S.; Dědina, J.: Flame-in-gas-shield and miniature diffusion flame hydride atomizers for atomic fluorescence spectrometry: optimization and comparison. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, **109**, 16–23 (2015).

Abstract of conference contributions:

Presenting author is underlined.

- Musil S., Marschner K., Matoušek T., Dědina J.: Selective Hydride Generation of Inorganic Arsenic for Fast screening of Samples of Marine Origin. In *Colloquium Spectroscopicum Internationale - CSI XL*, Book of Abstracts, Pisa, Italy, 11.–16.6.2017, p. PP37. (poster presentation)

- Marschner K., Musil S., Dědina J.: Cleavage of As–C Bond during Chemical Hydride Generation. In *Colloquium Spectroscopicum Internationale - CSI XL*, Book of Abstracts, Pisa, Italy, 11.–16.6.2017, p. OL169. (oral presentation)

- Marschner K., Matoušek T., Musil S.: Selektivní generování arsanu s ICP-MS detekcí pro rychlou analýzu anorganického arsenu ve vzorcích mořského původu. In: *Workshop SPECIAČNÍ ANAlÝZA 2017*, Skalka u Jěžova, Czech Republic, 22.–25.5.2017, p. 32, ISBN 978-80-88195-02-3. (oral presentation)

- Marschner K., Musil S., Dědina J.: Speciační analýzu arsenu založena na generování arsanů a detekcí atomovou fluorescenční spektrometrií. In: *Workshop SPECIAČNÍ ANALÝZA 2017*, Skalka u Ježova, Czech Republic, 22.–25.5.2017, p. 31, ISBN 978-80-88195-02-3. (oral presentation)

- Marschner K., Musil S., Rychlovský P., Dědina J.: Hydride generation of 'arsenosugars' from algae samples. In: *15th Workshop on Progress in Trace Metal Speciation for Environmental Analytical Chemistry, TraceSpec 2016*, Book of abstracts, Gdańsk, Poland, 4.–7.9.2016, p. 100, ISBN 978-83-62984-36-7. (poster presentation)

- Musil S., Marschner K., Dědina J.: Hydride generation and atomic fluorescence spectrometry as a sensitive tool for speciation analysis of arsenic. In: *15th Workshop on Progress in Trace Metal Speciation for Environmental Analytical Chemistry, TraceSpec 2016*, Book of abstracts, Poland, 4.–7.9.2016, p. 12, ISBN 978-83-62984-36-7. (oral presentation)

- Marschner K., Musil S., Rychlovský P., Dědina J.: Arsenic speciation by hydride generation coupled with atomic fluorescence spectrometry. In: *Proceedings of the 12th International Students Conference "Modern Analytical Chemistry"*, Prague, Czech Republic, 22.–23. 9.2016, p. 31–36, ISBN 978-80-7444-044-1. (oral presentation)

Dědina J., Kratzer J., Musil S., Marschner K., Matoušek T., Svoboda M.: Volatile species generation and atomization for atomic absorption and atomic fluorescence: New developments. In: *Beijing Conference and Exhibition on Instrumental Analysis - BCEIA 2015*, Beijing, China, 27.–30.10.2015, p. 290–291. (oral presentation)

- Marschner K., Musil S., Rychlovský P., Dědina J.: Efficient post HPLC column generation of arsanes for speciation analysis. In: *Colloquium Spectroscopicum Internationale - CSI XXXIX*, Book of Abstracts, Figueira da Foz, Portugal, 30.8.–3.9.2015, p. OP24. (oral presentation)

- Dědina J., Kratzer J., Musil S., Marschner K., Matoušek T., Svoboda M., Mester Z., Sturgeon R.E., Talába M., Dvořák P.: Volatile species generation and atomization for atomic absorption and atomic fluorescence: new developments. In: *Colloquium Spectroscopicum Internationale - CSI XXXIX*, Book of Abstracts, Figueira da Foz, Portugal, 30.8.–3.9.2011, p. KL9. (oral presentation

- Marschner K., Musil S., Rychlovský P., Dědina J.: Efficient generation of arsanes coupled with HPLC or with cryotrapping for speciation analysis of arsenic. In: *11th International Students Conference "Modern Analytical Chemistry"*, Prague, Czech Republic, 23.–24.9.2015, p. 123–129, ISBN 978-80-7444-036-6. (oral presentation)

- Marschner K., Musil S., Rychlovský P., Dědina J.: Arsenic speciation analysis by post-separation hydride generation and atomic fluorescence detection. In: *13th Rio Symposium on Atomic Spectrometry*, Merida, Mexico, 19.–24.10.2014, p. 133. (poster presentation)

- Marschner K., Musil S., Rychlovský P., Dědina J.: Arsenic Speciation Analysis by HPLC Postcolumn Hydride Generation and Detection by Atomic Fluorescence Detection. In: *10th International Students Conference "Modern Analytical Chemistry"*, Prague, 22.–23.9.2014, p. 74–77, ISBN 978-80-7444-030-4. (oral presentation)

- Marschner K., Musil S., Rychlovský P., Dědina J.: Arsenic speciation analysis based on selective hydride generation and atomic fluorescence detection. In: *European Symposium on Atomic Spectrometry ESAS 2014 & 15th Czech – Slovak Spectroscopic Conference*, Prague, Czech Republic, 16.–21.3.2014, p. 107. ISBN 978-80-905704-1-2. (oral presentation)