

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza

Studijní obor: Klinická a toxikologická analýza



Bc. Matěj Plecháč

SPECIAČNÍ ANALÝZA ARSENU S VYUŽITÍM GENEROVÁNÍ TĚKAVÝCH SPECIÍ
A ATOMIZACÍ V PLAZMOVÉM VÝBOJI S DIELEKTRICKOU BARIÉROU

Speciation analysis of arsenic based on volatile species generation and dielectric
barrier discharge plasma atomization

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Jan Kratzer, Ph.D.

Praha 2024

Tato diplomová práce vznikla na Ústavu analytické chemie AV ČR, v.v.i., na jeho detašovaném pracovišti Oddělení stopové prvkové analýzy v Praze. Tato práce byla finančně podporována výzkumným záměrem Ústavu analytické chemie AV ČR, v.v.i. (projekt RVO: 68081715) a Grantovou agenturou ČR (projekt č. 21-05285S).

–

Konzultanty této práce byli RNDr. Tomáš Matoušek, Ph.D.; RNDr. Milan Svoboda, Ph.D.
a RNDr. Václav Červený, Ph.D.

Prohlášení

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

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

Poděkování

Rád bych touto formou poděkoval vedoucímu práce RNDr. Janu Kratzerovi, Ph.D. a konzultantům práce RNDr. Tomáši Matouškovi, Ph.D.; RNDr. Milanu Svobodovi, Ph.D. za jejich odborné rady a pomoc při zpracování práce. Dále bych jim chtěl poděkovat za jejich trpělivost a čas při dohledu nad experimentální částí této práce. Poděkování patří také konzultantovi práce RNDr. Václavu Červenému, Ph.D. za zprostředkování práce na Ústavu analytické chemie AV ČR v Praze.

Ústavu analytické chemie AV ČR a jeho Detašovanému pracovišti Oddělení stopové prvkové analýzy v Praze bych rád poděkoval za poskytnutí prostor a prostředků pro realizaci experimentální části práce.

Poděkovat bych chtěl také mému spolupracovníkovi z Oddělení stopové prvkové analýzy v Praze MSc. Gilbertovi Coelho da Silva Junioru, PhD. za sestavení kontrolní jednotky GCbox02 používané v této práci. Rád bych poděkoval také Dominiku Vintrovi za jeho pomoc při grafickém zpracování nákrešů instrumentálních uspořádání.

Na závěr bych rád poděkoval také své rodině a blízkým přátelům za neustálou podporu během celého magisterského studia.

Abstrakt

Generování těkavých sloučenin (VSG) zahrnuje skupinu technik založených na derivatizaci analytu za účelem vytvoření těkavé sloučeniny před spektrometrickou detekcí. Selektivní přeměna analytu z kapalné do plynné fáze vede ke zvýšení účinnosti zavedení analytu do detektoru, jeho separaci od matrice a snížení rizika interferencí. Krok VSG lze navíc využít při speciální analýze nebo při prekoncentraci analytu. Nejčastějšími atomizátory těkavých látek jsou externě vyhřívané křemenné trubice (QTA). Jako alternativa ke QTA pro atomizaci hydridů se osvědčily atomizátory s plazmovým výbojem s dielektrickou bariérou (DBD). Rozdíl v toxicitě různých sloučenin téhož prvku vede k vývoji nových metod pro speciální analýzu. V této práci byly studovány různé přístupy ke speciální analýze toxikologicky významných specií arsenu, včetně anorganického iAs^{III} a iAs^V , kyseliny monomethylarseničné (MMA), kyseliny dimethylarseničné (DMA) a trimethyl arsen oxidu (TMA₂O) pomocí atomové absorpční spektrometrie s generováním hydridů (HG-AAS). Všechny tyto sloučeniny arsenu lze převést na těkavé sloučeniny, tj. arsan a jeho methylované analogy. Nejprve byla zkoumána schopnost QTA a DBD atomizátoru atomizovat různé těkavé specie As. Pro daný atomizátor byla pozorována srovnatelná citlivost mezi jednotlivými speciemi arsenu. Následně byly porovnány dva přístupy ke speciální analýze. První z nich využíval kyogenní past (CT) k separaci a zároveň k prekoncentraci specií As. Tato metoda byla kompatibilní s oběma atomizátory a lepší citlivosti a mezí detekce dosahovala ve spojení s QTA. Druhý přístup ke speciální analýze byl založen na separaci specií As v kapalné fázi pomocí HPLC, s využitím postkolonového HG, po kterém následovala *in-situ* prekoncentrace v DBD atomizátoru a AAS detekce. Tato metoda byla plně automatizována díky sestavení kontrolní jednotky řídící proces prekoncentrace. QTA nelze tímto způsobem pro *in-situ* prekoncentraci použít. Obě vyvinuté metody pro speciální analýzu As byly validovány analýzou certifikovaných referenčních materiálů.

Klíčová slova

Arsen, generování hydridů, speciální analýza, atomová absorpční spektrometrie, DBD atomizátor, prekoncentrace analytu

Abstract

Volatile species generation (VSG) comprises a group of techniques based on analyte derivatization in order to form a volatile compound prior to spectrometric detection. Selective analyte conversion from liquid to gas phase results in enhanced analyte introduction efficiency, but also in matrix separation and reduced risk of interferences. Moreover, VSG step can be utilized during speciation analysis or analyte preconcentration. The most frequent atomizers of volatile species are externally heated quartz tubes (QTA). Dielectric barrier discharge (DBD) atomizers have proved to be alternative hydride atomizers to QTA. The significant difference in toxicity of various species of the same element leads to the urgent need to develop new strategies for speciation analysis. Various approaches to speciation analysis of toxicologically relevant arsenic species including inorganic iAs^{III} and iAs^V , monomethylarsonic acid (MMA), dimethylarsinic acid (DMA) and trimethylarsine oxide (TMA₂O) by hydride generation atomic absorption spectrometry (HG-AAS) were investigated in this work. All these species can be converted to volatile compounds. i.e. arsane and its methylated analogues. Firstly, the ability of both atomizers, QTA and DBD, to atomize volatile As species was investigated. Comparable sensitivity was found among the species in given atomizer under the optimized conditions. Secondly, two approaches to speciation analysis were compared. The first one employed a cryotrap device (CT) to separate and also preconcentrate the As species at the same time. This strategy is compatible with both atomizers reaching better sensitivity and limits of detection for the QTA. The second approach was based on HPLC separation of the species in the liquid phase to be subsequently treated by post-column HG followed by *in-situ* preconcentration in DBD and AAS detection in a fully automated procedure operated by a self-designed control unit. The QTA cannot be employed for *in-situ* preconcentration in that way. Developed methods were validated by analysis of certified reference materials.

Key words

Arsenic, hydride generation, speciation analyses, atomic absorption spectrometry, DBD atomizer, analyte preconcentration

Obsah

1. Úvod	9
1.1. Cíle práce.....	9
2. Teoretická část	10
2.1. Arsen a jeho specie	10
2.1.1. Toxicita specií arsenu	12
2.2. Generování těkavých sloučenin.....	13
2.2.1. Chemické generování hydridů.....	14
2.2.2. Hydridově aktivní specie arsenu.....	15
2.2.3. Využití HG pro speciální analýzu	16
2.3. Spektrometrická detekce těkavých specií	17
2.4. Atomizátory pro HG-AAS detekci	18
2.4.1. Vyhřívaný křemenný atomizátor	19
2.4.2. Atomizace v plazmovém výboji s dielektrickou bariérou.....	20
2.5. Speciální analýza arsenu.....	22
2.5.1. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie.....	22
2.5.2. Separace v kryogenní pasti.....	23
2.6. Prekoncentrační techniky pro analýzu hydridotvorných prvků.....	25
2.6.1. Prekoncentrace v kryogenní pasti.....	26
2.6.2. Prekoncentrace v grafitovém atomizátoru.....	26
2.6.3. Prekoncentrace v DBD	26
2.6.4. Další způsoby prekoncentrace	28
3. Experimentální část	30
3.1. Seznam použitých chemikálií.....	30
3.2. Použité přístroje a pomůcky	31
3.2.1. Atomizátory.....	32
3.2.2. Kryogenní past	34
3.2.3. Kontrolní jednotka pro prekoncentraci v DBD	35
3.3. Příprava standardů a referenčních materiálů	36
3.3.1. Ověření koncentrace standardů metodou GF-AAS	37
3.3.2. Techniky generování hydridů.....	37

3.4.	Instrumentální uspořádání	38
3.5.	Zpracování naměřených dat	40
4.	Výsledky a diskuse.....	41
4.1.	Atomizace specií arsenu v MMQTA a DBD atomizátorech.....	41
4.1.1.	MMQTA	42
4.1.2.	DBD atomizátor.....	45
4.1.3.	Srovnání MMQTA a DBD atomizátoru.....	46
4.2.	Speciační analýza s využitím generování substituovaných hydridů a jejich separací v CT	47
4.2.1.	HG-CT-MMQTA-AAS	47
4.2.2.	HG-CT-DBD-AAS	49
4.2.3.	Určení analytických charakteristik HG-CT-AAS.....	52
4.2.4.	Validace metody HG-CT-AAS	53
4.2.5.	Srovnání atomizátorů ve spojení s CT	55
4.3.	Speciační analýza s využitím HPLC, postkolonového generování hydridů a prekoncentrací v DBD.....	56
4.3.1.	Postkolonové generování hydridů	56
4.3.2.	Speciační analýza bez před-oxidace vzorku a následnou prekoncentrací v DBD atomizátoru.....	58
4.3.3.	Speciační analýza s před-oxidací vzorku a následnou prekoncentrací v DBD atomizátoru.....	62
4.3.4.	Určení analytických charakteristik HPLC-HG-tDBD-AAS	63
4.3.5.	Validace metody HPLC-HG-tDBD-AAS	68
5.	Závěr	74

Seznam použitých zkratek a symbolů

AAS	Atomová absorpční spektrometrie
AES	Atomová emisní spektrometrie
AFS	Atomová fluorescenční spektrometrie
CRM	Certifikovaný referenční materiál
CT	Kryogenní past
CVG	Chemické generování těkavých sloučenin
DBD	Plazmový výboj s dielektrickou bariérou
tDBD	<i>in-situ</i> prekoncentrace v DBD atomizátoru
DMA	Kyselina dimethyl arseničná
GF	Grafitový atomizátor
GC	Plynová chromatografie
GLS	Separátor fází
HG	Generování hydridů
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
ICP-MS	Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem
LC	Kapalinová chromatografie
LDR	Lineární dynamický rozsah
LOD	Mez detekce
MMQTA	Vyhřívaný křemenný multiatomizátor
MMA	Kyselina monomethyl arseničná
PTFE	Polytetrafluorethylen
QTA	Vyhřívaný křemenný atomizátor
TMA ₃ O	Trimethyl arsen oxid
THB	Tetrahydridoboritan
VSG	Generování těkavých sloučenin

1. Úvod

1.1. Cíle práce

Porovnat účinnost atomizace nejvýznamnějších specií As tvořících těkavé specie ve dvou typech hydridových atomizátorů používaných v atomové absorpční spektrometrii (AAS) za optimalizovaných podmínek. Konkrétně se jedná o vyhřívaný křemenný multiatomizátor (MMQTA) a plazmový výboj s dielektrickou bariérou (DBD).

Porovnat různé přístupy ke speciační analýze arsenu založené na generování hydridů (HG) a jejich kompatibilitu s DBD-AAS detekcí. Konkrétně se jedná o:

1) Generování substituovaných hydridů s jejich následnou prekoncentrací a separací v kryogenní pasti (HG-CT-DBD-AAS).

2) Separaci specií As pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) s postkolonovým generováním hydridů (HPLC-HG-DBD-AAS).

3) HPLC separaci specií As s postkolonovým generováním hydridů a *in-situ* prekoncentrací v DBD atomizátoru (HPLC-HG-tDBD-AAS).

Pro nejvýhodnější uspořádání určit analytické charakteristiky a ověřit použitelnost metody analýzou certifikovaných referenčních materiálů.

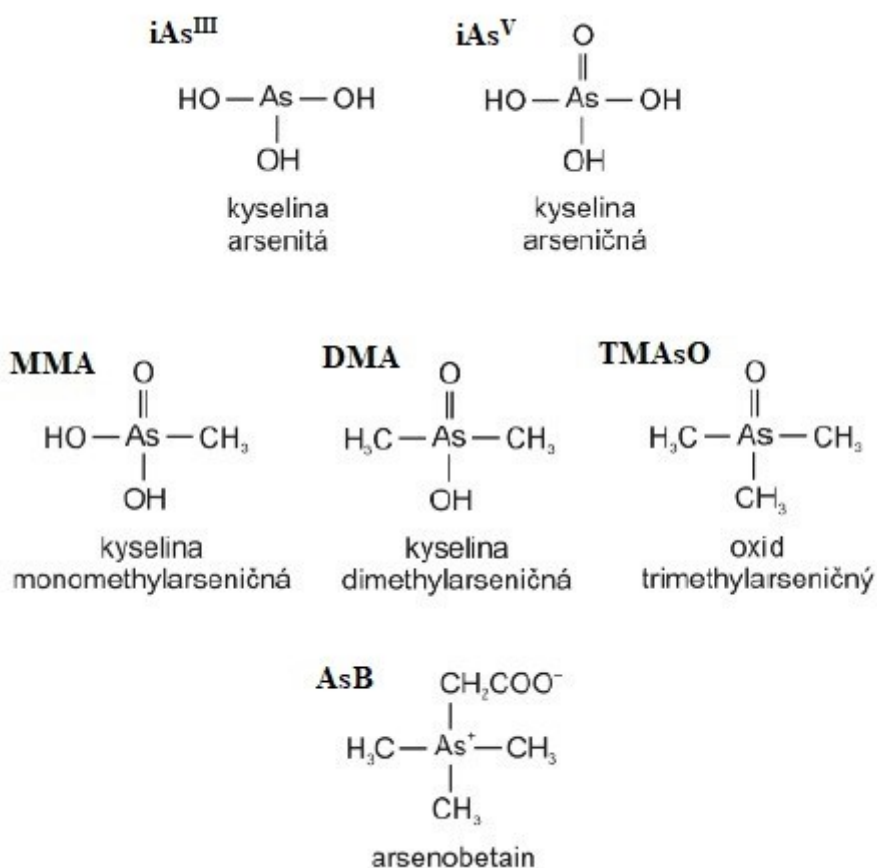
2. Teoretická část

2.1. Arsen a jeho specie

Arsen, As, je polokov, jemuž v periodické tabulce náleží místo v 15. skupině a 4. periodě. Ve sloučeninách může být přítomný v oxidačních číslech -3, 0, +3 a +5. Arsen je všudypřítomný, ve stopových koncentracích ho lze detekovat téměř kdekoli. V zemské kůře se nachází nejčastěji ve formě sulfidů, nebo jako příměs rud různých kovů. [1] Pětimocný anorganický arsen (iAs^V) a trojmocný anorganický arsen (iAs^{III}) jsou rozšířené v přírodních vodách, jelikož jejich soli jsou rozpustné v širokém rozmezí pH. [2] V dobře oksyložených povrchových vodách je obecně nejzastoupenější specií iAs^V . Pokud se arsen nachází v reduktivním prostředí, jakým jsou například sedimenty řek, více dominantní formou je iAs^{III} . [3] Kontaminace životního prostředí arsenem a jeho sloučeninami je díky jejich stoupajícímu využití v různých oblastech průmyslu, například ve sklářství, výrobě slitin, a hlavně polovodičů, závažným problémem. K uvolňování arsenu do půdy přispívá jeho využití v zemědělství, kam se dostává z pesticidů, herbicidů či veterinárních léčiv, jejichž je účinnou složkou, a také jako kontaminant z použitých fosfátových hnojiv. Do vody se arsen dostává depozicí ze vzduchu, rozpouštěním svých minerálů a rud které arsen obsahují, nebo nedostatečným zpracováním těžebních odpadních vod. [2]

Mezi organické specie arsenu řadíme methylované specie, kterými jsou kyselina monomethyl arseničná (MMA), kyselina dimethyl arseničná (DMA) a trimethyl arsen oxid (TMAsO). Strukturální vzorce nejběžnějších sloučenin arsenu nalezneme na Obr. 2.1. V případě obou methylovaných kyselin se arsen může vyskytovat také v trojmocné formě, avšak kyseliny monomethyl arsenitá a dimethyl arsenitá snadno oxidují na své pětimocné formy. Dále identifikujeme složitější organické sloučeniny arsenobetain a arsenocholin či arsenocukry. [2,4,5] Methylace arsenu je brána jako detoxifikační mechanismus různých organismů. Anorganické specie arsenu jsou methylovány bakteriemi a houbami za produkce dimethyl a trimethyl derivátů arsenu mechanismem, který zahrnuje substituci atomu kyslíku za methylovou skupinu. [5] Ryby jsou důležitým bioindikátorem pro mnoho znečišťujících látek ve vodě včetně specií arsenu. K bioakumulaci arsenu v rybách dochází přímo skrz žábry nebo kůži z vody, ale také konzumací jejich přirozené kořisti. V rybách tak můžeme nalézt anorganické, methylované i další organické specie arsenu. [6] Nedávné studie se zaměřily na speciální analýzu arsenu ve vodních organismech konzumovaných člověkem.

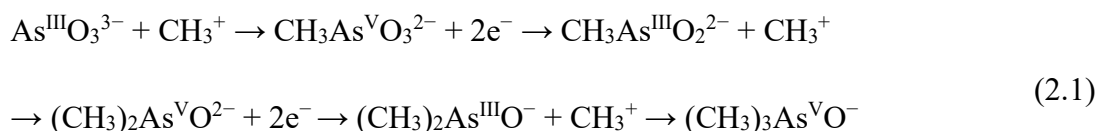
Nejdominantnější specií v mořských organismech je netoxický arsenobetain, jehož frakce může být až 70 % celkové koncentrace As. Kromě něj lze nalézt v těchto organismech nezanedbatelné koncentrace DMA, MMA, TMA₂O, arsenocholinu a také anorganického arsenu jako minoritní specie. Ve sladkovodních organismech je obecně celková koncentrace As nižší s více proměnlivým rozdělením specií. [7] Methylované specie arsenu můžeme nalézt také v rostlinách a plodinách. V rýži byla stanovena frakce DMA v různých vzorcích o podílu 10-90 % v závislosti na místě odběru a odrůdě. U rostlin se ale přítomnost methylovaných specií arsenu odůvodňuje jejich příjmem z půdy, která obsahuje bakterie nebo houby, které disponují redukčními metabolickými dráhami schopnými methylace anorganického arsenu. Při vystavení půdy anoxickým podmínkám žádná z rostlin nebyla schopná samostatné methylace arsenu. Přímý důkaz methylace arsenu u vyšších rostlin zatím nebyl prokázán. [4,8]



Obr. 2.1.: Chemické struktury nejběžnějších specií arsenu [9]

U člověka jsou metabolismus arsenu a jeho vylučování z organismu dobře popsány. Ke studiu metabolismu arsenu u člověka je často používána moč. Přijatý anorganický arsen je

z velké části metabolizován na MMA a DMA. [10] Obsah specií arsenu v moči je podle dostupných dat rozdělen na frakce obsahující 10-30 % anorganického arsenu, 10-20 % MMA a 60-80 % DMA. [11] Metabolismus arsenu probíhá dvěma procesy, jedná se o: a) redukční reakce přeměňující pětimocné specie arsenu na trojmocné a b) oxidační methylyaci, během které je anorganický arsen substituován na mono-, di- a tri-methylované deriváty. Oba kroky popisuje reakční schéma 2.1. [12]



Methylované specie arsenu jsou hlavními metabolity anorganického arsenu v lidské moči, do které jsou vylučovány spolu s anorganickými speciemi iAs^{V} a iAs^{III} . Přítomnost methylovaných specií v lidské moči souvisí s chronickou expozicí organismu vůči arsenu. K chronické expozici dochází nejčastěji kvůli přítomnosti anorganického arsenu v pitné vodě či inhalační expozicí. Finálním metabolitem arsenu produkovaným v játrech člověka je DMA. U jiných živočišných druhů byla ale prokázána i metabolická přeměna anorganického arsenu končící produkcí TMA₂O. [13]

2.1.1. Toxicita specií arsenu

V životním prostředí se arsen vyskytuje ve formě arsenitanů a arseničnanů. Za toxicitější z těchto dvou specií jsou považovány arsenitany. Po vstupu do organismu je arsen ukládán do jater, ledvin, srdce a plic. Akumulace v těchto tkáních je spojována s mnoha onemocněními včetně rakoviny, diabetu nebo srdečních problémů. Kromě toho působí arsen a jeho sloučeniny hepatotoxicky a neurotoxicky. Známkami chronické expozice arsenu jsou hyperpigmentace kůže, folikulární keratóza nebo vypadávání vlasů. Akutní otrava arsenem je provázena závratěmi, bolestí břicha, zvracením a průjmem. [2,14] Pětimocné methylované kyseliny arsenu (MMA a DMA) jsou obecně považované za méně toxické než anorganické specie arsenu. Arsenobetain a arsenocholin jsou pro člověka netoxické. Některé studie nicméně považují metabolismus arsenu za bioaktivační proces, jehož některé metabolity jsou toxicitější než anorganické specie původně přijaté organismem. Jedná se zejména o metabolity trojmocných methylovaných kyselin MMA a DMA. Tyto sloučeniny jsou pro lidský organismus toxické a byly prokázány jejich genotoxické účinky. V posuzování

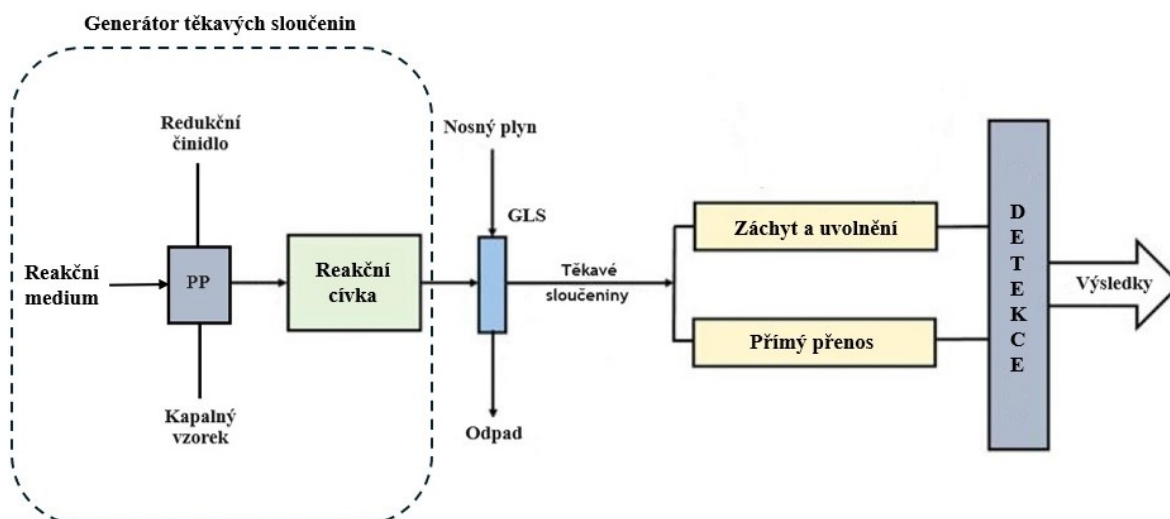
toxicity je ale nutno brát v potaz jak celkovou koncentraci arsenu, tak i koncentraci jednotlivých specií v organismu. [8,15]

V současnosti používané analytické metody pro stanovení arsenu a jeho specií jsou založené na detekci atomovými spektrometrickými technikami (kapitola 2.3.) a často využívají generování těkavých specií (kapitola 2.2.) jako způsob vnášení analytu do detektoru.

2.2. Generování těkavých sloučenin

Během generování těkavých sloučenin (VSG) dochází k přeměně netěkavých specií (většinou iontových, kovových nebo organokovových) na sloučeniny těkavé. Dochází k převodu sloučenin z kondenzované fáze do fáze plynné pomocí chemických, biologických a fyzikálních procesů. V analytické chemii se techniky VSG využívají k derivatizaci analytu a jeho přeměně na málo polární až nepolární těkavé sloučeniny, které jsou následně detekovány. Jednou z těchto technik je generování hydridů (HG), při kterém dochází k převedení analytu na těkavý hydrid. [16] Konverze analytu na těkavou sloučeninu lze dosáhnout reakcí chemickou, fotochemickou, elektrochemickou nebo působením plazmatu. Generování těkavých hydridů, s využitím tetrahydridoboritanu (THB) jako redukčního činidla, řadíme mezi techniky chemického generování těkavých sloučenin (CVG). [17]

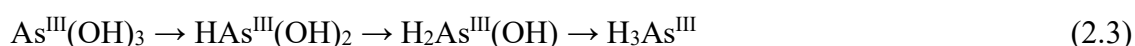
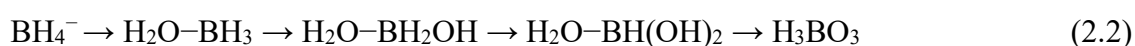
Kapalný vzorek může být do generátoru těkavých specií přiváděn kontinuálně, v režimu průtokové injekční analýzy nebo výstupem z chromatografické kolony po předchozí separaci specií analytu v kapalně fázi (postkolonové generování). V generátoru dochází k derivatizaci analytu a vzniku těkavých specií, které jsou oddělené od zbylé kapaliny v separátoru fází (GLS). Plynná fáze postupuje dále směrem k detektoru a kapalná fáze je odváděna do odpadu (Obr. 2.2.). Posledním používaným typem generátoru těkavých sloučenin je dávkové uspořádání (tzv. batch), kde hydridový generátor funguje zároveň i jako GLS. Vygenerovaná těkavá specie může být ihned zavedena z GLS do detektoru, což je nejběžnější přístup. Případně může být před detekcí za účelem dosažení lepšího detekčního limitu prekoncentrována. [17] Krok VSG je nezávislý na použitém detektoru. V případě použití VSG pro prvkovou a speciální analýzu na ultrastopových úrovních jsou k detekci využívány metody atomové spektrometrie blíže popsané v kapitole 2.3.



Obr. 2.2.: Schéma aparatury pro CVG s kontinuálním generováním (PP – peristaltické pumpy, GLS – separátor fází)

2.2.1. Chemické generováním hydridů

Reakce THB s analytem (v iontové formě) v kyselém prostředí, tj. chemické generování, je nyní nejpoužívanějším přístupem ke generování hydridů. Mezi typické hydridotvorné prvky patří As, Sb, Bi, Ge, Sn, Se, Te a Pb. Redukce analytu probíhá ve dvou krocích. Prvním krokem je hydrolyza THB v kyselém prostředí, kdy konečným produktem je kyselina boritá. Reakce je provázena tvorbou meziproductů po postupné hydrolyze B-H vazeb viz reakční schéma 2.2. [18]



Druhým krokem je redukce analytu probíhající přenosem vodíku z borohydridu. S analytem může reagovat každý ze čtyř produktů hydrolyzy borohydridu v reakčním schématu 2.2. Příklad generování hydridů ilustruje reakční schéma 2.3., kdy je pomocí borohydridu z vodného roztoku kyseliny arsenité generován plynný AsH_3 . Nejpoužívanější kyselinou pro HG je HCl, která se používá v koncentracích o rozsahu 1-9 mol·dm⁻³. Koncentrace THB ve vodném roztoku bývá v rozsahu 0,5-3 %. Koncentrace reakčních činidel závisí na zvoleném analytu a typu hydridového generátoru. Alternativou k HCl mohou být různé anorganické a organické kyseliny nebo pufrů. [16,19]

Díky vyšší účinnosti generování a rychlejší reakční kinetice předčilo generování hydridů s použitím tetrahydroboritanu dříve používanou metodu redukce pomocí kovu v kyselém prostředí (redukčním činidlem byl kovový Zn). [18]

2.2.2. Hydridově aktivní specie arsenu

Řada specií As významných z toxikologického pohledu je tzv. hydridově aktivních. To znamená, že je lze převést na těkavé sloučeniny = arsany s různým počtem methylových skupin. Znalost vztahu mezi speciemi arsenu a jim odpovídajícím těkavým sloučeninám je důležitá pro dosažení správných výsledků při speciální analýze. [20]

Obecně je účinnost generování hydridů za různých podmínek pro jednotlivé specie různá. Za optimalizovaných analytických podmínek dochází při reakci THB s iAs^{III} a iAs^V k tvorbě AsH_3 . Před převedením iAs^V na hydrid je vhodné nejdříve provést jeho předredukci na iAs^{III} . Tvorba AsH_3 z iAs^V totiž probíhá pomaleji, a tudíž by reakce nemusela proběhnout v daném experimentálním uspořádání kvantitativně. Redukci lze provést 30-60 min před analýzou za přítomnosti L-cysteinu nebo s použitím KI a kyseliny askorbové (tzv. off-line předredukce), nebo přímo v průtoku (on-line předredukce) za pomoci koncentrované HCl a THB. [20,21]

Methylované specie MMA, DMA a TMA₃O těkavé sloučeniny tvoří, ale s nižší účinností než anorganický As, což vede k nižší odezvě na detektoru. Z methylovaných As^{III} a As^V specií vzniká CH_3AsH_2 z MMA, $(CH_3)_2AsH$ z DMA a $(CH_3)_3As$ z TMA₃O. [20,22]

Složitější organické specie arsenu jako jsou arsenobetain, arsenocholin nebo arsenocukry těkavé sloučeniny netvoří. Aby bylo možné tyto sloučeniny stanovit pomocí technik generování těkavých sloučenin, je nutné je před generováním nejprve podrobit mikrovlánnému rozkladu, nebo fotooxidaci pomocí UV záření za přítomnosti peroxidisíranu draselného, což způsobí rozštěpení těchto molekul za tvorby strukturně jednodušších produktů, které již jsou hydridově aktivní. Nejčastějšími produkty rozkladu organických sloučenin As jsou MMA, DMA a anorganický As. [17,23] Nicméně použití rozdílných metod rozkladu vzorku vede k tvorbě množství produktů, které poskytují různou odezvu na detektoru. Neúplný rozklad organických sloučenin As tedy může vést k rozdílným výsledkům celkové koncentrace As. Pro správné stanovení celkového obsahu As ve vzorku je proto vhodná úplná mineralizace vzorku, například ve směsi kyselin dusičné a sírové za přítomnosti peroxidu vodíku. [22]

2.2.3. Využití HG pro speciální analýzu

Separace specií lze v některých případech docílit kromě chromatografických metod (viz kapitola 2.5.) také bez jejich použití, a to pomocí VSG kroku, díky možnosti selektivního generování těkavých sloučenin, nebo s využitím generování alkyl substituovaných těkavých sloučenin.

V případě selektivního generování se využívá faktu, že volbou podmínek generování (pH, koncentrace redukčního činidla apod.) lze dosáhnout stavu, kdy je na těkavou specii selektivně a kvantitativně převedena pouze jedna specie analytu, zatímco ostatní specie zůstávají v roztoku. [17] Příkladem může být selektivní generování trojmocného a pětímocného anorganického arsenu. Metodou předredukce pomocí L-cysteinu lze selektivně generovat anorganické specie As, jelikož iAs^V těkavé sloučeniny netvoří (z roztoku bez přídavku L-cysteinu bude generován pouze iAs^{III}). Nejdříve tedy změříme koncentraci iAs^{III} a následně po přídavku L-cysteinu a redukci pětímocné formy změříme celkový obsah anorganického arsenu. Koncentraci iAs^V získáme z rozdílu těchto hodnot. Analogicky lze takto docílit i separace trojmocných a pětímocných methylovaných sloučenin arsenu. [24] Zároveň některé specie nejsou hydridově aktivní vůbec. Příkladem může být arsenobetain, který je majoritní specii arsenu v materiálech mořského původu, a zařazením kroku postkolonového generování může být odstraněn z chromatogramu, kde by interferoval s píky jiných zájmových specií (viz kapitola 2.5.1). [25]

Dalším příkladem využití HG pro separační krok je možnost generování alkyl substituovaných hydridů. Tento přístup je použitelný v případě, že jednotlivé specie analytu mohou být převedeny na různé těkavé alkyl substituované hydridy. Vygenerovaná směs různě substituovaných těkavých sloučenin stejného analytu je následně zakoncentrována vymrazováním v kryogenní pasti (CT) za teplot kapalného dusíku a jednotlivé specie jsou následně při postupném ohřívání pasti separovány. Tento přístup je užitečný pro speciální analýzu methylovaných sloučenin As, Ge a Sb. V případě As se jedná o arsan a jeho methyl-substituované deriváty. [26]

Selektivního generování anorganických i methylovaných forem s různým oxidačním číslem As lze dosáhnout změnou reakčních podmínek, zejména pH. Generování těkavých sloučenin ze specií As je závislé na pH, které v případě HG závisí na koncentraci HCl v roztoku. Při nízkém pH (okolo 1) dochází při reakci s THB k vzniku hydridů z trojmocných i pětímocných specií As, naopak při vyšším pH (okolo 6) jsou pětímocné specie As v roztoku

disociované a hydridy jsou generovány pouze z trojmocných specií. Tímto způsobem lze od sebe oddělit jak anorganické specie, tak methylované specie o různém oxidačním čísle As. Selektivně generované specie As jsou následně separovány pomocí CT a detekovány. Princip kryogenní pasti je blíže popsán v kapitole 2.5.2. Tento přístup nám umožňuje stanovit koncentraci trojmocných specií a odečtem od celkové koncentrace dopočítat také koncentraci pětímocných specií díky úpravě pH reakčního roztoku. [24]

2.3. Spektrometrická detekce těkavých specií

K detekci těkavých specií jsou používány metody atomové spektrometrie včetně hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS). Atomově spektrometrické detektory slouží k velmi citlivému kvantitativnímu stanovení, zatímco některé MS techniky umožňují, v případě použití měkké ionizace, kvalitativní stanovení vedoucí k určení nebo potvrzení struktury těkavých specií. [18]

Metody atomové spektrometrie fungují na fyzikálním principu interakce záření s volnými atomy analytu. V důsledku toho vyžadují atomizaci molekuly těkavé sloučeniny, ve které byl analyt původně vázán. Podle typu interakce záření s volným atomem analytu rozlišujeme: atomovou absorpční spektrometrii (AAS), atomovou fluorescenční spektrometrii (AFS) a atomovou emisní spektrometrii (AES). Čtvrtou a hojně využívanou spektrometrickou technikou přiřazovanou k metodám atomové spektrometrie je hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS), ačkoli zde nedochází k interakci atomů analytu s fotony, ale dochází k ionizaci analytu a měřeno je hmotnostní spektrum. [27]

V AAS je analyt převeden v atomizátoru na volné atomy v základním stavu a měří se množství záření absorbovaného při jeho průchodu atomizátorem. To je dle Lambert-Beerova zákona přímo úměrné koncentraci volných atomů. Zdrojem záření v AAS je nejčastěji monochromatické záření o vlnové délce charakteristické pro analyzovaný prvek. Záření prochází skrz atomizátor a je, v ideálním případě, absorbováno pouze atomy analytu. Množství absorbovaného záření poskytuje informaci o koncentraci analytu ve vzorku. [27]

V AFS probíhá proces atomizace obdobně jako v AAS. Volné atomy analytu jsou následně ozářeny monochromatickým zářením o specifické vlnové délce a jsou excitovány do vyšších energetických stavů. Při návratu excitovaných atomů na nižší energetickou hladinu je emitováno záření (fluorescence) o charakteristické vlnové délce, které je

detekováno obvykle ve směru kolmém na paprsek excitujícího zdroje a jehož intenzita poskytuje kvantitativní informaci o analytu ve vzorku. [27]

V případě AES je analyt atomizován a volné atomy analytu jsou následně excitovány na vyšší energetickou hladinu vhodným zdrojem, například indukčně vázaným plazmatem nebo plamenem. Excitované atomy při navrácení na nižší energetickou hladinu emitují záření. Výsledkem je emisní spektrum umožňující kvantitativní i kvalitativní analýzu. V AES je tedy energie potřebná k excitaci dodána termálně (plazmatem, plamenem), na rozdíl od AFS, kde k excitaci volného atomu analytu ze základního stavu do excitovaného dochází dodáním energie, kterou nese absorbovaný foton. [27]

Metodou využívající detekci analytu ve formě atomárních iontů je ICP-MS. Atomy nebo molekuly analytu jsou ionizovány v plazmové hlavici, a vzniklé ionty jsou následně separovány v hmotnostním analyzátoru hmotnostního spektrometru dle své hmotnosti (m), resp. poměru m/z , kde z je náboj iontu, přičemž platí, že v plazmatu dominantně vznikají jednoduše nabití ionty ($z = 1$). Separované ionty jsou následně detekovány, nejčastěji elektronásobičem. Měřené hmotnostní spektrum poskytuje kvantitativní i kvalitativní informaci o prvcích a jejich izotopech ve vzorku. [18]

Na rozdíl od ICP-MS mohou některé hmotnostně spektrometrické techniky využívající měkké ionizační zdroje poskytnout strukturní informace o analytu. Mezi takové iontové zdroje řadíme například ionizaci elektrosprejem. Strukturní analýza může pomoci identifikovat složitější organické sloučeniny analytu ve vzorku. [28,29]

2.4. Atomizátory pro HG-AAS detekci

Atomizátor je zařízení schopné přeměny analytu na volné atomy v plynném stavu s dostatečnou účinností. Pro AAS detekci je důležité, aby tyto volné atomy byly v základním energetickém stavu. K atomizaci těkavých sloučenin lze v AAS použít plamen, elektrotermický atomizátor, vyhřívané křemenné trubice nebo miniaturní plazmata. [30]

Atomizace je pro AAS detekci klíčovým krokem po HG. Nejvíce rozšířeným atomizátorem těkavých sloučenin je vyhřívaný křemenný atomizátor (QTA). Alternativou ke QTA je plazmový výboj s dielektrickou bariérou, tzv. DBD atomizátor, ve kterém dochází k atomizaci hydridů při nízkých teplotách ve srovnání s QTA (viz kapitoly 2.4.1. a 2.4.2.). Mechanismus atomizace je v obou případech radikálový. Konkrétně se jedná o vodíkové radikály, jejichž přítomnost byla prokázána jako klíčová pro atomizaci, která byla

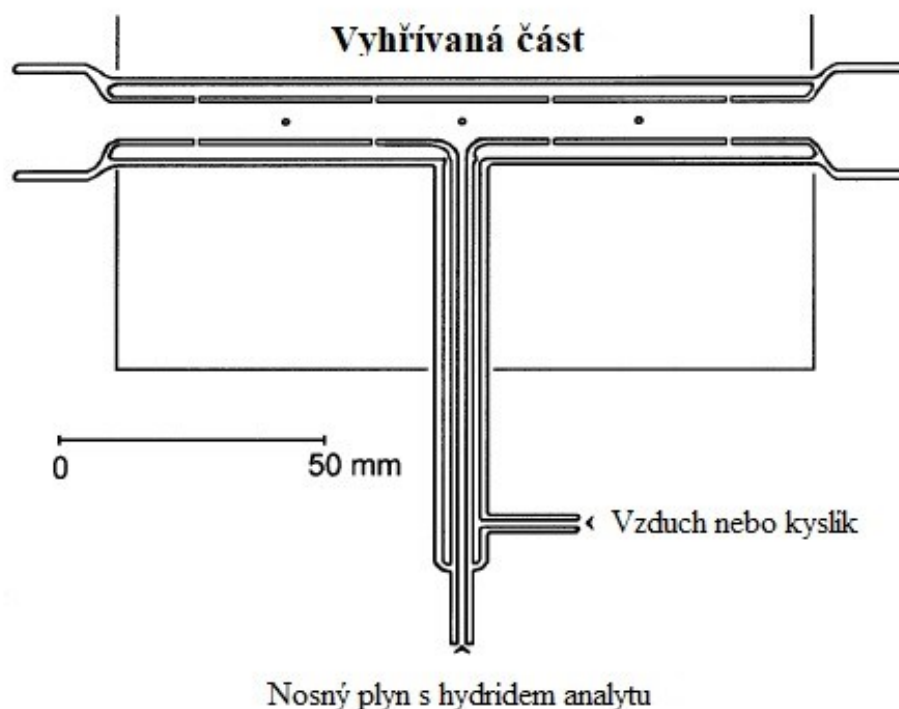
bez přítomnosti vodíku v atomizátoru výrazně nižší. Uvnitř ramene atomizátoru, které je umístěno v optické ose spektrometru (tzv. optické rameno) dochází k tvorbě vodíkových radikálů za reakce stop kyslíku s přebytkem vodíku, a to za vysoké teploty (QTA) nebo v prostředí plazmatu (DBD). Množství vodíku generované při HG rozkladem THB je dostatečné pro tvorbu vodíkových radikálů v množství řádově přesahujícím koncentraci hydridů analytu. V atomizátoru dochází k tvorbě nehomogenního oblaku vodíkových radikálů, uvnitř kterého dochází k atomizaci molekulární formy analytu. Volné atomy analytu jsou stabilní pouze uvnitř tohoto oblaku. Podíl vodíkových radikálů na atomizaci analytu byl prokázán v obou typech atomizátorů. [31–34]

2.4.1. Vyhříváný křemenný atomizátor

V literatuře bylo popsáno množství různých modifikací tohoto atomizátoru. Nejčastějším typem je QTA ve tvaru písmene T, méně používaná je pak verze tvaru písmena L. Takový atomizátor je externě vyhříván na atomizační teplotu buď plamenem acetylen-vzduch, nebo častěji odporově píčkou. Teplota uvnitř atomizátoru dosahuje hodnot 700-1100 °C. Plynná fáze z generátoru je přiváděna vstupním (přívodním) ramenem T-trubice a vstupuje do vyhříváné části horizontálního (optického) ramene, kde dochází k atomizaci hydridů analytu radikálovým mechanismem, jak bylo diskutováno výše v kapitole 2.4. Nevýhodou QTA je úzký lineární rozsah kalibračních závislostí a špatná odolnost vůči interferencím, naopak výhodou tohoto typu atomizátoru je nízká pořizovací cena, jednoduchost a vysoká citlivost. [30,31]

Novým typem atomizátoru, který byl vyvinut, aby překonal nevýhody QTA je křemenný multiatomizátor (MMQTA). Jeho konstrukce vychází z QTA, tedy jedná se o trubici tvaru písmena T. V případě MMQTA (Obr. 2.3.) je ale horizontální rameno trubice dvouplášťové a je tvořené dvěma koncentrickými trubicemi, přičemž vnitřní z nich je děrovaná. Plyn obsahující kyslík (vzduch nebo plynná směs argon/kyslík) je zaveden do vnější trubice, odkud vstupuje skrz několik malých otvorů do vnitřní trubice. U těchto otvorů dochází k reakci kyslíku s vodíkem a tvorbě vodíkových radikálů důležitých pro atomizaci analytu. Výsledkem je homogennější rozložení vodíkových radikálů po celé délce vnitřní trubice optického ramene. Výhodou je také fakt, že množství kyslíku přiváděného do trubice můžeme přesně regulovat. Za těchto podmínek volné atomy existují delší dobu, případně mohou být v trubici po svém zániku znovu atomizovány (reatomizace). Nejnovější verze

tohoto atomizátoru umožňují stejnoměrné vyplnění horizontální trubice radikály vodíku, což vede ke snížení vlivu atomizačních interferencí a lepší linearitě kalibračních křivek. [30,35]



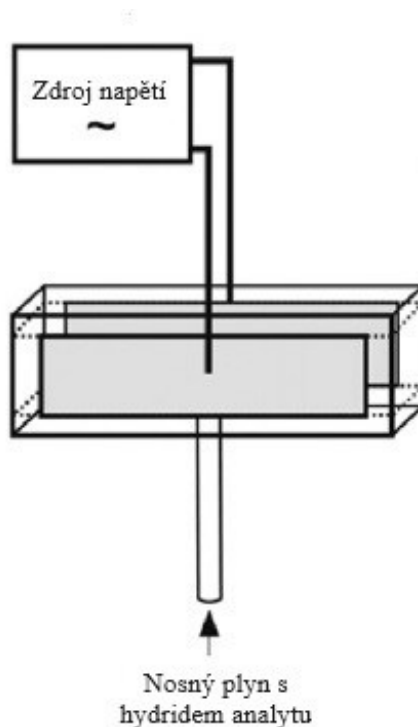
Obr. 2.3.: Schéma křemenného multiatomizátoru [35]

Dalším z typů křemenných atomizátorů, který na rozdíl od QTA a MMQTA nepotřebuje externí vyhřívání je atomizátor typu plamínek v křemenné trubici (FIT). Kyslík je přiváděn do atomizátoru z tlakové láhve, kapilárou ústící do spoje přívodního a optického ramene. Do nosného plynu je nutné dodávat navíc vodík z tlakové láhve k podpoření hoření plamínku. K atomizaci hydridů dochází opět v oblaku vodíkových radikálů. V případě FIT je ale oblak pevně fixován na konci přívodní kapiláry. [30]

2.4.2. Atomizace v plazmovém výboji s dielektrickou bariérou

Mezi atomizátory nevyžadující externí vyhřívání patří DBD. Jedná se o plazma nízkého výkonu pracující za atmosférického tlaku. Plazma vzniká mezi dvěma kovovými elektrodami, umístěnými paralelně, které jsou od sebe vzdálené typicky několik mm. Minimálně jedna z elektrod je kryta dielektrickou bariérou a mezi elektrody je vloženo vysoké střídavé napětí. Při zapálení výboje se toto dielektrikum nabije, náboj na dielektriku vytvoří lokální elektrické pole, které působí proti elektrickému poli na elektrodách a zabrání tak dalšímu pokračování výboje. Protože pro další pokračování výboje je třeba zvýšit napětí

nebo změnit jeho polaritu, je možné výboj s dielektrickou bariérou (DBD) udržet pouze při napájení střídavým napětím. V okamžiku zapálení výboje se ve výbojovém kanálku vytvoří elektrony s velkou energií, které způsobí ionizaci nebo excitaci plynu mezi elektrodami. Teplota plynu při tom zůstává stejná, jako je teplota okolí. [30,36]



Obr. 2.4.: Schéma atomizátoru s plazmovým výbojem s dielektrickou bariérou [37]

Mezi nejčastěji používané uspořádání v AAS patří planární DBD (Obr. 2.4.). Atomizátor má tvar písmene T. Horizontálně umístěné optické rameno má tvar kvádru. Jeho plášť se skládá ze dvou mikroskopických sklíček z křemenného skla, tvořících protilehlé stěny. Tato sklíčka fungují jako dielektrické bariéry, na které jsou z venku pevně připevněné dvě ploché kovové elektrody. Zbylé dvě stěny jsou tvořeny úzkými hranoly z křemenného skla. Křemenné stěny jsou stavené dohromady a mezi nimi vzniká prostor, ve kterém hoří plazma a do kterého je přívodním ramenem realizovaným úzkou trubičkou z křemenného skla přitavenou do středu optického ramene zaváděna plynná fáze z generátoru. Tvar a konstrukce elektrod se může lišit mezi různými typy planárních DBD. Planární DBD je vhodné pro spojení s AAS detekcí, jelikož elektrody jsou uspořádané paralelně se zdrojem záření a poskytují dostatečně dlouhou optickou dráhu. [37,38]

Mezi výhody DBD atomizátoru patří schopnost práce za laboratorní teploty bez externího vyhřívání, snadná miniaturizovatelnost, nízký výkon plazmatu (jednotky až

desítky W) a nízké provozní náklady. V porovnání s QTA je DBD atomizátor méně náchylný na atomizační interference, je ale citlivý na přítomnost aerosolu v plynné fázi vznikajícího při HG. K odstranění aerosolu dochází pomocí sušidla umístěného mezi GLS a atomizátor. Pro DBD atomizátor v uspořádání HG-AAS byla prokázána vysoká účinnost atomizace a dobrá citlivost pro hydridy As, Sb, Se a Te. [17,37,39]

2.5. Speciační analýza arsenu

Specie je chemická forma daného prvku, která je definovaná svou molekulovou strukturou nebo oxidačním číslem. Specie je pojem, kterým se rozumí distribuce definovaných specií prvku v rámci systému. Stanovení celkového obsahu prvku neposkytuje informace o jednotlivých speciích analytu. Specie daného prvku se od sebe liší toxicitou, biodostupností a dopadem na ekologické a biologické systémy. Speciační analýza je přístupem k porozumění chemickým a biologickým procesům, do kterých se jednotlivé specie zapojují. Důležitou součástí speciační analýzy je separace jednotlivých specií před jejich detekcí metodami atomové spektrometrie (viz kapitola 2.3.). [40]

K separaci specií dochází již před jejich vstupem do atomizátoru/iontového zdroje, jelikož při atomizaci dochází ke štěpení chemických vazeb a ztrátě informace o molekulové struktuře dané specie. Způsoby separace specií As rozdělujeme dle toho, kde a v jaké fázi k separaci dochází. Pokud dochází k separaci v kapalně fázi před HG, využíváme vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii (HPLC) nejčastěji s iontově výměnnou kolonou (viz kapitola 2.5.1.). [17]

Nachází-li se analyty po HG v plynné fázi, separace specií lze docílit pomocí plynové chromatografie (GC), obvykle metodou kryogenní separace, což je nejběžnější přístup využívaný při generování alkyl substituovaných hydridů (viz kapitola 2.2.3.). Posledním způsobem je separace specií přímo pomocí HG díky možnosti selektivního generování těkavých sloučenin (více v kapitole 2.2.3.). [17]

2.5.1. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Množství sloučenin stopových prvků je netěkavých a nelze je přeměnit derivatizací na těkavé sloučeniny bez přeměny z jejich původní chemické podoby. Běžně používanou metodou k separaci takových sloučenin za laboratorní teploty je HPLC. Jedná se o kapalinovou chromatografii (LC), jejíž efektivita je zvýšena použitím menších částic

stacionární fáze, které je spojeno s použitím vysokých tlaků (až 600 atm) nutných k překonání průtokového odporu. K separaci specií analytu v LC dochází na základě interakce stacionární fáze s molekulami analytu. Moderní techniky LC používané pro speciální analýzu jsou poměrně všestranné vzhledem k množství komerčně dostupných stacionárních a mobilních fází. Jedním z typů LC je iontově výměnná chromatografie, která se používá k separaci iontových i neiontových sloučenin, komplexů a neutrálních molekul. Stacionární fáze může v tomto případě obsahovat silné i slabé, kationtové i aniontové výměnné skupiny vázané na nosiči, kterým je nejčastěji silikagel. Mobilní fáze je většinou vodná, s možností přidání malého množství organického rozpouštědla pro zvýšení rozpustnosti analytu. Separace je kontrolována pomocí pH a iontové síly eluentu, který soutěží s molekulami analytu o místo na iontově výměnných skupinách stacionární fáze. [41]

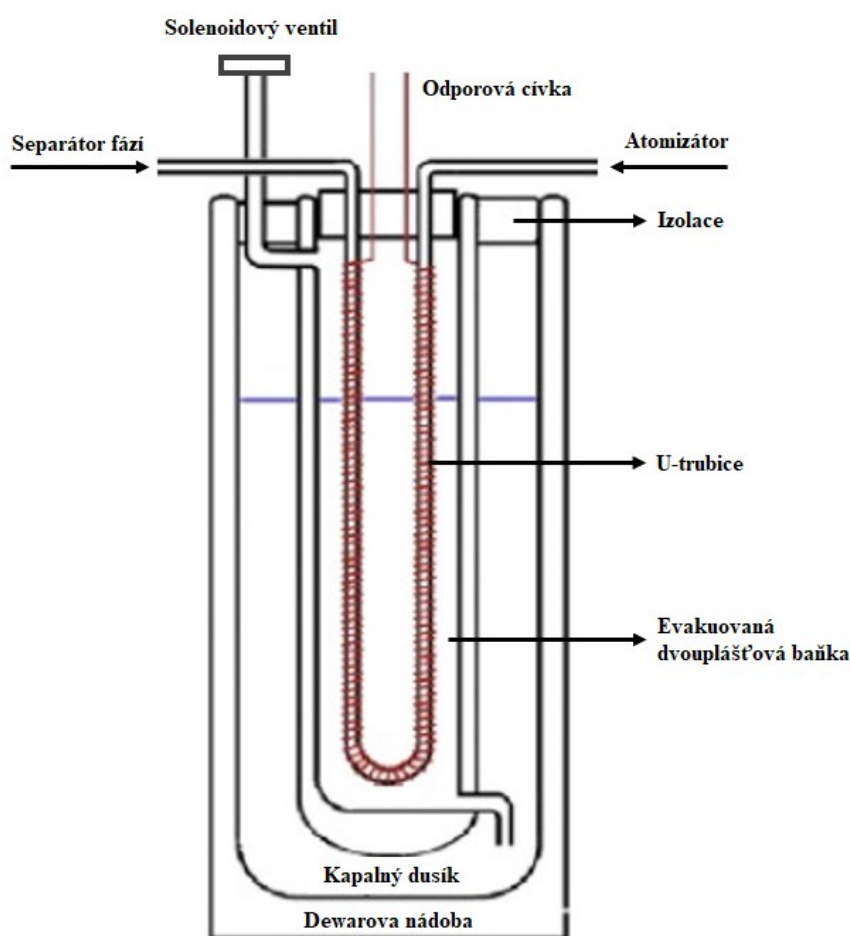
V případě, že jsou separované specie převeditelné na těkavou sloučeninu, lze na výstupu z HPLC zařadit on-line VSG krok a snížit tak detekční limity použitého spektrometrického detektoru. Tento přístup označujeme jako postkolonové generování těkavých sloučenin. Je třeba zdůraznit, že použitý VSG krok zde nemá žádný vliv na separaci specií. S jeho použitím je však dosaženo vyšší citlivosti stanovení díky efektivnějšímu zavedení specií analytu do detektoru. V porovnání se zmlžováním mobilní fáze, jehož účinnost je zpravidla mezi 5-10 %, lze citlivost při použití postkolonového VSG zvýšit 10-20x, pokud se účinnost konverze specií analytu do plynné fáze blíží 100%. Takovéto účinnosti je při postkolonovém generování hydridů běžně dosahováno. [42]

2.5.2. Separace v kryogenní pasti

Separace v CT se ve speciální analýze využívá při stanovení specií kovu lišících se stupněm alkylace (často methylace) a ve spojení s VSG, resp. HG, krokem. Je využívána při generování alkyl substituovaných hydridů, kdy je v HG kroku za optimálních podmínek kvantitativně vygenerována směs těkavých specií analytu. Ta je následně prekoncentrována a separována v kryogenní pasti. K separaci v CT dochází díky chromatografickým vlastnostem pasti a na základě rozdílných bodů varu substituovaných hydridů analytu zachycených uvnitř pasti při nízké teplotě.

Past se skládá z trubice tvaru U (Obr. 2.5.), která je před analýzou ponořena do Dewarovy nádoby naplněné kapalným dusíkem o teplotě -196°C . Nejčastěji používanými materiály pro konstrukci CT jsou křemenné nebo borosilikátové sklo, jelikož jsou schopné

vydržet velmi rychlé změny teplot (-196 °C až +280 °C), ke kterým během cyklického chlazení a ohřívání pasti dochází. Samotná trubice je pak naplněna silanizovaným chromatografickým materiálem, například křemennou vatou a funguje jako jednoduchá chromatografická kolona. U většiny kryogenních systémů je nežádoucí přítomnost vodní páry, která by mohla zamrznout uvnitř trubice a zablokovat jí. Řešením je přidáním různých typů sušidel před vstupem do CT. Nízká teplota v pasti je dostatečná pro kondenzaci hydridů zaváděných do trubice z generátoru. Trubice je omotána cívkou, která je odporově vyhřívána dle zvoleného teplotního programu a těkavé sloučeniny analytu jsou z pasti postupně uvolňovány na základě stoupající teploty varu (Tab. 2.1.) a v plynné fázi pokračují do detektoru. Nosným plynem v případě použití CT je He, jelikož Ar, který se jinak častěji používá v technice HG, by při teplotě kapalného dusíku v CT zkapalněl. Mezi typické aplikace pro CT patří separace hydridu analytu a jeho methyl-substituovaných derivátů. Kryogenní záchyt řadíme zároveň mezi prekoncentrační techniky (viz kapitola 2.6.2.) [43–45]



Obr 2.5.: Schéma semi-automatické kryogenní pasti [24]

Hlavní výhodou systému HG-CT v porovnání s široce rozšířenou separační metodou HPLC je možnost separace specií analytu bez nutnosti předúpravy vzorku. Tento fakt je velmi důležitý například pro biologické vzorky se složitými maticemi. Nevýhodou HG-CT, která zamezila komerčnímu rozšíření této metody, je náročná obsluha pastí spojená s nutností chlazení pastí kapalným dusíkem. [24,46]

Tab. 2.1.: Teploty varu vybraných hydridů As

Specie As	Teplota varu (°C)
AsH ₃	-55
CH ₃ AsH ₂	2
(CH ₃) ₂ AsH	36
(CH ₃) ₃ As	70

2.6. Prekoncentrační techniky pro analýzu hydridotvorných prvků

Ve stopové analýze prvků je v řadě případů koncentrace analytu ve vzorku velmi nízká, nebo se ještě snižuje během předúpravy vzorku k analýze, jakým je například ředění z důvodu snížení vlivu matrice a sním spojené riziko vzniku interferencí. Zařazením prekoncentračního kroku do procesu analýzy dochází k výraznému zlepšení detekčních limitů techniky HG-AAS, která v tomto uspořádání může být alternativou pro techniku ICP-MS, která bývá pro stopovou analýzu prvků často využívána. Vhodná prekoncentrační procedura by s ohledem na zamezení kontaminace vzorku měla obsahovat co nejmenší počet kroků a použitých činidel. Záchyt analytu by měl být co nejbližší k 100 % a taková technika by měla být dostatečně robustní i pro komplikovanější matrice vzorků. Hydrid přicházející z generátoru, může být prekoncentrován ve zvláštním prekoncentračním zařízení, kdy hovoříme o prekoncentraci tlakové, v absorpčním mediu nebo kryogenní (kapitola 2.5.2.). Druhým typem je prekoncentrace přímo v atomizátoru, v tomto případě hovoříme o *in-situ* prekoncentraci. Tlaková prekoncentrace využívá zachytávání hydridu spolu s generovaným vodíkem do balónu, nebo jiné hermeticky uzavřené nádoby. Následně je najímaný hydrid ve vhodnou dobu uvolněn do atomizátoru. Při prekoncentraci v absorpčním mediu využíváme vhodné absorpční kolony nebo kapaliny, ve kterých dochází k zakoncentrování analytu. Prekoncentrace tlaková a v absorpčním mediu vzhledem k rozvoji dalších technik nejsou v současnosti příliš používány. Prekoncentrační technikou ve zvláštním zařízení, která

nachází širší uplatnění zejména ve speciální analýze je kryogenní záchyt (více kapitoly 2.5.2 a 2.6.2.). Prekoncentrace přímo v atomizátoru je instrumentálně méně náročným řešením. Mezi atomizátory používané pro prekoncentraci řadíme grafitový atomizátor, MMQTA a DBD atomizátor. V případě MMQTA nedochází k záchytu hydridu přímo v prostoru, kde dochází k atomizaci, tj. v optickém rameni atomizátoru, ale v přívodním rameni. Důvodem je odlišnost optimální teploty záchytu a uvolnění analytu od teploty atomizační. [30,43,47]

2.6.1. Prekoncentrace v kryogenní pasti

Kromě separace specií analytu (viz kapitola 2.5.2.), dochází současně v CT i k jejich prekoncentraci. Díky prekoncentraci v CT získáváme užší píky a lepší poměr signál/šum v porovnání s on-line měřením. Nedávná automatizace procesu prekoncentrace v CT dále rozvíjí možnosti aplikací této techniky. [24,47]

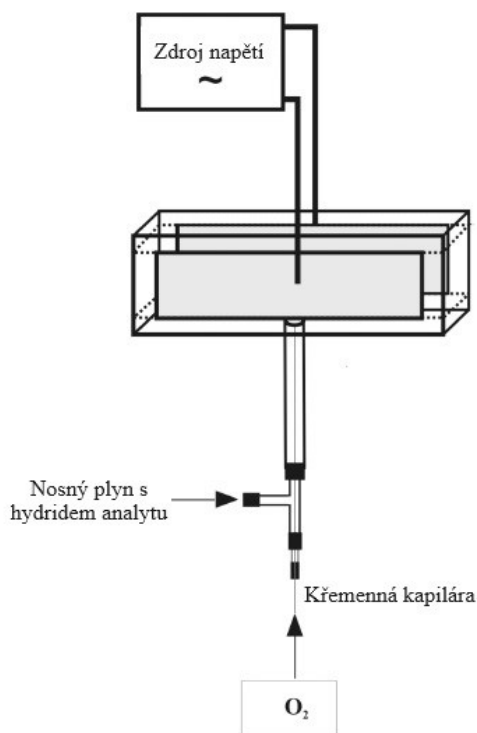
2.6.2. Prekoncentrace v grafitovém atomizátoru

Atomizátorem, který je velmi oblíbený pro *in-situ* prekoncentraci těžkavých sloučenin je grafitový atomizátor (GF). K zachytávání dochází v grafitové kyvetě, jejíž povrch je modifikován různými kovy (Ir, Pt a Rh), obdobně jako při konvenčním využití GF pro dávkování kapalných vzorků. Modifikaci povrchu dělíme na permanentní (Ir) nebo jednorázovou (Pt). Na nemodifikovaném povrchu k záchytu hydridů totiž téměř nedochází. Při *in-situ* prekoncentraci je hydrid zaváděn do prostoru GF, vyhřívaného na 200-600 °C, v závislosti na stanovovaném prvku. Po skončení generování se atomizátor se zachyceným hydridem zahřeje na teplotu 2500 °C a dochází k uvolnění a atomizaci analytu. Pro běžně stanovované hydridotvorné prvky se prekoncentrační účinnost při *in-situ* prekoncentraci v GF blíží 100 % a nejlepší publikované detekční limity se pohybují v řádech $\text{ng}\cdot\text{dm}^{-3}$. Metodu lze plně automatizovat připojením automatického dávkovače, do kterého je křemennou kapilárou zaváděn plynný vzorek obsahující hydridy analytu z generátoru. [47,48]

2.6.3. Prekoncentrace v DBD

Na rozdíl od GF, prekoncentrace a uvolnění hydridů analytu v DBD atomizátoru není řízena změnou teploty v atomizátoru, ale změnou složení plynné fáze. Vliv na záchyt analytu na vnitřním povrchu optického ramene DBD atomizátoru, v rameni ležícím přímo v optické ose spektrometru má přídavek kyslíku do nosného plynu (nejčastěji Ar, He). Po přídavku kyslíku (obvykle průtok v jednotkách $\text{cm}^3\cdot\text{min}^{-1}$) do směsi nosného plynu dochází

k účinnému záchytu analytu, který je následně po vypnutí přívodu kyslíku rychle uvolněn, atomizován a detekován, nejčastěji pomocí AAS nebo AFS. Kyslík může být přimíchán do nosného/plazmového plynu, nebo může být do optického ramene atomizátoru přiváděn pomocí tenké křemenné kapiláry (o průměru přibližně 0,53 mm) ústící do T-spojení přívodního a optického ramene (Obr. 2.6.). V literatuře byla doposud popsána prekoncentrace v DBD s účinností 100 % pro hydridy anorganického As a Sb [49,50]. Nižší účinnost, a to okolo 60-70 % byla pak popsána pro hydridy Se a Bi [51]. Mezi výhody prekoncentrace v DBD patří možnost miniaturizace, nižší průtok kyslíku nutný pro záchyt analytu než v křemenných atomizátorech nebo snadný a rychlý záchyt/uvolnění analytu, řízený pouze přepínáním přívodu plynu, místo časově náročných teplotních programů jako v případech GF a v křemenných atomizátorech. Prekoncentrace v DBD atomizátoru v systému HG-AFS byla již dříve použita například pro stopové stanovení iAs v rýži. Možnosti aplikace této metody pro speciální analýzy v kombinaci s HPLC, nebo automatizace tohoto procesu zatím nebyla ověřena a zůstává předmětem diskuse. [17,49,52]



Obr. 2.6.: Uspořádání DBD atomizátoru pro prekoncentraci analytu [49]

2.6.4. Další způsoby prekoncentrace

Využití křemenného skla pro prekoncentraci analytu bylo studováno již v 80. letech minulého století pro kapalné vzorky s detekcí pomocí plamenové atomové absorpční spektrometrie. Tento postup lze využít i pro plynné hydridy vygenerované během HG kroku, nicméně při použití křemenného skla nebo křemenné trubice účinnost prekoncentrace dosahuje pro nejběžnější hydridotvorné prvky maximálně 70 %. Prekoncentraci hydridů na křemenném povrchu je proto lepší realizovat s využitím křemenných atomizátorů. Nejčastěji se prekoncentrace hydridu analytu provádí v nezávisle vyhřívaném přívodním rameni QTA či MMQTA. K záchytu dochází po zapnutí přívodu kyslíku, jehož musí být stechiometrický nadbytek vůči vznikajícímu vodíku a vyhřátí přívodního ramene atomizátoru na optimální teplotu záchytu (100-800 °C v závislosti na stanovovaném prvku). Hydridy analytu jsou v takových podmínkách přeměněny na oxidy a zachytávají se na vnitřním křemenném povrchu atomizátoru. Pro uvolnění analytu z křemenného povrchu je nutné ohřát přívodní rameno na vyšší teplotu (600-900 °C v závislosti na analytu) a vypnout přívod kyslíku do atomizátoru. Analyt je následně uvolněn do optického ramene atomizátoru, kde dochází k jeho atomizaci. Pro většinu hydridotvorných prvků lze v křemenných atomizátorech za optimálních podmínek dosáhnout 100 % prekoncentrace. Výjimkou je As a Se, jejichž prekoncentrační účinnost dosahuje pouze 50, resp. 70 %. To je dáno nižší optimální teplotou přívodního ramene při záchytu, kdy dochází k ztrátám vlivem těkavosti těchto analytů. Další komplikací při stanovení As a Se jsou spektrální interference způsobené nespecifickou absorpcí molekulárního kyslíku na vlnové délce, na jaké dochází k detekci těchto analytů. Pro řadu analytů, včetně As, je tento přístup k prekoncentraci komplikovaný a pracný, jelikož procesy záchytu a uvolnění analytu jsou řízeny teplotou a složením plynné fáze. Pouze v případě některých analytů, např. Sb a Bi, se intervaly optimální teploty záchytu a uvolnění překrývají a jsou navíc blízké atomizační teplotě. V takovém případě je proces záchytu a uvolnění řízen jen složením plynné fáze, nikoli teplotou povrchu. Aparaturu i prekoncentrační postup lze pak výrazně zjednodušit. Prekoncentrace se provádí místo v přívodním rameni přímo v optickém rameni atomizátoru, jehož teplota je po celou dobu konstantní (870 °C). [47,53,54]

Další možností je prekoncentrace hydridů na kovových materiálech (plíšky a spirálky z W, Au a Mo). Kovové materiály mohou být vkládány také do nezávisle vyhřívaného přívodního ramene QTA či MMQTA za účelem modifikace prekoncentračního povrchu a

zvýšení prekoncentrační účinnosti. Modifikaci lze provádět i kapalnými činidly. Příkladem může být úspěšná 100 % prekoncentrace hydridu Se na zlatém drátku nebo použití zlatých nanočástic k modifikaci povrchu modulárního (oddělitelného) pasti přívodního ramene napojeného na optické rameno MMQTA. Prekoncentrační účinnost hydridu As na křemenném povrchu modifikovaném zlatými nanočásticemi se pro hydrid As blížila 90 %.

[47,55]

3. Experimentální část

3.1. Seznam použitých chemikálií

Deionizovaná voda o vodivosti $\leq 0,1 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ připravená zařízením Ultrapur (Watrex, USA)

Tetrahydroboritan sodný tablety, 98 %, šarže STBK0014, (Sigma-Aldrich, Německo)

Trizma® hydrochlorid (TRIS HCl), $\geq 99,0$ %, šarže SLCP0122 (Sigma-Aldrich, Německo)

Kyselina chlorovodíková ≥ 37 %, semiconductor grade, šarže K3280 (Honeywell, USA)

Kyselina dusičná 65 %, čistá (Lach-Ner, Česká republika)

Hydroxid draselný G.R. vločky, p.a., šarže PP/2020/0050 (Lach-Ner, Česká republika)

Hydroxid sodný perle, chemicky čistý, šarže PP/2020/10236 (Lach-Ner, Česká republika)

Hydroxid sodný pecky, p.a., šarže 2711221122 (Penta, Slovensko)

Peroxid vodíku 30 %, p.a., šarže 13160305 (Analytika, Česká republika)

Uhličitan amonný, p.a., šarže 40544 (Lachema, Česká republika)

Amoniak 25 % pro analýzu, šarže K52658032 031 (Merck, Německo)

L-cystein hydrochlorid monohydrát pro biochemii, šarže K55138438 348 (Millipore, USA)

Kapalný dusík, technický (SIAD, Česká republika)

Argon Ar, čistota 99,996 % (SIAD, Česká republika)

Vodík H₂, čistota 99,95 % (SIAD, Česká republika)

Helium He, čistota 99,998 % (SIAD, Česká republika)

Kyslík O₂, čistota 99,998 % (SIAD, Česká republika)

Zásobní standard $i\text{As}^{\text{III}}$ připravený z pevného As₂O₃ (Fluka, Německo). Navážené množství bylo rozpuštěno v 2,5 ml 10% NaOH a poté doplněno převařenou a odplyněnou deionizovanou vodou.

Zásobní standard $i\text{As}^{\text{V}}$, připravený z pevného As₂O₅ (Merck, Německo) rozpuštěného v 0,5 mol·dm⁻³ HNO₃

Zásobní standard MMA, rozpuštění 0,0974 g hexahydrátu methylarseničnanu sodného (Na₂CH₃AsO₃·6H₂O, Mr = 292), šarže 410-37B (Chem. Service, USA) v deionizované vodě

Zásobní roztok DMA , rozpuštění 0,0461 g dimethylarseničné kyseliny ($C_2H_7AsO_2$; $M_r = 138$) (Strem. Chemicals, USA) v deionizované vodě

Zásobní roztok TMA_sO , rozpuštění oxidu trimethylarseničného ($(CH_3)_3AsO$) (University of British Columbia, Kanada) v deionizované vodě

Standardní referenční materiál NIST 2669 specie arsenu v zmražené lidské moči (Level I a Level II), šarže H-479 (NIST, USA)

Certifikovaný referenční materiál DOLT-5 rybí játra, šarže 00048662 (NRC, Kanada)

Certifikovaný referenční materiál TORT-3 humří hepatopankreas, šarže 00048662 (NRC, Kanada)

Certifikovaný referenční materiál NASS-7 mořská voda, šarže 1130185 (NRC, Kanada)

Certifikovaný referenční materiál SLRS-6 říční voda, šarže 00055275 (NRC, Kanada)

3.2. Použité přístroje a pomůcky

Atomový absorpční spektrometr Shimadzu AA-7000 (Shimadzu Corporation, Japonsko), s výbojkou s dutou katodou pro As (Photron, Japonsko). Vlnová délka analytické čáry arsenu 193,7 nm. Nastavení pro měření s MMQTA a DBD atomizátorem s technikou generování hydridů: Šířka štěrby 0,7 nm, deuteriová korekce pozadí. Software pro vyhodnocování dat WizAArd (verze 5.02., Shimadzu Corporation, Japonsko) a LabSolutions (verze 5.63 SP1, Shimadzu Corporation, Japonsko).

Analytické váhy (Sartorius, Česká republika)

Laboratorní váhy Kern EW (Kern & Sohn, Německo)

Peristaltická pumpa Ismatec Reglo ICC (Ismatec, Švýcarsko)

Atomový absorpční spektrometr AAnalyst 800 (Perkin Elmer, USA) s bezelektrodovou výbojkou (Perkin Elmer, USA) a automatickým dávkovačem AS 800 (Perkin Elmer, USA). Vlnová délka analytické čáry arsenu 193,7 nm. Nastavení pro stanovení arsenu metodou přímého dávkování kapalného vzorku do grafitové kyvety: Šířka spektrálního intervalu 0,7 nm; Zeemanovská korekce pozadí. (Tento přístroj byl použitý pouze pro ověření koncentrace v zásobních standardech specií As (Kap. 3.3.1.))

Systém HPLC 1260 Infinity II (Agilent technologies, USA) pro gradientovou eluci s kolonou PRP-X100 pro aniontově výměnnou chromatografii (Hamilton, USA)

pH metr Seven easy pH s elektrodou InLab®413 (Mettler Toledo, Švýcarsko)

Suchý blok s ohřevem Grant typ QBD2 (P-LAB, Česká republika)

Programovatelný systém peristaltických pump pro dávkování do proudu FIAS-400 (PerkinElmer, USA) řízený počítačem

Odporová píčka pro ohřev MMQTA (Perkin Elmer, USA)

Regulátor teploty odporové píčky (MSVT-1, Ústav analytické chemie AV ČR)

Termočláňkový senzor typu K (Omega engineering, USA)

Kontrolní jednotka GCbox02 vlastní konstrukce pro automatizaci prekoncentračních měření s DBD atomizátorem

Laboratorní spínaný zdroj stejnosměrného proudu model EA-PS 3065-10 B (Elektro-Automatik GmbH, Německo)

Generátor frekvence (Lifetech, Česká republika)

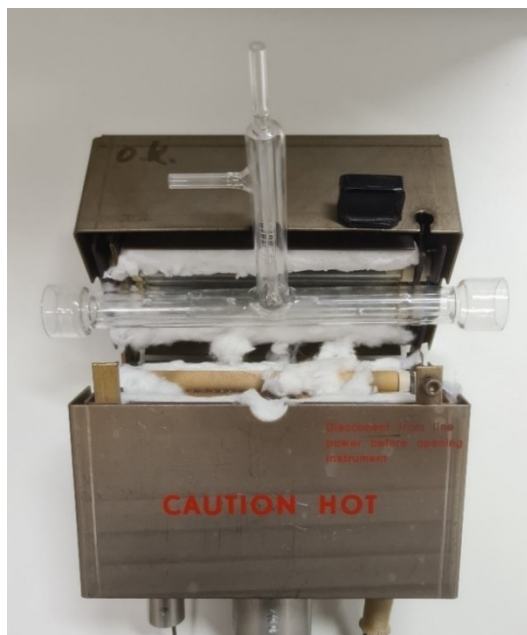
Vysokonapěťový transformátor (Lifetech, Česká republika)

Regulátory hmotnostního průtoku plynů (Omega, USA)

3.2.1. Atomizátory

Pro atomizaci těkavých specií As byl použit MMQTA s označením MH017 a DBD atomizátor s označením #8.

Optické rameno MMQTA použitého v této práci bylo tvořené dvěma koncentrickými trubicemi, tedy jednou vnitřní a jednou vnější trubicí (Obr. 3.1.). Vnitřní průměr vnitřní trubice MMQTA byl 6 mm a tato trubice byla pravidelně děrovaná 14 otvory po celé své délce. Vnitřní průměr vnější trubice činil 14 mm a tato trubice byla celistvá a bez děr. Celková délka přívodního ramena byla 100 mm a toto rameno bylo také tvořeno dvěma koncentrickými trubicemi, z nichž ale ani jedna nebyla děrovaná. Vnitřní trubice přívodního ramene měla vnitřní průměr 2 mm a sloužila k přívodu plynné fáze z GLS. Vnější trubice přívodního ramene sloužila k přívodu vzduchu do optického ramene atomizátoru. Konstrukce atomizátoru byla dříve detailně popsána v literatuře. [35,56]



Obr. 3.1.: MMQTA v odporově vyhřívané píce

Planární DBD atomizátor (Obr. 3.2.), který byl použitý v této práci se konstrukčně liší od jiných typů DBD tím, že využívá dvě páskové měděné elektrody (délka 50 mm, šířka 5 mm a tloušťka 0,15mm) přilepené ve střední části křemenného těla optického ramene atomizátoru. Povrch elektrod byl zvenku pokrytý izolační vrstvou z epoxidové pryskyřice pro zabránění vzniku nežádoucího parazitního výboje mezi stranami/hranami elektrod. Křemenné tělo atomizátoru (délka 73 mm, výška 15 mm a šířka 6 mm. Plazmový kanál uvnitř těla atomizátoru měl pak šířku 3 mm a výšku 7 mm) bylo umístěné do držáku z polyvinylchloridu, který udržoval atomizátor ve stálé poloze, chránil ho před poškozením a usnadnil umístění atomizátoru do optické osy spektrometru. Na spodní části tohoto držáku byl umístěn malý ventilátor, který chladil DBD atomizátor během měření proudem vzduchu. Konstrukce tohoto DBD atomizátoru byla dříve popsána v literatuře. [38]

Na externí vyhřívání MMQTA byla použita odporová pívka s regulátorem teploty a termočlánkovým senzorem typu K. Před měřením byl MMQTA zahřátý na teplotu 900 °C. Jako zdroj napětí pro DBD atomizátor byl použitý vysokonapěťový zdroj se sinusovou modulací střídavého vysokého napětí skládající se z laboratorního spínaného zdroje, frekvenčního generátoru (28 kHz) a vysokonapěťového transformátoru. Pracovní výkon DBD atomizátoru během měření byl 15 W, což odpovídalo nastavenému napětí o velikosti 25 V a proudu 0,7 A vkládaných z laboratorního proudového zdroje do frekvenčního generátoru.



Obr. 3.2.: DBD atomizátor s lepenými elektrodami v držáku z polyvinylchloridu

3.2.2. Kryogenní past

Pro měření v instrumentálním uspořádání HG-CT-AAS byla použita laboratorně zkonstruovaná kryogenní past. Skleněná U-trubice použitá při konstrukci této pasti měla délku 600 mm, její vnější průměr byl 4 mm a vnitřní 2 mm. Vnitřek trubice byl volně naplněn chromatografickým materiálem Chromosorb WAW-DCMS 45/60 (15 % OV-3). Po naplnění byla trubice ponechána zapojená v proudu helia po dobu několika hodin. Trubice byla následně omotána 80 % Ni/20 % Cr drátkem o průměru 0,51 mm (Omega engineering, USA) a celkovém odporu 15 Ω . Takto obmotaná U-trubice byla vložena do evakuované dvouplášťové skleněné baňky (viz obrázek 2.5.). Baňka měla zespodu vstupní otvor a nvrchu výstupní otvor. Oba konce U-trubice byly přilepeny na korkové víko a skleněná baňka byla vzduchotěsně uzavřena. K výstupnímu otvoru byl připojen solenoidový ventil, který byl připojen k systému FIAS-400 a sloužil k vypouštění plynného N_2 vzniklého při ohřevu pasti. Takto připravená baňka s U-trubicí byla ponořena do Dewarovy nádoby o objemu 4,3 litru, která byla naplněna kapalným dusíkem a přikryta polyethylenovým víkem. Vždy po 10 cyklech byla past doplněna asi půllitrem kapalného dusíku. Hladina kapalného dusíku tak byla udržována přibližně ve 3/4 výšky U-trubice. [24]

K ovládání kryogenní pasti, dávkování vzorku a kontrole peristaltických pump byl použit systém FIAS-400, který disponuje dvěma vícekanálovými peristaltickými pumpami a kontrolní jednotkou, která umožňuje automatizaci procesu separace v CT díky možnosti nastavení teplotního programu pro zapínání a vypínání ohřevu pasti (Tab. 3.1.). Dávkování vzorku bylo prováděno manuálně do plastové špičky o objemu 0,5 ml.

Tab. 3.1.: Teplotní program kryogenní pasti

Krok	t (s)	HG	Ventil otevřen	Ohřev zapnut	Popis děje
1	60	ano	–	–	Záchyt hydridu v pasti
2	90	–	–	–	
3	23	–	ano	ano	Uvolnění hydridu z pasti
4	7	–	ano	–	
5	30	–	ano	ano	
6	120	–	–	–	Ochlazení pasti na teplotu záchytu

3.2.3. Kontrolní jednotka pro prekoncentraci v DBD

Kompaktní kontrolní jednotka vlastní konstrukce s pracovním názvem GCbox02 byla sestrojena na Oddělení stopové prvkové analýzy pro účely prekoncentračních měření v DBD atomizátoru (Obr. 3.3.). V instrumentálním uspořádání HPLC-HG-tDBD-AAS tato jednotka zajišťovala komunikaci mezi HPLC, stolním počítačem a automatickým třicestným ventilem, který sloužil k regulaci přívodu kyslíku do DBD atomizátoru. Signál vyslaný z HPLC byl zaznamenán jednotkou GCbox02 a spustil nastavený časový program pro otevírání a zavírání automatického ventilu. Zároveň s časovým programem byl automaticky spuštěn záznam měření v software LabSolutions na stolním počítači. Jednotka umožňovala takto nastavit až 10 časových intervalů pro chromatografické píky v rámci jednoho chromatogramu. Pilotní experimenty byly prováděny bez použití této kompaktní kontrolní jednotky a během těchto experimentů bylo dávkování kyslíku do aparatury ovládáno manuálně. Použití jednotky GCbox02 vedlo ke snížení pracovní náročnosti měření a lepší reprodukovatelnosti analýz.



Obr. 3.3.: Kontrolní jednotka GCbox02 pro prekoncentrační měření s DBD atomizátorem (01 – sériový konektor pro propojení jednotky s HPLC, 02 – kabel pro napájení jednotky ze sítě, 03 – USB konektor pro propojení jednotky se stolním počítačem, 04 – automatický třícestný ventil pro regulaci přívodu kyslíku)

3.3. Příprava standardů a referenčních materiálů

Ze zásobních roztoků jednotlivých specií As byly připraveny standardy o koncentraci $100 \mu\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$ a $10 \mu\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$, které byly skladovány v lednici při teplotě $4 \text{ }^\circ\text{C}$ (detailní popis a koncentrace standardů viz kapitola 3.1.). Před ředěním na požadované koncentrace byly zásobní standardy nejprve vytemperovány na laboratorní teplotu. Předredukce pětimocných specií As před generováním byla prováděna přidávkem roztoku L-cysteinu tak aby bylo dosaženo jeho 2% koncentrace v roztoku standardu. Takto připravený roztok byl ponechán stát po dobu 1 hodiny, pro úplné zredukování pětimocných specií As na trojmocné.

Certifikovaný referenční materiál NIST 2669 byl připraven k analýze dle instrukcí v příloženém certifikátu. Vialka obsahující lidskou moč byla rozmrazena a před otevřením několikrát otočena tam a zpátky, aby došlo k homogenizaci vzorku. Manipulace s vialkou byla prováděna v zapnuté digestoři s nasazenými rukavicemi s důrazem na bezpečnost při práci s potenciálně infekčním materiálem. Pro odstranění částic byla provedena filtrace přes $0,45 \mu\text{m}$ PTFE stříkačkový filtr. Certifikovaný referenční materiál NIST 2669 level 2 byl kvůli vysoké koncentraci DMA ředěn 2x deionizovanou vodou.

Certifikované referenční materiály NASS-7 a SLRS-6 obsahující mořskou, respektive říční vodu byly dle instrukcí v příloženém certifikátu skladovány v lednici a jejich příprava byla prováděna v zapnuté digestoři pro zamezení kontaminace.

Pro extrakci specií As z certifikovaných referenčních materiálů TORT-3 a DOLT-5 byla použita extrakční metoda dříve použitá v rámci mezilaboratorního porovnávání a publikovaná v literatuře [57]. Bylo naváženo přesně asi 0,25 g materiálu do centrifugačních zkumavek o objemu 50 ml a extrahováno v 20 ml 1% H₂O₂ ředěného ze zásobního roztoku deionizovanou vodou. Centrifugační zkumavky byly umístěny na 1 h do suchého bloku zahřátého na 95 °C. Po extrakci byly zkumavky ponechány stát přes noc pro usazení sedimentu. Následně byl opatrně odebírán supernatant, který byl filtrován přes 0,45 μm PTFE stříkačkový filtr přímo do HPLC mikrovialky.

3.3.1. Ověření koncentrace standardů metodou GF-AAS

K ověření koncentrace specií As v zásobních roztocích bylo využito atomového absorpčního spektrometru AAnalyst 800 v systému s grafitovou kyvetou a Zeemanovskou korekcí pozadí. Grafitová kyveta s platformou byla modifikována permanentním modifikátorem iridiem s nadávkováním 40 μl o koncentraci 1000 μg·dm⁻³ s 20 μl 0,2% HNO₃. Pro stanovení As specií bylo dávkováno 10 μl vzorku s 12 μl 0,2% HNO₃ na platformu grafitové kyvety pomocí automatického dávkovače. Koncentrace zásobního roztoku každé specie byla 100 μl·dm⁻³. Teplotní program kyvety je uveden v tab. 3.2.

Tab. 3.2.: Teplotní program grafitové kyvety

Krok	T (°C)	t _N (s)	t _H (s)	Průtok chladícího plynu (cm ³ ·min ⁻¹)	Popis děje
1	110	1	30	250	sušení
2	130	15	30	250	sušení
3	1200	10	20	250	pyrolýza
4	2000	0	5	0	atomizace
5	2200	1	3	250	čištění atomizátoru

t_N – délka trvání teplotního gradientu, t_H – délka kroku po dosažení dané teploty

3.3.2. Techniky generování hydridů

V instrumentálním uspořádání HG-AAS (Obr. 3.4.) a HG-CT-AAS (Obr 3.5.) byla využívána metoda předredukce pětimocných specií As v roztocích standardů jednotlivých specií pomocí 2% L-cysteinu. Hydridový generátor se skládal z peristaltických pump,

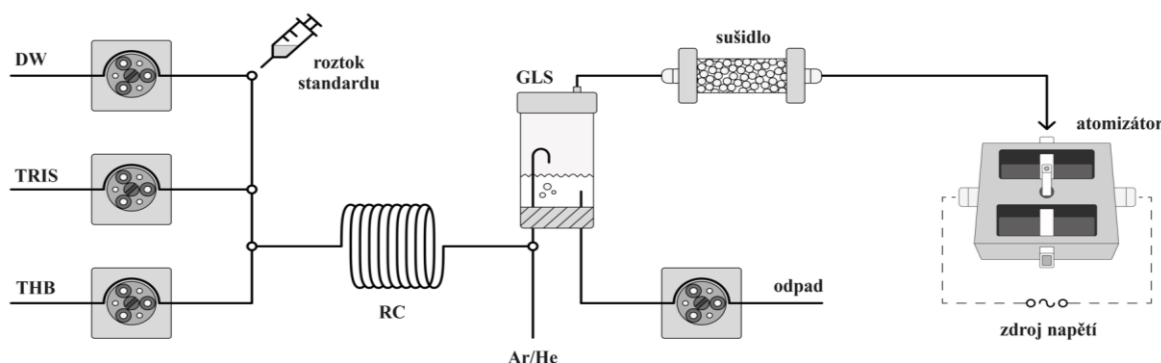
dávkovacího ventilu pro vzorek, reakční cívky a GLS. Nosné medium byla deionizovaná voda, do které bylo nejprve přivedeno reakční médium TRIS pufr o koncentraci $0,75 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ a následně redukční činidlo 1% roztok NaBH_4 . Do roztoku redukčního činidla byl pro stabilizaci TBH přidáván 0,1 %KOH. Peristaltické pumpy pro reakční roztoky a nosné médium byly zkalibrovány pomocí průtokoměru a nastaveny na průtok $1 \text{ cm}^3\cdot\text{min}^{-1}$. Roztok standardu nebo slepý pokus byl manuálně dávkován injekční stříkačkou do dávkovací cívky o objemu 0,5 ml a následně byl otočením dávkovacího ventilu dávkován přímo do generátoru. Všechny hadičky použité pro konstrukci generátoru byly z materiálu PTFE, čerpací hadičky peristaltických pump byly z materiálu Tygon. Reakční cívka použitá v tomto uspořádání měla délku 1 m a objem 0,8 ml. Směs kapalná a plynná fáze byla následně přivedena do GLS s nuceným odtahem, odkud oddělená plynná fáze pokračovala dále do sušidla a kapalná fáze byla odváděna do odpadu peristaltickou pumpou rychlostí $7 \text{ cm}^3\cdot\text{min}^{-1}$. Sušidlo sloužilo k minimalizaci vstupu vodních par do atomizátoru a bylo tvořené patronou z polypropylenu (délka 10 cm, vnitřní průměr 1,7 cm), která byla naplněná NaOH peckami.

V instrumentálním uspořádání HPLC-HG-tDBD-AAS (Obr. 3.6.) byla využívána metoda postkolonového generování hydridů. Díky změně v reakčních podmínkách a prodloužení reakční cívky dochází k redukci pětimocných specií As přímo v generátoru. Nosné medium byla mobilní fáze z HPLC ($(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ pufr o koncentraci $50 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$) o průtoku $1 \text{ cm}^3\cdot\text{min}^{-1}$, do které byla nejprve přivedena HCl o koncentraci $2 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ a následně 2,5% NaBH_4 . Do roztoku redukčního činidla byl pro stabilizaci TBH přidáván 0,1% KOH. Peristaltické pumpy pro reakční roztoky byly zkalibrovány pomocí průtokoměru a nastaveny na průtok $1 \text{ cm}^3\cdot\text{min}^{-1}$. Všechny hadičky generátoru byly z materiálu PTFE, čerpací hadičky peristaltických pump byly z materiálu Tygon. Reakční cívka měla délku 4,5 m a objem 8,9 ml. Dávkování roztoku standardu nebo slepého pokusu o objemu 0,1 ml bylo prováděno automatickým dávkovačem HPLC systému. Směs kapalná a plynná fáze přicházela do GLS jehož princip byl stejný jako v případě HG-AAS. Sušidlo bylo stejné konstrukce, patrona byla naplněna NaOH perlami.

3.4. Instrumentální uspořádání

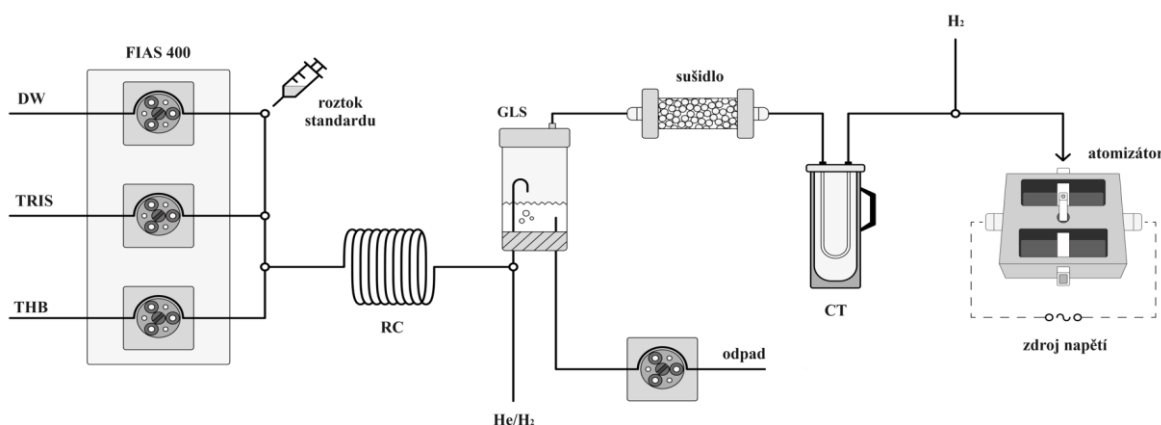
V průběhu měření experimentální části diplomové práce byla používána tři různá instrumentální uspořádání, která vždy vycházela ze základního uspořádání HG-DBD-AAS

(Obr. 3.4.). U dalších uspořádání bylo do aparatury připojeno zařízení pro separaci specií As, a to CT (Obr. 3.5.), nebo HPLC (Obr. 3.6.).



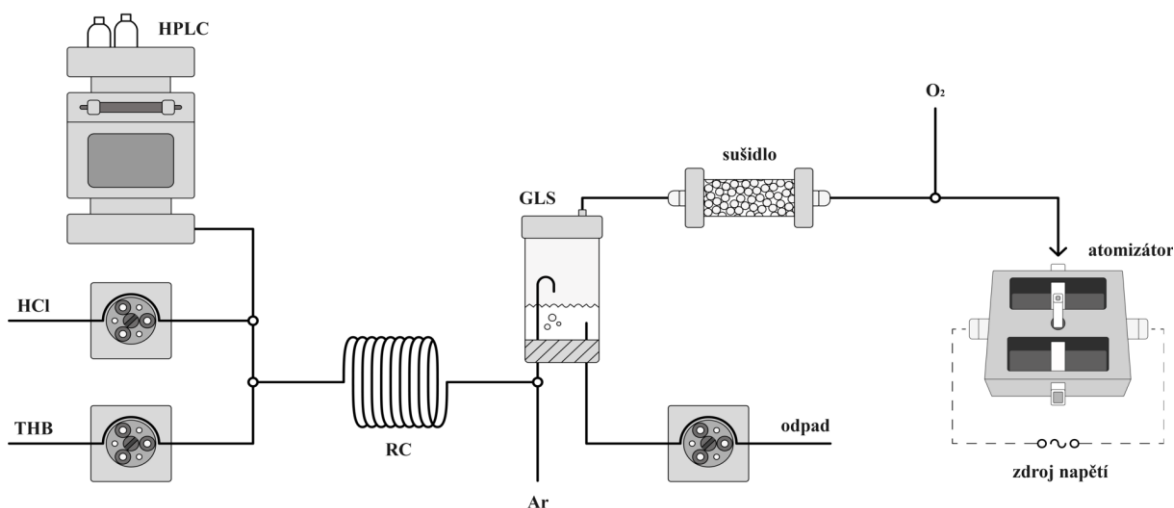
Obr. 3.4.: Instrumentální uspořádání HG-DBD-AAS (DW – deionizovaná voda, TRIS – TRIS pufr, THB – tetrahydridoboritan sodný, RC – reakční cívka, GLS – separátor fází)

V uspořádání HG-DBD-AAS byl používán jak MMQTA, tak DBD atomizátor.



Obr. 3.5.: Instrumentální uspořádání HG-CT-DBD-AAS (DW – deionizovaná voda, TRIS – TRIS pufr, THB – tetrahydridoboritan sodný, RC – reakční cívka, GLS – separátor fází, CT – kryogenní past)

V instrumentální uspořádání zobrazeném na Obr. 3.5. byly peristaltické pumpy a dávkování vzorku do toku deionizované vody ovládány systémem FIAS 400. Kryogenní past byla zapojena za sušidlo a za CT byl do nosného plynu přiváděn plynný vodík o průtoku $15 \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$ pro podpoření procesu atomizace. Používán byl v tomto uspořádání jak MMQTA, tak DBD atomizátor.



Obr. 3.6.: Instrumentální uspořádání HPLC-HG-tDBD-AAS (HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie, THB – tetrahydridboritan sodný, RC – reakční cívka, GLS – separátor fází)

V instrumentálním uspořádání zobrazeném na Obr. 3.6. byl místo kanálu pro nosné medium zapojen systém HPLC s automatickým dávkovačem a chromatografickou kolonou. Za sušidlem byl do nosného plynu přiváděn kyslík pro účely prekoncentrace v DBD atomizátoru. Pro srovnání byla prováděna i měření v režimu bez prekoncentrace, tj. v uspořádání HPLC-HG-DBD-AAS. V takovém případě nebyl kyslík do aparatury přidáván. Při tomto uspořádání byla také využívána metoda předoxidace vzorku pomocí 3% H_2O_2 před HPLC separací. Po přidávku H_2O_2 byl roztok ponechán stát přes noc. Tato úprava vzorku umožňovala převedení iAs^{III} na iAs^V , což umožňovalo stanovení TMA_sO , jehož eluční čas byl stejný jako pro iAs^{III} . Tedy bez předoxidace docházelo ke stanovení iAs^{III} a s předoxidací ke stanovení TMA_sO .

3.5. Zpracování naměřených dat

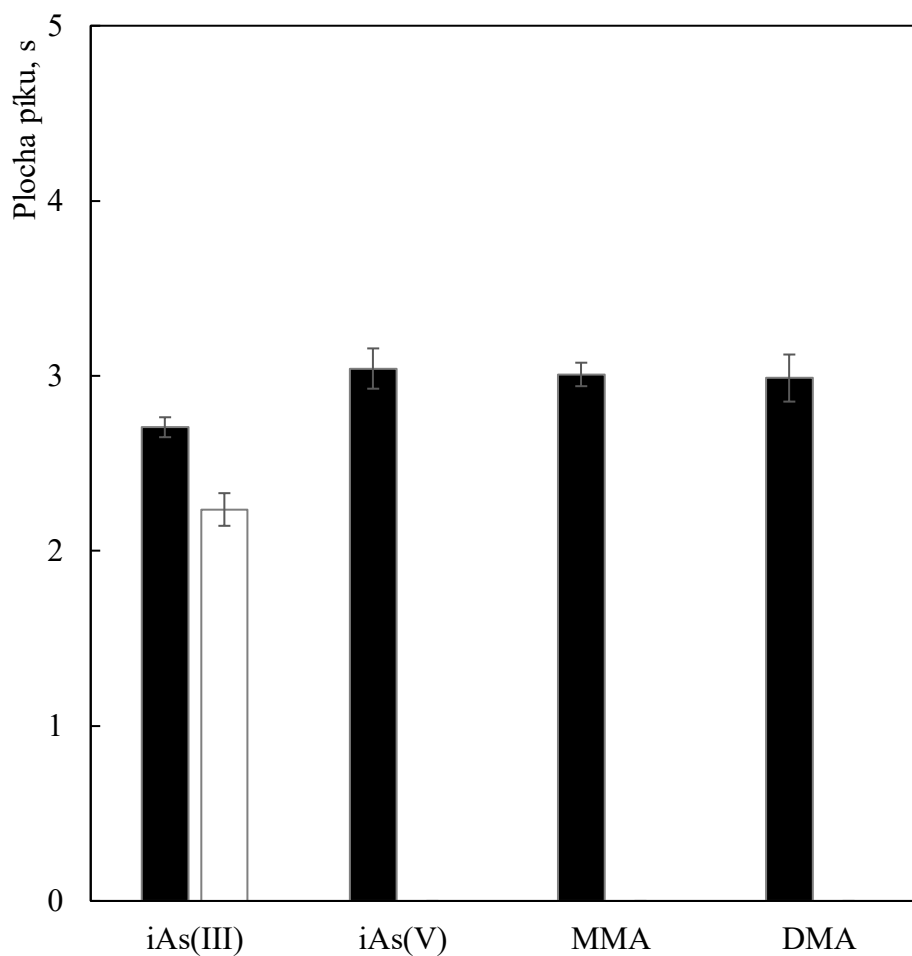
Data naměřená v programu WizAard byla vyhodnocována pomocí programu LabSolutions. Tento program s pomocí uživatelsky nastavené základní linie vypočítal plochu píku, která odpovídala množství přítomného analytu. Hodnoty byly exportovány a dále vyhodnocovány v programu Microsoft Excel 2019.

4. Výsledky a diskuse

4.1. Atomizace specií arsenu v MMQTA a DBD atomizátorech

Experimenty byly provedeny v experimentálním uspořádání HG-AAS (Obr. 3.4.). Měřeny byly vždy odděleně specie arsenu iAs^V , MMA a DMA. Podmínky atomizace v MMQTA a DBD atomizátorech, pokud nejsou optimalizovány v rámci této práce, byly převzaty z předchozích prací publikovaných pracovníky Oddělení stopové prvkové analýzy. Těkavé sloučeniny byly generovány z prostředí TRIS pufru za experimentálních podmínek uvedených v kapitole 3.3.1. Zásobní roztoky obsahující pětimocné specie byly předredukovány přidavkem 2% roztoku L-cysteinu po dobu jedné hodiny. Kvantitativnost takto provedené předredukce byla sledována v experimentu porovnávajícím velikost plochy píku pro jednotlivé specie v přítomnosti L-cysteinu a bez ní (Obr. 4.1.). Z naměřených dat při použití DBD atomizátoru je patrné, že jedinou specií, poskytující signál i bez předredukce L-cysteinem je iAs^{III} . Zároveň je důležité zmínit, že plocha píku iAs^{III} se vlivem předredukce L-cysteinem zvýšila asi o 20 %. To mohlo být způsobeno částečnou oxidací iAs^{III} v zásobním roztoku standardu.

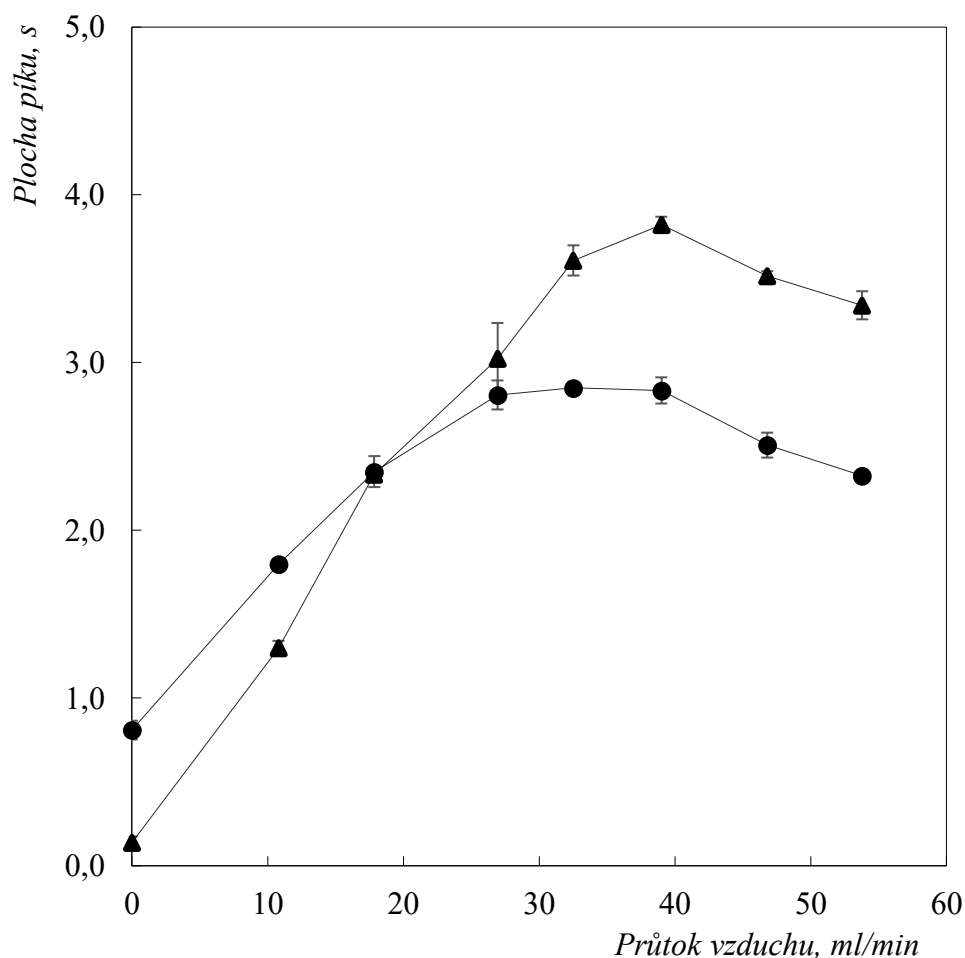
Koncentrace standardů byly pravidelně ověřovány metodou GF-AAS (kapitola 3.3.1). Odchylka od nominálních hodnot koncentrací byla 1-5 %. Při výpočtech citlivostí bylo pracováno s přesnými koncentracemi standardů stanovených metodou GF-AAS.



Obr. 4.1.: Porovnání plochy píku při stanovení specií As po předredukci L-cysteinem (■) a bez předredukce (□), koncentrace specií iAs^{III} , iAs^V , MMA a DMA ve standardech $10 \mu g \cdot dm^{-3}$, průtok argonu $72 \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$

4.1.1. MMQTA

S použitím iAs^V jako modelové specie byl nejprve zkoumán vliv průtoku vzduchu do MMQTA na signál s použitím dvou různých nosných plynů (Ar a He). Následně byla za optimálního průtoku vzduchu stanovena a porovnána citlivost stanovení jednotlivých specií As.

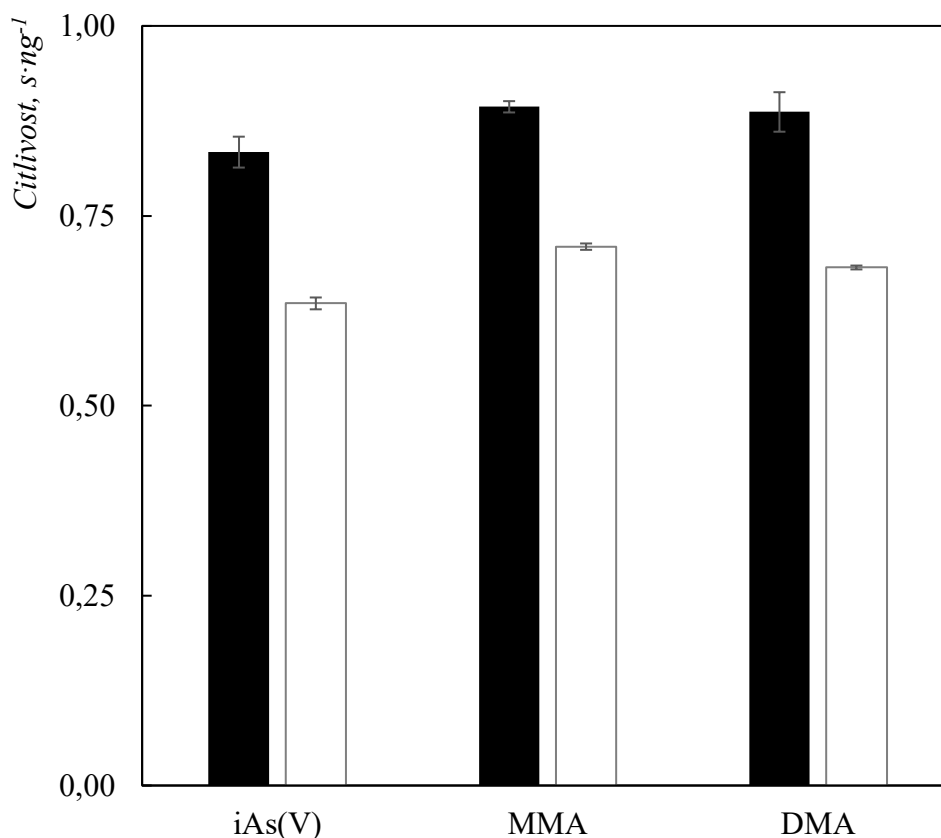


Obr. 4.2.: Závislost plochy píku na průtoku vzduchu pro nosné plyny argon (●) a helium (▲), koncentrace standardu iAs^V $10 \mu\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$

Byl optimalizován průtok vzduchu do MMQTA pro dva nosné plyny – argon a helium při jejich průtoku 72 ml min^{-1} . Průběh závislosti plochy píku na průtoku vzduchu je pro oba nosné plyny podobný, jak je patrné z Obr. 4.2. Optimální průtok vzduchu do MMQTA pro argon jako nosný plyn byl $33 \text{ cm}^3\cdot\text{min}^{-1}$ a pro helium $39 \text{ cm}^3\cdot\text{min}^{-1}$, kdy bylo dosaženo nejvyšší plochy signálu, a tedy i citlivosti. Při použití helia jako nosného plynu byla citlivost za optimálních podmínek asi 1,3x vyšší než při použití argonu. Toto pozorování může souviset s faktem, že hodnota atomového absorpčního koeficientu je závislá na prostředí, tj. povaze nosného inertního plynu a také na teplotě.

Průběh závislosti citlivosti stanovení iAs^V na průtoku vzduchu pro argon jako nosný plyn uvedený v grafu na Obr. 4.2. velmi dobře odpovídá závislostem pozorovaným pro arsen v MMQTA v dřívějších publikacích, kdy byl shodně pozorován nárůst signálu s přidávkou vzduchu, dosažení maxima signálu a následně při vyšších průtocích vzduchu docházelo k

poklesu analytického signálu. Uvedený průběh závislosti jasně dokazuje pozitivní vliv přídavku vzduchu na signál As a citlivost stanovení As a ilustruje užitečnost použití MMQTA pro stanovení tohoto prvku metodou HG-AAS v porovnání s QTA. Optimální průtok vzduchu se v publikacích mírně liší, pohybuje se zpravidla mezi 20 a 30 $\text{cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$ [55,58]. Rozdílnosti v optimální pozorované hodnotě průtoku vzduchu jsou dány drobnými odlišnostmi v konstrukci jednotlivých kusů MMQTA, zejména uniformitě průměru otvorů ve vnitřní trubici optického ramene, které jsou dělány ručně sklářem.



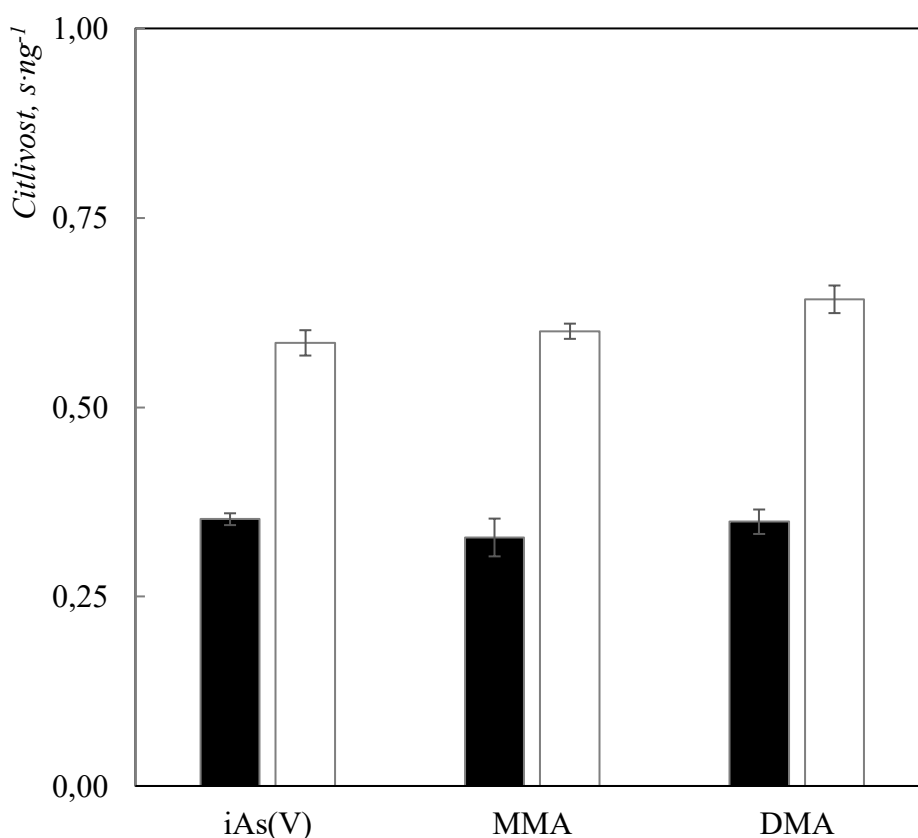
Obr. 4.3.: Porovnání citlivosti stanovení specií As v MMQTA pro nosné plyny helium (■) a argon (□), koncentrace specií iAs^V, MMA a DMA ve standardech 10 $\mu\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$, průtok argonu i helia 72 $\text{cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$, průtok vzduchu do MMQTA pro argon 33 $\text{cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$ a pro helium 39 $\text{cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$

Následně byla porovnána citlivost stanovení pro všechny tři specie As za optimálního průtoku vzduchu do MMQTA pro oba nosné plyny. Citlivost byla v daném nosném plynu srovnatelná pro všechny specie As (Obr. 4.3.), to poukazuje na podobnou účinnost atomizace příslušných hydridů těchto specií za zvolených podmínek za předpokladu jejich srovnatelných účinností generování. Citlivost pro iAs^V, MMA a DMA byla při použití helia jako nosného plynu 0,83, 0,89 a 0,89 $\text{s} \cdot \text{ng}^{-1}$. Při použití argonu jako nosného plynu pak

citlivost dosahovala hodnot $0,64 \text{ s}\cdot\text{ng}^{-1}$ pro iAs^{V} , $0,71 \text{ s}\cdot\text{ng}^{-1}$ pro MMA a $0,68 \text{ s}\cdot\text{ng}^{-1}$ pro DMA. Citlivost při použití helia jako nosného plynu byla tedy přibližně 1,3x vyšší, v porovnání s Ar, pro všechny tři specie. Důvod vyšší citlivosti v He bude v případě MMA a DMA stejný jako v případě iAs^{V} , jak bylo diskutováno výše. Směrodatné odchylky měření, vypočítané z 5 replikátů, se pohybovaly v rozmezí 1-3 %. Citlivost stanovení iAs v MMQTA za optimálních podmínek s použitím Ar jako nosného plynu se běžně pohybuje kolem hodnoty $0,50 \text{ s}\cdot\text{ng}^{-1}$ [49,55]. Hodnota pozorovaná v této práci je tedy asi o 20 % vyšší, což může být pravděpodobně způsobeno tím, že v předchozích pracích byly používány standardy iAs^{III} a měření byla prováděna bez předredukce v HG kroku, přičemž použité standardy iAs^{III} mohly být částečně, právě přibližně z 20% zoxidovány na iAs^{V} .

4.1.2. DBD atomizátor

Citlivost stanovení jednotlivých specií As byla analogicky porovnávána také v DBD atomizátoru za použití argonu a helia jako nosných plynů.



Obr. 4.4.: Porovnání citlivosti stanovení specií As v DBD atomizátoru pro nosné plyny helium (■) a argon (□), koncentrace specií iAs^{V} , MMA a DMA ve standardech $10 \mu\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$, průtok argonu i helia $72 \text{ cm}^3\cdot\text{min}^{-1}$

Citlivost stanovení všech tří specií je v daném nosném plynu srovnatelná, jak vyplývá z Obr. 4.4. To poukazuje na podobnou účinnost atomizace příslušných hydridů v DBD atomizátoru, opět při předpokladu srovnatelné účinnosti generování všech specií. Citlivost pro iAs^V , MMA a DMA byla při použití helia jako nosného plynu $0,35$, $0,33$ a $0,35 \text{ s}\cdot\text{ng}^{-1}$. Za použití argonu jako nosného plynu a bylo dosaženo citlivosti $0,59 \text{ s}\cdot\text{ng}^{-1}$ pro iAs^V , $0,60 \text{ s}\cdot\text{ng}^{-1}$ pro MMA a $0,64 \text{ s}\cdot\text{ng}^{-1}$ pro DMA. Citlivost při použití argonu jako nosného plynu byla tedy asi $1,8x$ vyšší v porovnání s citlivostí při použití helia. Výsledky jsou tedy naprosto opačné než ty pozorované v MMQTA (kapitola 4.1.1.). Podobný rozdíl v citlivosti při použití Ar a He jako nosných plynů byl pozorován již dříve pro iAs , kdy citlivost v argonu byla přibližně $2x$ vyšší než v heliu [49]. Citlivost stanovení iAs v argonu v práci [49] činila $0,48 \text{ s}\cdot\text{ng}^{-1}$, což je asi o 20% méně než v této diplomové práci, kdy byla pro iAs^V pozorována citlivost $0,60 \text{ s}\cdot\text{ng}^{-1}$. Předchozí práce věnující se stanovení iAs v DBD atomizátoru uvádějí hodnoty citlivosti kolem $0,45 \text{ s}\cdot\text{ng}^{-1}$ [59].

V jedné z dříve publikovaných prací byla studována atomizace všech tří specií As v DBD atomizátoru a pozorovaná citlivost činila $0,50$, $0,48$ a $0,27 \text{ s}\cdot\text{ng}^{-1}$ pro iAs^V , MMA a DMA [60]. Ve zmíněné práci byly specie As generované z prostředí $0,7 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3} \text{ HNO}_3$ a stanovená účinnost generování byla 90% pro iAs^V , 70% pro MMA a pouze 35% pro DMA. Hodnoty citlivostí pozorované v této diplomové práci lze porovnat s těmi publikovanými společně s hodnotami účinnosti generování pro jednotlivé specie v práci [60]. Z těchto výsledků lze odvodit, že účinnost generování všech specií As z prostředí TRIS pufru v této diplomové práci, je blízká 100% a účinnost atomizace je pro všechny specie As v DBD atomizátoru srovnatelná. Směrodatné odchylky měření vypočítané z 5 replikátů se pohybovaly v rozmezí $2-7 \%$.

4.1.3. Srovnání MMQTA a DBD atomizátoru

Měření provedená v kapitolách 4.1.1. a 4.1.2. dokazují, že oba atomizátory byly v režimu HG-AAS schopny atomizovat všechny tři specie As. Pro daný atomizátor a nosný plyn byla citlivost pro všechny tři specie ve všech případech srovnatelná. Nejvyšší citlivosti dosahuje MMQTA s heliem jako nosným plynem, naopak nejnižší citlivost byla naměřena v DBD atomizátoru s heliem jako nosným plynem. Absolutní hodnota citlivosti byla sestupná v následujícím pořadí:

$$\text{MMQTA (He)} > \text{MMQTA (Ar)} > \text{DBD (Ar)} > \text{DBD (He)}$$

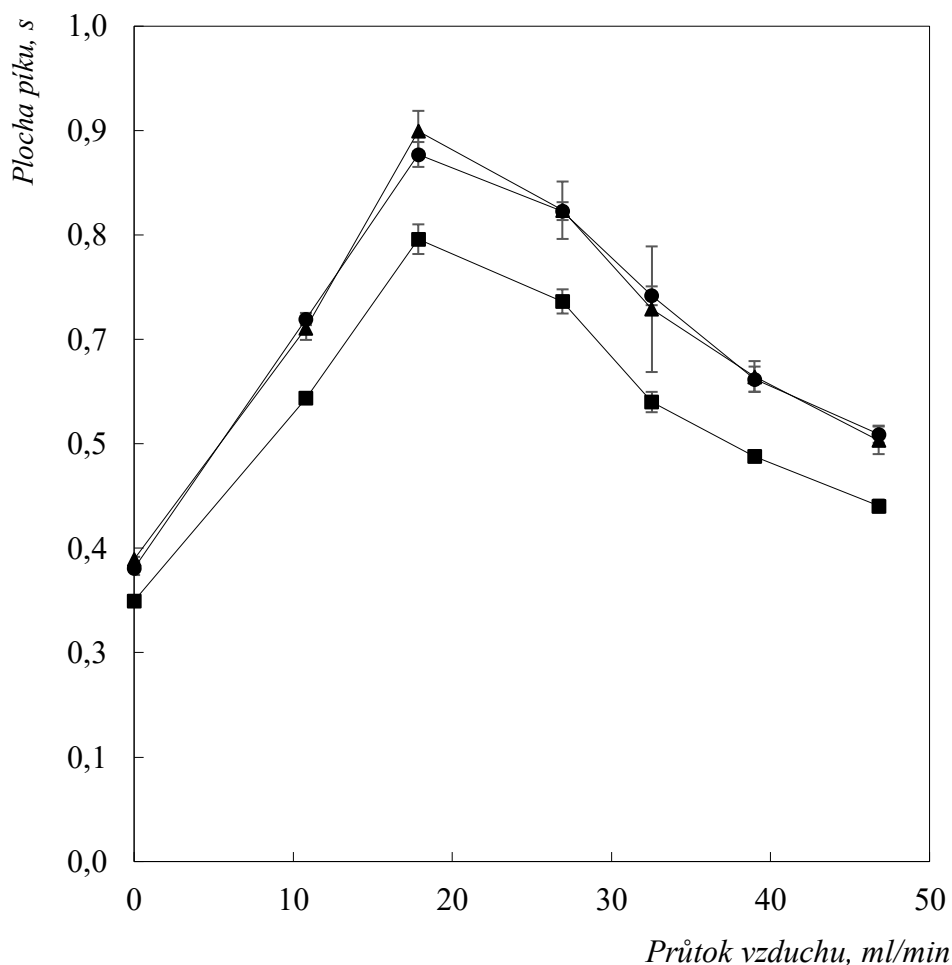
Z ekonomických důvodů má smysl upřednostnit při výběru nosného plynu argon před heliem. Jak vyplývá z předešlých měření, citlivost stanovená pro specie As v DBD atomizátoru i MMQTA byla při použití argonu jako nosného plynu srovnatelná. Použití helia je nutné v případě prekoncentračních měření a provádění speciální analýzy s využitím CT, jelikož Ar při teplotě kapalného dusíku použitého pro chlazení CT zkapalní a nelze ho tak pro tyto účely použít.

4.2. Speciální analýza s využitím generování substituovaných hydridů a jejich separací v CT

Experimenty byly provedeny v uspořádání HG-CT-AAS (Obr. 3.5.). Stanovovány byly specie iAs^V , MMA a DMA. Zásobní roztoky obsahující pětimocné specie byly redukovány přídatkem 2% roztoku L-cysteinu po dobu jedné hodiny. Těkavé sloučeniny byly generovány z prostředí TRIS pufru za experimentálních podmínek uvedených v kapitole 3.3.1. Jako nosný plyn bylo použité helium, jelikož argon by za nízkých teplot v CT zkapalněl.

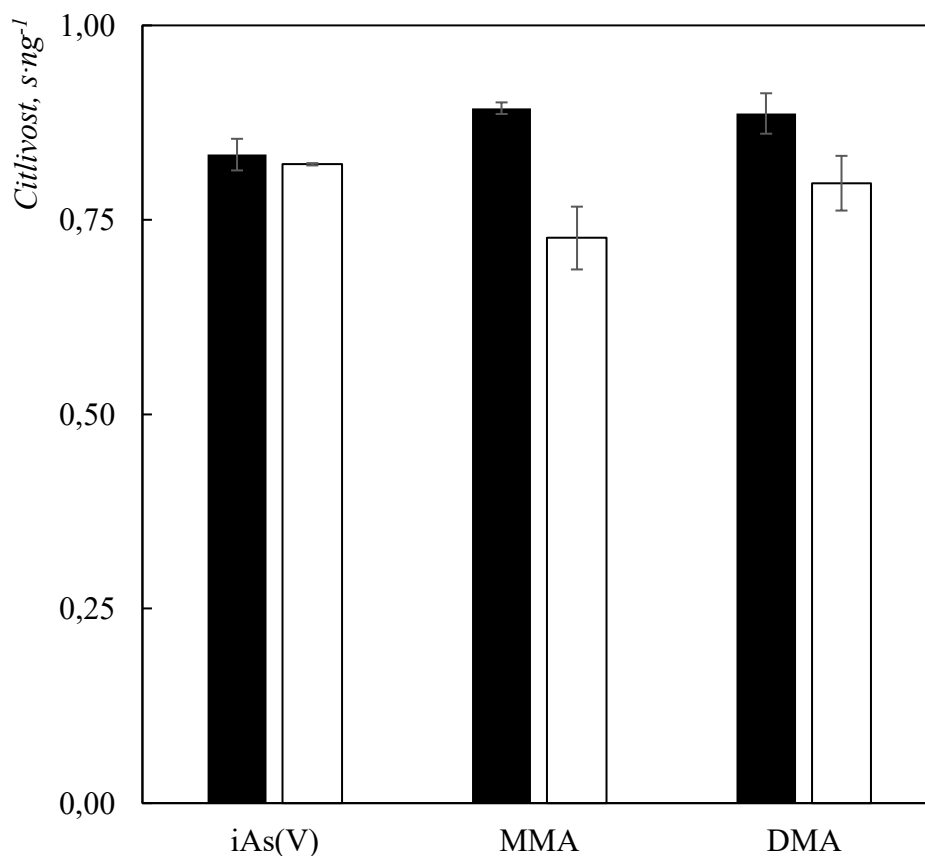
4.2.1. HG-CT-MMQTA-AAS

Zkoumán byl vliv průtoku vzduchu do MMQTA za použití helia jako nosného plynu. Závislost plochy píku na průtoku vzduchu byla proměřena pro všechny tři specie As. Následně byla za optimálního průtoku vzduchu stanovena citlivost stanovení specií v MMQTA atomizátoru ve spojení s CT, která byla porovnána s výsledky uvedenými v kapitole 4.1.1.



Obr. 4.5.: Závislost ploch píku na průtoku vzduchu do MMQTA za použití helia jako nosného plynu v režimu HG-CT-AAS pro iAs^V (●), MMA (■) a DMA (▲), koncentrace specií iAs^V , MMA a DMA ve směsném standardu $2 \mu g \cdot dm^{-3}$, průtok helia $72 \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$

Závislosti signálu specií As na průtoku vzduchu do MMQTA jsou uvedeny v grafech na Obr. 4.5. a vykazují očekávaný průběh se zřetelným maximem. Citlivost pro iAs^V , MMA a DMA byla při optimálním průtoku $18 \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$ vzduchu do MMQTA 0,88, 0,81 a 0,91 $\text{s} \cdot \text{ng}^{-1}$. Hodnoty citlivostí byly srovnatelné s těmi naměřenými v kapitole 4.1.1. jež činily 0,83, 0,89 a 0,89 $\text{s} \cdot \text{ng}^{-1}$ pro iAs^V , MMA a DMA. Nižší optimum průtoku vzduchu v porovnání s kapitolou 4.1.1. ., je dáno nižším množstvím vodíku přiváděným do atomizátoru z tlakové láhve. Za experimentálních podmínek pro měření s CT (kapitola 3.3.2.) vznikalo v závislosti na míře rozkladu THB přibližně $28 \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1} \text{ H}_2$. Po zachycení hydridů analytu v CT bylo generování vypnuto. Přísun vodíku do aparatury byl od vypnutí generování kompenzován přidávkem vodíku o průtoku $20 \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$ z tlakové lahve do nosného plynu.



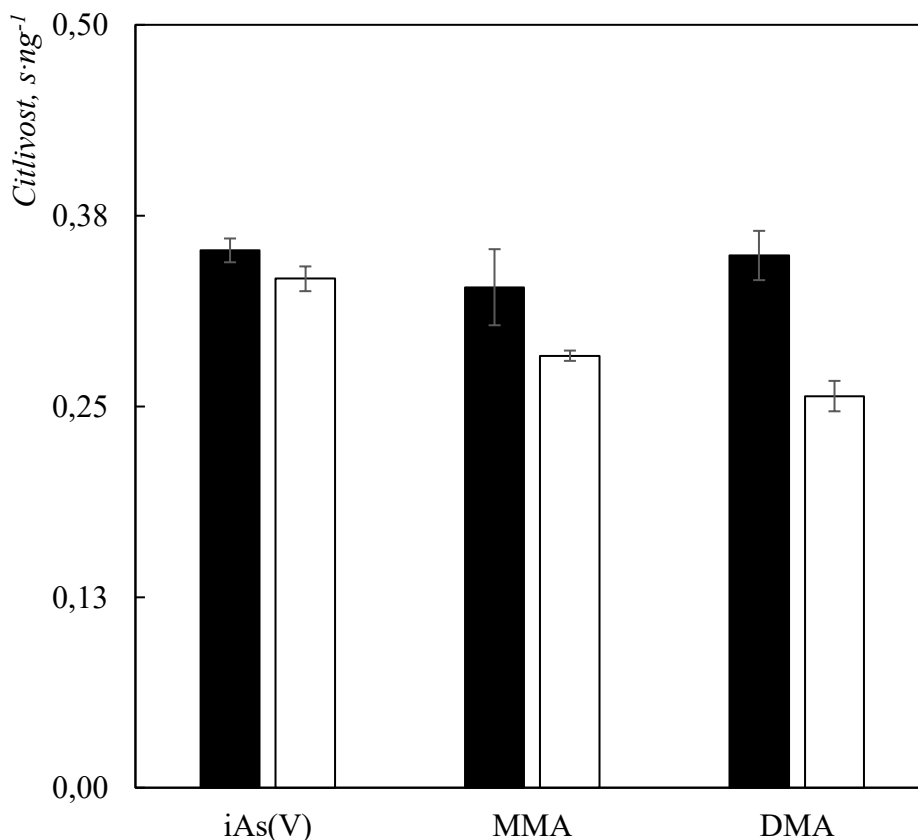
Obr. 4.6.: Porovnání citlivosti stanovení specií As v MMQTA pro online režim (■) a režim s CT (□) za použití helia jako nosného plynu, koncentrace specií iAs^V, MMA a DMA ve standardech 2 μg·dm⁻³, průtok helia 72 cm³·min⁻¹, průtok vodíku 20 cm³·min⁻¹

Hodnoty citlivosti pro stanovení iAs, MMA a DMA v režimu s CT byly znovu stanoveny během měření kalibračních křivek při měření CRM. V rámci těchto experimentů byly stanoveny hodnoty citlivosti 0,82, 0,73 a 0,80 s·ng⁻¹ pro iAs^V, MMA a DMA. Směrodatné odchylky měření vypočítané z 3 replikátů se pohybovaly v rozmezí 0,1-5,5 %. Tyto hodnoty byly následně porovnány s hodnotami citlivosti všech specií v MMQTA stanovenými v režimu online (kapitola 4.1.1.). Citlivosti iAs a DMA byly při použití obou režimů srovnatelné. Citlivost pro MMA byla v režimu online přibližně 1,2x vyšší než v režimu s CT (Obr. 4.6.).

4.2.2. HG-CT-DBD-AAS

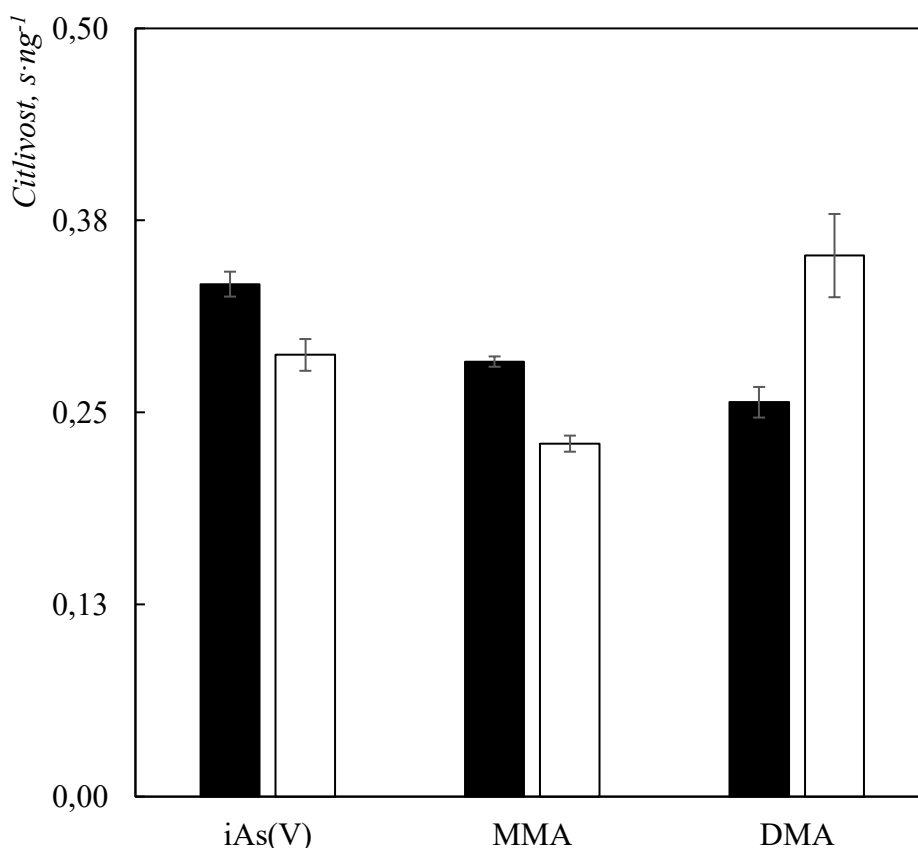
Byla stanovena citlivost zájmových specií As v DBD atomizátoru ve spojení s CT, která byla porovnána s výsledky uvedenými v kapitole 4.1.2. pro DBD atomizátor bez použití CT. Dále byla zkoumána možnost použití vodíku jako nosného plynu místo dražšího helia pro instrumentální uspořádání HG-CT-DBD-AAS. Citlivosti naměřené při použití vodíku jako

nosného plynu byly porovnané s hodnotami při použití helia jako nosného plynu pro DBD atomizátor.



Obr. 4.7.: Porovnání citlivosti stanovení specií As v DBD atomizátoru pro online režim (■) a režim s CT (□) za použití helia jako nosného plynu, koncentrace specií iAs^V, MMA a DMA ve standardech 2 μg·dm⁻³, průtok helia 72 cm³·min⁻¹, průtok vodíku 20 cm³·min⁻¹

Byly porovnány citlivosti zájmových specií v DBD atomizátoru při režimu online (kapitola 4.1.2.) a režimu s CT. Hodnoty citlivosti pro stanovení iAs^V, MMA a DMA v režimu s CT byly znovu stanoveny během měření kalibračních křivek při měření CRM. V rámci těchto experimentů byly stanoveny hodnoty citlivosti 0,33, 0,28 a 0,26 s·ng⁻¹ pro iAs^V, MMA a DMA. Směrodatné odchylky měření pro 3 replikáty se pohybovaly v rozmezí 1-4 %. Citlivost pro iAs^V byla v obou režimech měření srovnatelná. Citlivost pro MMA byla v režimu online asi 1,2x vyšší a pro DMA asi 1,4x vyšší (Obr. 4.7.).



Obr. 4.8.: Porovnání citlivosti v DBD atomizátoru v režimu CT pro směs helia a vodíku (■) a pouze vodíku (□) jako nosného plynu koncentrace specií iAs^V, MMA a DMA ve standardech 2 μg·dm⁻³, průtok helia 72 cm³·min⁻¹, průtok vodíku 80 cm³·min⁻¹

Porovnávány byly dva typy nosných/plazmových plynů pro DBD atomizátor. Jak helium, tak vodík nekapalní při teplotách kapalného dusíku v pasti a při použití obou těchto plynů plazma v atomizátoru hoří po celou dobu experimentu. Při zvolení vodíku jako nosného plynu byl jeho průtok nastavený na 80 cm³·min⁻¹. V případě použití helia jako nosného plynu byl jako v předešlých měřeních, do nosného plynu přiváděn vodík o průtoku 20 cm³·min⁻¹. Citlivost při použití vodíku jako nosného plynu činila 0,29, 0,23 a 0,35 s·ng⁻¹. Pro specie iAs a MMA je citlivost vyšší při použití směsi helia a vodíku jako nosných plynů. Naopak pro DMA je citlivost vyšší při použití vodíku jako nosného plynu. Tato hodnota má ale nejvyšší směrodatnou odchylku, konkrétně 8 %. U ostatních hodnot citlivosti nebyla směrodatná odchylka vyšší než 4% (Obr. 4.8.).

Využití vodíku jako nosného plynu může být ekonomicky zajímavou alternativou pro měření s DBD atomizátorem ve spojení s CT. Výhodou použití vodíku by mohlo být i to, že by se při měření používal pouze jeden nosný plyn, na rozdíl od měření s heliem, kdy musí

být navíc přidávána určitá frakce vodíku do nosného plynu pro podpoření atomizace. Citlivost jednotlivých specií As při použití vodíku jako nosného plynu je srovnatelná s tou při použití helia. Vodíkové plazma bylo ale méně stabilní než plazma v heliu a docházelo také ke zvyšování signálu pozadí v průběhu měření, což mohlo snížit opakovatelnost měření. Použití těchto dvou nosných plynů pro DBD atomizátor bez zapojené CT bylo dříve zkoumáno při měření iAs^V a citlivost v obou plynech byla srovnatelná. Autoři této publikace rovněž pozorovali vysokou směrodatnou odchylkou a horší opakovatelnost měření [49].

4.2.3. Určení analytických charakteristik HG-CT-AAS

Byly stanoveny meze detekce (LOD) pro zájmové specie As v MMQTA a DBD atomizátoru, přičemž atomizace v DBD byla prováděna jak s využitím směsi He/H₂ jako nosného/plazmového plyn, tak i pouze v čistém vodíku.

Tab. 4.1.: Meze detekce pro MMQTA a DBD atomizátor ve spojení s kryogenní separací

Specie As	LOD (ng·dm ⁻³)		
	MMQTA	DBD (He+H ₂)	DBD (H ₂)
iAs^V	126	387	326
MMA	139	352	420
DMA	149	344	899

Stanovené meze detekce byly pro MMQTA asi 3x nižší než pro oba typy DBD atomizace (Tab. 4.1.). Rozdíly v LOD mezi atomizátory korelují s rozdílem v naměřené citlivosti v těchto experimentálních uspořádáních (Obr. 4.9.). V DBD atomizátoru s H₂ jako nosným plynem byl pozorován asi 2x vyšší LOD pro DMA než pro ostatní specie. Tento výkyv byl způsobem nestabilitou vodíkového plazmatu, která se zhoršovala v průběhu měření a mohla mít na LOD negativní vliv. Pozorována byla také vyšší hodnota směrodatné odchylky při měření DMA v H₂ jako nosném plynu (Obr. 4.7.).

4.2.4. Validace metody HG-CT-AAS

Byly stanoveny koncentrace zájmových specií As ve vybraných CRM. Jednalo se o referenční materiály mořské vody (NASS-7) a říční vody (SLRS-6). V obou CRM je certifikován pouze celkový obsah iAs, dále uváděný jako iAs(tot.), nicméně hodnoty koncentrací zájmových specií jsou uvedeny jako informativní hodnoty. Speciační analýza byla provedena technikou HG-CT s využitím MMQTA i DBD atomizátoru. DBD atomizátor byl provozován jak s použitím směsi He+H₂, tak i v atmosféře čistého H₂. Výsledky jsou přehledně uvedeny v tabulkách 4.2 a 4.3. Pro účely detailní diskuze jsou uvedeny stanovené hodnoty koncentrací všech specií As, a to i v případě, kdy tyto hodnoty ležely pod hodnotou LOD. Tento fakt je však vždy diskutován.

Tab. 4.2.: Koncentrace specií As stanovené v CRM NASS-7

CRM	Certifikát**	MMQTA	DBD (He/H ₂)	DBD (H ₂)	
NASS-7	Specie As	c (ng·dm ⁻³)	c (ng·dm ⁻³)	c (ng·dm ⁻³)	
	iAs (tot.)*	846 ± 5	878 ± 15	908 ± 21	769 ± 95
	MMA	19 ± 1	25 ± 19	40 ± 31	—***
	DMA	193 ± 2	161 ± 30	164 ± 39	178 ± 31

* Roztok CRM byl předredukován 2% L-cysteinem, stanovena byla celková koncentrace iAs

** Informativní hodnoty koncentrací specií As

*** Stanovení koncentrace nebylo vyhodnocováno

Koncentrace iAs(tot.), stanovená v referenčním materiálu NASS-7 pomocí obou atomizátorů, se blížila certifikované koncentraci (Tab. 4.2.). Methylované specie byly v referenčním materiálu NASS-7 zastoupené v menších koncentracích, konkrétně pro MMA se jednalo o koncentraci pod hodnotou LOD pro všechny metody s CT zkoumané v této práci. Koncentrace stanovené pro MMA byly zatíženy vysokou směrodatnou odchylkou a v případě DBD s H₂ jako nosným plynem nebyla přítomnost MMA v CRM nalezena. Koncentrace DMA byla pod hodnotou LOD pouze pro DBD atomizátor, ale přesto byla naměřená koncentrace v obou atomizátorech srovnatelná.

Tab. 4.3.: Koncentrace specií As stanovené v CRM SLRS-6

CRM	Certifikát**	MMQTA	DBD (He/H ₂)	DBD (H ₂)	
SLRS-6	Specie As	c (ng·dm ⁻³)	c (ng·dm ⁻³)	c (ng·dm ⁻³)	
	iAs (tot.)*	362 ± 4	351 ± 13	408 ± 48	302 ± 8
	MMA	75 ± 2	75 ± 21	148 ± 48	92 ± 50
	DMA	73 ± 3	58 ± 17	107 ± 26	153 ± 39

* Roztok CRM byl předredukován 2% L-cysteinem, stanovena byla celková koncentrace iAs

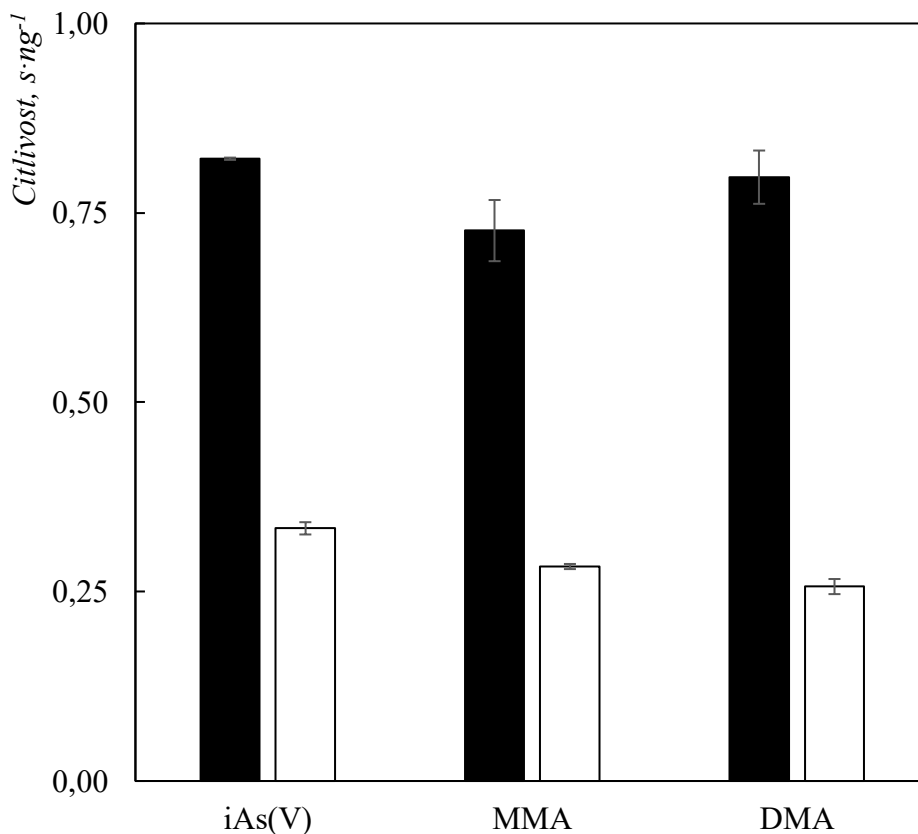
** Informativní hodnoty koncentrací specií As

Nejlepších výsledků při měření referenčního materiálu SLRS-6 bylo dosaženo v MMQTA (Tab. 4.3.), zejména díky tomu, že koncentrace specií As v tomto CRM byly ještě nižší než v NASS-7. To platilo hlavně pro methylované specie, jejichž koncentrace byly pod LOD všech zkoumaných metod s CT.

Vysoké hodnoty meze detekce v DBD atomizátoru ve spojení s CT jsou spojeny s nutností použití helia jako nosného plynu, ve kterém byla citlivost pro DBD atomizátor asi 3x nižší než pro MMQTA. V důsledku toho bylo pro stanovení koncentrací v referenčním materiálech vhodnější spojení CT s MMQTA. Spojení MMQTA s CT bylo již dříve úspěšně použito při speciální analýze arsenu v různých biologických matricích s výtěžností 78-113 % [10]. Na základě stanovených analytických charakteristik pro DBD atomizátor ve spojení s CT, zejména s přihlédnutím k nízké citlivosti a vysokým LOD, nebylo v dalších experimentech s tímto experimentálním uspořádáním pokračováno.

4.2.5. Srovnání atomizátorů ve spojení s CT

Oba atomizátory byly ve spojení s CT schopné atomizovat všechny tři specíe As. Spojení CT s oběma atomizátory umožňovalo provádět speciální analýzu arsenu.



Obr. 4.9.: Porovnání citlivosti v MMQTA (■) a DBD (He/H₂) atomizátoru (□) v režimu CT, koncentrace specií iAs^V, MMA a DMA ve standardech 2 μg·dm⁻³, průtok helia 72 cm³·min⁻¹, průtok vodíku 20 cm³·min⁻¹

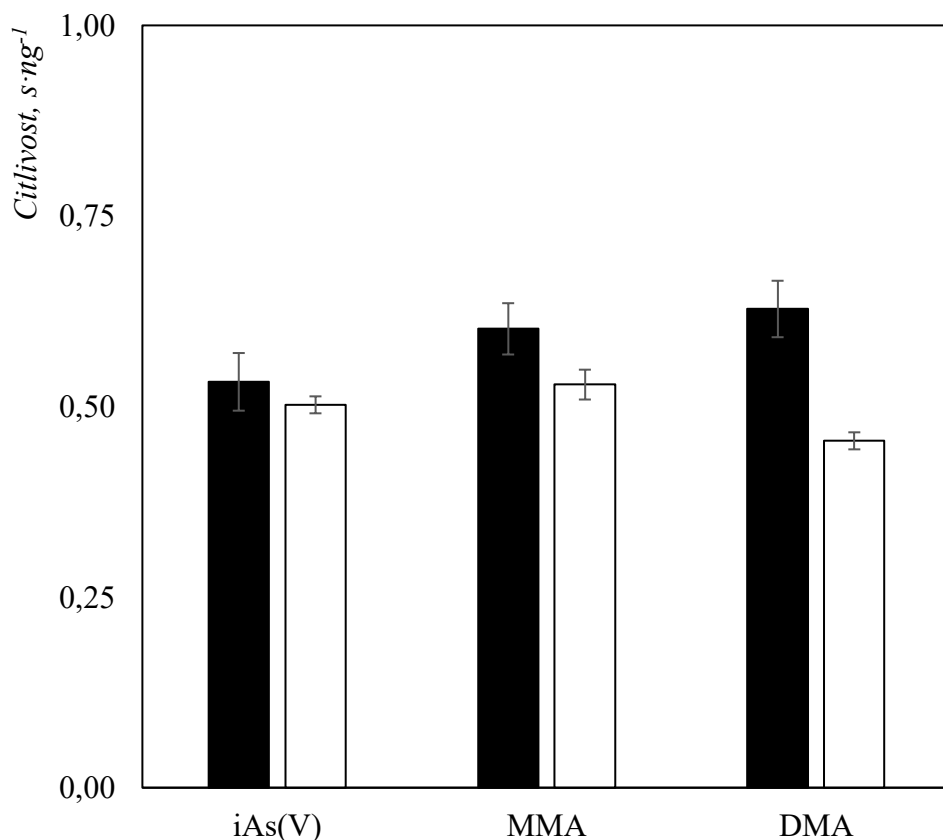
Stanovení citlivosti specií As v obou atomizátorech v režimu s CT bylo porovnáno (Obr. 4.9.). Poměry citlivostí korelují s daty z online režimu (kapitola 4.1.) s použitím helia jako nosného plynu. Citlivost v MMQTA byla i ve spojení s CT přibližně 3x vyšší než pro DBD atomizátor využívající směs He/H₂ jako nosný plyn, který byl vybrán pro porovnání, jelikož pro většinu stanovovaných specií As je citlivější než DBD atomizátor s H₂ jako nosným plynem.

4.3. Speciační analýza s využitím HPLC, postkolonového generování hydridů a prekoncentrací v DBD

Experimenty byly provedeny v experimentálním uspořádání HPLC-HG-tDBD-AAS (Obr. 3.6.). Ke generování docházelo až po separaci specií As pomocí HPLC. Nebyla použita předredukce 2% L-cysteinem, a tedy byla možná separace anorganických forem iAs^{III} a iAs^V pomocí HPLC. Kromě anorganických forem byly v tomto uspořádání stanovovány také methylované specie MMA, DMA a TMA₂O. Stanovení TMA₂O bylo umožněno díky předoxidaci vzorku pomocí 3% H₂O₂ před HPLC separací. K atomizaci těkavých sloučenin As byl během experimentů v této kapitole používán pouze DBD atomizátor s argonem jako nosným plynem. Proud argonu byl nastaven na 72 cm³·min⁻¹.

4.3.1. Postkolonové generování hydridů

Díky změně reakčních podmínek (kapitola 3.3.2.) dochází při postkolonovém generování k redukci pětimocných forem a jejich převedení na těkavé sloučeniny přímo v toku reakční směsi. Porovnána byla účinnost postkolonové redukce oproti předredukci pomocí L-cysteinu, která byla využívána v předchozích experimentech.

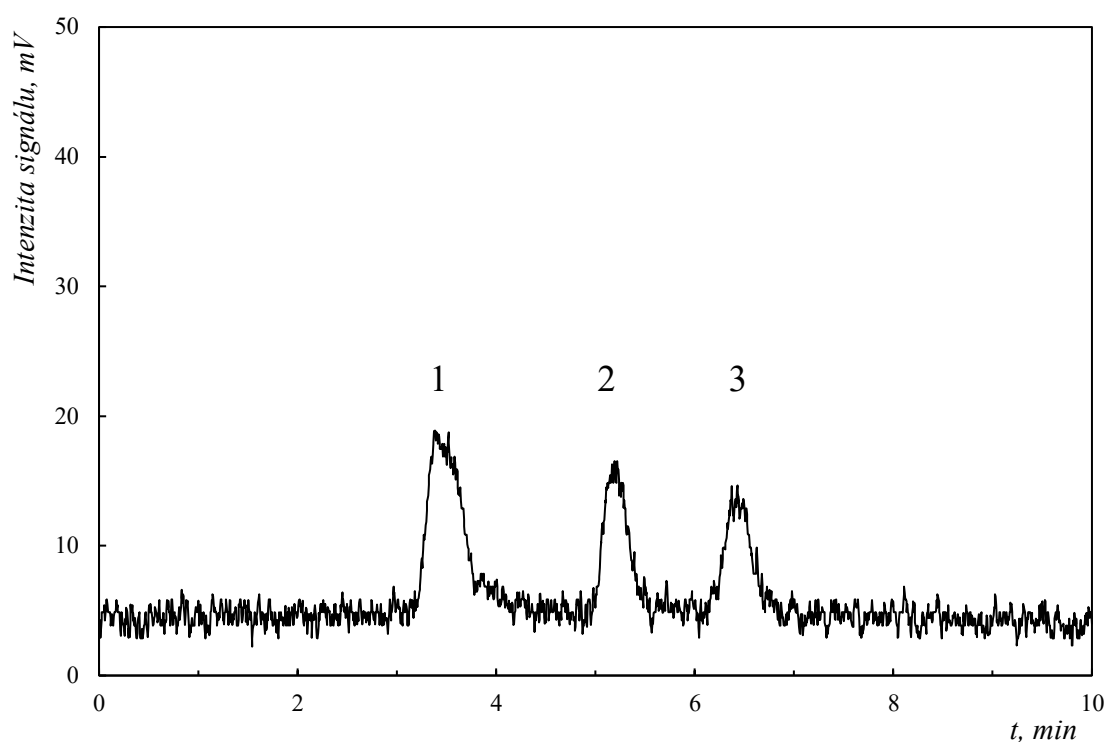


Obr. 4.10.: Porovnání citlivosti při předredukci L-cysteinem (■) a postkolonové redukci (□), koncentrace specií iAs^V, MMA a DMA ve standardech 2 μg·dm⁻³, průtok argonu 72 cm³·min⁻¹

Citlivost zájmových specií As při použití obou redukčních metod byla porovnána. Specie As byly stanoveny jednotlivě, tj. bez zapojení HPLC. Citlivost s postkolonovou redukcí dosahovala podobných hodnot jako za předredukce L-cysteinem (Obr. 4.9.). Účinnost postkolonové redukce byla v porovnání s předredukci L-cysteinem 92% pro iAs^V, 93% pro MMA a 77% pro DMA. Při postkolonovém generování hydridů byl využíván koncentrovanější (2,5% roztok) THB a hydridy byly generovány z prostředí HCl o koncentraci 2 mol·dm⁻³. Za těchto reakčních podmínek dochází ke vzniku většího množství vodíku (přibližně 60 cm³·min⁻¹) při generování hydridů, jehož vliv na citlivost byl rovněž zkoumán. Bylo zjištěno, že větší množství vznikajícího vodíku nemá významný vliv na citlivost žádné ze zájmových specií.

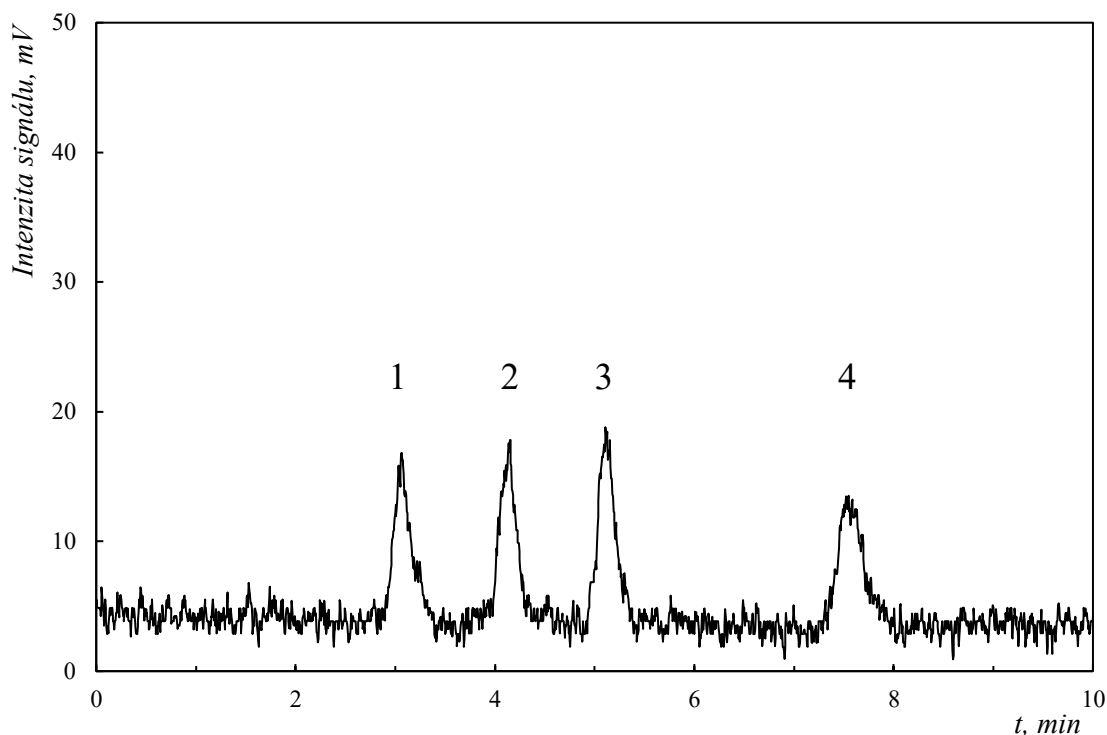
4.3.2. Speciační analýza bez před-oxidace vzorku a následnou prekoncentrací v DBD atomizátoru

Optimalizovány byly podmínky separace specií As pomocí HPLC. Vyzkoušena byla izokratická i gradientová eluce. Cílem bylo analýzu co nejvíce zkrátit a zároveň dosáhnout dobré separace píků čtyř specií As. Dobrá separace píků byla důležitá pro následnou prekoncentraci těkavých specií As v DBD atomizátoru pomocí přídatku kyslíku do proudu nosného plynu. Předmětem speciační analýzy bez před-oxidace vzorku pomocí H_2O_2 byla separace specií iAs^{III} , iAs^{V} , MMA a DMA. Měřen byl směsný standard zájmových specií o koncentraci $10 \mu\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$.



Obr. 4.11.: Chromatogram izokratické eluce s $(\text{NH}_3)_2\text{CO}_3$ puforem o $\text{pH} = 10$
(eluční pořadí: iAs^{III} +DMA (1), MMA (2), iAs^{V} (3)), koncentrace $(\text{NH}_3)_2\text{CO}_3$ pufru $50 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$,
koncentrace specií iAs^{V} , MMA a DMA ve směsném standardu $10 \mu\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$, průtok argonu
 $72 \text{ cm}^3\cdot\text{min}^{-1}$

Při izokratické eluci s puforem o $\text{pH} = 10$ trvala separace přibližně 7 min (Obr. 4.11.). V porovnání s použitím izokratické eluce s puforem o $\text{pH} = 8$, kdy separace trvala asi 15 min, vedlo použití pufru o vyšším pH k výraznému zkrácení analýzy. Při těchto podmínkách ale docházelo ke koeluci prvních dvou analytů, konkrétně iAs^{III} a DMA. Na základě těchto dat bylo přistoupeno k eluci s pH gradientem.

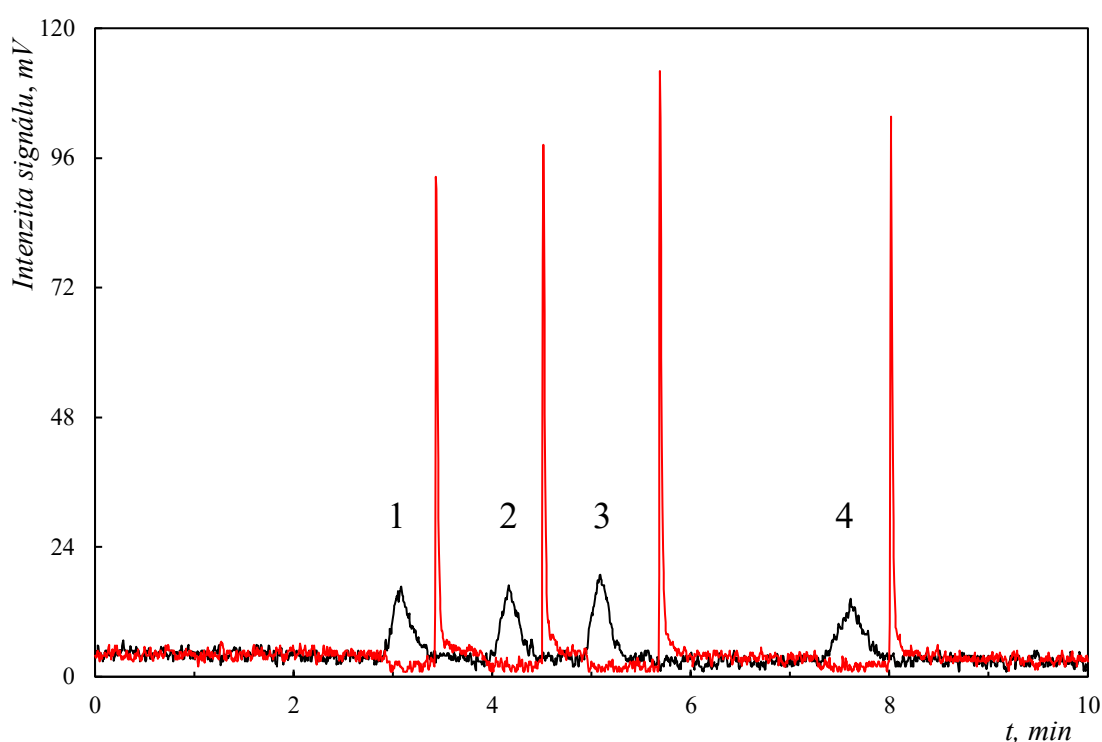


Obr. 4.12.: Chromatogram gradientové eluce s $(\text{NH}_3)_2\text{CO}_3$ pufry o pH = 8 a pH = 10 (eluční pořadí: iAs^{III} (1), DMA (2), MMA (3), iAs^{V} (4)), koncentrace $(\text{NH}_3)_2\text{CO}_3$ pufry $50 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$, koncentrace specií iAs^{V} , MMA a DMA ve směsném standardu $10 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$, průtok argonu $72 \text{ cm}^3\cdot\text{min}^{-1}$

Při eluci s pH gradientem ke koeluci prvních dvou píků již nedocházelo (Obr. 4.12.). Všechny čtyři specie As byly od sebe dostatečně separovány a došlo také k zúžení píků. Průběh separace byl vhodný i pro následující prekoncentrační měření (viz dále). Čas analýzy se oproti izokratické eluci s pufrem o pH = 10 neprodloužil. Zkoušeno bylo více pH gradientů s různým časovým průběhem. Vybraný pH gradient efektivně separoval všechny čtyři zájmové specie v nejkratším čase (Tab. 4.4.). Podobných výsledků separace lze dosáhnout na stejné koloně i během eluce s gradientem koncentrace $(\text{NH}_3)_2\text{CO}_3$ pufry. [61]

Tab. 4.4. Časový průběh pH gradientu

t (min)	(NH ₃) ₂ CO ₃ pufr, pH = 8 (%)	(NH ₃) ₂ CO ₃ pufr, pH = 10 (%)
0	100	0
3,5	0	100
7	0	100
10	100	0
12	100	0



Obr. 4.13.: Chromatogram online měření (—) a preconcentračního měření (—) směsného standardu zájmových specií As (eluční pořadí: iAs^{III} (1), DMA (2), MMA (3), iAs^V (4)), koncentrace (NH₃)₂CO₃ pufru 50 mmol·dm⁻³, koncentrace specií iAs^{III}, iAs^V, MMA a DMA ve směsném standardu 10 μg·dm⁻³, průtok argonu 72 cm³·min⁻¹, průtok kyslíku 7 cm³·min⁻¹

Spojení HPLC separace specií As s jejich postkolonovým generováním a DBD-AAS detekcí, tedy použití techniky HPLC-HG-DBD-AAS, bylo již v literatuře popsáno [34]. K separaci byla použita stejná kolona, mobilní fází byl hydrogenfosforečnanový pufr o koncentraci 15 mmol·dm⁻³ a hodnotě pH = 6. V této práci bylo dosaženo pro různé specie As čítající iAs^{III}, iAs^V, MMA a DMA řádově rozdílných hodnot LOD, což je překvapivé,

neboť při očekávané srovnatelné míře účinnosti atomizace, by i hodnoty LOD specií As měly být podobné. I tato dříve publikovaná práce byla jednou z motivací k provedení vlastních experimentů prezentovaných v této diplomové práci. Srovnání detekčních limitů publikovaných dříve ve zmíněné práci a těmi, kterých bylo dosaženo v této diplomové práci metodou HPLC-HG-DBD-AAS je detailněji diskutováno v kapitole 4.3.4. Z chromatogramu uvedeného na Obr. 4.12. je patrné, že plocha píku, a tedy i citlivost stanovení je pro všechny specíe As srovnatelná.

S použitím *in-situ* prekoncentrace jednotlivých specií v DBD atomizátoru lze dosáhnout užších píků, tedy zlepšit poměr signál šum a snížit mez detekce jednotlivých specií. Prekoncentrace hydridů *in-situ* v DBD atomizátoru je diskutována v kapitole 2.6.3. Proveditelnost *in-situ* prekoncentrace hydridu As v DBD atomizátoru byla v literatuře popsána jak ve spojení s AAS detekcí [49], tak i s AFS detektorem [62]. V obou případech bylo dosaženo 100% účinnosti prekoncentrace. Ve spojení s HPLC separací a postkolonovým generováním byla *in-situ* prekoncentrace v DBD atomizátoru také využita, a to ve spojení s AFS detekcí, ale prekoncentrovány nebyly všechny specíe, ale jen anorganicky vázaný arsen [52]. Cílem této práce bylo ověřit možnost postupné *in-situ* prekoncentrace všech specií As v DBD atomizátoru a proces automatizovat.

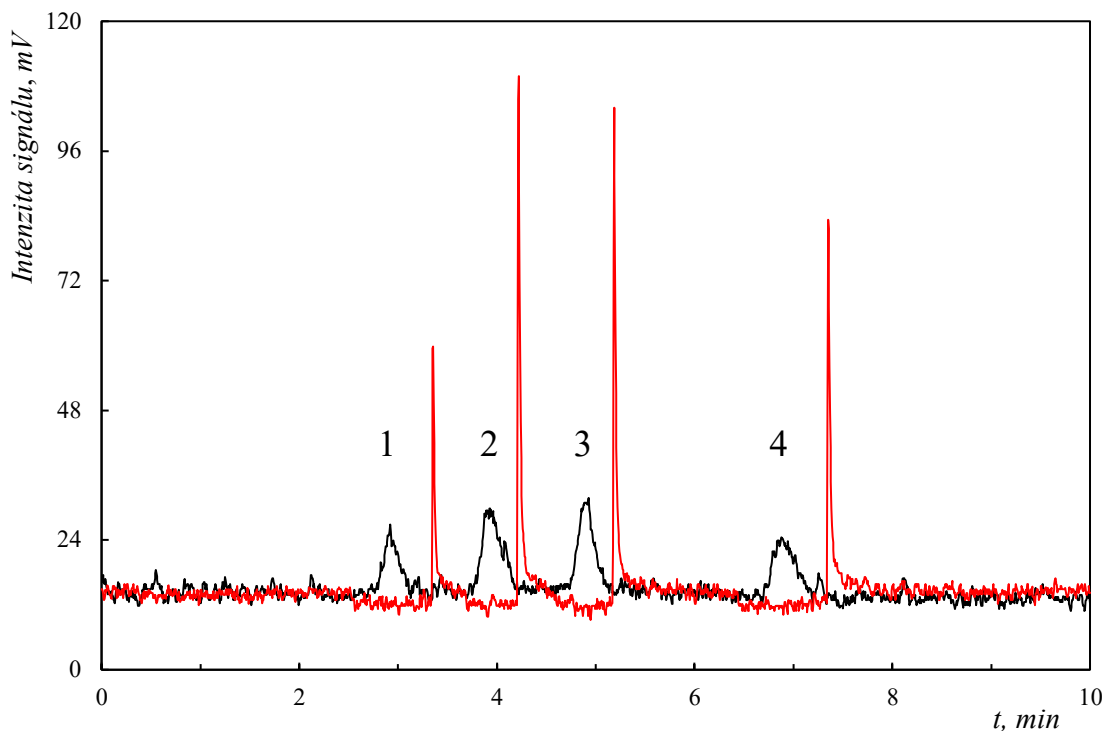
Prekoncentrace v DBD atomizátoru, jejíž průběh je na chromatogramu (Obr. 4.13.) zobrazený červenou barvou, probíhala po zapnutí přívodu kyslíku do nosného plynu. Ten byl přiváděn vždy v časovém rozmezí, které bylo zaznamenáno pro každý pík během předešlého online měření. Průtok kyslíku pro prekoncentraci v DBD atomizátoru byl $7 \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$, což byla optimální hodnota pro prekoncentraci hydridu As nalezená v předchozí práci s použitím stejné konstrukce DBD ve stejné laboratoři [49]. Časové intervaly byly následně nastaveny v jednotce GCbox02 a ovládání přívodu kyslíku probíhalo automaticky. Přivedení kyslíku do nosného plynu a začátek záchytu analytu bylo v chromatogramu zobrazeno poklesem základní linie. Po vypnutí přívodu kyslíku byl analyt hromadně atomizován a v chromatogramu vznikl velmi úzký a vysoký pík, který rychle klesal zpět na základní linii. U žádné ze specií As nedocházelo k překryvu prekoncentračního píku se zónou následující specíe. Jak je patrné z chromatogramu na Obr. 4.13. i v režimu s prekoncentrací, tedy metodou HPLC-HG-tDBD-AAS, lze dosáhnout srovnatelné citlivosti pro všechny specíe As, což svědčí o srovnatelné účinnosti prekoncentrace (blíže viz kapitola 4.3.4). Pilotní experimenty byly prováděny s manuálním vypínáním a zapínáním proudu kyslíku, což bylo pro operátora časově náročné. Proto bylo zkonstruována kontrolní jednotka

GCbox02 blíže popsána v kapitole 3.2.3., která umožnila automatické spínání proudu kyslíku v potřebných časech. I tento proces automatizace vyvinutý v rámci této práce je významným přínosem k rutinnějšímu uplatnění vyvinuté metody. Všechny experimenty v režimu HPLC-HG-tDBD-AAS dále popsané v této práci byly prováděny s využitím automatické regulace kyslíku pomocí jednotky GCbox02.

4.3.3. Speciační analýza s před-oxidací vzorku a následnou prekoncentrací v DBD atomizátoru

Metoda vyvinutá v kapitole 4.3.2. umožňuje provést speciační analýzu iAs^{III} , iAs^V , MMA a DMA. Ve vzorcích, které obsahují TMA₂O je jeho speciační analýza s použitím stejného přístupu komplikovaná až nemožná, jelikož při HPLC separaci dochází k jeho ko-eluci s píkem iAs^{III} . Toto je z literatury dobře známo [42], řešením je před-oxidace vzorku. Při předoxidaci vzorku pomocí H_2O_2 dochází k převedení iAs^{III} na iAs^V . S tímto přístupem nelze provést speciační analýzu iAs^{III} na iAs^V , ale stanovujeme celkové množství anorganicky vázaného arsenu $iAs(tot.)$, které po provedené oxidaci peroxidem vodíku odpovídá signálu iAs^V . Koncentrace iAs je relevantní informací z pohledu speciační analýzy a dobrým kompromisem s ohledem na fakt, že je díky tomu možné kvantifikovat TMA₂O.

Podmínky HPLC separace i prekoncentrace v DBD atomizátoru byly shodné s těmi uvedenými v kapitole 4.3.2. Předmětem zájmu speciační analýzy byly tedy specie TMA₂O, DMA, MMA a iAs^V . Použit byl směsný standard zájmových specií o koncentraci $10 \text{ ug} \cdot \text{dm}^{-3}$.



Obr. 4.14.: Chromatogram online měření (—) a preconcentračního měření (—) směšného standardu zájmových specií As (eluční pořadí: TMAAsO (1), DMA (2), MMA (3), iAs(tot.) (4)), koncentrace specií TMAAsO, iAs^V, MMA a DMA ve směšném standardu 10 μg·dm⁻³, průtok argonu 72 cm³·min⁻¹, průtok kyslíku 7 cm³·min⁻¹

Typický průběh chromatogramu v režimu bez preconcentrace i s preconcentrací za použití před-oxidace vzorku pomocí peroxidu vodíku je uveden na Obr. 4.14. Pík pro TMAAsO je v preconcentračním režimu asi poloviční v porovnání s píky ostatních specií. Důvodem byla nižší účinnost preconcentrace TMAAsO za zvolených podmínek, které byly vhodné pro ostatní specie As. Dalším důvodem pro nižší odezvu na detektoru mohla být suprese signálu pro TMAAsO vlivem H₂O₂, který eluoval ve stejném čase jako TMAAsO. U žádné ze specií As nedocházelo k překryvu preconcentračního píku se zónou následující specie.

4.3.4. Určení analytických charakteristik HPLC-HG-tDBD-AAS

Byla stanovena účinnost preconcentrace zájmových specií As. Byl stanoven lineární dynamický rozsah (LDR) pro zájmové specie As v preconcentračním režimu měření. Stanoveny byly LOD pro speciační analýzu bez před-oxidace a s před-oxidací vzorku pomocí H₂O₂.

Tab. 4.5.: Prekoncentrační účinnosti

Účinnost prekoncentrace (%)				
iAs ^{III}	iAs ^V	MMA	DMA	TMA ₅ O
97 ± 4	94 ± 4	98 ± 3	97 ± 5	68 ± 7

Prekoncentrační účinnost byla počítána jako podíl citlivosti v prekoncentračním a online režimu. Za zvolených podmínek prekoncentrace dosahovaly všechny specie As, kromě TMA₅O účinnosti prekoncentrace nad 90 %. Prekoncentrační účinnost blízka 100% byla v předchozích pracích pozorována v DBD pro iAs [49,52], pro ostatní specie nebyla v literatuře popsána. Prekoncentrační účinnost je důležitý údaj, značící míru záchytu analytu v prekoncentračním zařízení.

Tab. 4.6.: Souhrnná tabulka LOD zájmových specií v prekoncentračním a online režimu

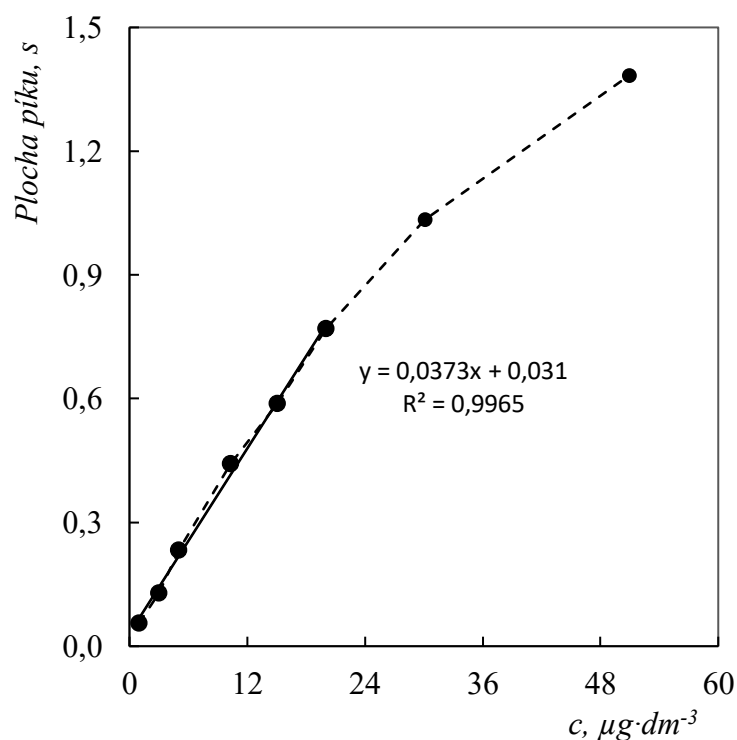
LOD specií As (ng·dm ⁻³)					
	iAs ^{III}	iAs ^V	MMA	DMA	TMA ₅ O
LOD onl.	625	920	672	731	-
LOD pre.	117	130	150	160	-
LOD onl. (H ₂ O ₂)*	-	703	535	808	1259
LOD pre. (H ₂ O ₂)*	-	209	249	189	716

Onl. – online režim měření, Pre. – prekoncentrační režim měření

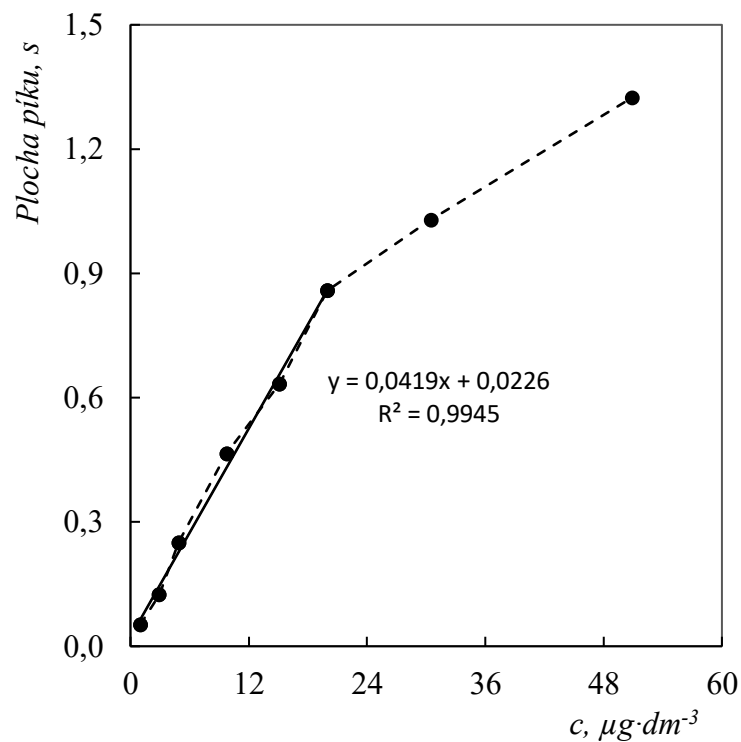
*V roztoku standardu přítomen 3 % H₂O₂ pro oxidaci iAs^{III}, který eluuje ve stejném čase jako TMA₅O

V tabulce 4.6. jsou shrnuty meze detekce dosahované v režimech HPLC-HG-DBD-AAS a HPLC-HG-tDBD-AAS. LOD dosažené pro jednotlivé specie v režimu bez prekoncentrace a před-oxidace v této práci mohou být porovnány s těmi publikovanými pro stejnou metodu v literatuře [34]. V této diplomové práci byly hodnoty LOD pro iAs^{III}, iAs^V, MMA a DMA srovnatelné, v rozsahu 0,6 až 0,9 μg·dm⁻³. Naproti tomu v práci [34], bylo dosaženo horších LOD a tyto hodnoty se od sebe pro různé specie výrazně lišily. Stanovené hodnoty LOD byly: 1 μg·dm⁻³ pro iAs^{III}, 12 μg·dm⁻³ pro iAs^V, 2 μg·dm⁻³ pro MMA a 18 μg·dm⁻³ pro DMA. Důvodem horších LOD ve zmíněné práci může být použití He místo Ar jako plazmového plynu v DBD atomizátoru, vyšší průtok nosného plynu (250 cm³·min⁻¹) a větší zředění volných atomů, a také podmínky postkolonového HG, ve kterých byly použity vyšší koncentrace HCl (30 %) i redukčního činidla (5 % KBH₄), což mohlo mít za následek

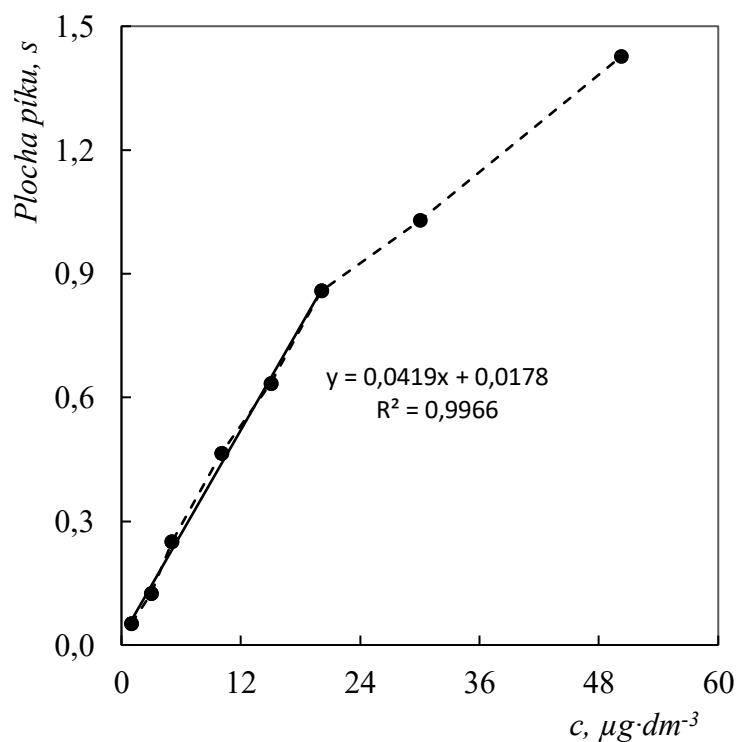
bouřlivější reakci s vyšší produkcí vodíku a negativním vlivem na šum základní linie. Vysvětlení rozdílnosti v hodnotách LOD, které se mezi speciemi liší až o řád, se z výsledků publikovaných ve výše zmíněné práci hledá těžko a samotnými autory práce není diskutováno. Hodnoty LOD v prekoncentračním režimu byly při analýze bez před-oxidace asi 5x nižší než v online režimu. S před-oxidací pak byly LOD v prekoncentračním režimu asi 2x nižší. Nižších LOD při prekoncentraci se dosahuje díky užším píkům a lepšímu poměru signál/šum v porovnání s online režimem měření. Při měření LOD byl používán směsný standard o koncentraci $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$ a měřeno bylo vždy 10 replikátů tohoto standardu. Nejvyšší LOD byla stanovena pro TMA_sO. To mohlo být dáno nižší účinnosti prekoncentrace této specie, nebo možnou supresí signálu TMA_sO způsobenou H₂O₂, který eluoval ve stejném čase. Hodnoty LOD v obou režimech měření jsou s využitím před-oxidace a bez ní pro specie iAs^V, MMA a DMA srovnatelné.



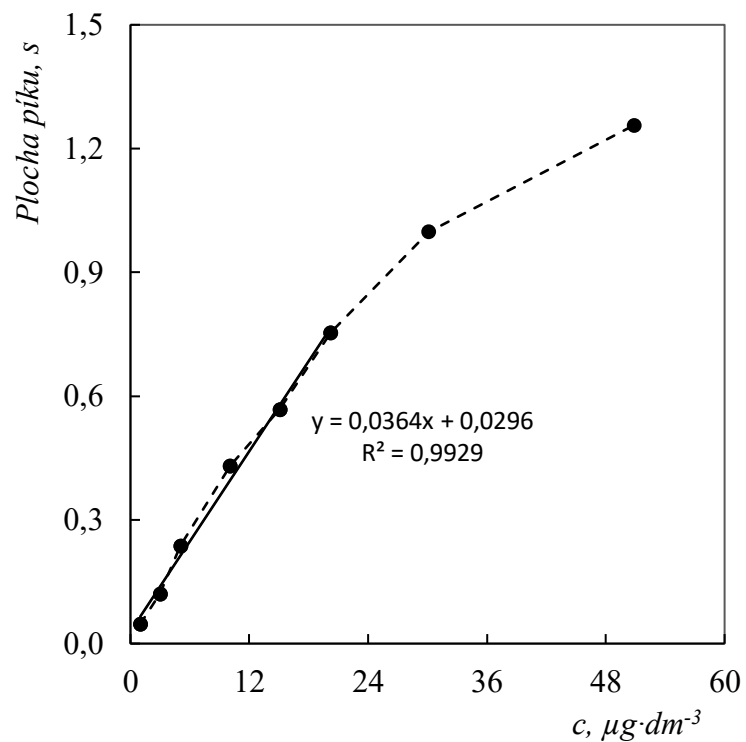
Obr. 4.15.: Závislost plochy píku na koncentraci iAs^{III} v prekoncentračním režimu, průtok argonu $72 \text{ cm}^3\cdot\text{min}^{-1}$, průtok kyslíku $7 \text{ cm}^3\cdot\text{min}^{-1}$



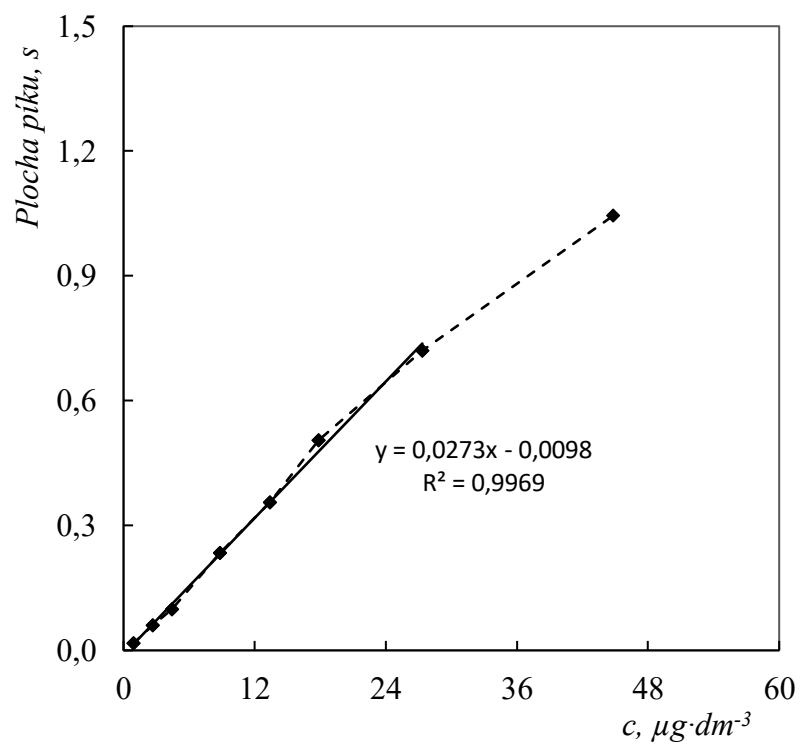
Obr. 4.16.: Závislost plochy píku na koncentraci iAs^{V} v prekoncentračním režimu, průtok argonu $72 \text{ cm}^3\cdot\text{min}^{-1}$, průtok kyslíku $7 \text{ cm}^3\cdot\text{min}^{-1}$



Obr. 4.17.: Závislost plochy píku na koncentraci MMA v prekoncentračním režimu, průtok argonu $72 \text{ cm}^3\cdot\text{min}^{-1}$, průtok kyslíku $7 \text{ cm}^3\cdot\text{min}^{-1}$



Obr. 4.18.: Závislost plochy píku na koncentraci DMA v prekoncentračním režimu, průtok argonu $72\text{ cm}^3\cdot\text{min}^{-1}$, průtok kyslíku $7\text{ cm}^3\cdot\text{min}^{-1}$

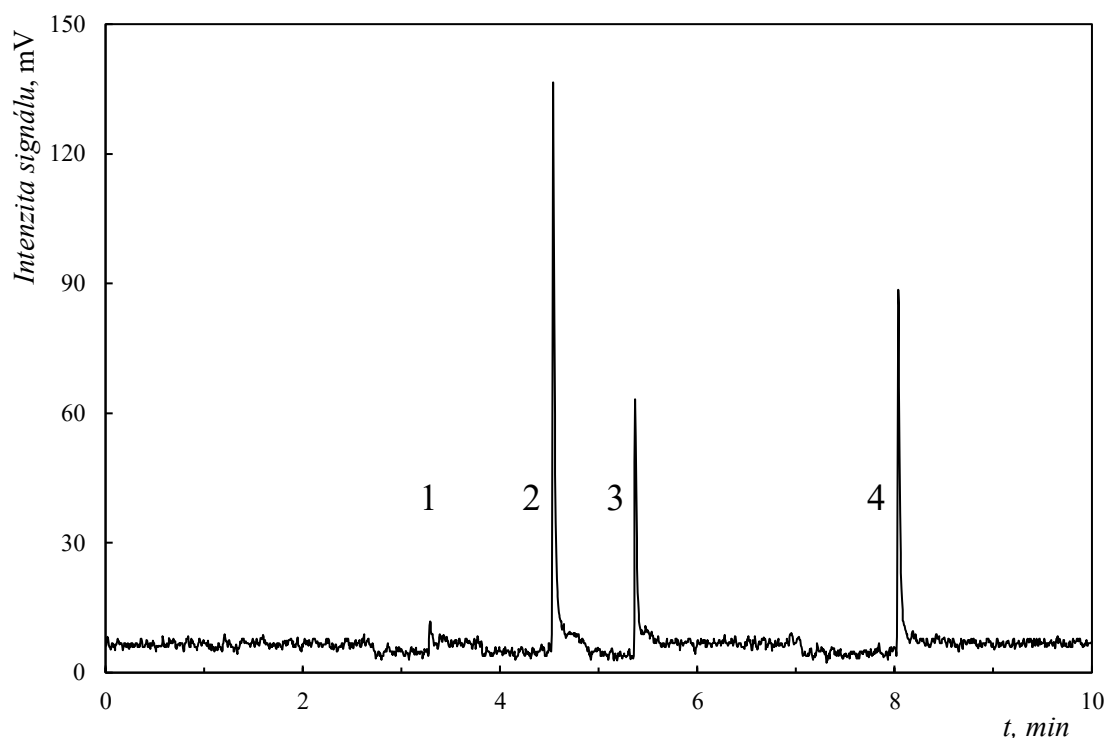


Obr. 4.19.: Závislost plochy píku na koncentraci TMAOs v prekoncentračním režimu, průtok argonu $72\text{ cm}^3\cdot\text{min}^{-1}$, průtok kyslíku $7\text{ cm}^3\cdot\text{min}^{-1}$

Znalost LDR je velmi důležitá pro správné ředění CRM nebo vzorků o vyšších koncentracích specií As při měření v prekoncentračním režimu. Pro měření byly použity standardy specií o koncentraci 1, 3, 5, 10, 15, 20, 30 a 50 $\mu\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$ (Obr. 4.15-19.). Směrnice a korelační koeficienty zobrazené v těchto grafech jsou vypočítané pouze pro lineární část závislosti plochy píku na koncentraci analytu. Pro specie iAs^{III} , iAs^{V} , MMA a DMA nebyla odezva detektoru lineárně závislá na koncentraci analytu pro standardy o koncentraci vyšší než 20 $\mu\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$. Pro TMA₂O byla odezva detektoru lineárně závislá na koncentraci i pro standard o koncentraci 30 $\mu\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$ (Obr. 4.17.). Důvodem širšího LDR pro TMA₂O mohla být nižší prekoncentrační účinnost TMA₂O. Stanovován byl také LDR pro online režim měření a při tomto režimu měření byla odezva detektoru lineárně závislá na koncentraci specií As v celém rozsahu měřených koncentrací (50 $\mu\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$).

4.3.5. Validace metody HPLC-HG-tDBD-AAS

Stanovovány byly koncentrace specií As ve vybraných CRM. Jednalo se o referenční materiál lidské moči (NIST-2669) na dvou koncentračních úrovních (Level I. a Level II.), rybích jater (DOLT-5) a humřího hepatopankreatu (TORT-3).



Obr. 4.20.: Chromatogram prekoncentračního měření CRM NIST-2669 level II. (eluční pořadí: TMA₂O (1), DMA (2), MMA (3), tot. iAs (4)), průtok argonu 72 $\text{cm}^3\cdot\text{min}^{-1}$, průtok kyslíku 7 $\text{cm}^3\cdot\text{min}^{-1}$

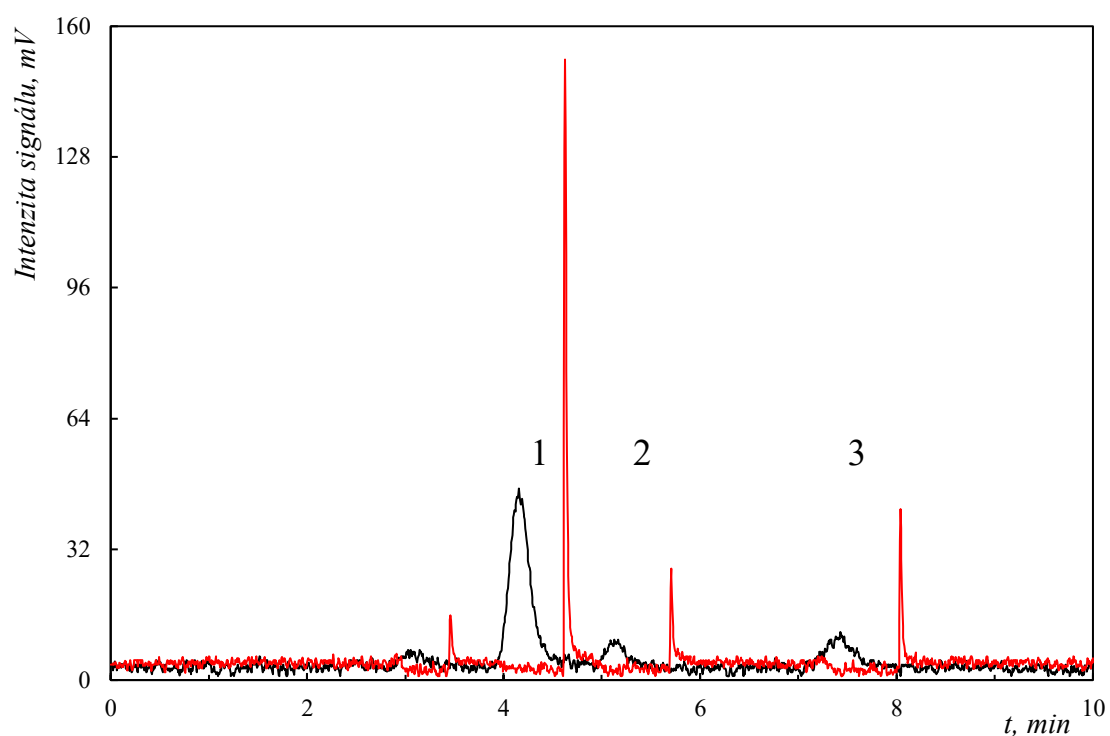
Tab. 4.7.: Stanovené koncentrace specií As v CRM NIST-2669

CRM NIST-2669		Certifikát	HPLC-HG-tDBD-AAS	
Level I.	Specie As	c ($\mu\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$)	c ($\mu\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$)	Výtěžnost (%)
	TMA ₅ O*	–	–	–
	iAs(tot.)**	3,88	4,06 ± 0,25	105
	MMA	1,87 ± 0,39	1,97 ± 0,02	105
	DMA	3,47 ± 0,41	2,99 ± 0,19	86
Level II.	Specie As	c ($\mu\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$)	c ($\mu\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$)	Výtěžnost (%)
	TMA ₅ O	1,94 ± 0,27	2,04 ± 0,47	105
	iAs(tot.)*	11,19	12,45 ± 0,08	111
	MMA	7,18 ± 0,56	7,86 ± 0,14	109
	DMA	25,30 ± 0,70	26,47 ± 0,12	105

* Koncentrace nebyla uvedena v certifikátu

**Hodnota byla stanovena jako součet certifikovaných hodnot pro iAs^{III} a iAs^V

Byly stanoveny koncentrace zájmových specií As ve dvou verzích referenčního materiálu NIST-2669 s matricí lidské moči, které se lišily v koncentraci zájmových specií. V jeho koncentrovanější verzi (Level II.) je certifikována hodnota koncentrace pro TMA₅O, což bylo důležité pro validaci metody s před-oxidací vzorku. Měření tohoto referenčního materiálu byla provedena pouze v prekoncentračním režimu (Obr. 4.20.). Oba referenční materiály byly před analýzou podrobeny před-oxidací 3% H₂O₂. V NIST-2669 level I. hodnota koncentrace TMA₅O nebyla certifikována a ani při měření metodou HPLC-HG-tDBD-AAS nebyla přítomnost této specie v CRM nalezena. U ostatních specií v této verzi CRM stanovené koncentrace odpovídaly hodnotám uvedeným v certifikátu. U verze NIST-2669 Level II. byly úspěšně stanovené koncentrace všech čtyř zájmových specií As, které odpovídaly hodnotám uvedeným v certifikátu (Tab. 4.7.). Metoda HPLC-HG-tDBD-AAS s před-oxidací vzorku byla vhodná pro separaci a stanovení koncentrací specií TMA₅O, DMA, MMA a iAs(tot.) v obou verzích referenčního materiálu NIST-2669.



Obr. 4.21.: Chromatogram online měření (—) a prekoncentračního měření (—) CRM TORT-3 (eluční pořadí: DMA (1), MMA (2), iAs(tot.) (3)), průtok argonu $72 \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$, průtok kyslíku $7 \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$

Tab. 4.8.: Stanovené koncentrace specií As v CRM TORT-3

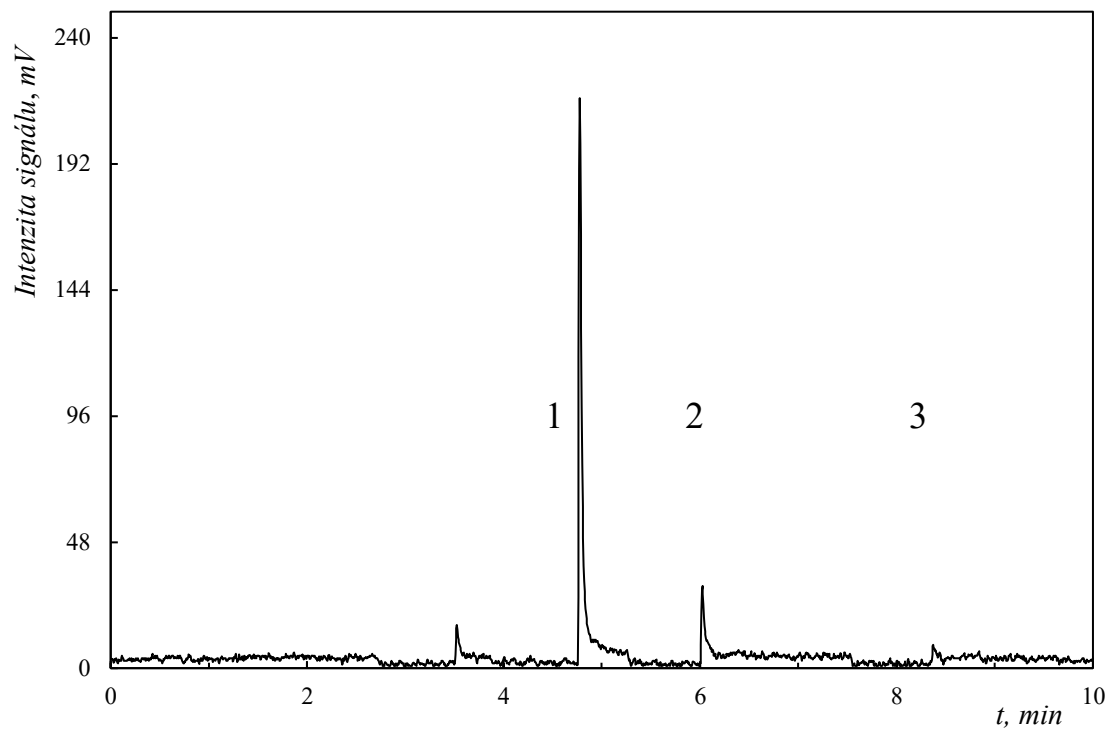
CRM TORT-3		Konsenzus*	HPLC-HG-tDBD-AAS	
Online režim	Specie As	c ($\text{mg} \cdot \text{dm}^{-3}$)	c ($\text{mg} \cdot \text{dm}^{-3}$)	Výtěžnost (%)
	iAs(tot.)	$0,624 \pm 0,02$	$0,652 \pm 27,28$	105
	MMA	$0,360 \pm 0,03$	$0,372 \pm 12,01$	103
	DMA	$3,790 \pm 0,35$	$2,613 \pm 15,33$	69
Prekoncentrační režim	Specie As	c ($\text{mg} \cdot \text{dm}^{-3}$)	c ($\text{mg} \cdot \text{dm}^{-3}$)	Výtěžnost (%)
	iAs(tot.)	$0,624 \pm 0,02$	$0,603 \pm 17,00$	97
	MMA	$0,360 \pm 0,03$	$0,362 \pm 8,94$	101
	DMA	$3,790 \pm 0,35$	$2,620 \pm 70,91$	69

*Konsenzuální hodnoty koncentrací specií As pro danou metodu extrakce jsou převzaty z [57]

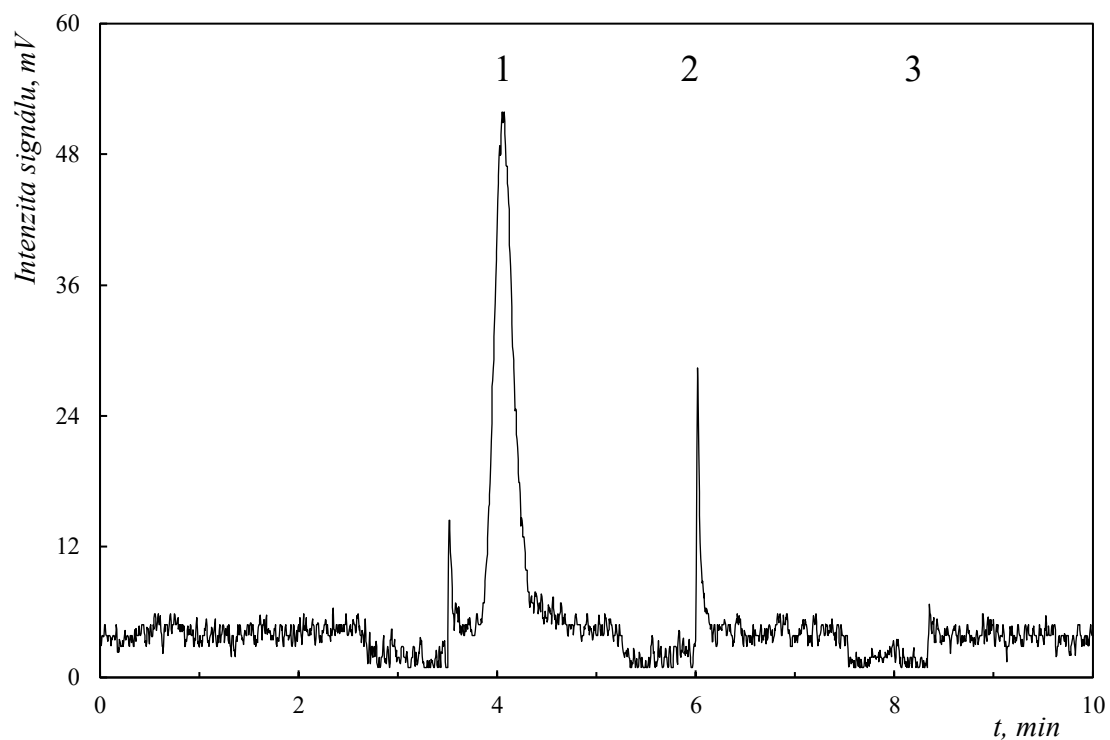
K ověření použitelnosti vyvinuté HPLC-HG-tDBD-AAS metody byly dále použity i pevné certifikované referenční materiály s maticí živočichů mořského původu. Specie As z

nich musely být nejprve extrahovány. Optimalizace metody extrakce nebyla předmětem této práce, byla použita doporučená metoda, jež byla dříve využita pro stejné CRM v rámci mezilaboratorního porovnávání. Metoda je detailně popsána v práci [57]. Rovněž hodnoty, ke kterým jsou vztahovány výsledky dosažené v této diplomové práci (konsenzuální hodnoty) pro tyto materiály (tabulky 4.8. a 4.9.) jsou převzaty z této práce [57].

V referenčním materiálu TORT-3 byly koncentrace specií As v řádech stovek $\mu\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$ až jednotek $\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$. Tento referenční materiál byl pro účely online měření ředěn přibližně 80x a při měření v prekoncentračním režimu byl ředěn asi 160x vzhledem k LDR této metody. Koncentrace v TORT-3 byly stanoveny nejprve v online režimu a následně v prekoncentračním režimu a výsledky v obou režimech byly porovnány (Obr. 4.21.). Ředění CRM bylo v případě MMA a iAs(tot.) dostatečné a stanovené koncentrace obou těchto specií se pro oba režimy shodují s hodnotami konsenzuálními (Tab. 4.8.). U DMA dosahovala stanovená koncentrace při použití obou režimů měření asi 70 % hodnoty konsenzuální. Při téměř shodných hodnotách koncentrace stanovených pro DMA v TORT-3 pomocí online i prekoncentračního režimu, došlo k chybě zřejmě ještě před samotnou analýzou pomocí metody HPLC-HG-tDBD-AAS. Vysvětlením může být nedostatečná extrakce DMA z referenčního materiálu při přípravě vzorku. Krok extrakce byl proveden dle instrukcí obecné extrakční metody vyvinuté pro tento typ referenčních materiálů. Obecně vzato má krok extrakce velký vliv na výsledky analýzy, což se v tomto případě pro DMA potvrdilo.



Obr. 4.22.: Chromatogram prekoncentračního měření CRM DOLT-5 (eluční pořadí: DMA (1), MMA (2), iAs(tot.) (3)), průtok argonu $72 \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$, průtok kyslíku $7 \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$



Obr. 4.23.: Chromatogram hybridního měření CRM DOLT-5 (eluční pořadí: DMA (1), MMA (2), iAs(tot.) (3)), průtok argonu $72 \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$, průtok kyslíku $7 \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$

Tab. 4.9.: Stanovené koncentrace specií As v CRM DOLT-5

CRM DOLT-5		Konsenzus*	HPLC-HG-tDBD-AAS	
Prekoncentrační mód	Specie As	c (mg·dm ⁻³)	c (mg·dm ⁻³)	Výtěžnost (%)
	iAs (tot.)	0,033 ± 0,00	0,046 ± 0,01	138
	MMA	0,249 ± 0,03	0,251 ± 0,16	101
	DMA	3,31 ± 0,22	2,50 ± 0,46	76
Hybridní mód	Specie As	c (mg·dm ⁻³)	c (mg·dm ⁻³)	Výtěžnost (%)
	iAs (tot.)	0,033 ± 0,00	0,039 ± 0,02	119
	MMA	0,249 ± 0,03	0,271 ± 0,09	109
	DMA	3,31 ± 0,22	3,16 ± 0,77	96

*Konsenzuální hodnoty koncentrací specií As pro danou metodu extrakce jsou převzaty z [57]

Koncentrace specií As byly v referenčním materiálu DOLT-5 podobně vysoké jako u TORT-3. Výjimkou byla koncentrace iAs(tot.), která byla v CRM DOLT-5 asi 20x nižší. Právě kvůli nižší koncentraci iAs(tot.) byl referenční materiál ředěn pouze 80x pro měření v prekoncentračním režimu, což mělo negativní vliv na stanovení koncentrace DMA v tomto režimu, jelikož koncentrace DMA byla vzhledem k LDR i po ředění stále příliš vysoká. Výtěžnost DMA v prekoncentračním režimu byl tedy pouze 78 %. Tento problém byl řešen aplikací tzv. hybridního režimu, kdy pík pro DMA byl měřen v online režimu a prekoncentrovány byly pouze specie MMA a iAs(tot.), u kterých k překročení LDR nedocházelo. Díky aplikaci hybridního módu došlo k zlepšení výtěžnosti DMA na 96 %. Stanovené koncentrace pro iAs(tot.) se v obou režimech měření od koncentrací uvedených v konsenzu výrazně liší. Důvodem pravděpodobně byla nízká koncentrace iAs(tot.) po ředění, které ale bylo nutné pro stanovení DMA. Odhadovaná koncentrace iAs(tot.) po ředění byla ale stále nad LOD metody.

5. Závěr

Podářilo se splnit všechny stanovené cíle diplomové práce. Nejprve byla porovnána účinnost atomizace nejvýznamnějších specií As, které tvoří těkavé sloučeniny a to iAs^V , MMA a DMA. Porovnání účinnost atomizace bylo uskutečněno ve dvou typech hydridových atomizátorů, konkrétně se jednalo o MMQTA a DBD atomizátor. U obou zmíněných atomizátorů byla také porovnávána citlivost stanovení při použití argonu a helia jako nosných plynů. Pro MMQTA byla provedena optimalizace průtoku vzduchu do atomizátoru pro oba zmíněné nosné plyny. Z naměřených dat je zřejmé, že nejvyšší citlivosti dosahuje MMQTA atomizátor s heliem jako nosným plynem, naopak nejnižší citlivosti dosahuje DBD atomizátor s heliem jako nosným plynem. Citlivost stanovení specií As byla pro oba atomizátory srovnatelná při použití argonu jako nosného plynu. Argon je v porovnání s heliem ekonomicky zajímavou alternativou, ale není kompatibilní při speciální analýze s CT, která byla dalším předmětem studia této práce.

Dalším důležitým cílem této práce byla speciální analýza arsenu. Prvním studovaným přístupem ke speciální analýze bylo generování substituovaných hydridů s jejich následnou prekoncentrací a separací v CT. V tomto uspořádání bylo využíváno jako nosný plyn helium, jelikož argon za teplot kapalného dusíku v CT kapalní. Pro oba atomizátory byla ve spojení s CT stanovena citlivost stanovení specií As, která byla následně porovnána s výsledky citlivosti předešlého on-line měření pro helium jako nosný plyn a hodnoty citlivostí byly pro oba dva režimy srovnatelné, což svědčí o kvantitativním zachytu a uvolnění specií arsenu v CT. Porovnána byla také citlivost stanovení specií As pro oba atomizátory ve spojení s CT, která byla pro DBD atomizátor asi 3x nižší než pro MMQTA, což korelovalo s výsledky předešlých on-line měření. Pro DBD atomizátor bylo také testováno použití vodíku jako nosného plynu, které může být zajímavou ekonomickou alternativou k použití helia jako nosného plynu. Citlivost ve vodíku byla v porovnání s heliem srovnatelná. Nevýhodou při použití vodíku bylo zvýšení signálu pozadí dané nestabilitou vodíkového plazmatu a vyšší směrodatné odchylky měření, které vedly k nižší opakovatelnosti výsledků. Následně byly pro uspořádání HG-CT-MMQTA/DBD-AAS určeny analytické charakteristiky. Nejnižších LOD dosahoval MMQTA, kdy LOD byly asi 3x nižší než ty pro DBD atomizátor s použitím helia nebo vodíku jako nosného plynu. To korelovalo s naměřenou citlivostí, která je pro DBD atomizátor v heliu výrazně nižší než pro MMQTA. Stanoveny byly také koncentrace specií As ve vybraných referenčních materiálech. Zejména kvůli nízkým koncentracím

specií As v těchto referenčních materiálech poskytovalo lepší výsledky spojení CT s MMQTA atomizátorem.

Druhým studovaným přístupem ke speciální analýze byla separace specií As pomocí HPLC s využitím postkolonového generování hydridů a následnou atomizací v DBD atomizátoru. Byla stanovena účinnost postkolonové redukce oproti předredukci L-cysteinem, která byla používána v předchozích experimentech a výsledky obou redukčních metod byly pro všechny specie As srovnatelné. Následně byly optimalizovány podmínky HPLC separace umožňující separovat specie iAs^{III} , DMA, MMA a iAs^V během 10 minutové analýzy. Za těchto podmínek ale docházelo ke koeluci TMA₂O s iAs^{III} . Pokud byl ve vzorku přítomný TMA₂O, probíhala proto speciální analýza s před-oxidací vzorku pomocí H₂O₂ a přítomný iAs^{III} byl kvantitativně převeden na iAs^V . Pokud ve vzorku TMA₂O přítomný nebyl, probíhala speciální analýza bez před-oxidace vzorku a byla umožněna speciace obou anorganických forem As.

Posledním cílem práce byla speciální analýza As s HPLC separací, postkolonovým generováním hydridů a *in-situ* prekoncentrací v DBD atomizátoru. Byla kvantifikována účinnost prekoncentrace pro všechny zájmové specie As, jež byla za daných experimentálních podmínek vyšší než 90 % pro iAs^{III} , iAs^V , MMA a DMA. Pro TMA₂O pak byla stanovena prekoncentrační účinnost 68 %. Následně byly pro uspořádání HPLC-HG-DBD-AAS určeny analytické charakteristiky. Při prekoncentraci v DBD atomizátoru byly naměřené LOD asi 5x nižší než pro on-line měření. Byl určen také LDR metody, který byl pro iAs^{III} , iAs^V , MMA a DMA do koncentrace 20 $\mu g \cdot dm^{-3}$ a pro TMA₂O do 30 $\mu g \cdot dm^{-3}$. Následně byly touto metodou stanoveny koncentrace specií As ve vybraných certifikovaných referenčních materiálech. V závislosti na koncentracích specií As v těchto materiálech byl při měření používán online režim nebo prekoncentrační režim. Pokud to bylo možné, byly koncentrace specií As v referenčních materiálech stanoveny pomocí obou režimů měření a výsledky byly následně porovnány. Pro referenční materiál NIST-2669, ve kterém je koncentrace specií As příliš nízká vzhledem k LOD online režimu, bylo vhodnější použití prekoncentračního režimu. Při měření referenčního materiálu TORT-3 byly použity oba režimy měření s podobnou výtěžností. V referenčním materiálu DOLT-5 byla koncentrace DMA asi 100x vyšší než koncentrace iAs^V . V tomto případě byl využitý tzv. hybridní mód, kdy DMA nebyla na rozdíl od ostatních specií As prekoncentrována. Aplikací hybridního módu došlo ke zlepšení výtěžnosti pro DMA.

Seznam použité literatury

- [1] Rund, S.A.C.G.; Consultant, S.: Arsenic and arsenic compounds. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans* **100 C**, 41–93 (2011).
- [2] Duker, A.A.; Carranza, E.J.M.; Hale, M.: Arsenic geochemistry and health. *Environment International* **31**, 631–641 (2005).
- [3] World Health Organisation: *Arsenic in drinking-water*. WHO Guidelines (WHO/SDE/WSH/03.04/75/Rev/1) 2003.
- [4] Lomax, C.; Liu, W.J.; Wu, L. et al.: Methylated arsenic species in plants originate from soil microorganisms. *New Phytologist* **193**, 665–672 (2012).
- [5] Kumaresan, M.; Riyazuddin, P.: Overview of speciation chemistry of arsenic. *Current Science* **80**, 837–846 (2001).
- [6] Magellan, K.; Barral-Fraga, L.; Rovira, M. et al.: Behavioural and physical effects of arsenic exposure in fish are aggravated by aquatic algae. *Aquatic Toxicology* **156**, 116–124 (2014).
- [7] Ruttens, A.; Blanpain, A.C.; De Temmerman, L. et al.: Arsenic speciation in food in Belgium. Part 1: Fish, molluscs and crustaceans. *Journal of Geochemical Exploration* **121**, 55–61 (2012).
- [8] Zhu, M.; Zeng, X.; Jiang, Y. et al.: Determination of arsenic speciation and the possible source of methylated arsenic in Panax Notoginseng. *Chemosphere* **168**, 1677–1683 (2017).
- [9] Musil, S.: Speciační analýza arsenu založená na generování hydridů. *Chemické listy* **114**, 374–381 (2020).
- [10] Hernández-Zavala, A.; Matoušek, T.; Drobná, Z. et al.: Speciation analysis of arsenic in biological matrices by automated hydride generation-cryotrapping-atomic absorption spectrometry with multiple microflame quartz tube atomizer (multiatomizer). *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **23**, 342–351 (2008).
- [11] Raml, R.; Rumpler, A.; Goessler, W. et al.: Thio-dimethylarsinate is a common metabolite in urine samples from arsenic-exposed women in Bangladesh. *Toxicology and Applied Pharmacology* **222**, 374–380 (2007).

- [12] Valenzuela, O.L.; Borja-Aburto, V.H.; Garcia-Vargas, G.G. et al.: Urinary trivalent methylated arsenic species in a population chronically exposed to inorganic arsenic. *Environmental Health Perspectives* **113**, 250–254 (2005).
- [13] Hayakawa, T.; Kobayashi, Y.; Cui, X. et al.: A new metabolic pathway of arsenite: Arsenic-glutathione complexes are substrates for human arsenic methyltransferase Cyt19. *Archives of Toxicology* **79**, 183–191 (2005).
- [14] Singh, A.P.; Goel, R.K.; Kaur, T.: Mechanisms pertaining to arsenic toxicity. *Toxicology International* **18**, 87–93 (2011).
- [15] Mass, M.J.; Tennant, A.; Roop, B.C. et al.: Methylated trivalent arsenic species are genotoxic. *Chemical Research in Toxicology* **14**, 355–361 (2001).
- [16] Sturgeon, R.E.; Mester, Z.: Analytical Applications of Volatile Metal Derivatives. *Applied Spectroscopy* **56**, 202–13 (2002).
- [17] D'Ulivo, A.; Sturgeon, R.E.: *Vapor Generation Techniques for Trace Element Analysis*. Oxford, Elsevier 2022.
- [18] Dědina, J.: *Chapter: Generation of Volatile Compounds for Analytical Atomic Spectroscopy*. Encyclopedia of Analytical Chemistry, Chichester, John Wiley & Sons 2010.
- [19] Yan, X.P.; Ni, Z.M.: *Vapour generation atomic absorption spectrometry*. *Analytica Chimica Acta* **291**, 89–105 (1994).
- [20] Marschner, K.; Musil, S.; Dědina, J.: Demethylation of Methylated Arsenic Species during Generation of Arsanes with Tetrahydridoborate in Acidic Media. *Analytical Chemistry* **88**, 6366–6373 (2016).
- [21] Correia, C.L.T.; Gonçalves, R.A.; Azevedo, M.S. et al.: Determination of total arsenic in seawater by hydride generation atomic fluorescence spectrometry. *Microchemical Journal* **96**, 157–160 (2010).
- [22] Šlejkovec, Z.; Van Elteren, J.T.; Woroniecka, U.D.: Underestimation of the total arsenic concentration by hydride generation techniques as a consequence of the incomplete mineralization of arsenobetaine in acid digestion procedures. *Analytica Chimica Acta* **443**, 277–282 (2001).
- [23] Cordos, E.A.; Frentiu, T.; Ponta, M. et al.: Optimisation of analytical parameters in inorganic arsenic (III and V) speciation by hydride generation using L-cysteine as

prereducing agent in diluted HCl medium. *Chemical Speciation and Bioavailability* **18**, 1–9 (2006).

[24] Matoušek, T.; Hernández-Zavala, A.; Svoboda, M. et al.: 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 multi. *Spectrochimica Acta - Part B* **63**, 396–406 (2008).

[25] Pétursdóttir, Á.H.; Gunnlaugsdóttir, H.; Jörundsdóttir, H. et al.: Determination of inorganic arsenic in seafood: Emphasizing the need for certified reference materials. *Pure and Applied Chemistry* **84**, 191–202 (2012).

[26] Ellwood, M.J.; Maher, W.A.: An automated hydride generation-cryogenic trapping-ICP-MS system for measuring inorganic and methylated Ge, Sb and As species in marine and fresh waters. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **17**, 197–203 (2002).

[27] Skoog, Douglas A., West, Donald M., Holler, F. James, Crouch, S.R *Fundamentals of Analytical Chemistry*. 9. vyd., Brooks/Cole, Cengage Learning 2014.

[28] Hsieh, Y.J.; Jiang, S.J.: Application of HPLC-ICP-MS and HPLC-ESI-MS procedures for arsenic speciation in seaweeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **60**, 2083–2089 (2012).

[29] Richter, J.; Lischka, S.; Piechotta, C.: Analysis of arsenic species in fish after derivatization by GC-MS. *Talanta* **101**, 524–529 (2012).

[30] Černohorský, T.; Červený, V.; Dočekal, B. et al.: *Atomová absorpční spektrometrie kurz AAS I*. Spektroskopická společnost Jana Marka Marci, Praha 2015.

[31] 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).

[32] Kratzer, J.; Zelina, O.; Svoboda, M. et al.: Atomization of Bismuthane in a Dielectric Barrier Discharge: A Mechanistic Study. *Analytical Chemistry* **88**, 1804–1811 (2016).

[33] Shubert-Jacobs, M.; Welz, B.: Investigations on atomization mechanisms in hydride-generation atomic absorption spectrometry. *Journal of Analytical Chemistry* **324.8**, 832–838. (1986).

- [34] Zhu, Z.; Zhang, S.; Lv, Y. et al.: Atomization of hydride with a low-temperature, atmospheric pressure dielectric barrier discharge and its application to arsenic speciation with atomic absorption spectrometry. *Analytical Chemistry* **78**, 865–872 (2006).
- [35] 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* **57**, 451–462 (2002).
- [36] Meyer, C.; Müller, S.; Gurevich, E.L. et al.: Dielectric barrier discharges in analytical chemistry. *Analyst* **136**, 2427–2440 (2011).
- [37] Brandt, S.; Schütz, A.; Klute, F.D. et al.: Dielectric barrier discharges applied for optical spectrometry. *Spectrochimica Acta - Part B* **123**, 6–32 (2016).
- [38] Straka, M.; Burhenn, S.; Marschner, K. et al.: Novel designs of dielectric barrier discharge hydride atomizers for atomic spectrometry. *Spectrochimica Acta - Part B* **146**, 69–76 (2018).
- [39] Niu, G.; Knodel, A.; Burhenn, S. et al.: Review: Miniature dielectric barrier discharge (DBD) in analytical atomic spectrometry. *Analytica Chimica Acta* **1147**, 211–239 (2021).
- [40] Michalke, B.: Element speciation definitions, analytical methodology, and some examples. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **56**, 122–139 (2003).
- [41] Szpunar-Łobińska, J.; Witte, C.; Łobinski, R. et al.: Separation techniques in speciation analysis for organometallic species. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* **351**, 351–377 (1995).
- [42] Marschner, K.; Musil, S.; Dědina, J.: Achieving 100% Efficient Postcolumn Hydride Generation for As Speciation Analysis by Atomic Fluorescence Spectrometry. *Analytical Chemistry* **88**, 4041–4047 (2016).
- [43] Dědina, J.; Tsalev, L.D.: *Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry*. Chichester, Wiley & Sons, Inc. 1995.
- [44] Raab, A.; Feldmann, J.: *Encyclopedia of Analytical Science (Second Edition)*, Elsevier 2005.
- [45] Gonzalez, A.; Cervera, M.L.; Armenta, S. et al.: A review of non-chromatographic methods for speciation analysis. *Analytica Chimica Acta* **636**, 129–157 (2009).

- [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* **63**, 685–691 (2008).
- [47] Černohorský, T.; Červený, V.; Dempířová, L. et al.: *Atomová absorpční spektrometrie a příbuzné metody kurz AAS II*. Spektroskopická společnost Jana Marka Marci, Praha 2019.
- [48] Matusiewicz, H.; Sturgeon, R.E.: Atomic spectrometric detection of hydride forming elements following in situ trapping within a graphite furnace. *Spectrochimica Acta - Part B* **51**, 377–397 (1996).
- [49] Novák, P.; Dědina, J.; Kratzer, J.: Preconcentration and Atomization of Arsane in a Dielectric Barrier Discharge with Detection by Atomic Absorption Spectrometry. *Analytical Chemistry* **88**, 6064–6070 (2016).
- [50] Zurynková, P.; Dědina, J.; Kratzer, J.: Trace determination of antimony by hydride generation atomic absorption spectrometry with analyte preconcentration/atomization in a dielectric barrier discharge atomizer. *Analytica Chimica Acta* **1010**, 11–9 (2018).
- [51] Kratzer, J.; Musil, S.; Dědina, J.: Feasibility of: In situ trapping of selenium hydride in a DBD atomizer for ultrasensitive Se determination by atomic absorption spectrometry studied with a ⁷⁵Se radioactive indicator. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **34**, 193–202 (2019).
- [52] Yao, Z.; Liu, M.; Liu, J. et al.: Sensitivity enhancement of inorganic arsenic analysis by: In situ microplasma preconcentration coupled with liquid chromatography atomic fluorescence spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **35**, 1654–1663 (2020).
- [53] Kratzer, J.: Ultratrace determination of lead by hydride generation in-atomizer trapping atomic absorption spectrometry: Optimization of plumbane generation and analyte preconcentration in a quartz trap-and-atomizer device. *Spectrochimica Acta - Part B* **71–72**, 40–47 (2012).
- [54] Kratzer, J.; Dědina, J.: Arsine and selenium hydride trapping in a novel quartz device for atomic-absorption spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **388**, 793–800 (2007).

- [55] Fernandes de Oliveira, A.; Svoboda, M.; Benada, O. et al.: Ultratrace determination of arsenic by hydride generation atomic absorption spectrometry with preconcentration on gold nanoparticles. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **37**, 620–631 (2022).
- [56] Dědina, J.; Matoušek, T.: Multiple microflame - a new approach to hydride atomization for atomic absorption spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **15**, 301–304 (2000).
- [57] Gajdosechova, Z.; Grinberg, P.; Kubachka, K. et al.: Determination of inorganic As, DMA and MMA in marine and terrestrial tissue samples: a consensus extraction approach. *Environmental Chemistry* **20**, 5–17 (2023).
- [58] de Moraes Flores, É.M.; Medeiros Nunes, A.; Luiz Dressler, V. et al.: Multiple microflame quartz tube atomizer: Study and minimization of interferences in quartz tube atomizers in hydride generation atomic absorption spectrometry. *Spectrochimica Acta - Part B* **64**, 173–8 (2009).
- [59] Burhenn, S.; Kratzer, J.; Klute, F.D. et al.: Atomization of arsenic hydride in a planar dielectric barrier discharge: Behavior of As atoms studied by temporally and spatially resolved optical emission spectrometry. *Spectrochimica Acta - Part B* **152**, 68–73 (2019).
- [60] Kratzer, J.; Lacko, M.; Dryahina, K. et al.: Atomization of As and Se volatile species in a dielectric barrier discharge atomizer after hydride generation: Fate of analyte studied by selected ion flow tube mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* **1190**, 1-8 (2022).
- [61] Mukta, S.; Gundlach-Graham, A.: Ion chromatography - nitrogen-sustained microwave inductively coupled atmospheric pressure plasma - mass spectrometry (IC-MICAP-MS) for arsenic speciation analysis in rice. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **39**, 491–499 (2024).
- [62] Mao, X.; Qi, Y.; Huang, J. et al.: Ambient-Temperature Trap/Release of Arsenic by Dielectric Barrier Discharge and Its Application to Ultratrace Arsenic Determination in Surface Water Followed by Atomic Fluorescence Spectrometry. *Analytical Chemistry* **88**, 4147–4152 (2016).