

UNIVERZITA KARLOVA
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Bc. Štěpánka Petreňová

Speciační analýza arzenu s využitím hydridového generování –
kryogenního záchytu – plynové chromatografie – atomové
absorpční spektrometrie

Arsenic speciation analysis by hydride generation – cryotrapping
– gas chromatography – atomic absorption spectrometry

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Milan Svoboda, Ph.D.

Praha 2018

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 je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 17. května 2018

.....

Štěpánka Petreňová

Pod'akovanie

Touto cestou by som chcela pod'akovať všetkým, ktorý mi pri riešení tejto diplomovej práce vychádzali v ústrety. V prvom rade ďakujem svojmu výbornému školiteľovi RNDr. Milanovi Svobodovi, Ph.D. za odborné vedenie, množstvo cenných rád a tiež za jeho podporu a trpezlivosť behom celej práce. Ďakujem taktiež doc. RNDr. Jiřímu Dědinovi, DSc. za všestrannú pomoc. Pod'akovanie patrí aj celému vedeckému tímu na Oddelení stopovej prvkovej analýzy Ústavu analytické chemie AV ČR, v. v. i. za spoluprácu, ochotu a ústretový prístup. Zároveň ďakujem svojej rodine za všetku podporu, lásku, starostlivosť a umožneniu štúdia na vysokej škole.

Abstrakt SK

Táto práca sa zaoberá špeciálnou analýzou arzénu s využitím hydridového generovania – kryogénneho záchytu – plynovej chromatografie – atómovej absorpčnej spektrometrie. Cieľom práce bol rozvoj metodiky a inštrumentácie špeciálnej analýzy arzénu založenej na kombinácií selektívneho generovania substituovaných hydridov s detekciou atómovou absorpčnou spektrometriou s využitím kryogénneho záchytu generovaných špecií a ich separácie pomocou plynového chromatografu. V prvej časti práce je študovaný vplyv jednotlivých parametrov ovplyvňujúcich separáciu v plynovom chromatografe a to doba nástreku z kryogénnej pasce do GC, teplotný program, prietoková rýchlosť nosného plynu a prietoková rýchlosť nosného plynu cez rozbočovač („deanswitch“). Optimalizácia týchto parametrov je snaha o dosiahnutie dostatočného rozlíšenia jednotlivých píkov arzénových špecií separovaných pomocou plynového chromatografu. Ďalej je požadovaná dostatočná citlivosť metódy v porovnaní s ostatnými metódami využívajúcich AAS detekciou ako napríklad hydridové generovanie v kombinácií s kryogénnou pascou. Preto je braný zreteľ aj na limity detekcie a kvantifikácie arzénových špecií. Z dôvodu rozšírenia možností dávkovania rôzneho objemu vzorku a zníženiu „koncentračných“ limitov detekcie je do systému zaradená dávkovacia špička nahradzujúca dávkovaciu cievku dovoľujúca dávkovať objemy vzoriek od desiatok mikrolitrov až po desať mililitrov. Pre zistenie strát jednotlivých arzénových špecií vplyvom priechodu plynovým chromatografom boli výsledky porovnané so zavedenými prístupmi, a to kombinácie hydridového generovania s AAS detekciou a hydridového generovania – kryogénneho záchytu s AAS detekciou. Druhý zmienovaný prístup poslúžil pre hodnotenie ovplyvnenia tvaru, výšky a plochy píku separácií na kolóne plynového chromatografu. Analytické charakteristiky zavedených prístupov s novým prístupom študovaným v tejto práci boli porovnané. V závere práce bola snaha zistiť, či je študovaný prístup dostatočne robustný a vhodný pre využitie špeciálnej analýzy arzénu v rôznych typoch vzoriek, či už sa jedná o vzorky zo životného prostredia alebo biologické vzorky. K tomu účelu boli využité certifikované referenčné materiály a porovnanie výsledkov s ďalšími konkurenčnými metódami ako je kombinácia vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie, hydridového generovania s atómovou fluorescenčnou spektrometriou alebo hydridového generovania s kryogénnym záchytom a atómovou fluorescenčnou spektrometriou.

Abstrakt CZ

Tato práce se zabývá speciální analýzou arzenu s využitím hydridového generování – kryogenního záchytu – plynové chromatografie – atomové absorpční spektrometrie. Cílem práce byl rozvoj metodiky a instrumentace speciální analýzy arzenu založené na kombinaci selektivního generování substituovaných hydridů s detekcí atomovou absorpční spektrometrií s využitím kryogenního záchytu generovaných arsanů a jejich separace pomocí plynového chromatografu. V první části práce je studován vliv jednotlivých parametrů ovlivňující separaci v plynovém chromatografu, a to doba nástřiku z kryogenní pasti do GC, teplotní program, průtoková rychlost nosného plynu a průtoková rychlost nosného plynu přes rozbočovač („deanswitch“). Optimalizace těchto parametrů je snahou o dosažení dostatečného rozlišení jednotlivých píků arzenových specií separovaných pomocí plynového chromatografu. Dále je požadována dostatečná citlivost metody ve srovnání s ostatními metodami využívající AAS detekci jako je kombinace hydridového generování s kryogenní pastí. Proto je brán zřetel i na limity detekce a kvantifikace arzenových specií. Z důvodu rozšíření možností dávkování různého objemu vzorků a snížení „koncentračních“ limitů detekce je do systému zařazena dávkovací špička nahrazující dávkovací cívku dovolující dávkovat objemy vzorků od desítek mikrolitrů až po deset mililitrů. Pro zjištění ztrát jednotlivých arzenových specií vlivem průchodu plynovým chromatografem byly výsledky porovnány se zavedenými přístupy, a to kombinací hydridového generování s AAS detekcí a hydridového generování – kryogenního záchytu s AAS detekcí. Nadto druhý zmíněný přístup posloužil pro hodnocení ovlivnění tvaru, výšky a plochy píku separací na koloně plynového chromatografu. Analytické charakteristiky zavedených přístupů s novým přístupem studovaným v této práci byly porovnány. V závěru práce byla snaha zjistit, zda je studovaný přístup dostatečně robustní a vhodný pro využití speciální analýzy arzenu v různých typech vzorků ať už se jedná o vzorky z životního prostředí či biologické. K tomu účelu byly využity certifikované referenční materiály a porovnání výsledků s dalšími konkurenčními metodami jako je kombinace vysokoúčinné kapalinové chromatografie, hydridového generování s atomovou fluorescenční spektrometrií nebo hydridového generování s kryogenním záchytem a atomovou fluorescenční spektrometrií.

Abstrakt EN

The thesis is focused on a speciation analysis of arsenic with use of the hydride generation – cryotrapping – gas chromatography – atomic absorption spectrometry. The aim of this project was the development of a method and instrumentation of the speciation analysis of arsenic based on combination of selective generation of substituted hydrides with a detection by atomic absorption spectrometry and with use of the cryotrapping of generated arsenic species and their separation by the gas chromatography. In the first part of this work the effects of individual parameters which influence the separation in the gas chromatograph were studied. Especially, time of injection from the cryotrap into GC, temperature program, carrier gas flow and carrier gas flow through a “deanswitch”. Optimization of these parameters is an attempt to achieve a satisfactory resolution of the individual peaks of arsenic species separated by gas chromatography. Furthermore, an adequate sensitivity of this method is required to be achieved in comparison to other methods that use AAS detection such as a combination of hydride generation with cryotrapping. For this reason, the detection limits and the quantification of arsenic species were important to be determined as well. A sampling coil was replaced by a sampling tip allowing sampling of various volumes from tenths of microliters up to ten milliliters which lead to broadening the possibilities of sampling volumes and lowering the “concentration” detection limits. To determine the loss of individual arsenic species caused by passing through the gas chromatograph the results were compared to well-established approaches, combinations of hydride generation with AAS detection and hydride generation - cryogenic trapping with AAS detection. The second strategy mentioned above was used to evaluate the influence of the separation on the gas chromatographic column on the peak height, shape and area. Analytical characteristics of the established methods with a novel approach studied in this project were compared. The final part of this project was to assess if the approach studied is sufficiently robust and suitable for speciation analysis of arsenic in diverse types of samples regardless of the origin (environmental or biological samples). For this objective, certified reference materials were used, and the results were compared with other competitive methods e.g. combination of HPLC, hydride generation with atomic fluorescence spectrometry or hydride generation with cryotrapping and atomic fluorescence spectrometry.

Kľúčové slová:

Hydridové generovanie, kryogénny záchyt, plynová chromatografia, atomová absorpčná spektrometria, arzén, špeciálna analýza

Kľúčová slova:

hydridové generování, kryogenní záchyt, plynová chromatografie, atomová absorpční spektrometrie, arzén, špeciální analýza,

Key words:

hydride generation, cryotrapping, gas chromatography, atomic absorption spectrometry, arsenic, speciation analysis

Obsah

Úvod	11
1 Teoretická časť	12
1.1 Arzén.....	12
1.1.1 Metabolizmus arzénu	12
1.1.2 Toxicita.....	12
1.2 Atómová absorpčná spektrometria	14
1.3 Generovanie hydridov.....	16
1.3.1 Chemické generovanie hydridov.....	16
1.3.1.1 Metódy priameho prenosu	16
1.3.1.2 Kolekčné metódy	17
1.3.2 Elektrochemické generovanie hydridov	18
1.3.3 Fotochemické generovanie hydridov	18
1.5 Atomizácia hydridov.....	18
1.6 Speciačná analýza	19
1.6.1 Selektívne generovanie hydridov	20
1.6.2 Generovanie substituovaných hydridov	20
1.6.3 Postkolonové generovanie	21
1.7 Plynová chromatografia	21
1.7.1 Nástrek	21
1.7.2 Kolóna	22
1.7.3 Detektory.....	22
2 Experimentálna časť	23
2.1 Chemikálie	23
2.1.1 Certifikované referenčné materiály	24
2.2 Prístroje.....	25
2.2.1 Atómový absorpčný spektrometer	25
2.2.2 Plynový chromatograf.....	25
2.2.3 Ostatné použité zariadenia	25
2.3 Popis súčastí aparatúr.....	26
2.3.1 Generátor hydridov	26
2.3.2 Separátor fáz.....	28

2.3.3 Sušiacie zariadenie	28
2.3.4 Kremenná U-kapilára	28
2.3.5 Kremenný multiatomizátor	29
2.4 Použité systémy	29
2.4.1 HG-AAS.....	29
2.4.2 HG-CT-AAS	30
2.4.3 HG-CT-GC-AAS	30
2.5 Konvencia a spracovanie nameraných dát	32
3 Výsledková časť a diskusia	34
3.1 HG-AAS	34
3.1.1 Kalibračné závislosti	34
3.1.2 Analytické charakteristiky.....	36
3.2 HG-CT-AAS	37
3.2.1 Kalibračné závislosti	37
3.2.2 Analytické charakteristiky.....	39
3.3 HG-CT-GC-AAS	40
3.3.1 Optimalizácia parametrov separácie v GC.....	40
3.3.1.1 Optimalizácia doby nástreku z kryogénnej pasce do GC	41
3.3.1.2 Optimalizácia teplotného programu GC.....	42
3.3.1.3 Optimalizácia prietoku nosného plynu	48
3.3.1.4 Optimalizácia prietoku cez rozbočovač.....	50
3.3.2 Kalibračná závislosť.....	52
3.3.3 Analytické charakteristiky.....	53
3.3.4 Referenčné materiály.....	54
3.3.5 Vzorky moču	56
4 Záver.....	58
5 Použitá literatúra.....	59

Zoznam skratiek

A	Absorbancia
AAS	Atómová absorpčná spektrometria
AFS	Atómová fluorescenčná spektrometria
CFA	Kontinuálna prietoková analýza
DMA ^s	Kyselina dimetylarzeničná
FIA	Injekčná prietoková analýza
FID	Plameňovo ionizačný detektor
GC	Plynová chromatografia
HG	Generovanie hydridov
HG-AAS	Generovanie hydridov v spojení s atómovou absorpčnou spektrometriou
HG-CT-GC-AAS	Generovanie hydridov s kryogénnym záchytným plynovým chromatografom s detekciou atómovým absorpčným spektrometrom
iAs ^{III}	Kyselina arzenitá
iAs ^V	Kyselina arzeničná
ICP-MS	Hmotnostná spektrometria s indukčne viazaným plazmatom
LOD	Medza detekcie
LOQ	Medza kvantifikácie
MA ^s	Kyselina metylarzeničná
s	Smerodajná odchýlka
s _b	Smerodajná odchýlka slepého pokusu
s _r	Relatívna smerodajná odchýlka
PA	Plocha píku
PTFE	Polytetrafluoretylén
TMA ^s O	Oxid trimetylarzeničný
TRIS	Tris(hydroxymetyl)aminometán

Úvod

V dnešnej dobe sa kladie veľký dôraz na sledovanie účinku arzénu a jeho zlúčenín na ľudský organizmus. Kvôli rozdielnej toxicite jednotlivých foriem je potrebné mať k dispozícii dostatočne citlivú, robustnú a rýchlu analytickú metódu vhodnú pre stanovenie jednotlivých foriem arzénu, ktorou je možné analyzovať aj biologické materiály so zložitejšou maticou ako napr. moč.

Ciele diplomovej práce

Hlavným cieľom tejto práce bol rozvoj metodiky a inštrumentácie špeciálnej analýzy arzénu založenej na kombinácii selektívneho generovania substituovaných hydridov s detekciou atómovou absorpčnou spektrometriou s využitím kryogénneho záchytu generovaných specií a ich separácie pomocou plynového chromatografu. Ďalším cieľom bolo dokázanie, že nedochádza k stratám arzénových specií pri zapojení plynového chromatografu do systému, k čomu slúžilo porovnanie so zavedenými metódami ako sú HG-CT-AAS a HG-AAS. Posledným z cieľov bolo overiť študovaný prístup HG-CT-GC-AAS pre špeciálnu analýzu arzénu v certifikovaných referenčných materiáloch a v reálnych vzorkách moči a porovnanie výsledkov s výsledkami získanými ďalšími konkurenčnými metódami ako je HPLC-HG-AFS alebo HG-CT-AFS.

1 Teoretická časť

1.1 Arzén

Arzén patrí do V. hlavnej skupiny periodickej sústavy prvkov. Arzén sa v prírode najčastejšie vyskytuje v zlúčeninách spolu so sírou, kyslíkom a železom.¹ Arzén sa nachádza vo viac než 245 mineráloch a z toho najbežnejšie sú arsenopyrit (FeAsS), realgar (AsS) a auripigment (As₂S₃).² Jeho obsah v zemskej kôre predstavuje približne 2 mg kg⁻¹. Zlúčeniny arzénu sa využívajú v metalurgii, ďalej potom pri výrobe herbicídov a insekticídov.³ Niektoré zlúčeniny arzénu sú súčasťou prípravkov na impregnáciu dreva.⁴

Agentúra pre životné prostredie (EPA) a Svetová zdravotnícka organizácia (WHO) stanovili maximálnu prípustnú koncentráciu arzénu v pitnej vode na 50 μg dm⁻³ a doporučenú koncentráciu na 10 μg dm⁻³.⁵ V Českej republike je limit pre arzén v pitnej vode 10 μg dm⁻³.⁶

1.1.1 Metabolizmus arzénu

Anorganický arzén je metabolizovaný oxidačnými a redukčnými procesmi a je vylučovaný močom. Metabolická cesta je nasledujúca: Anorganické arseničnany (iAs^V) – anorganické arsenitany (iAs^{III}) – kyselina metylarseničná (MAs^V) – kyselina metylarsenitá (MAs^{III}) – kyselina dimetylarseničná (DMAs^V) – kyselina dimetylarsenitá (DMA^{III}) – trimetylarseničný oxid (TMAs^{VO}).⁷

Arzén je tiež možné nájsť v prírode vo forme organických zlúčenín, ktoré sú považované za netoxické, keďže sa v organizme nemetabolizujú a sú v nezmenenej forme vylučované močom. Organické zlúčeniny sa vyskytujú hlavne v morských živočíchoch a sú to napríklad arsenobetain a arsenocholín.⁸

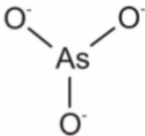
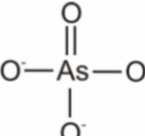
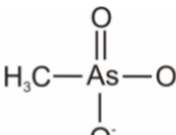
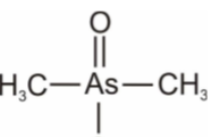
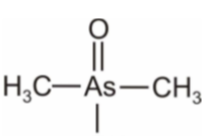
1.1.2 Toxicita

Toxicita arzénu je spojená s jeho oxidačným stavom a druhom zlúčeniny. Anorganické formy arzénu sú vysoko toxické, jeho trojmocné formy sú toxickejšie než päťmocné.⁹ Trojmocná forma anorganického arzénu sa viaže na tiolové skupiny aminokyselín v proteínoch a inhibuje tak niektoré enzymatické systémy, päťmocná forma sa neviaže priamo na aktívne miesta enzýmov, ale najprv sa redukuje na trojmocnú formu.¹⁰ Akútne otravy sa prejavujú problémami tráviacej sústavy, ktoré vedú k celkovej

dehydratácií organizmu a obehovému zlyhaniu. Dochádza k poškodeniu pečene a obličiek.¹¹ Chronické vystavenie organizmu arzénu má rôznorodé prejavy. Jeden z prejavov môže byť poškodenie kože alebo kardiovaskulárne problémy, ďalej rovnako ako pri akútnych otravách tráviace ťažkosti, a v neposlednej rade poškodenie nervovej sústavy.¹² Objaviť sa takisto môže rakovina močového mechúra alebo pľúc.¹³

Toxicita arzénu klesá v poradí arzán – anorganické arsenitany – organické trojmocné zlúčeniny – anorganické arseničnany – organické päťmocné zlúčeniny – arsoniové zlúčeniny – elementárny arzén.¹

Tab. 1.1 Zlúčeniny arzénu tvoriace prchavé hydridy

Skratka používaná v texte práce	Sumárny vzorec zlúčeniny vstupujúcej do reakcie	Štruktúrny vzorec	Vzniknutá prchavá zlúčenina
iAs ^{III}	Arzenitan AsO ₃ ³⁻		AsH ₃
iAs ^V	Arzeničnan AsO ₄ ³⁻		AsH ₃
MAs ^V	Metylarzeničnan CH ₃ AsO ₃ ²⁻		CH ₃ AsH ₂
DMA ^V	Dimetylarzeničnan C ₂ H ₆ AsO ₂ ⁻		(CH ₃) ₂ AsH
TMA ^V O	Oxid trimetylarzeničný C ₃ H ₉ AsO		(CH ₃) ₃ As

Prehľad zlúčenín arzénu využitých v tejto práci so zjednodušenými vzorcami je zobrazený v tab. 1.1. V tejto tabuľke sú uvedené príslušné hydridy, ktoré vzniknú chemickým generovaním pomocou tetrahydridoboritanu sodného.

$(\text{CH}_3)_3\text{As}$ nie je hydrid, ale jedná sa o jeho trimetylovanú substituovanú formu, s ktorou je možné pracovať analogicky ako s arzénovými hydridami, pretože je to tak isto prchavá zlúčenina a bude pre jednoduchosť v texte zahrnutá medzi hydridy.

1.2 Atómová absorpčná spektrometria

Atómová absorpčná spektrometria je jedna z najbežnejších metód prvkovej analýzy, ktorá sa používa už od 60. rokov minulého storočia. Touto metódou sa dá stanovovať väčšina prvkov periodickej sústavy aj v stopových koncentráciách. Výhodou AAS je vysoká selektivita a citlivosť stanovenia, za relatívne nízke náklady. Princíp AAS spočíva v absorpcii elektromagnetického žiarenia voľnými atómami v plynnom stave, ktoré vznikajú v atomizátore. Voľné atómy absorbujú fotóny určitej energie. Energetická hodnota fotónov je charakteristická pre určitý druh atómov a počet absorbovaných fotónov je mierou množstva stanovovaných atómov.¹⁴ Podľa spôsobu atomizácie môžeme metódy rozdeliť do troch skupín:

AAS s plameňovou atomizáciou (F-AAS), ktorá je jedna z najrozšírenejších analytických techník pre stanovenie stopových množstiev prvkov, vďaka jej jednoduhosti, robustnosti a cene, ale jej nevýhoda je nízka citlivosť.¹⁵

AAS s elektrotermickou atomizáciou (ETA-AAS), kde je rozšírené použitie grafitových kyviet. Táto technika sa dostala do popredia po uvedení HR-CS-GFAAS, a to kvôli jej nesporným výhodám ako stanovenie pevných vzoriek bez úpravy, čiže sa eliminuje čas prípravy vzoriek na analýzu. V tejto technike je možné použiť vodné štandardy na vytvorenie kalibrácie pre stanovenie pevných vzoriek.¹⁶ Taktiež je možné stanovovať nekovy ako Cl,¹⁷ P, F a S.¹⁸ v podobe biatómových molekúl.

AAS s generovaním prchavých zlúčenín (HG-AAS). Touto technikou je možné stanoviť všetky prvky, ktoré sú schopné vytvoriť prchavé hydridy alebo studené páry v prípade kadmia¹⁹ a ortuti.²⁰

Prístroj AAS je zložený zo základných častí a to zdroj primárneho žiarenia, atomizátor, monochromátor a detektor.

Primárne žiarenie musí mať vysokú žiarivú energiu a stabilný žiarivý tok. V AAS sa využívajú tri typy zdroja primárneho žiarenia:

Výbojka s dutou katódou (HCL) je najčastejšie a najdlhšie používaným zdrojom primárneho žiarenia. HCL je lampa s dutou, často valcovou, katódou obsahujúcu jeden alebo viac prvkov analytu. Anóda je väčšinou vyrobená z volfrámu alebo niklu. Výbojka je plnená vzácnym plynom ako argón alebo neón. Medzi elektródami je vložené napätie 100-200 V a napájací prúd výbojky je v jednotkách miliampérov. Vložením napätia na elektródy sa vzácny plyn ionizuje zrážkami s urýchlenými elektrónmi. Kationy vzácneho plynu bombardujú povrch katódy a vyrážajú atómy kovu, tie sú excitované zrážkami s iónmi a elektrónmi plazmatu a pri následnom vyžiarení fotónu sa vrátia naspäť do základného stavu.^{14,21}

Superlampa funguje na princípe výbojky s dutou katódou. Intenzita žiarenia je zvýšená ďalším, pomocným, výbojom medzi dvoma pomocnými elektródami pred ústím katódy. Tieto výbojky sa vyznačujú vyššou intenzitou žiarenia, lepšou linearitou kalibračných závislostí než klasické výbojky s dutou katódou, ďalšou výhodou sú tiež nižšie obstarávacie náklady v porovnaní s bezelektrodovou výbojkou.²¹

Bezelektrodová výbojka (EDL) je sklenená banka s kremenným vstupným oknom vyplneným vhodným množstvom prvku v zmesi ako kov a prchavá zlúčenina (napr. halogenid kovu). Výbojka je umiestnená v cievke rádiofrekvenčného generátora, po prípade v rezonančnej dutine mikrovlnného generátora. Oba tieto generátory dodávajú energiu k vytvoreniu stabilného výboja. Bezelektrodové výbojky emitujú veľmi úzke čiary s intenzitou až o rád vyšší než výbojky s dutou katódou. V dnešnej dobe sú bezelektrodové výbojky v AAS bežnou praxou a pre mnoho prvkov nahrádzajú ostatné lampy. V prípade arzénu EDL lampa poskytuje dvojnásobné zlepšenie citlivosti a lepšie limity detekcie v porovnaní s HCL.^{14,21}

1.3 Generovanie hydridov

Generovanie prchavých zlúčenín je veľmi obľúbená technika vďaka svojej jednoduchosti a nízkej cene vybavenia. Jej hlavná výhoda spočíva v princípe tejto metódy, kedy pri prechode analytu z kvapalného do plynného stavu dochádza k separácii od matrice a tým pádom aj potlačeniu interferenčných vplyvov matrice. Ďalej ponúka možnosť zakoncentrovania analytu v plynnej fázi pred detekciou, čo vedie k zníženiu detekčných limitov o niekoľko rádov.²² Hydridy sa dajú generovať zo vzorky buď chemicky, elektrochemicky alebo fotochemicky.

Techniky generovania hydridov je možné využiť pre mnoho prvkov periodickej sústavy a to napríklad As, Bi, Ge, Pb, Se, Sb, Sn, Te a ďalších. Najrozšírenejšou metódou je chemické generovanie hydridov, kedy je hydrid vytvorený chemickou reakciou s redukčným činidlom. Ako redukčné činidlo sa najbežnejšie používa tetrahydridoboritan sodný.²³

Spojenie HG-AAS poskytuje vysokú citlivosť a nízky šum základnej línie za nízke prevádzkové náklady na rozdiel od použitia AFS alebo ICP-MS. Ak sa využije kremenný multiatomizátor namiesto klasického kremenného atomizátoru je možné zvýšiť odolnosť voči interferenčným vplyvom a zvýšiť lineárny dynamický rozsah. Touto metódou sa dajú pohodlne analyzovať vzorky s vodnou matricou, ale aj vzorky s oveľa zložitejšou matricou ako sú biologické vzorky ako moč alebo krv, sedimenty atď.^{24,25}

1.3.1 Chemické generovanie hydridov

Chemické generovanie hydridov sa skladá z dvoch fáz. V prvej fázi prebieha redukcia analytu v kvapalnej fázi na hydrid a prevedenie tohto hydridu do plynnej fáze. V druhej časti prebieha transport hydridu v plynnej fáze do atomizátoru.²⁵ Existujú dve základné metódy generovania hydridov a to buď metóda priameho prenosu, kedy je uvoľnený hydrid z roztoku vedený priamo do atomizátoru alebo kolekčná metóda, kedy je hydrid zhromažďovaný v kolekčnom zariadení a až potom uvoľnený a vedený do atomizátoru.²⁷

1.3.1.1 Metódy priameho prenosu

Pri metódach priameho prenosu sú hydridy vedené priamo do atomizátoru a patrí medzi nich: kontinuálne usporiadanie, dávkovanie do prúdu a dávkové usporiadanie. Pri

kontinuálnom usporiadaní je konštantný tok vzorku zmiešaný s konštantným tokom redukčného činidla a reakčného média. Reakčná zmes je následne vedená cez reakčnú cievku do separátora fáz, kde dochádza k oddeleniu plynnej fáze od kvapalnej, ktorá je vedená do odpadu. Hydrid je privádzaný prúdom nosného plynu do atomizátoru.

Dávkovanie do prúdu je podobné ako kontinuálne usporiadanie, s tým rozdielom, že konštantný tok vzorku je nahradený tokom nosiča. Do prúdu nosiča je pomocou dávkovacieho ventilu dávkovaná vzorka.²⁸

Dávkové usporiadanie zahŕňa nádobu, vyrobenú zo skla alebo plastu, ktorá slúži ako reaktor a súčasne ako separátor fáz. Vzorka je umiestnená do nádoby a redukčné činidlo je k nej privádzané peristaltickým čerpadlom alebo manuálne pomocou injekčnej striekačky. Privádzaný nosný plyn pomáha uvoľňovaniu hydridu z kvapalnej fáze a transportuje ho do atomizátoru. Po ukončení reakcie je zreagovaná zmes odstránená do odpadu a generátor je vypláchnutý.²⁹

1.3.1.2 Kolekčné metódy

Základnom kolekčných metód je zachytenie analytu v časti aparatury hydridového generátora alebo mimo neho. Záchyt môže prebiehať v absorpčnom médiu, alebo in situ záchyt v grafitových atomizátoroch, ďalšia možnosť je záchyt vymrazovaním.

Pri záchyte vymrazovaním je hydrid zachytený v U-trubicí plnenej sorbentom ponorenej do kvapalného dusíku. Po prebehnutí reakcie v hydridovom generátore a zachytení celkového hydridu v kryogénnej pasci je táto pasca vyhriata nad teplotu varu daného hydridu a dochádza k uvoľneniu hydridu z pasce a prúdom nosného plynu je unášaný do atomizátoru, kde dochádza k detekcii.³⁰ Hlavnou výhodou tejto techniky je možnosť zachytiť hydrid z veľkého objemu vzorku, následne ho uvoľniť a transportovať veľmi rýchlo do atomizátoru. Nevýhodou je časová náročnosť a obťažná automatizácia.

Pred U-trubicu sa pridáva sušiacie zariadenie, ktoré eliminuje vodnú paru, ktorá vychádza zo separátora fáz a tým pádom sa predchádza zamrznutiu vodnej pary v kryogénnej pasci a upchatiu. Ako jediné vhodné sušidlo pre arzén je NaOH, pretože iba pri použití NaOH nedochádza k stratám žiadnych arzénových foriem.³¹

1.3.2 Elektrochemické generovanie hydridov

Ďalšia možnosť prípravy prchavých zlúčenín je elektrochemické generovanie.³² Táto technika predstavuje alternatívu k príprave prchavých zlúčenín, kedy sa miesto redukčného činidla používa k redukcii prechod elektrického prúdu v prostredí veľmi čistých minerálnych kyselín. K redukcii dochádza v elektrolytickej cele.³³ Ako jedna z výhod je zamedzenie kontaminácie analyzovaného vzorku redukčným činidlom.

1.3.3 Fotochemické generovanie hydridov

Najnovší prístup generovania hydridov predstavuje fotochemické generovanie.³⁴ Ku generovaniu hydridov dochádza pomocou ultrafialového žiarenia v prítomnosti nízko molekulárnych organických kyselín. Ku kvapalnému vzorku je pridaná organická kyselina, ktorá sa pôsobením UV žiarenia rozloží a dochádza k rade radikálových reakcií, pri ktorých taktiež dochádza k fotoredukcii analytu na prchavý hydrid.³⁵

1.5 Atomizácia hydridov

Najčastejšie využívanými atomizátormi pri generovaní hydridov sú kremenné atomizátory, ďalej sa dá použiť aj plameň alebo grafitový atomizátor. V tejto práci bol využívaný kremenný multiatomizátor.

Externe vyhrievaný kremenný atomizátor ma obvykle tvar písmena T, jeho vodorovné rameno leží v optickej ose spektrometru a je vyhrievané buď plameňom acetylén-vzduch alebo pomocou odporovo vyhrievanej piecky. Do prírodného ramena atomizátoru je hydrid privádzaný zmesou nosného plynu a vodíku z generátora hydridov a v atomizátore je prevedený na voľné atómy. Konvenčný kremenný atomizátor nevyužíva špeciálny prívod kyslíku, avšak jeho určitý obsah je dôležitý pre dosiahnutie optimálnej citlivosti. Kyslík sa do atomizátoru dostáva buď zo vzorku, alebo z reakčných médií alebo je obsiahnuté jeho určité množstvo v plynach. Atomizácia hydridov nie je termický proces, hydridy sú atomizované interakciou s vysoko energetickými vodíkovými radikálmi. Na začiatku prírodného ramena sa tvorí oblak voľných vodíkových radikálov, ktoré vznikli reakciou medzi vodíkom z tetrahydridoboritanu sodného a kyslíkom. Poloha oblaku H radikálov závisí na teplotnom profile vnútri atomizátoru, na prietoku nosného plynu a na konkrétnom atomizátore.³⁶ V oblaku

vodíkových radikálov dochádza k reakcií medzi radikálom vodíku a hydridom analytu podľa nasledujúcich rovníc:



Nedostatky tohto typu atomizátoru spočívajú v nízkej odolnosti voči interferenciám a nedostatočnej linearite kalibračných závislostí, to sa deje vďaka tomu, že voľnými vodíkovými radikálmi nie je vyplnená celá optická trubica ale iba jej časť a voľné atómy analytu môžu podliehať ďalším chemickým reakciám.³⁷

Nevýhody kremenného atomizátoru môžu byť potlačené a to tak, že by bol analyt udržiavaný v stave voľných atómov. K tomu sa používa multiatomizátor, v ktorom vznikajú mnohopočetné oblaky vodíkových radikálov a analyt je opakovane atomizovaný. Multiatomizátor je dvojplášťový externe vyhrievaný atomizátor. Jeho časť umiestnená v optickej dráhe sa skladá z dvoch koncentrických trubíc, ktoré sú vyhrievané na teplotu 700 – 1100 °C. Vnútna trubica odpovedá optickej trubici kremenného atomizátoru, jediný rozdiel je v otvoroch umiestnených v celej dĺžke vnútornej optickej trubice. Do priestoru medzi trubicami je privádzaný kyslík, a ten vstupuje otvormi do vnútorného objemu. K prívodu hydridu z generátoru slúži rovnako ako u kremenného atomizátoru prírodné rameno v strednej časti optickej trubice. Na vstupe kyslíku do optickej trubice dochádza k reakcii kyslíku s prítomným vodíkom a tým k tvorbe vodíkových radikálov. Pri optimálnych podmienkach by optická trubica mala byť rovnomerne vyplnená vodíkovými radikálmi. Produkty zániku voľných atómov by mali byť okamžite znova atomizované reakciou s vodíkovými radikálmi.³⁸ Odolnosť multiatomizátoru voči atomizačným interferenciám je o jeden až dva rady vyššia v porovnaní s kremenným atomizátorom.³⁹

1.6 Speciačná analýza

Termín speciačná analýza je definovaný ako stanovenie koncentrácií jednotlivých fyzikálne-chemických foriem prvku, ktorých súčet tvorí celkovú koncentráciu prvku vo vzorku. Jednotlivé fyzikálne-chemické formy prvku sa nazývajú chemické specie, ktoré

sú definované izotopickým zložením, elektronickým alebo oxidačným stavom, prípadne štruktúrou komplexu alebo molekuly.⁴⁰ Špeciálnu analýzu s využitím generovania hydridov je možné rozdeliť podľa troch prístupov: selektívne generovanie hydridov, generovanie substituovaných hydridov a postkolonové generovanie hydridov.

1.6.1 Selektívne generovanie hydridov

Pri selektívnom generovaní hydridov je využívaný fakt, že hydridy niektorých foriem analytu sa generujú iba za určitých podmienok.⁴¹ V prípade generovania trojmocných foriem arzenu je vhodný TRIS HCl pufovať o koncentrácií $0,75 \text{ mol dm}^{-3}$ a hodnote $\text{pH} = 6,0$. V druhom prípade je možné generovať hydridy trojmocných aj päťmocných foriem, obvykle pri nízkom pH , ktoré je dosiahnuté napr. HCl o koncentrácií 1 mol dm^{-3} , alebo generovaním po predredukcii päťmocných foriem. Tak sa získa celkový obsah arzenu a z rozdielov hodnôt sa dá dopočítať obsah päťmocných foriem.

Bežne používané látky pre predredukcii sú jodid draselný (v kombinácii s kyselinou askorbovou)⁴² a najčastejšie je používaný L-cysteín (v kombinácii s HCl).⁴³ Pri použití L-cysteínu je ako reakčné médium používaná HCl vo veľmi úzkom rozhraní koncentrácií od $0,01 \text{ mol dm}^{-3}$ do $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$. Vhodný spôsob udržania optimálneho pH pre generovanie je použitie vhodného pufru, napríklad TRIS HCl o koncentrácií $0,75 \text{ mol dm}^{-3}$ a o hodnote $\text{pH} = 6$.⁴⁴ Výhodou L-cysteínu je, že sa chová ako maskovacie činidlo a tým zvyšuje tolerančný limit voči interferenčným vplyvom. Avšak jeho nevýhodou je dlhá doba kompletnej predredukcii, ktorá za laboratórnej teploty trvá približne 60 minút.⁴⁵ Pre predredukcii sa taktiež môže použiť kyselina thioglykolová.⁴⁶

1.6.2 Generovanie substituovaných hydridov

Špeciálna analýza založená na generovaní substituovaných hydridov sa používa v prípadoch, kedy je možné jednotlivé formy analytu previesť na rôzne alkyl substituované hydridy. Analýza prebieha v troch základných krokoch. Ako prvé sa generujú zmesi alkyl substituovaných hydridov, potom dochádza k separácii jednotlivých foriem a následne prebieha atomizácia a detekcia. V prípade arzenu je typickou aplikáciou špeciácia iónových metyl a dimetyl zlúčenín. Výsledkom generovania je zmes metyl substituovaných hydridov a príslušného hydridu AsH_3 . Následne dochádza k separácii zmesi hydridov a zastúpenie jednotlivých foriem hydridov udáva zastúpenie

analyzovaných foriem analytu. Po ohriati zachytených vymrazených hydridov dochádza k ich uvoľneniu a separácii na základe ich bodov varu.³⁰

1.6.3 Postkolónové generovanie

Pri postkolónovom generovaní dochádza pred chemickým generovaním najprv k separácii jednotlivých foriem separačnou metódou, najčastejšie HPLC. Hydridy sú potom postupne generované z jednotlivých specii. Cieľom postkolónového generovania je zvýšenie citlivosti vďaka vyššej účinnosti transportu analytu do detektoru a potlačení interferencii pri atomizácii.

1.7 Plynová chromatografia

Plynová chromatografia (GC) je analytická separačná metóda, ktorá je založená na rozdelení látok medzi dve nemiešateľné fázy. Mobilnú fázu predstavuje nosný plyn a najčastejšie sa využívajú vodík, dusík, hélium a argón. Pri voľbe nosného plynu sú dôležité faktory ako viskozita, čistota, typ používaného detektoru a cena plynu. Ako stacionárna fáza môže byť použitá pevná látka alebo kvapalina. Plynová chromatografia je založená na mechanizme adsorpcie, rozdeľovania alebo vylučovania.⁴⁶

Plynový chromatograf sa skladá z nástreku alebo injektoru, prípadne dávkovacieho zariadenia, chromatografickej kolóny, detektoru a systému pre spracovanie dát.⁴⁸

1.7.1 Nástrek

Injektor je vstupom analyzovanej látky do plynového chromatografu. Nástrek látky sa najčastejšie vykonáva pomocou špeciálnej striekačky cez septum, ktoré oddeľuje vnútro injektoru od vonkajšieho prostredia. Súčasťou injektoru je liner – sklenená vložka, v ktorom dochádza pomocou vysokej teploty k rýchlemu odpareniu vzorky a ku správne premiešaniu pár vzorky s nosným plynom. Medzi injektor a kolónu je zaradený splitter, čo je delič toku a ten umožňuje viesť iba časť odpareného vzorku na kolónu. Pri stopovej analýze sa využíva technika nástreku bez splitu, nazývaná splitless injection, kedy je celá nastrieknutá vzorka vedená do kolóny.⁴⁹

1.7.2 Kolóna

V plynovej chromatografii sa používajú náplňové alebo kapilárne kolóny. Náplňové kolóny sú vyrobené zo skla alebo kovu a majú dĺžku od 1 až po 5 metrov, ich vnútorný priemer je 2 až 4 milimetre. Kolóna je bežne naplnená pevnou stacionárnou fázou, ktorá sa používa pri separácií trvalých plynov, ktoré nie je možné skvapalniť, ako napríklad vodík, dusík alebo oxid uhoľnatý a nízko vrúcich uhľovodíkov. Druhou možnosťou je pevný nosič, ktorý je pokrytý vrstvou kvapalnej stacionárnej fáze. Takéto kolóny sa s obľubou používajú pri separácií lupininových alkaloidov.⁵⁰

Kapilárne kolóny majú dĺžku od 5 po 60 metrov a vnútorný priemer od 0,1 metrov až po 0,53 milimetrov a vyrábajú sa z kremenného skla, a kvôli pevnosti sú potiahnuté vrstvou polyimidu. Stacionárna fáza je rozprestretá na vnútorných stenách kapiláry. Kapilárne kolóny sa používajú na špeciálnu analýzu arzénu.⁵¹

1.7.3 Detektory

Medzi najpoužívanejšie detektory v plynovej chromatografii patria: Plameňovo ionizačný detektor – FID, detektor elektrónového záchytu – ECD, tepelne vodivostný detektor – TCD, a hmotnostný detektor – MS. Existujú aj spojenia s AES⁵² alebo AAS.⁵³

Plameňovo ionizačný detektor bol prvýkrát predstavený na konci 50. rokov. Od tej doby je z neho jeden z najpoužívanejších detektorov v plynovej chromatografii. Výhodou tohto detektoru je možnosť stanovenia všetkých organických zlúčenín s dostatočnou citlivosťou, ako napríklad kofeín⁵⁴, alebo vitamín E.⁵⁵ Detektor elektrónového záchytu je selektívny ionizačný detektor citlivý na elektronegatívne atómy, a to hlavne halogény. Detektor je vhodný pre stopovú analýzu pesticídov v životnom prostredí.^{56,57} Tepelne vodivostný detektor je obľúbený pre svoju univerzálnosť a širokú linearitu.⁵⁸ Hmotnostný detektor má rovnako široké použitie, napríklad stanovenie pesticídov v ryži,⁵⁹ alebo stanovenie furánu v detskom jedle.⁶⁰ Ako systém na spracovanie dát slúži počítač so špeciálnym programom k tomu určeným, ktorý ovláda celý systém.

2 Experimentálna časť

2.1 Chemikálie

Deionizovaná voda pripravená zariadením Ultrapur firmy Watrex, USA;

Tetrahydridoboritan sodný 97% čistý, Sigma-Aldrich, Nemecko, pracovný roztok 1% NaBH₄ v 0,1% KOH;

Trizma hydrochlorid (TRIS HCl) pufor, Sigma-Aldrich, Nemecko, o koncentracií 0,75 mol dm⁻³ (pH upravené na 6 pomocou 10% roztoku KOH Lach-ner, Česká republika);

Hydroxid sodný, p.a., perly (Lach-Ner, Česká republika) boli použité ako náplň do sušiacieho zariadenia;

Kyselina chlorovodíková, suprapure, Merck, Nemecko, o koncentracií 1 mol dm⁻³ pre vymývanie hydridového generátoru;

Na čistenie atomizátoru bola použitá zmes 38% HF (Spolek pro chemickou a hutní výrobu, n. p. Ústí nad Labem) a 68% HNO₃ (Lachema, Neratovice) v pomere 3:7 po dobu 10 minút. Následne bol atomizátor omytý deionizovanou vodou.

L-cysteín hydrochlorid-monohydrát, čistota pre biochémiu, Merck, Nemecko;

Pracovné roztoky iAs^{III} boli pripravené presným riedením zásobného roztoku o koncentracii 1000 mg dm⁻³ z pevného As₂O₃ Lach-Ner, Česká republika, navážené množstvo bolo rozpustené v 2,5 cm³ 10% NaOH a potom doplnené 1 mol dm⁻³ HNO₃ na výsledný objem 25 cm³; zásobný roztok je uchovávaný v chladničke;

Pracovné roztoky MAs^V boli pripravené presným riedením zásobného roztoku o koncentracií 1000 mg dm⁻³ pripraveného rozpustením hexahydrátu metylarzeničnanu sodného, Chem. Service, USA, v deionizovanej vode;

Pracovné roztoky DMAs^V boli pripravené presným riedením zásobného roztoku DMAs^V o koncentracií 1000 mg dm⁻³, ktorý bol pripravený rozpustením dimetylarseničnej kyseliny, Strem. Chemicals, USA, v deionizovanej vode;

Pracovné roztoky TMA^{VO} boli pripravené presným riedením zásobného roztoku 1000 mg dm^{-3} TMA^{VO} , ktorý bol pripravený z pevného oxidu trimetylarzeničného rozpusteného v deionizovanej vode, University of British Columbia, Kanada;

Argón čistoty 99,996 % , SIAD, Praha, ČR

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

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

Kvapalný dusík, technický, SIAD, Praha, ČR

Zdroj vzduchu bol kompresovaný rozvod v laboratóriu

pH pufor, $4,01 \pm 0,02$, Hach Lange, Nemecko

pH pufor, $7,00 \pm 0,02$, Hach Lange, Nemecko

2.1.1 Certifikované referenčné materiály

Ako referenčné materiály boli použité 3 typy vôd s rôznym obsahom arzénu, Institute for National Measurement Standards, National Research Council, Canada

CASS-5 Morská voda z blízkosti pobrežia

Vzorka morskej vody bola odobraná v roku 2007 v júly v prístave Halifax v Novom Škótsku v hĺbke 12 metrov. Vzorka bola následne okyslená kyselinou dusičnou, ultrapure, na $\text{pH} = 1,6$ a po ďalších úpravách je uchovávaná v chlade v 500 cm^3 polyetylénovej fľaši. Hmotnostný podiel arzénu vo vzorku je $1,21 \pm 0,09 \mu\text{g kg}^{-1}$ a koncentračný podiel je $1,24 \pm 0,09 \mu\text{g dm}^{-3}$.

SLRS-5 Riečna voda

Vzorka riečnej vody bola odobraná v meste Ottawa. Následne bola vzorka okyslená kyselinou dusičnou, ultrapure, na $\text{pH} = 1,6$ a po ďalších úpravách je uchovávaná v chlade v 500 cm^3 polyetylénovej fľaši. Hmotnostný podiel arzénu vo vzorku je $0,413 \pm 0,039 \mu\text{g kg}^{-1}$.

NASS-5 Morská voda

Vzorka morskej vody bola odobraná v severnom Atlantiku v hĺbke 10 m juhovýchodne od Halifaxu, Kanada. Následne bola vzorka okyslená kyselinou dusičnou, (ultrapure) na $\text{pH} = 1,6$ a po ďalších úpravách je uchovávaná v chlade v 500 cm^3 polyetylénovej fľaši. Koncentračný podiel arzénu vo vzorku je $1,27 \pm 0,12 \mu\text{g dm}^{-3}$.

2.2 Prístroje

2.2.1 Atómový absorpčný spektrometer

AA-7000 Shimadzu, Japonsko, s výbojkou s dutou katódou (Photron Lamps, Australia) a s deutériovou korekciou pozadia (Shimadzu, Japonsko)

Jednotka CBM-20A Shimadzu, Japonsko

Vlnová dĺžka analytickej čiary arzénu 193,7 nm

Šírka štrbiny 0,7 nm

Napájací prúd 12 mA

Software: WizAArd, Shimadzu; LabSolutions analysis data system, Shimadzu (Japonsko)

2.2.2 Plynový chromatograf

Plynový chromatograf 7880A GC system, Agilent Technologies, USA

Kolóna používaná pri metóde HG-CT-GC-AAS: HP-1/PN:19095Z-626, o dĺžke 60 m, vnútornom priemere 0,53 mm a hrúbke stacionárnej fáze je $5 \mu\text{m}$, Agilent Technologies, USA

Plameňovo ionizačný detektor, Agilent Technologies, USA

Software OpenLAB CDS, ChemStation Edition, Agilent Technologies, USA

2.2.3 Ostatné použité zariadenia

Peristaltické čerpadla, Ismatech, Nemecko

Hmotnostné regulátory prietoku plynov Omega a Cole Parmer, USA

Rotametry Cole Parmer, USA

Elektrická piecka MHS20 Perkin Elmer, USA

Kremenný multiatomizátor

pH meter SevenEasy, Mettler toledo, Česká republika

Prietokové čerpacie hadičky Tygon, Ismatech, Nemecko

PTFE hadičky VICI Jour, Švajčiarsko

Použité software:

Microsoft® Word a Microsoft® Excel 2016 (Microsoft Corporation, USA);

Microcal™ OriginPro® 8.5 (Microcal Software, USA);

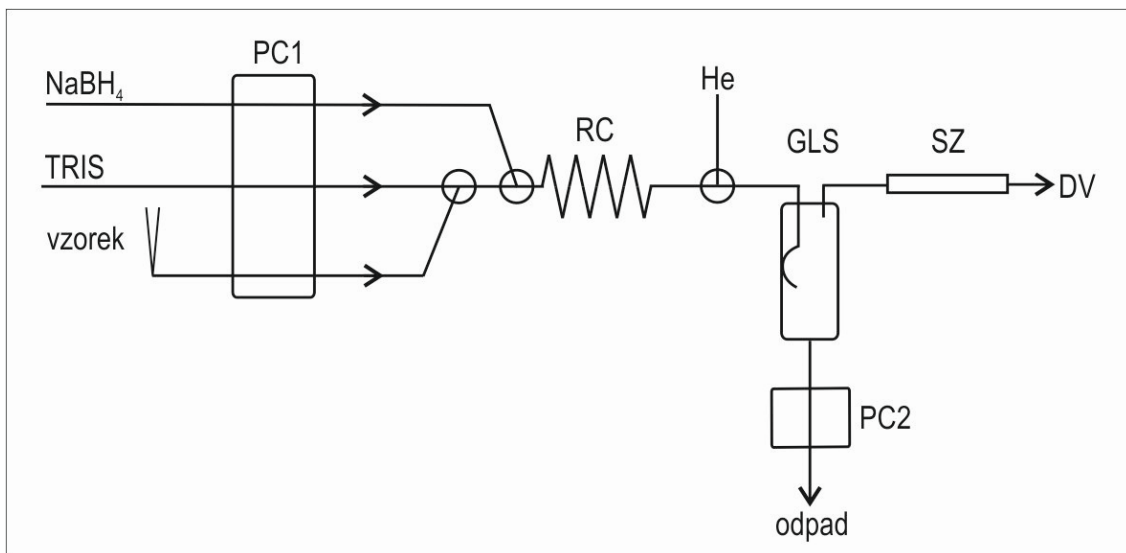
2.3 Popis súčastí aparátúr

2.3.1 Generátor hydridov

Vzorka je ručne dávkovaná do prúdu deionizovanej vody automatickou pipetou do dávkovacej špičky o objeme 0,5 cm³, prípadne o objeme 5 cm³ pre dávkovanie väčšieho objemu vzorku. Za vzorku sa v tejto diplomovej práci považuje štandardný roztok arzénových specií, vzorky certifikovaných referenčných materiálov a tak isto vzorky moču. Pomocou peristaltického čerpadla je čerpaný roztok vzorky zmiešaný s 0,75 mol dm⁻³ TRIS pufrom s prietokom 2 cm³ min⁻¹ pre oba kanály v pomere 1:1 v prvom T-konektore viz. schéma na obr. 2.1. Takto zmiešaný roztok je vedený k druhému T-konektoru, kde sa zmiešava s redukčným činidlom 1% NaBH₄ v 0,1% KOH, ktorý je rovnako čerpaný s prietokom 2 cm³ min⁻¹. Táto reakčná zmes putuje cez reakčnú slučku, ktorej objem je 0,79 cm³, do tretieho T-konektoru, kde je pridávaný nosný plyn, hélium, s prietokom 35 cm³ min⁻¹. Reakčná zmes je privádzaná do separátora fáz s núteným odťahom, ktorý je naklonený o 45° a má objem 7 cm³. V separátore fáz (kap. 2.3.2) sa od seba oddelí kvapalná a plynná zložka, kvapalná zložka sa odčerpáva pomocou peristaltického čerpadla do odpadu rýchlosťou 6 cm³ min⁻¹. Plynná časť ďalej putuje cez sušiacie zariadenie (kap. 2.3.3) do multiatomizátoru, kde je detekovaná.

Aby došlo k úplnej predredukcii päťmocných arzénových foriem, je potrebné zmiešať určitý objem vzorku s naváženým množstvom L-cysteínu, aby vznikol 2% roztok. Týmto spôsobom sa stanoví suma trojmocných a päťmocných arzénových foriem. Pred začiatkom stanovenia je potrebné počkať 60 minút, kým sa všetky arzénové specie premenia z päťmocných na trojmocné. TMA^sVO sa stanovuje bez predredukcie L-cysteínom, pretože má schopnosť tvoriť trimetylarzán už pri zmiešaní s TRIS pufrom. Trojmocné formy sa stanovia bez pridania L-cysteínu. Množstvo päťmocných foriem sa dopočíta z rozdielu medzi dvoma alikvótmi.

Pri príprave roztokov iAs^{III} sa používala prevarená deionizovaná voda, ktorá sa ešte nechala 30 minút prebublávať plynným argónom pre vytesnenie kyslíku, keďže zlúčeniny trojmocného arzenu nie sú v roztoku tak stabilné ako päťmocné a dochádza k ich oxidácií. Vzorky referenčných materiálov boli nariadené zásobným roztokom L-cysteínu, aby vznikol 2% roztok, s výnimkou SLRS-5, kde sa použil naviac alikvót bez predredukcie. Vzorky moču S3 a S5 boli pred analýzou nariadené 3x, predredukované 2% L-cysteínom, vzorka moču ŠP bola rozdelená do dvoch alikvótov, pričom jeden bol riedený zásobným roztokom L-cysteínu, aby vznikol 2% roztok a druhý bol riedený deionizovanou vodou 3x.



Obrázok 2.1 Hydridový generátor: PC1, PC2 – peristaltické čerpadla, RC – reakčná cievka, He – Hélium, GLS – separátor fáz, SZ – sušiacie zariadenie, DV – šesť cestný ventil, dávkovanie vzorky prebieha cez dávkovaciu špičku, ktorá je naznačená.

2.3.2 Separátor fáz

Separátor fáz s núteným odťahom je používaný pre oddelenie plynnej a kvapalnej fáze. V metóde HG-CT-GC-AAS je tento separátor používaný kvôli pretlaku (18-20 PSI) v U-kapiláre. Separátor s núteným odťahom je vyrobený zo sklenenej vialky so šrúbovacím viečkom s tromi otvormi, do ktorých vedú PTFE hadičky o vnútornom priemere 1 mm, jedna hadička slúži na prívod reakčnej zmesi do separátoru. Druhá hadička slúži na vývod plynnej fáze, ktorá putuje cez sušiacu trubicu ďalej do kryogénnej pasce-GC-AAS. Tretia hadička, ktorá siaha až na dno vialky, slúži na odvádzanie odpadu, ktorý je odčerpávaný peristaltickou pumpou. Objem tohto separátoru fáz je 7 cm³ a je naklonený o 45° kvôli efektívnejšiemu odťahu kvapalnej zmesi.

2.3.3 Sušiace zariadenie

Pred vstupom do kryogénnej pasce je potrebné minimalizovať vstup kvapiek vody a aerosólu, pretože by mohlo dôjsť k zamrznutiu a upchatiu kryogénnej pasce. Kvapky vody a aerosól vznikajú v separátore fáz počas hydridového generovania arzénových foriem. Ako najvhodnejšie sušiace zariadenie sa osvedčila polypropylénová patróna naplnená NaOH perlami o dĺžke 11,4 cm a vnútornom priemere 1,6 cm.⁶¹

2.3.4 Kremenná U-kapilára

Ako kryogénna pasca bola využitá komerčne dostupná kremenná kapilára dĺžky 20 cm (non-polar fused silica capillary, Supelco, USA) s vnútorným priemerom 0,53 mm potiahnutá polyimidom, umiestnená v teflónovej hadičke (vnútorný priemer 0,75 mm), ktorá slúži ako ochrana proti prasknutiu po vytiahnutí z tekutého dusíku. U-kapilára je pri záchyte specií ponorená iba 3 cm zo svojej 20 cm dĺžky v kvapalnom dusíku.³¹ U-kapilárou voľne prechádza nosný plyn a vodík uvoľnený pri reakcii, avšak specie vytvorené pri generovaní sú zachytené. Po ukončení generovania je kapilára manuálne vytiahnutá z kvapalného dusíku a po následnom ohreve kapiláry, ktorý je zabezpečený iba teplotou v laboratóriu, dochádza k uvoľňovaniu jednotlivých foriem podľa ich teplôt varu a tieto formy putujú cez plynový chromatograf, prípadne priamo z kryogénnej pasce do atomizátoru, kde sú detekované.

2.3.5 Kremenný multiatomizátor

K atomizácii bol používaný kremenný multiatomizátor, jeho optická trubica má dĺžku 158 mm, vnútorný priemer 6,33 mm a má celkovo 14 otvorov, do ktorého bol privádzaný vzduch s prietokom $25 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ cez PTFE hadičku, prietok bol udržiavaný pomocou hmotnostného prietokomeru. Pri využití kryogénneho záchytu a plynového chromatografu bol ako druhý plyn využitý vodík s prietokom $15 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$, pretože hydridový generátor je vypnutý a nedochádza ku generovaniu vodíku z chemickej reakcie medzi TRIS pufrom a NaBH_4 . Optické rameno multiatomizátoru bolo vyhrievané na teplotu 900°C elektrickou pieckou s regulátorom teploty.²⁴ V prípade poklesu citlivosti bolo nutné multiatomizátor vyčistiť. Čistenie prebiehalo v zmesi HF a HNO_3 v pomere 7:3 po dobu 10 minút. Následne bol multiatomizátor vymytý deionizovanou vodou a vysušený pomocou vývevy.

2.4 Použité systémy

2.4.1 HG-AAS

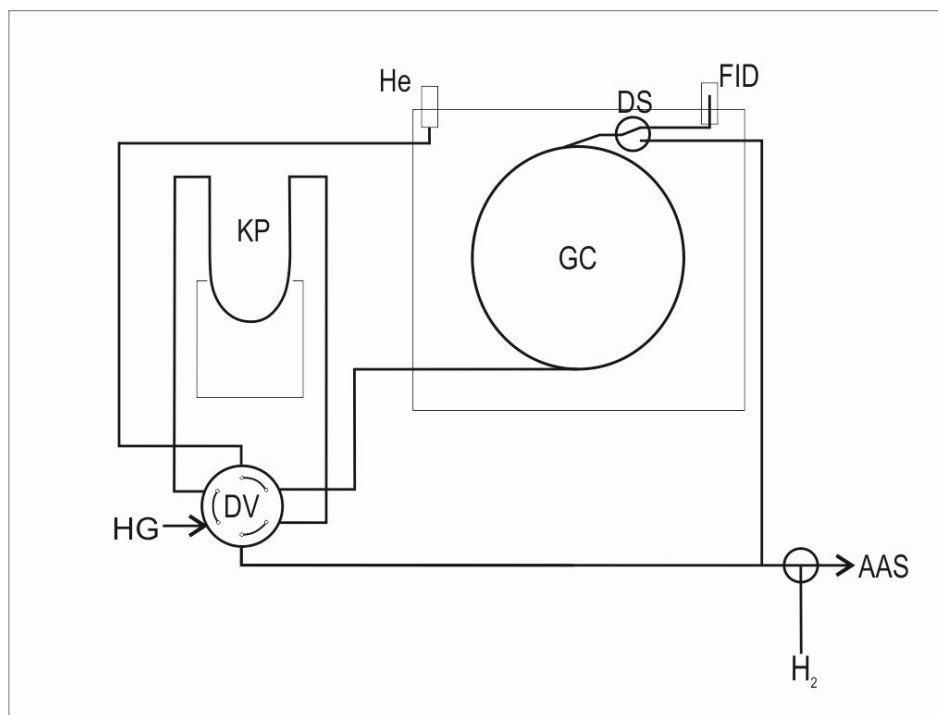
Pre porovnávacie stanovenia s ostatnými prístupmi popísanými nižšie bola využitá metóda HG-AAS. Spočíva vo vygenerovaní plynných špecií v hydridovom generátore (kap. 2.3.1) s následnou detekciou v AAS. Štandardné roztoky arzénových špecií o koncentrácií $10 \mu\text{g dm}^{-3}$ boli dávkované do dávkovacej špičky hydridového generátora (kap. 2.3.1). Šesť cestný ventil (obr. 2.2) sa v tomto prípade ponechal v základnej polohe, takže všetky vygenerované špecie prešli priamo do multiatomizátoru, atómového absorpčného spektrometra, kde došlo k detekcii. V metóde HG-AAS sa využíval vodík vzniknutý chemickou reakciou NaBH_4 a TRIS pufru v hydridovom generátore. Avšak pre porovnanie signálov medzi HG-AAS, HG-CT-AAS a HG-CT-GC-AAS bolo pre experimenty v tomto usporiadaní využitý iba vodík z chemickej reakcie a nie z tlakovej fľaše. Podmienky atomizácie by neboli pre všetky tri usporiadania porovnateľné, keďže u nasledujúcich usporiadaní sa pridáva prietok vodíku ($15 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$) z tlakovej fľaše, ktorý nahrádza rovnaké množstvo generované chemickou reakciou v hydridovom generátore.

2.4.2 HG-CT-AAS

Metóda HG-CT-AAS spočíva vo vygenerovaní plynných špecií v hydridovom generátore (kap. 2.3.1) a následnom záchyte týchto špecií v kryogénnej pasci. Pri ponechaní šesť cestného ventilu (obr. 2.2) v základnej polohe sú vygenerované špecie unášané nosným plynom do multiatomizátoru umiestneného v atómovom absorpčnom spektrometre, kde dochádza k detekcii. Prietoková rýchlosť vodíku je $15 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ (kap. 2.3.5) a prietoková rýchlosť vzduchu prúdiaceho do multiatomizátoru je $25 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$.

2.4.3 HG-CT-GC-AAS

Metóda HG-CT-GC-AAS je založená na generovaní hydridov v hydridovom generátore (kap. 2.3.1). V ďalšom kroku sa plynné špecie dostávajú do kryogénnej pasce (kap. 2.3.4). Kryogénna pasca je pripojená k hydridovému generátoru šesť cestným ventilom (vnútorný povrch potiahnutý teflónom) a tiež k plynovému chromatografu viz. schéma na obr. 2.2. Pri ponechaní šesť cestného ventilu v základnej polohe dochádza k záchytu hydridov v kryogénnej pasci. Následne je dávkovací ventil prepnutý do dávkovacej polohy tzn. do prúdu nosného plynu GC a pri ohreve pasce je hydrid „nastrieknutý“ pomocou nosného plynu (He) na kolónu, kde prebehne separácia. Dôležitým parametrom je doba „nástreku“ z kryogénnej pasce na kolónu GC, je potrebné ponechať kryogénnu pascu dostatočne dlho pri laboratórnej teplote, než sa zachytený hydrid uvoľní a je možné ho previesť na kolónu GC naraz, v malom objeme a bez strát danej formy. Po separácii na kolóne GC prejdú špecie cez prírodné rameno, ktoré spája GC s AAS, do multiatomizátoru (AAS), kde sú detekované. Pred vstupom plynnej zmesi z GC alebo z kryogénnej pasce do atomizátoru sa privádza vodík ($15 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$). Ďalej sa využíva prívod vzduchu do atomizátoru s prietokom $25 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$. Pred začatím analýzy, v prípade prestávky dlhšej než jeden týždeň, bolo vždy potrebné vykonať kondicionáciu GC s teplotným programom znázorneným v tab. 2.1. Koncová teplota sa menila v závislosti na modifikácii teplotného programu pre separáciu arzénových špecií a bola vždy o 10°C vyššia než v teplotnom programe pre stanovenie arzénových špecií.



Obr. 2.2: Hydridový generátor spojený s plynovým chromatografom a atómovým absorpčným spektrometrom. HG – hydridový generátor, KP – kryogénna pasca, He – hélium, H₂ – vodík, GC – plynový chromatograf, DS – deanswitch, FID – plameňovo ionizačný detektor, AAS – atómový absorpčný spektrometer

Boli optimalizované parametre separácie v plynovom chromatografe a to doba nástreku z kryogénnej pasce do GC (kap. 3.3.1.1), teplotný program (kap. 3.3.1.2), prietoková rýchlosť nosného plynu (kap. 3.3.1.3) a prietoková rýchlosť cez rozbočovač (kap. 3.3.1.4.). Po optimalizačných štúdiách bolo prístupné k overeniu metódy HG-CT-GC-AAS pomocou stanovenia certifikovaných referenčných materiálov a následne bola metóda otestovaná aj na zložitejších biologických vzorkách a to vzorkách moči.

Tab.2.1: Teplotný program GC pre kondicionáciu kolóny

Teplota (°C)	50
Počiatkový čas (min)	20
Teplotný gradient (°C/min)	10
Konečná teplota (°C)	160
Konečný čas (min)	41
Celkový čas (min):	61

2.5 Konvencia a spracovanie nameraných dát

Ku spracovaniu a vyhodnoteniu dát boli použité nasledujúce programy: Microsoft® Word a Microsoft® Excel 2016 (Microsoft Corporation, USA); Microcal™ OriginPro® 8.5 (Microcal Software, USA); WizAArd (Shimadzu, Česká republika); LabSolutions analysis data system (Shimadzu, Česká republika); Software OpenLAB CDS, ChemStation Edition, (Agilent Technologies, USA).

Všetky výsledky sú udávané v ng pre ľahšie porovnanie pretože pri dávkovaní vzorky do dávkovacej špičky sa často menil objem štandardného roztoku alebo vzorku. Koncentrácia štandardného roztoku zostávala vo väčšine prípadov pokiaľ nie je uvedené inak rovnaká a to $10 \mu\text{g dm}^{-3}$. V tejto diplomovej práci každé stanovenie reprezentuje medián získaný z troch hodnôt. Medián je stredná hodnota merania. Je výhodné ho využívať na odhad strednej hodnoty pri malom počte analytických výsledkov.⁶³ Zo všetkých nameraných hodnôt bola vypočítaná smerodajná odchýlka, ktorá je zobrazovaná ako chybová úsečka v grafických závislostiach. Smerodajná odchýlka charakterizuje presnosť výsledkov, kde n predstavuje počet vykonaných meraní sledovanej veličiny a x_i predstavuje nameranú hodnotu sledovanej veličiny pre i -té meranie.

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=0}^n (x_i - \tilde{x})^2}$$

Relatívna smerodajná odchýlka je vyjadrená ako podiel smerodajnej odchýlky a mediánu a udáva sa v percentách.⁶⁴

$$s_r = \frac{s}{\tilde{x}}$$

Medza detekcie (LOD) je stanovená ako trojnásobok smerodajnej odchýlky nameraných hodnôt slepého vzorku vzťahnutý na citlivosť, kde s_b je smerodajná odchýlka 10 za sebou zmeraných hodnôt slepého vzorku a k je smernica kalibračnej priamky.

$$\text{LOD} = \frac{3 s_b}{k}$$

Medza stanoviteľnosti (LOQ) je stanovená ako desať násobok smerodajnej odchýlky nameraných hodnôt slepého vzorku vzťahnutého na citlivosť, kde s_b je smerodajná

odchýlka 10 za sebou zmeraných hodnôt slepého vzorku a k je smernica kalibračnej priamky.

$$\text{LOQ} = \frac{10 s_b}{k}$$

Rozlíšenie píkov charakterizuje mieru relatívnej separácie poprípade mieru vzájomného prekryvania dvoch susedných píkov, kde $R_{i,j}$ je rozlíšenie dvoch susedných píkov, $t_{R,i}$ a $t_{R,j}$ sú retenčné časy susedných píkov a w_i a w_j sú šírky píkov pri základni.

$$R_{i,j} = \frac{2(t_{R,i} + t_{R,j})}{w_i + w_j}$$

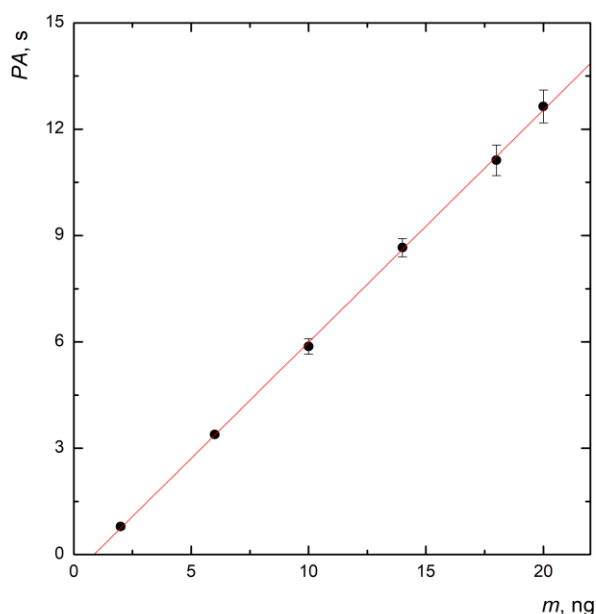
3 Výsledková časť a diskusia

3.1 HG-AAS

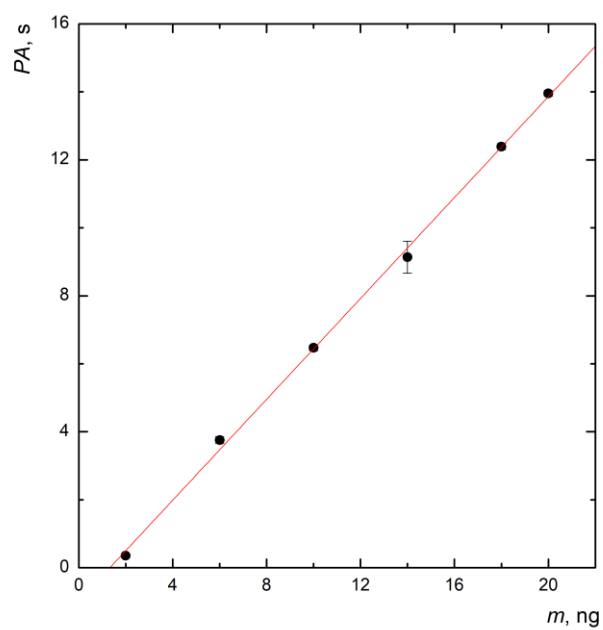
Pre zistenie strát jednotlivých arzénových specíí vplyvom priechodu GC boli výsledky porovnané s metódou HG-AAS. Toto porovnávacie stanovenie bolo vykonávané na začiatku každého dňa pred stanovením pomocou HG-CT-GC-AAS. Stanovenia metódou HG-AAS slúžia tiež pre porovnanie jednotlivých prístupov (kap. 2.4).

3.1.1 Kalibračné závislosti

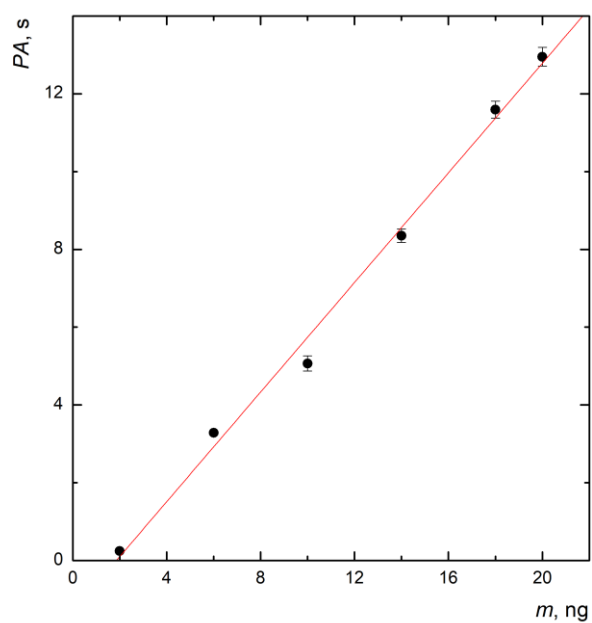
Kalibračné závislosti iAs^{III} , MAs^V , $DMAs^V$ s 2% L-cysteínom a TMs^VO bez predredukcie boli získané zo štandardných roztokov obsahujúcich vždy jednu formu metódou HG-AAS. Vo výsledkoch sú uvádzané pôvodné arzénové formy, z ktorých boli generované hydridy. Prietoky plynov a kvapalných reagensí uvádza kapitola 2.3.1. Generátor hydridov. Na obrázkoch 3.1, 3.2, 3.3, 3.4 sú znázornené kalibračné závislosti pre všetky formy. Použitá koncentrácia štandardných roztokov každej formy bola $10 \mu g dm^{-3}$.



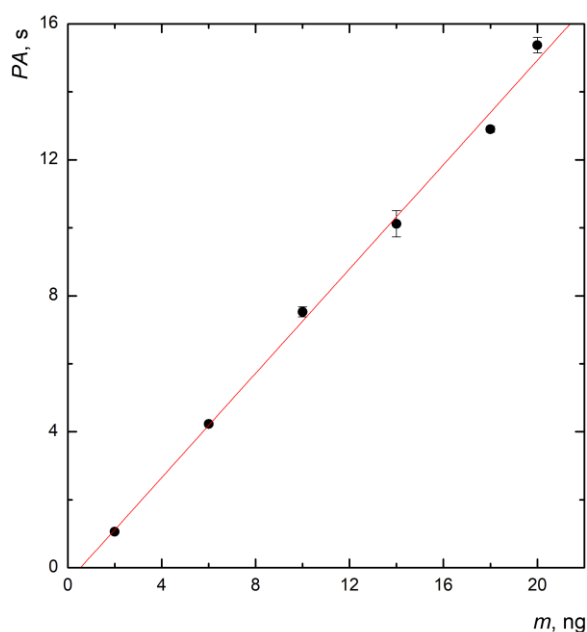
Obr.3.1 Kalibračná závislosť plochy píku (PA) arzánu generovaného z iAs^{III} s predredukciou 2% L-cysteínu na prepočítanú hmotnosť analytu, HG- AAS



Obr. 3.2 Kalibračná závislosť plochy píku (PA) metylarzánu generovaného z MAS^V s predredukciou 2% L-cysteínu na prepočítanú hmotnosť analytu, HG- AAS



Obr. 3.3 Kalibračná závislosť plochy píku (PA) dimetylarzánu generovaného z DMAS^V s predredukciou 2% L-cysteínu na prepočítanú hmotnosť analytu, HG- AAS



Obr. 3.4 Kalibračná závislosť plochy píku (PA) trimetylarzánu generovaného z TMAs^{VO} na prepočítanú hmotnosť analytu, HG- AAS

3.1.2 Analytické charakteristiky

Z kalibračných závislostí zobrazených na obr. 3.1, 3.2, 3.3, 3.4 boli zistené základné analytické charakteristiky pre arzénové formy stanovované metódou HG-AAS, ktoré reprezentuje tab 3.1 uvedená nižšie. Medza detekcie a medza stanoviteľnosti boli vypočítané podľa vzťahov uvedených v kapitole 2.5 Konvencia a spracovanie nameraných dát. Ďalej bol určený korelačný koeficient a citlivosť metódy.

Tab. 3.1 Základné charakteristiky pre metódu HG-AAS

Forma As	iAs^{III}	MAs^{V}	DMAs^{V}	TMAs^{VO}
LOD (ng)	0,132	0,127	0,149	0,205
LOQ (ng)	0,440	0,422	0,498	0,683
Citlivosť (s ng^{-1})	0,655	0,742	0,704	0,767
Korelačný koeficient	0,9996	0,9986	0,9941	0,9961

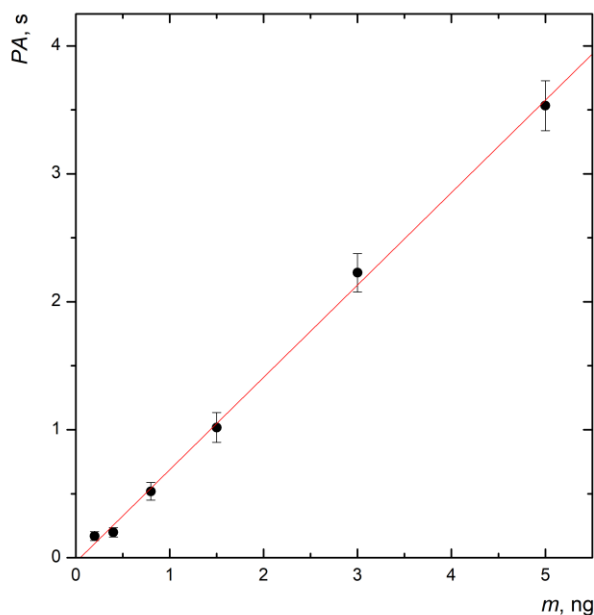
Hodnoty LOD a LOQ sú pre všetky specie zrovnateľné. Taktiež hodnoty citlivostí sú zrovnateľné za uvedených podmienok generovania, čo je v súlade s predošlými publikovanými výsledkami.⁴⁴

3.2 HG-CT-AAS

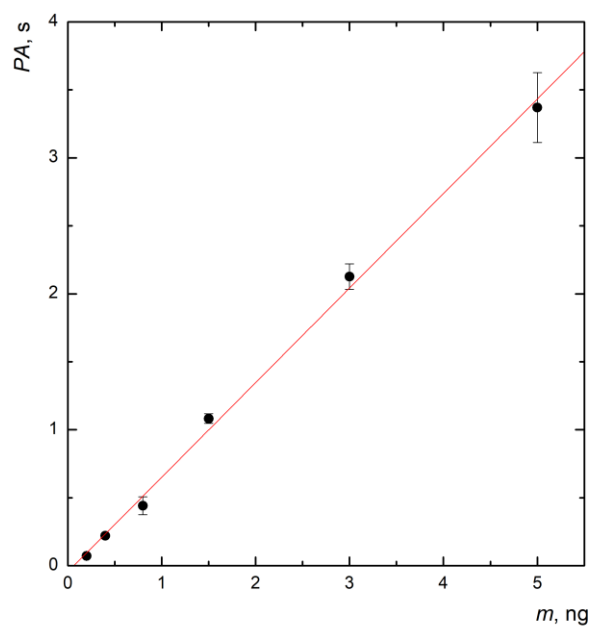
Ako ďalšie boli vykonané porovnávacie stanovenia metódou HG-CT-AAS. Dôvodom je overenie, či nedochádza k strate specií už pri záchyťe/uvoľnení z pasce a teda či sú všetky vygenerované specie prevedené do plynového chromatografu. Ako kryogénna pasca sa používa kremenná U – kapilára, ktorá je popísaná v kapitole 2.3.4 Kremenná U-kapilára.

3.2.1 Kalibračné závislosti

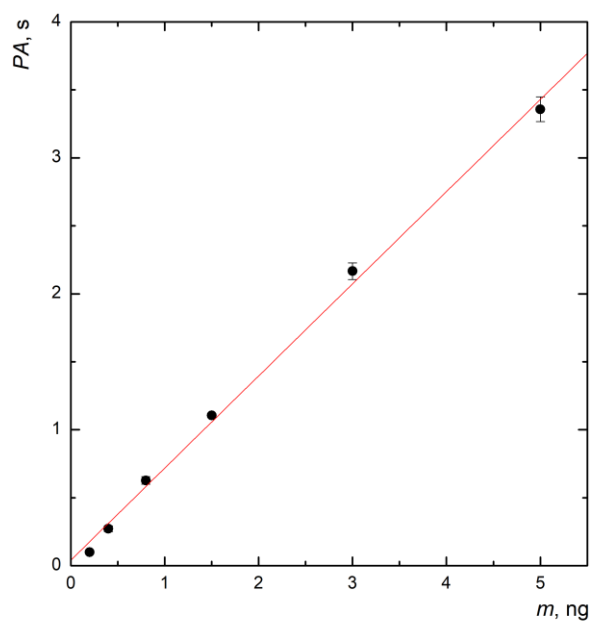
Boli získané kalibračné závislosti foriem iAs^{III} , MAs^V , $DMAs^V$ po predredukcii s 2% L-cysteínom a TMs^VO bez predredukcii metódou HG-CT-AAS. Na obrázkoch 3.5, 3.6, 3.7 a 3.8 sú znázornené kalibračné závislosti pre všetky formy.



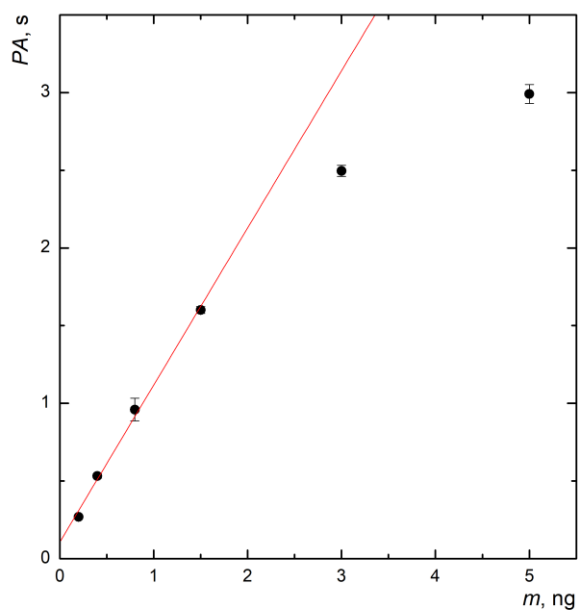
Obr. 3.5 Kalibračná závislosť plochy píku (PA) arzánu generovaného z iAs^{III} s predredukciou 2% L-cysteínu na prepočítanú hmotnosť analytu, HG-CT-AAS



Obr. 3.6 Kalibračná závislosť plochy píku (PA) metylarzánu generovaného z MAS^V s predredukciou 2% L-cysteínu na prepočítanú hmotnosť analytu, HG- CT-AAS



Obr. 3.7 Kalibračná závislosť plochy píku (PA) dimetylarzánu generovaného z DMAS^V s predredukciou 2% L-cysteínu na prepočítanú hmotnosť analytu, HG- CT-AAS



Obr. 3.8 Kalibračná závislosť plochy píku (PA) trimetylarzánu generovaného z TMA^VO na prepočítanú hmotnosť analytu, HG-CT- AAS

3.2.2 Analytické charakteristiky

Z kalibračných závislostí boli zistené základné analytické charakteristiky podobne ako u spojenia HG-AAS. Hodnoty LOD, LOQ, citlivosti a korelačných koeficientov pre danú arzénovú formu získané metódou HG-CT-AAS zhŕňa tab. 3.2. Vo výsledkoch sú teda uvádzané arzénové formy, z ktorých boli generované hydridy. Vyhodnotenie uvedených analytických charakteristík podlieha postupu uvedenému v kapitole 2.5 Konvencia a spracovanie nameraných dát.

Tab. 3.2 Základné charakteristiky pre metódu HG-CT-AAS

Forma As	iAs ^{III}	MA ^S ^V	DMA ^S ^V	TMA ^S ^V O
LOD (ng)	0,186	0,094	0,211	0,165
LOQ (ng)	0,620	0,313	0,704	0,551
Citlivosť (s ng ⁻¹)	0,722	0,695	0,678	1,011
Korelačný koeficient	0,9979	0,9971	0,9968	0,9955

LOD a LOQ sú pre všetky specie zrovnateľné. Citlivosť metódy je pre všetky formy zrovnateľná.

3.3 HG-CT-GC-AAS

3.3.1 Optimalizácia parametrov separácie v GC

Prvou úlohou bolo optimalizovať teplotný program kolóny plynového chromatografu pre stanovenie specii arzénu metódou HG-CT-GC-AAS. Boli hľadané podmienky, pri ktorých bude dosiahnuté čo najlepšie rozlíšenie píkovo za čo najkratší čas bez straty jednotlivých specii v GC, prípadne v spojení medzi GC a ostatnými časťami aparatury. Optimalizované boli taktiež doba „nástreku“ hydridov z kryogénnej pasce do GC, prietoková rýchlosť nosného plynu prechádzajúca kolónou a prietoková rýchlosť cez tzv. rozbočovač GC. Začiatok optimalizačných štúdií zahŕňal východzí teplotný program A uvedený v tab. 3.3. Retenčné časy, plochy píkovo a výšky píkovo pre tento teplotný program sú zhrnuté v tab. 3.4. Pre optimalizačné štúdie bola vždy jedna zmena parametrov premeraná dvakrát. Vo výsledkoch sú uvádzané pôvodné arzénové formy, z ktorých boli generované hydridy.

Tab. 3.3: Teplotný program A

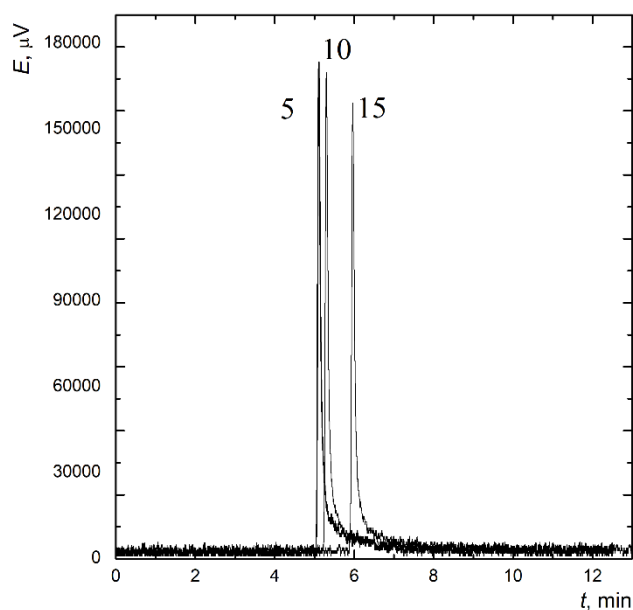
Teplota (°C)	50
Počiatkový čas (min)	2
Teplotný gradient (°C/min)	20
Konečná teplota (°C)	150
Konečný čas (min)	5,5
Celkový čas (in):	12,5

Tab.3.4: Retenčné časy, plochy, výšky píkovo a rozlíšenie pre arzénové specie získané v teplotnom programe A

	iAs ^{III}	MAs ^V	DMAs ^V	TMas ^V O
Retenčný čas (min)	5,3	6,6	7,9	8,6
Plocha píku (s)	3,135	3,361	2,934	2,730
Výška píku (A)	0,382	0,367	0,336	0,161
Rozlíšenie		1,0	1,4	0,9

3.3.1.1 Optimalizácia doby nástreku z kryogénnej pasce do GC

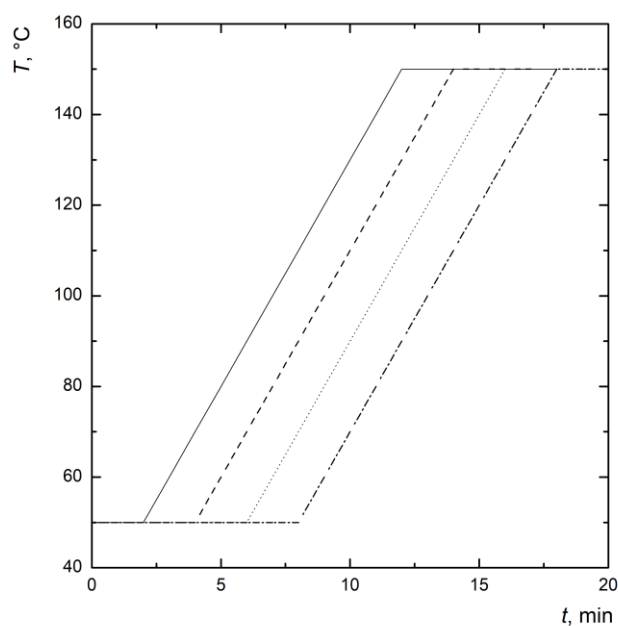
Jedným z dôležitých optimalizovaných parametrov bola doba nástreku z kryogénnej pasce do plynového chromatografu, kedy sa testovali tri časové intervaly pre dobu medzi zahratím kryogénnej pasce a dávkovaním na kolónu GC. Na obr. 3.9 je možné pozorovať vplyv doby nástreku na retenčný čas arzánu a tiež na chvostovanie píku. Optimálna doba zotrvania CT pri laboratórnej teplote pred dávkovaním do GC bola 10 sekúnd. Ako štandardný roztok pre tento účel bol využitý iAs^{III} s 2% L-cysteínom, pretože sa jedná po iAs^V o najstabilnejšiu formu v roztoku za splnenie podmienok uchovávanía a prípravy roztoku viz. 2. Experimentálna časť. Dôležité je najmä použitie ďalšej stabilnej arzénovej specie (iAs^{III}) pre porovnanie s $TMAAs^VO$, ktorý nie je predredukciou podrobený.



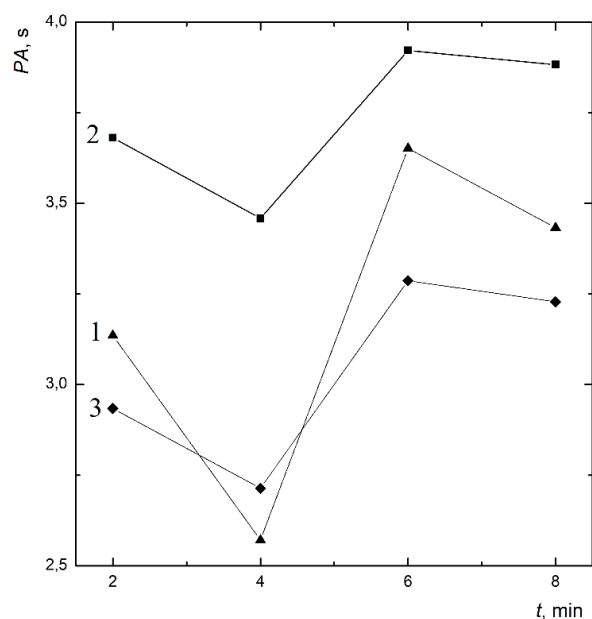
Obr. 3.9: Chromatogram znázorňujúci pík arzánu pre 5, 10, 15 sekundový nástrek z kryogénnej pasce do GC

3.3.1.2 Optimalizácia teplotného programu GC

Jeden z cieľov práce bolo vytvoriť teplotný program pre čo najúčinnejšiu separáciu arzénových špecíí, aby bolo dosiahnuté rozlíšenie aspoň 1,0, kedy je prekrytie susedných pík 2 %, za čo najkratší celkový čas. Sledované boli okrem plochy píku aj výška píku (absorbancia). Pri optimalizácii sa vychádzalo zo základného teplotného programu A popísaného v tab. 3.3. Ako prvý parameter bol optimalizovaný počiatkový čas, pri ktorom je konštantná teplota kolóny 50°C. V pôvodnom teplotnom programe A bol počiatkový čas 2 minúty. Pri optimalizáciách sa počiatkový čas postupne predlžoval a to na 3; 4; 6; 8 minút viz. teplotné programy B, C, D, E na obr. 3.10. Na obr. 3.11 sú vynesené veľkosti plochy píkov arzénových špecíí v závislosti na zmene počiatkového času. Z tejto závislosti vyplýva dosiahnutie najväčšej odozvy pri počiatkovom čase 6 minút.



Obr. 3.10: Grafické znázornenie teplotných programov B, C, D, E s rozdielnym počiatkovým časom



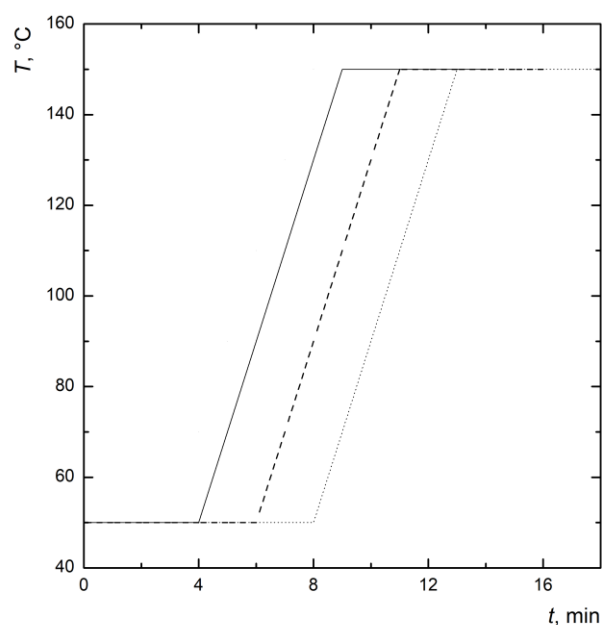
Obr. 3.11: Závislosť dĺžky počiatočného času teplotného programu na plochu pík (PA).

1-iAs^{III}, 2-MAs^V, 3-DMAs^V

Pri tejto zmene počiatočného času nebolo dosiahnuté dostatočné rozlíšenie jednotlivých pík, ktoré je zhrnuté v tab. 3.6, a tak bolo pristúpené k zmene pôvodného teplotného programu a to znížením teplotného gradientu z 20°C za minútu na 10°C za minútu a s nastavením dĺžky počiatočného času 4, 6 a 8 minút. Grafické znázornenie teplotných programov F, G, H je zobrazené na obr. 3.12.

Tab. 3.6: Rozlíšenie arzénových špecíí pri teplotných programoch B, C, D, E.

Teplotný program	Rozlíšenie medzi iAs ^{III} a MAs ^V	Rozlíšenie medzi MAs ^V a DMAs ^V	Rozlíšenie medzi DMAs ^V a TMs ^V O
B	1,0	1,3	0,5
C	1,0	1,4	0,6
D	0,9	1,4	0,6
E	0,9	1,4	0,7

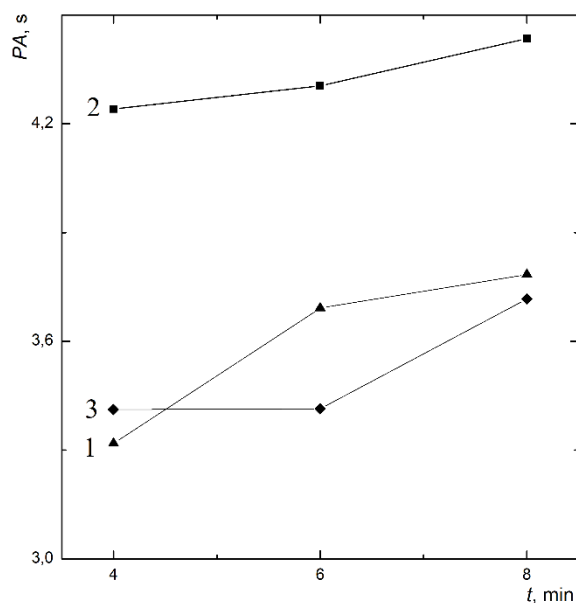


Obr. 3.12: Grafické znázornenie teplotných programov F, G, H s teplotným gradientom 10°C za minútu, s rôznym počiatočným časom

Ako je z obr. 3.13 viditeľné, plochy píkov pri predĺžení času ostávajú takmer nezmenené, avšak ani v tomto prípade nebolo rozlíšenie dostatočné a dochádzalo k chvostovaniu všetkých píkov, preto sa pristúpilo k ďalším modifikáciám teplotného programu. Rozlíšenie píkov jednotlivých špecíí pre teplotné programy F,G,H je znázornené v tab. 3.7.

Tab. 3.7: Rozlíšenie arzénových špecíí pri teplotných programoch F, G, H

Teplotný program	Rozlíšenie medzi iAs^{III} a MAs^V	Rozlíšenie medzi MAs^V a $DMAs^V$	Rozlíšenie medzi $DMAs^V$ a TMs^VO
F	0,9	1,4	0,8
G	0,9	1,4	0,5
H	1,1	1,8	0,4



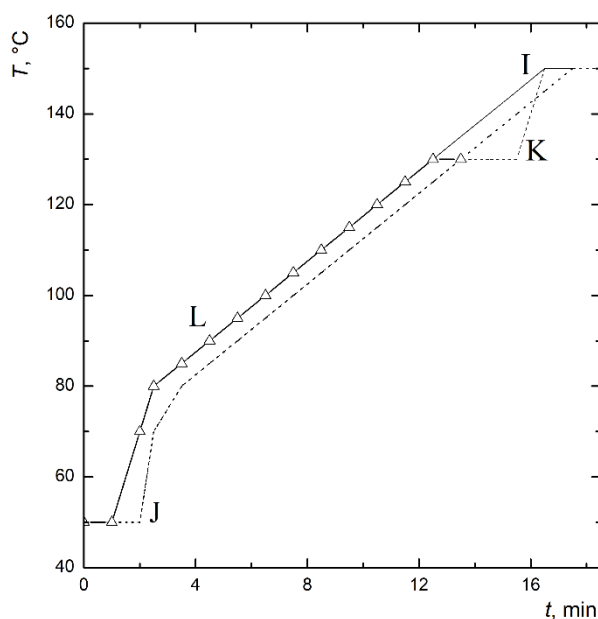
Obr. 3.13: Závislosť vplyvu dĺžky počiatočného času teplotného programu na plochu pík

1-iAs^{III}, 2-MAs^V, 3-DMAs^V

Ďalšou modifikáciou teplotného programu bola zmena teplotného gradientu ako je znázornené na obr. 3.14. Pri teplotnom programe I zotrvala kolóna pri teplote 50°C 1 minútu, potom nasledovalo zvyšovanie teploty na 80°C a to rýchlosťou 20°C za minútu, a po dosiahnutí tejto teploty nasledovalo ďalšie zvyšovanie teploty rýchlosťou 5°C za minútu až do finálnej teploty 150°C, kde kolóna zotrvala po dobu 1 minútu. Celkový čas tohto merania bol 17,5 minútu. Pri teplotnom programe J meranie prebiehalo podobne, avšak počiatočný čas bol nastavený na 2 minútu. Výsledný teplotný program J trval 18,5 minút. V poslednom teplotnom programe K bola pridaná ešte tretia zmena teploty. Po dosiahnutí 80°C teplota stúpala rýchlosťou 5°C za minútu do teploty 130°C a potom bola zmenená rýchlosť gradientu na 20°C za minútu až do teploty 150°C a táto teplota bola udržiavaná po dobu 2 minút. Teplotný program K mal celkové trvanie 17,5 minút. Vypočítané hodnoty rozlíšenia zhrňuje tab. 3.8.

Tab. 3.8: Rozlíšenie arzénových špecií pri teplotných programoch I, J, K

Teplotný program	Rozlíšenie medzi iAs^{III} a MAs^V	Rozlíšenie medzi MAs^V a $DMAs^V$	Rozlíšenie medzi $DMAs^V$ a TMs^VO
I	0,9	1,3	0,4
J	0,9	1,2	0,5
K	0,9	1,3	0,6



Obr.3.14: Grafické znázornenie teplotných programov I, J, K, L

Pri optimalizácii teplotného programu bolo vyskúšaných viac variant s rôznymi zmenami teplotného gradientu, kedy teplota stúpala rýchlosťou 20 °C za minútu do dosiahnutia 80 °C, na tejto hodnote zotrvala 5 minút a potom stúpala znova rýchlosťou 20 °C za minútu až do hodnoty 130 °C, kde zotrval 1 minútu. Ďalší teplotný program začínal na hodnote teploty 50 °C a stúpala rýchlosťou 20 °C za minútu do hodnoty 80 °C, potom teplota stúpala rýchlosťou 2 °C za minútu až do dosiahnutia hodnoty 100 °C, nakoniec stúpala rýchlosťou 20 °C za minútu až do dosiahnutia hodnoty 130 °C. Avšak ani jeden z nich výrazne neprispel k zlepšeniu rozlíšenia a chvostovania pík jednotlivých foriem.

Ako optimálny teplotný program bol vybraný teplotný program L s dvoma

teplotnými gradientmi. Teplota 50°C bola udržiavaná po dobu 1 minúty a následne dochádzalo k gradientu 20°C za minútu do teploty 80°C. Po dosiahnutí tejto teploty sa gradient zmenil na 5°C za minútu a takto to pokračovalo až do dosiahnutia teploty 130°C, táto teplota bola udržiavaná po dobu 1 minúty. Výsledný teplotný program je zhrnutý v tab. 3.9.

Tab. 3.9 Teplotný program L

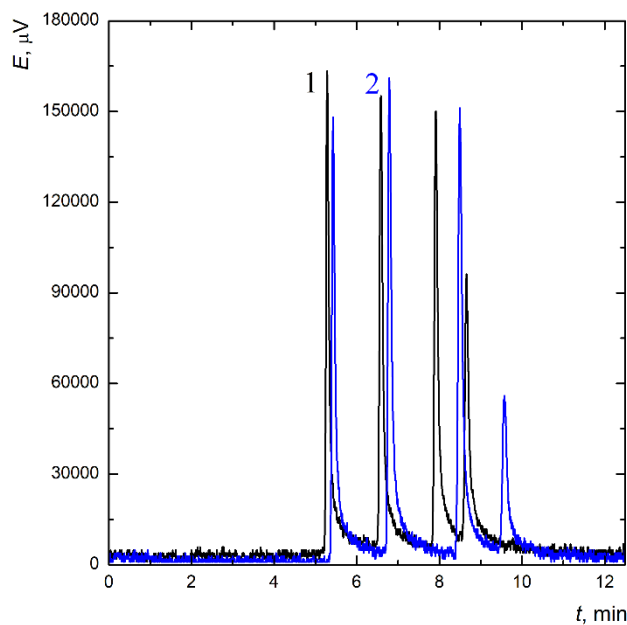
Teplota (°C)	50
Počiatočný čas (min)	1
Teplotný gradient 1 (°C/min)	20
Konečná teplota 1 (°C)	80
Konečný čas 1 (min)	0
Teplotný gradient 2 (°C/min)	5
Konečná teplota 2 (°C)	130
Konečný čas 2 (min)	1
Celkový čas (min):	13,5

Konečná teplota sa v tomto programe znížila z pôvodných 150 °C na 130 °C. Na obr. 3.15 je znázornený chromatogram arzénových foriem pri teplotnom programe A a pri teplotnom programe L, kde rozlíšenie medzi iAs^{III} a MAs^V dosahuje 1,1 a rozlíšenie medzi MAs^V a $DMAs^V$ dosahuje 1,4 a rozlíšenie medzi $DMAs^V$ a $TMas^VO$ je 1,1. Percentuálne vyjadrenie strát jednotlivých foriem pre teplotný program A a L je znázornený v tabuľke 3.10. Ako 100% boli použité plochy pík ziskane pre HG-AAS. Teplotný program L je znázornený na obr. 3.14.

Tab.3.10: Percentuálne vyjadrenie strát jednotlivých foriem pre teplotný program A a L

Arzénové specie	Teplotný program A (%)	Teplotný program L (%)
IAS^{III}	84	102
MAs^V	86	99
$DMAs^V$	84	107

Z Tab.3.10 je viditeľné, že pri použití programu L nedochádza k stratám jednotlivých spécií v GC. Na obr. 3.15 sú znázornené chromatogramy arzénových spécií pre teplotný program A a teplotný program L, kde dochádza k zlepšeniu rozlíšenia medzi píkmi všetkých spécií.



Obr. 3.15 Chromatogram arzénových spécií pre teplotný program A (1) a teplotný program L (2)

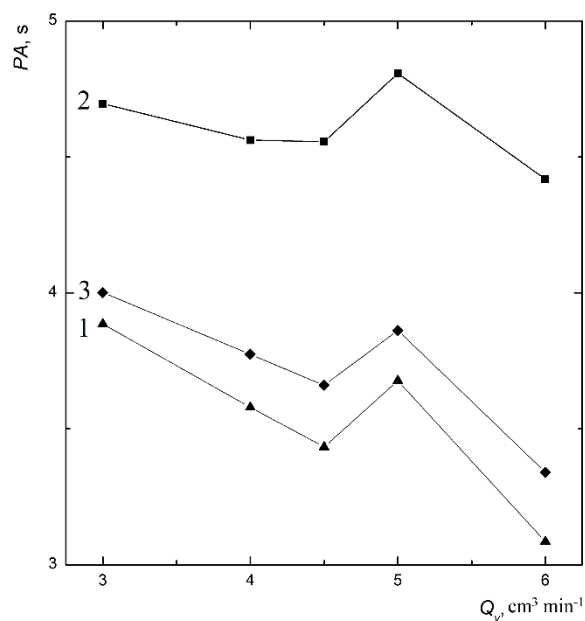
3.1.1.3 Optimalizácia prietoku nosného plynu

Vplyv prietoku nosného plynu v GC je znázornený na obr. 3.16, kde je odozva vyjadrená plochou píku. Na obr. 3.17 je zobrazená analogická závislosť avšak odozva je vyjadrená výškou píku teda hodnotou absorbancie. Výška píku nie je hlavným sledovaným parametrom pri optimalizačných štúdiách a je uvedená ako dodatočný údaj k závislosti na obrázku 3.16. Z obr. 3.16 je viditeľné, že pri vyššom prietoku než $4 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ odozva pre každú formu klesá. Dochádza k rozšíreniu a chvostovaniu pík a ku zníženiu ich výšok. V súvislosti s rastúcou šírkou píku v polovici výšky a hlavne pri základni sa predlžuje časový interval pre integráciu a tým dochádza k väčším chybám pri integrácii. Z týchto dôvodov sa pristúpilo k zvoleniu prietoku $4 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ pre ďalšie experimenty. V tab. 3.11 sú zhrnuté percentuálne vyjadrenia strát jednotlivých foriem pri zmene

prietokovej rýchlosti nosného plynu, ako 100 % sa využívajú plochy specií vygenerovaných HG-AAS.

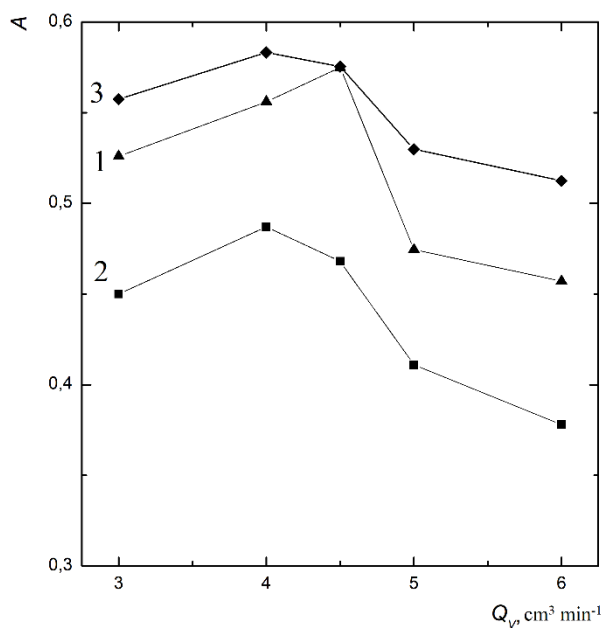
Tab. 3.11 Percentuálne vyjadrenie strát plôch pri optimalizácii prietokovej rýchlosti nosného plynu.

Arzénové specie	3 $\text{cm}^3 \text{min}^{-1}$ (%)	4 $\text{cm}^3 \text{min}^{-1}$ (%)	4,5 $\text{cm}^3 \text{min}^{-1}$ (%)	5 $\text{cm}^3 \text{min}^{-1}$ (%)	6 $\text{cm}^3 \text{min}^{-1}$ (%)
iAs^{III}	98 ± 14	96 ± 1	94 ± 6	97 ± 1	82 ± 29
MAs^{V}	94 ± 7	92 ± 6	92 ± 3	101 ± 1	86 ± 25
DMAs^{V}	113 ± 5	109 ± 8	105 ± 1	111 ± 1	96 ± 23



Obr.3.16: Závislosť plochy píkovo (PA) na zmene prietoku nosného plynu kolónou (Q_v)

1- iAs^{III} , 2- MAs^{V} , 3- DMAs^{V}

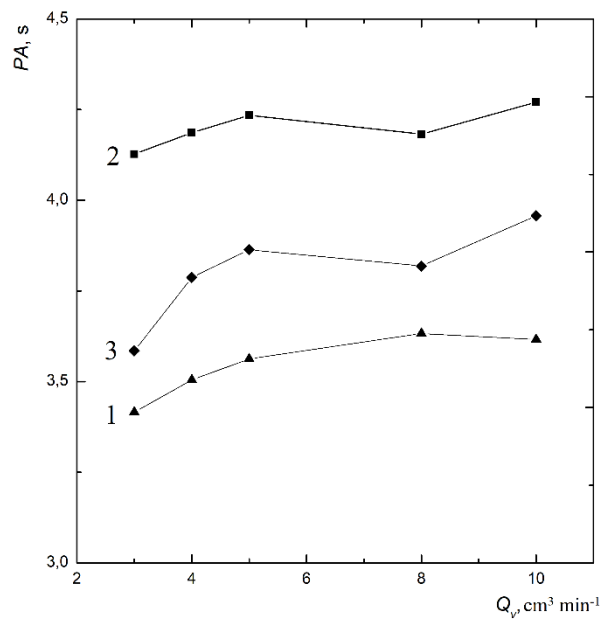


Obr. 3.17 Závislosť výšky píkov – absorbancie (A) na zmene prietoku nosného plynu kolónou (Q_v)

1-iAs^{III}, 2-MAs^V, 3-DMA s^V

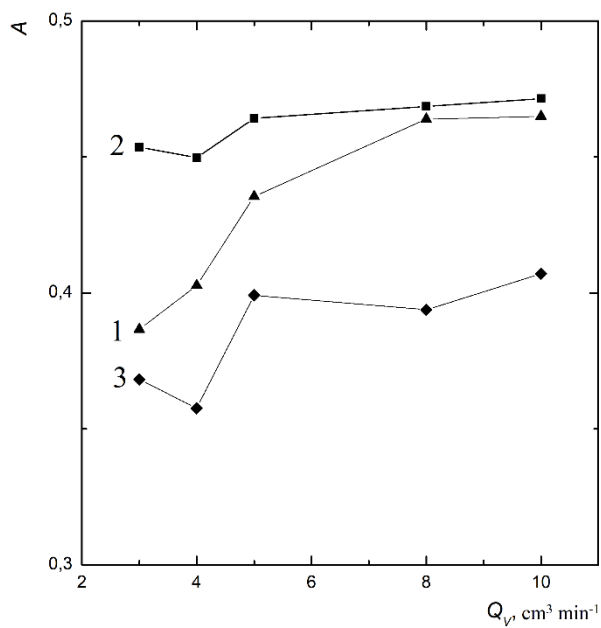
3.1.1.4 Optimalizácia prietoku cez rozbočovač

Nosným plynom cez rozbočovač je tiež hélium. Jeho prietok ovplyvňuje veľkosť prietoku z kolóny do „vetvy“ pre FID alebo AAS.⁶² Pomocou kalkulátora od dodávateľa GC sa dá tento prietok vypočítať. Z dôvodu pozorovania strát jednotlivých špecíí, bolo pristúpené k optimalizácii prietoku týmto rozbočovačom. Maximálny povolený prietok rozbočovačom je 10 cm³ min⁻¹. Závislosť plochy píkovej danej formy na prietoku nosného plynu rozbočovačom znázorňuje obr. 3.18. Doplnkovou závislosťou k hodnotám plochy píku na obr. 3.18 je závislosť výšky píku uvedená na obr. 3.19. Z oboch závislostí je viditeľné, že do prietoku 5 cm³ min⁻¹ sa aj plochy aj výšky píkovej mierne zvyšujú a od prietoku 5 cm³ min⁻¹ až do 10 cm³ min⁻¹ zostávajú približne konštantné, z toho dôvodu bola zvolená hodnota 5 cm³ min⁻¹ pre ďalšie experimenty. So znížením prietoku dochádza k stratám arzénových špecíí vplyvom nedostatočného transportu z kolóny do „vetvy,, pre AAS.



Obr. 3.18: Závislosť plochy píkov (PA) na zmene prietoku (Q_v) cez rozbočovač v GC

1-iAs^{III}, 2-MAs^V, 3-DMA^{5V}

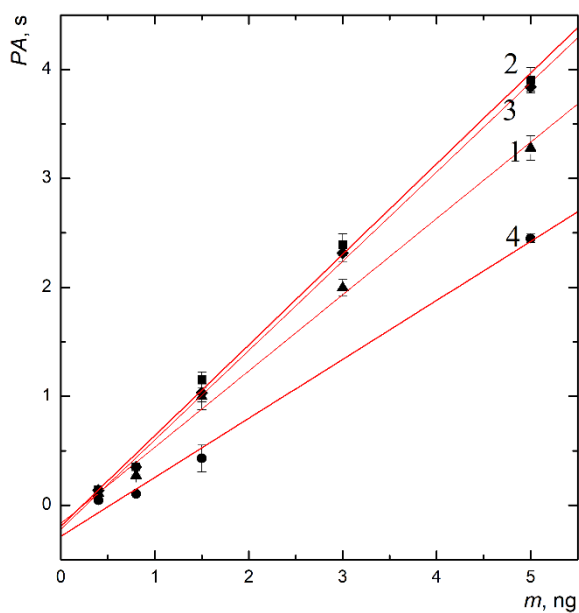


Obr. 3.19: Závislosť výšky píkov – absorbancie (A) na zmene prietoku (Q_v) cez rozbočovač v GC

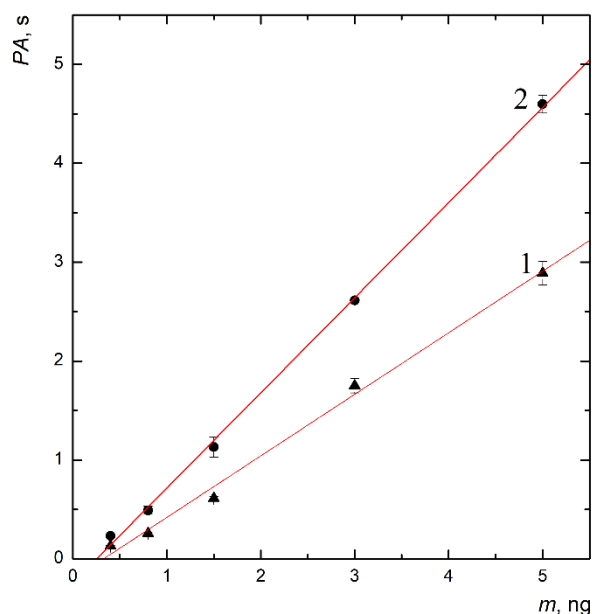
1-iAs^{III}, 2-MAs^V, 3-DMA^{5V}

3.3.2 Kalibračná závislosť

Kalibračné závislosti pre specie generované z iAs^{III} , MAs^V , $DMAs^V$ a $TMas^VO$ boli namerané z roztokov zmesových štandardov v roztoku s 2% L-cysteínom, v prípade $TMas^VO$ bez predredukcie s L-cysteínom. Kalibračná závislosť zmesového štandardu iAs^{III} , MAs^V , $DMAs^V$ a $TMas^VO$ s predredukciou 2% L-cysteínom je znázornená na obr. 3.20 a bez predredukcie 2% L-cysteínom je znázornená na obr. 3.21.



Obr. 3.20 Kalibračná závislosť plochy píku (PA) pre zmesový roztok arzánov s predredukciou 2% L-cysteínu na prepočítanú hmotnosť analytu, HG- CT-GC-AAS, 1- iAs^{III} , 2- MAs^V , 3- $DMAs^V$, 4- $TMas^VO$



Obr. 3.21 Kalibračná závislosť plochy píku (PA) arzónu a trimetylarzónu generovaných z iAs^{III} a $TMAsvO$ bez prídavku L-cysteínu na prepočítanú hmotnosť analytu, HG-CT-GC-AAS, 1- iAs^{III} , 2- $TMAsvO$

3.3.3 Analytické charakteristiky

Okrem citlivostí a korelačných koeficientov pre specie arzónu stanovené metódou HG-CT-GC-AAS boli vypočítané i medza detekcie a medza stanoviteľnosti podľa vzťahov uvedených v kap. 2.5 Konvencia a spracovanie nameraných dát. Zmienené charakteristiky kalibračných závislostí sú zhrnuté v tabuľke 3.12. Vo výsledkoch sú teda uvádzané pôvodné arzónové formy, z ktorých boli generované hydridy.

Tab. 3.12 Analytické charakteristiky pre metódu HG-CT-GC-AAS

Forma As	iAs^{III}	$MAsv$	$DMAsv$	$TMAsvO$
LOD (ng)	0,143	0,091	0,088	0,196
LOQ (ng)	0,476	0,304	0,293	0,655
Citlivosť ($s\ ng^{-1}$)	0,700	0,832	0,820	0,982
Korelačný koeficient	0,9949	0,9964	0,9983	0,9935

Metóda HG-CT-GC-AAS dosahuje pre všetky arzénové specie porovnateľné hodnoty citlivostí ako u HG-AAS. LOD a LOQ sú v porovnaní s HG-AAS porovnateľné čo ale nekorešponduje s využitím prekoncentračného zariadenia akým je kryogénna pasca. V porovnaní s HG-CT-AAS sa teda ukazuje, že ani LOD a LOQ pre toto usporiadanie nie sú významne nižšie. S využitím plynového chromatografu naopak môže dôjsť k väčšej chybe pri vyhodnocovaní dlhšieho integračného intervalu píku v dôsledku rozmytia píku danej formy. V tab.3.13 sú zhrnuté retenčný čas, plochy a výšky píkov pre všetky arzénové specie získané po optimalizačných štúdiách. Po všetkých optimalizačných štúdiách metódy HG-CT-GC-AAS je plocha píku arzánu 99 %, metylarzánu 102 %, dimetylarzánu 100 % a trimetylarzánu 108 % v porovnaní s plochami pre arzénové specie metódou HG-AAS, z čoho vyplýva, že nedochádza k stratám specii pri priechode plynovým chromatografom.

Tab. 3.13 Retenčný čas, plocha píku a výška píku pre arzénové specie získané po všetkých optimalizáciách.

	iAs ^{III}	MAs ^V	DMAs ^V	TMAS ^{VO}
Retenčný čas (min)	5,4	6,8	8,5	9,6
Plocha píku (s)	3,806	3,980	3,741	4,497
Výška píku (A)	0,489	0,431	0,399	0,373

3.3.4 Referenčné materiály

Výsledné koncentrácie jednotlivých foriem, vrátane certifikovaných hodnôt koncentrácií, ktoré boli získané meraním referenčných materiálov metódou HG-CT-GC-AAS zobrazuje tab. 3.14. Tu sú uvádzané hodnoty arzénových foriem, ktoré boli prítomne vo vzorku podľa prístupu predredukcie L-cysteínom (kap. 2.3.1).

Tab. 3.14 Hodnoty referenčných materiálov nameraných metódou HG-CT-GC-AAS vrátane certifikovaných hodnôt.

Referenčný materiál	iAs ^V (ng dm ⁻³)	MAs ^V (ng dm ⁻³)	DMAs ^V (ng dm ⁻³)	TMA ^V O (ng dm ⁻³)	Súčet (ng dm ⁻³)	Certifikovaná hodnota (ng dm ⁻³)
SLRS-5	282 ± 13	67 ± 9	74 ± 6	109 ± 19	532 ± 25	413 ± 39
NASS-5	1237 ± 35	<LOD	<LOD	<LOD	1237 ± 35	1270 ± 120
CASS-5	1207 ± 53	<LOD	<LOD	<LOD	1207 ± 53	1210 ± 90

Tab. 3.15 Hodnoty referenčných materiálov nameraných metódou HG-CT-AFS⁴³

Referenčný materiál	iAs ^{III+V} (ng dm ⁻³)	MAs ^V (ng dm ⁻³)	DMAs ^V (ng dm ⁻³)	TMA ^V O (ng dm ⁻³)	Súčet (ng dm ⁻³)
SLRS-5	295,5 ± 6,1	39,2 ± 2,7	45,6 ± 2,5	19,6 ± 0,7	400 ± 7,2
CASS-5	1103 ± 44	10,2 ± 2,4	116,0 ± 6,8	16,2 ± 1,6	1245 ± 45

V certifikovaných referenčných materiáloch NASS-5 a CASS-5 nebolo nájdené žiadne detekovateľné množstvo TMA^VO. Certifikovaný referenčný materiál SLRS-5 bol rozdelený do dvoch alikvótov, v prípade alikvótu bez predredukcie 2% L-cysteínom bol stanovený TMA^VO, ostatné arzénové specie sa nepodarilo bez predredukcie 2% L-cysteínom stanoviť. V tab. 3.15 sú zhrnuté výsledky získané metódou HG-CT-AFS, pre referenčné materiály SLRS-5 a CASS-5.⁴³ Výsledky špeciálnej analýzy certifikovaného referenčného materiálu SLRS-5 metódou HG-CT-GC-AAS v porovnaní s HG-CT-AFS sú v dobrej zhode, okrem trimetylarzán, ktorého hodnoty sa niekoľko násobne líšia. Špeciálnou analýzou certifikovaného referenčného materiálu CASS-5 metódou HG-CT-GC-AAS a HG-CT-AFS boli dosiahnuté podobné výsledky, avšak metódou HG-CT-GC-AAS sa nepodarilo stanoviť hodnoty metylarzán a dimetylarzán. Súčet arzénových

specií pre certifikované referenčné materiály pre metódu HG-CT-GC-AAS, HG-CT-AFS a certifikované hodnoty sú v dobrej zhode.

3.3.5 Vzorky moču

Výsledné koncentrácie jednotlivých foriem vzoriek moču, ktoré boli poskytnuté zamestnancami Ústavu analytickej chémie, Akadémie Vied ČR, boli stanovené metódou HG-CT-GC-AAS. Zámerom bolo otestovať metódu HG-CT-GC-AAS na zložitejších reálnych vzorkách. Vzorka moču ŠP bola rozdelená do dvoch alikvóto, pričom v alikvóte bez predredukcie 2% L-cysteínom bola stanovený obsah iAs^{III} $240 \pm 23 \text{ ng dm}^{-3}$, metylarzán, dimetylarzán sa nepodarilo detekovať, stanovený obsah trimetylarzánu je zhrnutý v tab. 3.16.

Tab. 3.16 Namerané hodnoty vzoriek moči metódou HG-CT-GC-AAS.

Vzorky moču	iAs^{III+V} (ng dm^{-3})	MAs^{III+V} (ng dm^{-3})	$DMAs^{III+V}$ (ng dm^{-3})	$TMas^{VO}$ (ng dm^{-3})	Súčet (ng dm^{-3})
S3	532 ± 35	350 ± 48	1369 ± 52	278 ± 69	2529 ± 103
S5	546 ± 45	565 ± 73	2339 ± 158	215 ± 48	3666 ± 324
SP	308 ± 45	333 ± 43	1750 ± 39	115 ± 14	2506 ± 140

Tab. 3.17 Referenčné hodnoty vzoriek moču merané metódou HG-CT-AFS

Vzorky moču	iAs^{III+V} (ng dm^{-3})	MAs^{III+V} (ng dm^{-3})	$DMAs^{III+V}$ (ng dm^{-3})
S3	386 ± 12	324 ± 23	1189 ± 75
S5	432 ± 4	618 ± 33	2669 ± 159

Tab. 3.18 Referenčné hodnoty vzoriek moču merané metódou HPLC-HG-AFS

Vzorky moču	iAs^{III+V} (ng dm^{-3})	MAs^{III+V} (ng dm^{-3})	$DMAs^{III+V}$ (ng dm^{-3})
S3	359 ± 18	366 ± 20	1337 ± 63
S5	425 ± 36	659 ± 21	2551 ± 71

V tab. 3.16 sú zhrnuté výsledky stanovenia vzoriek moču metódou HG-CT-GC-AAS V tab. 3.17 sú udané hodnoty koncentrácií vzoriek S3 a S5 získané metódou HG-CT-AFS a v tab. 3.18 pre HPLC-HG-AFS, keďže pri týchto metódach nebola stanovená koncentrácia $\text{TMA}^{\text{V}}\text{O}$, tak sa v tabuľke neuvádza a z rovnakého dôvodu nie je uvedený celkový súčet arzénových specii. Stanovenia uvedené v tab. 3.17 a 3.18 slúžia na porovnanie a boli vykonané na Ústave analytickej chémie na Akadémii vied ČR. Vzorky ŠP týmito metódami neboli stanovené. Výsledky stanovené metódami HG-CT-GC-AAS a HG-CT-AFS sa zhodujú, v prípade metylarzánu a dimetylarzánu sa zhodujú na 90%, v prípade arzánu boli metódou HG-CT-GC-AAS získané vyššie výsledky. Stanovenia metódami HG-CT-GC-AAS a HPLC-HG-AFS sú rovnako v dobrej zhode. Pri porovnaní týchto metód dosahujú arzénové specie vzorku S3 viac ako 90% zhodu s výnimkou arzánu, ktorý má metódou HG-CT-GC-AAS vyššie hodnoty. Vzorka S5 je v tomto prípade vo veľmi dobrej zhode s porovnávanou metódou. Výsledky naznačujú, že metóda je použiteľnou alternatívou k HG-CT-AAS/AFS či HPLC-HG-AFS.

4 Záver

Hlavným cieľom tejto diplomovej práce bola optimalizácia spojenia plynového chromatografu pre špeciálnu analýzu arzénu s hydridovým generovaním, kryogénnou pascou a s detekciou atómovým absorpčným spektrometrom. Optimalizované parametre ovplyvňujúce rozlíšenie, tvar, citlivosť vyjadrenú pomocou plochy píku a dĺžky chromatogramu boli rýchlosť nástreku, teplotný program a prietok nosného plynu. Bolo dosiahnuté dostatočné rozlíšenie píkov, minimalizované ich chvostovanie bez strát jednotlivých foriem a zároveň bola dosiahnutá primeraná doba analýzy. Vo výslednom teplotnom programe bola znížená finálna teplota kolóny z 150 °C na 130 °C a vložené dva teplotné gradienty s celkovou dobou jedného chromatogramu 13,5 minúty. Hodnoty rozlíšenia píkov po vyššie uvedených optimalizáciach medzi iAs^{III} a MAs^V dosahuje 1,1, rozlíšenie medzi MAs^V a $DMAs^V$ dosahuje 1,4 a rozlíšenie medzi $DMAs^V$ a $TMas^VO$ je 1,1. Ako zrovnávacie metódy slúžili HG-CT-AAS a HG-AAS, aby bolo dokázané, že pri transporte specii cez plynový chromatograf a prírodné rameno do AAS nedochádzalo k žiadnym stratám. Hodnoty LOD, LOQ a citlivosti pre HG-CT-GC-AAS sú v dobrej zhode s HG-AAS a HG-CT-AAS a teda zapojenie GC do systému významne neovplyvňuje LOD a LOQ. Po optimalizačných štúdiách boli stanovené obsahy arzénových specii u troch certifikovaných referenčných materiálov CASS-5, SLRS-5 a NASS-5 metódou HG-CT-GC-AAS. Keďže u týchto materiálov nie je uvedená špeciálna informácia (zastúpenie jednotlivých foriem arzénu) je porovnávaný súčet stanovených specii s certifikovaným celkovým obsahom arzénu. Získané hodnoty sú v zhode s certifikovanými hodnotami okrem SLRS-5, kde je s použitím metódy HG-CT-GC-AAS výsledok vyšší než certifikovaná hodnota. Navyše bolo vykonané porovnanie s publikovanými prácami, v ktorých bola uskutočnená aj špeciálna analýza niektorých zmienovaných referenčných materiálov a rozdiel spočíva hlavne u $TMas^VO$, ktorého obsah významne ovplyvňuje celkovú hodnotu arzénu. Následne bola metóda otestovaná na matrične zložitejších vzorkách moču, vzorky boli poskytnuté zamestnancami Akadémie Vied ČR. Výsledky boli porovnané s dvoma skôr použitými metódami HG-CT-AFS a HPLC-HG-AFS. HG-CT-GC-AAS je vhodný variant k bežným metódam ako je HPLC-ICP-MS alebo HG-CT-AAS s klasickou plnenou U-trubicou chromosorbom.

5 Použitá literatura

1. Jain, C. K.; Ali, I.: Arsenic: Occurrence, Toxicity and Speciation Techniques. *Water Research* **34**, 4304–4012 (2000).
2. Leermakers, M.; Baeyens, W.; DeGieter, M.: Toxic Arsenic Compounds in Environmental Samples: Speciation and Validation. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **25**, 1–10 (2006).
3. Ungureanu, G.; Santos, S.; Boaventura, R.: Arsenic and Antimony in Water and Wastewater: Overview of Removal Techniques with Special Reference to Latest Advances in Adsorption. *Journal of Environmental Management* **151**, 326–42 (2015).
4. Bhowmick, S.; Pramanik, S.; Mondal, P.: Arsenic in Groundwater of West Bengal, India: A Review of Human Health Risks and Assessment of Possible Intervention Options. *Science of the Total Environment* **612** (2018)
5. Guidelines for Drinking-water Quality, 4th edition incorporating the first addendum. Dostupné z URL <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/254637/9789241549950-eng.pdf?sequence=1> (02.04.2018)
6. Vyhláška č. 252/2004 Sb. - Pražské vodovody a kanalizace, a.s. Dostupné z URL <http://www.pvk.cz/vse-o-vode/vyhlaska-c-252-2004-sb/> (02.04.2018).
7. Bilal Shakoor, M.; Nawaz, R.; Hussain, F.: Human Health Implications, Risk Assessment and Remediation of As-Contaminated Water: A Critical Review. *Science of the Total Environment* **601**, 756–69 (2017).
8. Francesconi, K. A.; Kuehnelt, D.: Kuehnelt, D.: Determination of Arsenic Species: A Critical Review of Methods and Applications, 2000-2003. *Analyst* **129**, 373–395 (2004).
9. Styblo, M.; Del Razo, L. M.; Vega, L.; Germolec, D.R.: Comparative Toxicity of Trivalent and Pentavalent Inorganic and Methylated Arsenicals in Rat and Human Cells. *Archives of Toxicology* **74**, 289–99 (2008).
10. Mandal, B.: Arsenic Round the World: A Review. *Talanta* **58**, 201–235 (2002).
11. Liu, J.; Lu, Y.; Wu, Q.: Mineral Arsenicals in Traditional Medicines: Orpiment, Realgar, and Arsenolite. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **326**, 363–368 (2008).

12. Jomova, K.; Jenisova, Z.; Feszterova, M.: Arsenic: Toxicity, Oxidative Stress and Human Disease. *Journal of Applied Toxicology* **31**, 95–107 (2011).
13. Roggenbeck, B. A.; Banerjee, M.; Leslie, E.: Cellular Arsenic Transport Pathways in Mammals. *Journal of Environmental Sciences* **49** (2016).
14. Welz, B.; Sperling, M.: *Atomic Absorption Spectrometry*. Wiley-VCH, Weinheim (1999).
15. Wu, P.; He, S.; Luo, B.: Flame Furnace Atomic Absorption Spectrometry: A Review. *Applied Spectroscopy Reviews* **44**, 411–37 (2009).
16. Goreti, M.; Oleszcuk, N.; dos Santos, W.: Current Status of Direct Solid Sampling for Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry - A Critical Review of the Development between 1995 and 2005. *Applied Spectroscopy Reviews* **41**, 377–400 (2006).
17. Pereira, R. E.; Welz, B.; Lopez, A. H. D.: Strontium Mono-Chloride - A New Molecule for the Determination of Chlorine Using High-Resolution Graphite Furnace Molecular Absorption Spectrometry and Direct Solid Sample Analysis. *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy* **102**, 1–6 (2014).
18. Welz, B.; Lepri, F. G.; Araujo, R.: Determination of Phosphorus, Sulfur and the Halogens Using High-Temperature Molecular Absorption Spectrometry in Flames and Furnaces-A Review. *Analytica Chimica Acta* **647**, 137–148 (2009).
19. Korkmaz, D.; Demir, C.; Aydin, F.: Cold Vapour Generation and On-Line Trapping of Cadmium Species on Quartz Surface Prior to Detection by Atomic Absorption Spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **20**, 46–52 (2005).
20. Gil, S.: Ultrasound-Promoted Cold Vapor Generation in the Presence of Formic Acid for Determination of Mercury by Atomic Absorption Spectrometry. *Analytical Chemistry* **78**, 6260–6264 (2006).
21. Němcová, I.; Čermáková, L.; Rychlovský, P.: *Spektrometrické analytické metody I*. Univerzita Karlova v Praze, Nakladatelství Karlonim, 2004.
22. Dědina, J.: Atomization of Volatile Compounds for Atomic Absorption and Atomic Fluorescence Spectrometry: On the Way towards the Ideal Atomizer. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* **62**, 846–72 (2007).

23. D'Ulivo, A.: Chemical Vapor Generation by Tetrahydroborate(III) and Other Borane Complexes in Aqueous Media - A Critical Discussion of Fundamental Processes and Mechanisms Involved in Reagent Decomposition and Hydride Formation. *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy* **59**, 793–825 (2004).
24. Hernandez-Zavala, A.; Matousek, T.; Drobna, Z.: Speciation Analysis of Arsenic in Biological Matrices by Automated Hydride Generation-Cryotrapping-Atomic Absorption Spectrometry with Multiple Microflame Quartz Tube Atomizer (Multiatomizer). *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **23**, 342–51 (2008).
25. Matoušek, T.; Wang, Z.; Douillet, Ch.: Direct Speciation Analysis of Arsenic in Whole Blood and Blood Plasma at Low Exposure Levels by Hydride Generation-Cryotrapping-Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* **89**, 9633–37 (2017).
26. Dědina, J.; Tsalev, D. L.: *Hydride generation atomic absorption spectrometry*. Chichester, Wiley 1995.
27. Bortoleto, G.; Cadore, S.: Determination of Total Inorganic Arsenic in Water Using On-Line Pre-Concentration and Hydride-Generation Atomic Absorption Spectrometry. *Talanta* **67**, (2005).
28. Hansen, E. H.; Miró, M.: How Flow-Injection Analysis (FIA) over the Past 25 Years Has Changed Our Way of Performing Chemical Analyses. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **26**, 18–26 (2007).
29. Kozak, L.; Niedzielksi, P.: The Simultaneous Arsenic, Antimony, and Selenium Determination in Water Samples by Batch Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry. *Analytical Letters* **44**, 2312–2320 (2011).
30. Dědina, J.: Atomové absorpční a fluorescenční detektory pro speciální analýzu založenou na generované těkavých sloučenin. In: Inovace v atomové absorpční a fluorescenční spektroskopii. 105–124 (2007), Dostupné z URL: <<http://www.vscht.cz/anl/paci/PAC/prezentace/Inovace.pdf>> (02.04.2018)
31. Svoboda, M.; Kratzer, J.; Vobecký, M.; Dědina, J.: A Miniaturized Cryogenic Trap Design for Collection of Arsanes. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* **111**, 46–51 (2015).

32. Arbab-Zavar, M. H.; Chamsaz, M.; Youssefi, A.: Multivariate Optimization on Flow-Injection Electrochemical Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry of Cadmium. *Talanta* **97**, 229–34 (2012).
33. Arbab-Zavar, M. H.; Chamsaz, M.; Youssefi, A.: Evaluation of Electrochemical Generation of Volatile Zinc Hydride by Heated Quartz Tube Atomizer Atomic Absorption Spectrometry. *Analytical Sciences* **28**, 717–722 (2012).
34. Linhart, O.; Smolejová, J.; Červený, V.; Hraníček, J.: Determination of As by UV-Photochemical Generation of Its Volatile Species with AAS Detection. *Monatshefte Für Chemie - Chemical Monthly* **147**, (2016).
35. da Luz Potes, M.; Kolling, L.; Jesus, A.: Determination of Mercury in Fish by Photochemical Vapor Generation Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry. *Analytical Methods* **8**, 8165–8172 (2016).
36. Dedina, J.; Matousek, T.: Multiple Microflame - a New Approach to Hydride Atomization for Atomic Absorption Spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **15**, 301–304 (2000).
37. Dědina, J.: Atomization of volatile compounds for atomic absorption and atomic fluorescence spectrometry: On the way towards the ideal atomizer. *Spectrochimica Acta Part B* **62**, 846 – 872 (2007).
38. de Moraes Flores, E. M.; Nunes, A. M.; Dressler, V.: Multiple Microflame Quartz Tube Atomizer: Study and Minimization of Interferences in Quartz Tube Atomizers in Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy* **64**, 173–178 (2009).
39. Matoušek, T.; Dědina, J.; Selecká, A.: Multiple microflame quartz tube atomizer — further development towards the ideal hydride atomizer for atomic absorption spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* **57**, 451–462 (2002).
40. Templeton, D. M.; Ariese, F.; Cornelis, R.: Guidelines for Terms Related to Chemical Speciation and Fractionation of Elements. Definitions, Structural Aspects, and Methodological Approaches (IUPAC Recommendations 2000). *Pure and Applied Chemistry* **72**, 1453–1470 (2000).
41. Moraes, D. P.; Svoboda, M.; Matoušek, T.; Flores, E.; Dědina, J.: Selective Generation of Substituted Arsines-Cryotrapping-Atomic Absorption Spectrometry for

- Arsenic Speciation Analysis in N-Methylglucamine Antimonate. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **27**, 1734–42 (2012).
42. dos Santos, G. M.; Pozebon, D.; Cerveira, C.: Inorganic Arsenic Speciation in Rice Products Using Selective Hydride Generation and Atomic Absorption Spectrometry (AAS). *Microchemical Journal* **133**, 265–271 (2017).
43. Musil, S.; Matoušek, T.; Currier, J.; 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).
44. Matoušek, T.; Hernández-Zavala, A.; Svoboda, M.; Langrová, L.: Oxidation state specific generation of arsines from methylated arsenicals based on l-cysteine treatment in buffered media for speciation analysis by hydride generation-automated cryotrapping-gas chromatography-atomic absorption spectrometry with the multiatomizer. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* **63**, 396–406 (2008).
45. Matoušek, T.; Currier, J.; Trojánková, N.: 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).
46. Musil, S.; Matoušek, T.: On-line pre-reduction of pentavalent arsenicals by thioglycolic acid for speciation analysis by selective hydride generation–cryotrapping–atomic absorption spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* **63**, 685-691 (2008).
47. Lékopis - Plynová chromatografie. Dostupné z URL <http://www.lekopis.cz/Kap_2_2_28.htm> (02.04.2018).
48. Bartle, K. D.: History of gas chromatography. *Trac-Trends in Analytical Chemistry* **32**, 547-557 (2002).
49. Kirchner, M.; Matisová, E.; Domotorová, M.: Practical aspects of splitless injection of semivolatile compounds in fast gas chromatography. *Journal of Chromatography A* **1055**, 159-168 (2004).
50. Aniszewski, T.: CHAPTER 2 - Alkaloid Chemistry. *Alkaloids - Secrets of Life*, 61–139 (2007).

51. Campillo, N.; Penalver, R.; Vinas, P.: Speciation of arsenic using capillary gas chromatography with atomic emission detection. *Talanta*, **77**, 793-799 (2008).
52. Cai, Y.; Monsalud, S.; Jaffe, R.: Gas Chromatographic Determination of Organomercury Following Aqueous Derivatization with Sodium Tetraethylborate and Sodium Tetraphenylborate - Comparative Study of Gas Chromatography Coupled with Atomic Fluorescence Spectrometry, Atomic Emission Spectrometry and Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography A* **876**, 147-155 (2000).
53. Feng, Y. L.; Narasaki, H.: Speciation of Organotin Compounds in Marine Sediments by Capillary Column Gas Chromatography-Atomic Absorption Spectrometry Coupled with Hydride Generation. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **372**, 382-386 (2002).
54. Pasiás, I. N.; Kiriakou, I.; Proestos, Ch.: Development of a Rapid Method for the Determination of Caffeine in Coffee Grains by GC-FID—A Fully Validated Approach. *Antioxidants* **6**, 67 (2017).
55. Pasiás, I. N.; Kiriakou, I.; Papakonstantinou, L.: Determination of Vitamin E in Cereal Products and Biscuits by GC-FID. *Foods* **7**, 3 (2018).
56. Duan, J.; Cheng, Z.; Bi, J.: Residue behavior of organochlorine pesticides during the production process of yogurt and cheese. *Food Chemistry* **245**, 119-124 (2018).
57. Xu, Z.; Huan, Z.: Simultaneous Determination of Eight Pesticide Residues in Cowpeas by GC-ECD. *Journal of Chromatographic Science* **55**, 1-6 (2017).
58. Zuas, O.; Budiman, H.: Estimating Precision and Accuracy of GC-TCD Method for Carbon Dioxide, Propane and Carbon Monoxide Determination at Different Flow Rate of Carrier Gas. *Hemijaska Industrija* **70**, 451-459 (2016).
59. Amirahmadi, M.; Yazdanpanah, H.; Kobarfard, F.: Exposure Assessment for Some Pesticides through Rice Consumption in Iran Using a Multiresidue Analysis by GC-MS. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* **17**, 124-139 (2018).
60. Conduurso, C.; Cincotta, F.; Verzera, A.: Determination of Furan and Furan Derivatives in Baby Food. *Food Chemistry* **250**, 155–161 (2018).
61. 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).

62. Increase the resolving power of your GC, Capillary Flow Technology: Deans Switch. Dostupné z URL < <https://www.agilent.com/cs/library/brochures/5989-9384EN.pdf>> (20.04.2018).
63. Opekar, F.; Jelínek, I.; Rychlovský, P.; Plzák, Z.: *Základní analytická chemie pro studenty, pro než analytická chemie není hlavním studijním oborem*. Univerzita Karlova v Praze, Nakladatelství Karlonim, 2003.
64. Meloun M., Militký J.: *Statistická analýza experimentálních dat*, Praha, Academia 2004.