

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta
Katedra analytické chemie

Doktorský studijní program: Analytická chemie

Autoreferát disertační práce



UV-fotochemické generování těkavých sloučenin selenu
pro potřeby ultrastopové analýzy metodou AAS

Mgr. Marcela Rybínová

Školitel: Doc. RNDr. Petr Rychlovský, CSc.

Školitel-konzultant: RNDr. Václav Červený, Ph.D.

Praha 2016

Disertační práce byla vypracována na Katedře analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze (Hlavova 2030/8, 128 43, Praha 2).

Finančně byla disertační práce podporována z následujících projektů Univerzity Karlovy v Praze: GAUK 228214, UNCE 204025/2012 a SVV (265201, 267215, 260084, 260205, 260317). Dále byla práce podporována z projektu Grantové agentury ČR (č. projektu: P206/14-23532S).

Abstrakt

Disertační práce se zabývá studiem UV-fotochemického generování těkavých sloučenin (UV-PVG) ve spojení s atomovou absorpční spektrometrií (AAS). S využitím modelového analytu selenu (Se(IV)) byla provedena celá řada experimentů přispívajících k rozšíření dosavadních poznatků o dané problematice.

V první fázi výzkumu byla sestavena aparatura pro UV-PVG v režimu kontinuální průtokové analýzy propojená s detekcí AAS se zevně vyhřívaným křemenným atomizátorem. Důraz byl kladen na konstrukci generátoru těkavých sloučenin neboli na UV-fotoreaktor, kdy byly jako reakční cívky využity teflonové hadičky a křemenné trubičky různých rozměrů. Po kompletaci aparatury následovala optimalizace pracovních podmínek (především koncentrace a druh fotochemického činidla i dalších činidel zvyšujících analytický signál; průtoková rychlost nosného plynu a vodíku; průtoková rychlost vzorku) a určeny byly základní analytické charakteristiky stanovení selenu navrženou metodou. Z výsledků vyplynulo, že teflonové reakční cívky velmi dobře konkurují těm křemenným. Správnost metody byla úspěšně potvrzena analýzou certifikovaného referenčního materiálu, praktická využitelnost byla ověřována analýzou vzorků s různorodou maticí. Stanovován byl obsah selenu ve vzorcích pitných vod a ve vybraných potravinových doplncích. Za účelem zjištění celkové účinnosti UV-PVG byla provedena série experimentů s radioaktivním indikátorem ⁷⁵Se. Kromě převodu analytu na těkavé sloučeniny bylo danou metodou možné sledovat distribuci analytu do jednotlivých částí aparatury. Dalšího snížení mezí detekce a citlivosti bylo dosaženo propojením UV-PVG s *in situ* záchytem těkavých sloučenin v grafitové kyvetě před vlastní elektrotermickou atomizací. Provedena byla také interferenční studie, kdy byl zkoumán vliv vybraných minerálních kyselin a solí, přechodných kovů nebo ostatních hydridotvorných prvků na stanovení selenu.

Pro srovnání byla značná část experimentů uskutečněna s využitím tradičního chemického generování těkavých sloučenin s tetrahydridoboritanem sodným jako redukčním činidlem. Analytické charakteristiky získané za optimalizovaných pracovních podmínek či dosažené účinnosti jasně ukázaly, že je UV-PVG plně alternativní ke konvenčnímu přístupu ke generování těkavých sloučenin. Jako hlavní nedostatek se na současné úrovni poznání jeví celkově nižší odolnost vůči interferenčním vlivům.

Obsah

1 ÚVOD	5
2 CÍLE PRÁCE	7
3 MATERIÁL A METODIKA	8
3.1 Přístroje a zařízení	8
3.1.1 UV-fotoreaktor	8
3.1.2 Atomový absorpční spektrometr	9
3.1.3 Měření radioaktivity	9
3.2 Procedura	9
3.2.1 Generování těkavých sloučenin	9
3.2.2 Experimenty s radioaktivním indikátorem ^{75}Se	11
4 VÝSLEDKY A DISKUZE	11
4.1 Optimalizace	11
4.2 Základní analytické charakteristiky	13
4.3 Analýza certifikovaného referenčního materiálu	14
4.4 Účinnost generování těkavých sloučenin	14
4.5 Analýza praktických vzorků	17
4.6 <i>In situ</i> záchyt těkavých sloučenin v grafitové kyvetě	18
4.7 Interferenční studie	20
5 ZÁVĚRY	21
6 POUŽITÁ LITERATURA	24

1 ÚVOD

Spektrometrické metody patří mezi nejvýznamnější analytické přístupy využívané pro **(ultra)stopovou prvkovou analýzu**. Přestože se v posledních letech do popředí zájmu dostávají zejména metody využívající jako budící zdroj indukčně vázané plazma, své uplatnění stále nachází i **atomová absorpční spektrometrie (AAS)**. Vyniká především relativně snadným konstrukčním uspořádáním a tím i nižšími pořizovacími a provozními náklady. Využívána bývá v několika variantách, které se liší způsobem provedení atomizace. Pro (ultra)stopovou analýzu je vhodná elektrotermická atomizace či atomizace v křemenných atomizátorech. Oba zmíněné typy lze účinně propojit s generováním těkavých sloučenin.

Selen je pro náš organismus velice důležitým a zajímavým stopovým prvkem. Může být esenciální i toxický, přičemž hranice rozlišující oba dva stavy je poměrně úzká¹. Toto dvojitě chování je jedním z důvodů, proč se stal selen předmětem mnoha studií. Zároveň je také jedním ze zástupců klasických hydridotvorných prvků, které lze poměrně snadno přeměnit na těkavé sloučeniny.

Techniky generování jsou s oblibou využívány již několik desítek let jako alternativa ke konvenčnímu dávkování kapalných vzorků. Jejich výhoda spočívá ve vysoké transportní účinnosti analytu do detekčního systému či v účinném odseparování matrice vzorku. V důsledku těchto jevů často dochází k omezení interferencí a ke snížení limitů detekce. Existuje několik způsobů, jak převést analyt z kondenzované fáze do fáze plynné. Široce aplikované je především **chemické generování (CVG)**, při kterém je analyt redukován na těkavou sloučeninu nejčastěji reakcí s tetrahydridoboritanem sodným v prostředí kyseliny chlorovodíkové (NaBH₄-HCl). I přes svou dlouholetou popularitu vykazuje CVG jisté nedostatky. Redukční činidlo NaBH₄ je poměrně drahé, nestabilní a připravit ho lze pouze v omezené čistotě (tím se samo stává potenciálním zdrojem kontaminací vzorku)^{2,3}.

Relativně novým přístupem ke generování těkavých sloučenin je **UV-fotochemické generování těkavých sloučenin (UV-PVG)**. Těkavé sloučeniny jsou v tomto případě generovány v důsledku působení UV-záření na kapalnou vzorek s obsahem analytu. Klíčovou roli přitom vedle UV-záření zastávají fotochemická činidla, používají se především organické kyseliny s nízkou molární molekulovou hmotností⁴⁻⁶. Reakční mechanismus vzniku těkavých sloučenin je díky složité povaze fotoreakcí stále předmětem diskuzí. Představeno bylo několik možných teorií. Jedna z nich předpokládá, že v důsledku

fotolytického rozkladu fotochemického činidla vznikají reaktivní volné radikály, které mají schopnost redukovat sledovaný analyt právě až za vzniku těkavých sloučenin⁴. Na základě teoretických kalkulací byl navržen i alternativní mechanismus bez přítomnosti radikálů⁷.

Rozlišujeme dva základní režimy generování – používají se metody přímého přenosu a metody spojené s kolekcí. Při prvním způsobu jsou těkavé sloučeniny uvolněné z kapalného vzorku přímo transportovány do atomizátoru⁸. Uplatnit lze tři různé varianty přímého přenosu, a sice kontinuální průtokovou analýzu^{4,9}, průtokovou injekční analýzu^{10,11} a dávkové uspořádání^{2,12}; varianta dávkového uspořádání je při UV-PVG využívána méně často. Pokud jde o kolekční mód, těkavé sloučeniny jsou nejprve zachytávány v různých kolekčních zařízeních. Až po ukončení generování (generování z celého dávkovaného objemu vzorku) dochází k atomizaci⁸. Kolekční techniky se zatím uplatnily při identifikaci těkavých specií (kolekce vymrazováním)^{4,13}. Za účelem zvýšení citlivosti stanovení byly těkavé sloučeniny některých analytů shromažďovány přímo v atomizátoru. Uplatněn byl zejména *in situ* záchyt těkavých sloučenin a následná atomizace v grafitové kyvetě (GF-AAS)^{10,14}. Vedle zlepšení citlivosti přináší *in situ* záchyt ve srovnání s přímou atomizací i některé další výhody. Za přednost je považována eliminace vlivu kinetiky uvolňování těkavých sloučenin ze separátoru fází, omezení atomizačních interferencí či redukce vlivu fluktuací průtoku nosného plynu na získaný signál.

Základem aparatury pro UV-PVG je generátor těkavých sloučenin neboli **UV-fotoreaktor**. Představeny byly různé konstrukční typy. V průtokovém uspořádání je nejčastěji složen ze zdroje záření a z reakční cívky, kterou proudí vzorek. Jako zdroje záření se používají rtuťové UV-výbojky s různým tlakem uvnitř trubice a různým výkonem. Reakční cívky jsou vyráběny z teflonu^{4,15} nebo z křemene^{11,16}. Obvykle bývají kolem zdroje UV-záření ovinuty, k povrchu výbojky mohou být upevněny i jiným způsobem.

Celkový proces generování sestává z několika dílčích procesů, mezi které je řazena konverze analytu na těkavé sloučeniny, jejich uvolnění do plynné fáze (separace plyn-kapalina) a následný transport do detektoru. Výsledná **účinnost generování** je závislá na účinnostech jednotlivých kroků. K jejímu hodnocení lze přistupovat několika způsoby. Při nejobjektivnějším způsobu je využívána radioaktivně značená sloučenina analytu (radioaktivní indikátor). Účinnost je určována na základě porovnání radioaktivity příslušného radioaktivního indikátoru změřené ve vstupním roztoku (vzorek před UV-PVG) s aktivitou téhož indikátoru ve formě vygenerovaných těkavých sloučenin zachycených na vhodném sorbentu. Metoda dále umožňuje zmapovat distribuci příslušného radioizotopu (a tím pádem i studovaného analytu, protože jsou ve stejné formě) – kromě frakce analytu

převedené na těkavé sloučeniny je možné zjistit frakci analytu přecházející do kapalného odpadu či frakci ulpívající na různých površích aparatury^{17,18}.

Jedním z problémů konvenčního chemického generování jsou **interference** způsobené přechodnými kovy⁸. Vyskytují se zejména během generačního kroku v důsledku tvorby aktivního kovu (např. elementární forma kovu, sraženina nebo koloid), který adsorbuje a/nebo rozkládá těkavé sloučeniny analytu či samotné redukční činidlo NaBH_4 ^{8,19,20}. Další interference vyplývají z přítomnosti ostatních hydridotvorných prvků, které mohou být problematické hlavně v plynné fázi (v atomizátoru). Tolerance vůči potenciálním interferentům byla zkoumána i v souvislosti s UV-PVG^{4,12,15}. Ukázalo se, že závažné interference se objevují i při tomto způsobu generování. Mechanismy interferencí zatím nebyly plně objasněny, je však pravděpodobné, že se do značné míry shodují s těmi při CVG (např. konkurence mezi analytem a interferentem o redukující radikály, spolusrázení redukovaných forem interferentů s meziprodukty UV-PVG analytu apod.^{9,21}).

2 CÍLE PRÁCE

Hlavním cílem disertační práce bylo implementovat do laboratoře spektrometrických metod UV-fotochemické generování těkavých sloučenin a obohatit tím doposud využívanou škálu technik zavádění vzorku o novou alternativu. Záměrem bylo využít nejen poznatků z literatury, ale především pokusit se přispět k dalšímu rozvoji techniky. Vytýčeno bylo několik dílčích cílů:

- 1.) Sestavit aparaturu pro UV-fotochemické generování těkavých sloučenin v průtokovém uspořádání a propojit ji s atomovou absorpční spektrometrií se zevně vyhřívaným křemenným atomizátorem (UV-PVG/QF-AAS).
- 2.) Blíže se zaměřit na možná konstrukční řešení generátoru těkavých sloučenin.
- 3.) Optimalizovat experimentální podmínky pro modelový prvek selen a určit základní analytické charakteristiky stanovení selenu.
- 4.) Ověřit správnost navržené metody analýzou certifikovaného referenčního materiálu a vyzkoušet ji za účelem analýzy vybraných reálných vzorků (vzorky vod, potravinové doplňky).
- 5.) Zjistit účinnost UV-fotochemického generování těkavých sloučenin selenu zejména na základě experimentů s radioaktivním indikátorem ⁷⁵Se.

- 6.) Pokusit se snížit meze detekce a zvýšit citlivost stanovení selenu prostřednictvím *in situ* záchytu vygenerovaných těkavých sloučenin v grafitové kyvetě atomového absorpčního spektrometru (UV-PVG/GF-AAS) před vlastní elektrotermickou atomizací.
- 7.) Provést interferenční studii – sledovat vliv vybraných minerálních kyselin a solí, přechodných kovů nebo ostatních hydridotvorných prvků na stanovení selenu navrženou metodou.
- 8.) Provést celkové porovnání s tradičním chemickým generováním založeným na reakci s redukčním činidlem tetrahydridoboritanem sodným (porovnání základních analytických charakteristik, účinností či porovnání odolnosti vůči interferencím).

3 MATERIÁL A METODIKA

3.1 Přístroje a zařízení

3.1.1 UV-fotoreaktor

Při UV-PVG byly těkavé sloučeniny selenu generovány v průtokovém UV-fotoreaktoru složeném ze zdroje záření a z reakční cívky přichycené k jeho povrchu. Zdrojem UV-záření byla nízkotlaká rtuťová UV-výbojka trubcovitého typu (253,7 nm, 20 W, rozměry 610 mm x 152 mm x 108 mm) (Ushio, Japonsko). Reakční cívka byla zhotovena z teflonu nebo z křemene. Teflonové hadičky byly okolo UV-výbojky omotány přímo. Křemenné trubičky byly zahýbány do tvaru písmene „S“, spojeny kousky Tygonových hadiček, a přichyceny k povrchu výbojky běžnou stahovací kabelovou páskou.

Pro zjednodušení jsou jednotlivé reakční cívky (a potažmo i UV-fotoreaktory) v disertační práci označovány dle použitého materiálu a rozměrů jako:

- **Teflon I** (1,0 mm i.d./2,0 mm o.d.)
- **Teflon II** (1,0 mm i.d./1,4 mm o.d.)
- **Křemen I** (2,0 mm i.d./4,0 mm o.d.)
- **Křemen II** (0,5 mm i.d./2,0 mm o.d.)

3.1.2 Atomový absorpční spektrometr

Atomový absorpční spektrometr Unicam 939 Solaar (Unicam, UK) byl použit k detekci těkavých sloučenin selenu. Ke korekci nespecifické absorpce posloužila ve všech případech deuteriová výbojka (Cathodeon, UK). Jako zdroj primárního elektromagnetického záření byla povětšinou využívána výbojka s dutou katodou pro selen (napájecí proud 10 mA, šířka spektrálního intervalu 0,5 nm) (Heraeus, UK). Záření bylo detekováno na charakteristické vlnové délce 196,0 nm. Pouze při analýze reálných vzorků byla jako zdroj záření použita výbojka s velmi vysokou intenzitou záření, tzv. superlampa (Photron, Austrálie).

K atomizaci těkavých sloučenin byl používán především křemenný atomizátor ve tvaru písmene „T“ zevně vyhříváný na teplotu 950 °C. Pokud bylo UV-PVG kombinováno s *in situ* záchytem, byla atomizace prováděna v grafitovém atomizátoru GF 90 (Unicam, UK). Vnitřní povrch grafitové květy s prodlouženou životností byl modifikován vrstvou iridia.

3.1.3 Měření radioaktivity

Při experimentech s radioaktivním indikátorem ^{75}Se byl k měření radioaktivity (měřena *off-line*) používán gama spektrometr Minaxi Auto-Gamma 5000 (Packard Instrument Co., USA) vybavený polovodičovým detektorem studnicového typu zhotoveným z monokrystalu NaI(Tl). Rozsah měřených energií gama záření byl na analyzátoru nastaven v intervalu 60 – 467 keV, měření probíhalo po dobu 120 s.

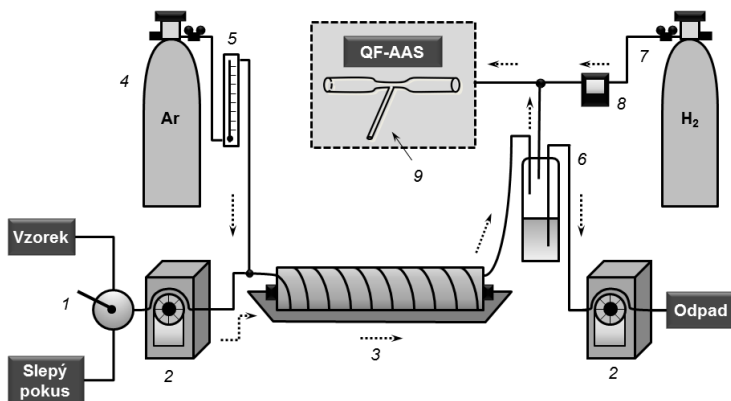
3.2 Procedura

3.2.1 Generování těkavých sloučenin

UV-fotochemické generování těkavých sloučenin bylo prováděno v režimu kontinuální průtokové analýzy. Před samotnou analýzou byl kapalný vzorek s obsahem selenu *off-line* smísen s fotochemickým činidlem. V některých případech byla navíc přidávána další činidla (zejména kyselina dusičná). Vzorky/slepé pokusy byly peristaltickou pumpou čerpány do UV-fotoreaktoru, kde byly v důsledku působení UV-záření generovány těkavé sloučeniny selenu. Přepínání mezi pumpováním vzorku a slepého pokusu bylo realizováno manuálně ovládaným dvoucestným ventilem. Reakční směs obohacená o těkavé sloučeniny byla na výstupu z UV-fotoreaktoru transportována do

separátoru fází s nuceným odtahem, kde se oddělovala kapalná a plynná fáze. Zatímco přebytečná kapalina byla řízeně odčerpávána druhou peristaltickou pumpou do odpadu, plynná fáze byla proudem nosného plynu (argon; zaváděn do proudu kapalného vzorku před UV-fotoreaktor) unášena do zevně vyhřívaného křemenného atomizátoru. Za účelem efektivní atomizace bylo do atomizátoru zaváděno malé množství vodíku. Schéma aparatury pro UV-PVG/QF-AAS je načrtnuto na **Obr. 1**.

Při *in situ* záchytu byla plynná fáze na výstupu ze separátoru fází vedena přes solenoidový ventil do předehřáté grafitové kyvety (nebo do odpadu). K usnadnění práce bylo využito automaticky ovládané dávkovací zařízení. Vodík tentokrát do atomizátoru zaváděn nebyl.



Obr. 1 Schéma aparatury pro UV-PVG/QF-AAS

1 – dvoucestný přepínací ventil; 2 – peristaltická pumpa; 3 – UV-fotoreaktor; 4 – tlaková lahev s nosným plynem; 5 – rotometr; 6 – separátor fází s nuceným odtahem; 7 – tlaková lahev s vodíkem; 8 – digitální regulátor průtoku plynů; 9 – křemenný atomizátor

Aparatura pro srovnávací chemické generování s NaBH_4 (taktéž v průtokovém uspořádání) byla modifikována. Především nebyl zapotřebí UV-fotoreaktor, nahrazen byl tetlonovou reakční cívkou. Při experimentech s křemenným atomizátorem nebyl do atomizátoru zaváděn přídatný vodík, dostatečné množství se uvolňovalo rozkladem redukčního činidla. Při zjišťování účinnosti (radioexperimenty) byla využita také varianta CVG v dávkovém uspořádání.

3.2.2 Experimenty s radioaktivním indikátorem ^{75}Se

Při experimentech s radioindikátorem byla využita stejná aparatura jako pro kontinuální generování popsaná v souvislosti s UV-PVG/QF-AAS. Na výstupu ze separátoru fázi však nebyl umístěn křemenný atomizátor, nýbrž dvě sériově zapojené plastové kolonky naplněné granulovaným aktivním uhlím. Po skončení generování byly celé kolonky umístěny do měřících nádobek a byla měřena jejich aktivita. Měřena byla také aktivita odpadních roztoků po generování a aktivita jednotlivých součástí aparatury, které přišly do styku s radioindikátorem selenu (např. čerpací a spojovací hadičky včetně spojek). Díky svým rozměrům nebylo možné do měřících nádobek umístit separátor fázi a reakční cívky. Z toho důvodu byla měřena aktivita ve výlužích získaných na základě opakovaného výplachu (trojnásobného) lučavkou královskou.

Účinnost UV-PVG byla určena na základě frakce analytu (% podíl ze vstupní aktivity změřené v kapalném vzorku před UV-PVG) zachycené na kolonkách. Obdobně byly ke vstupní aktivitě vztahovány aktivity zjištěné v kapalném odpadu a v jednotlivých částech aparatury. Pro získání celkové účinnosti UV-PVG selenu byly frakce analytu na kolonkách vztaženy k maximální dosažitelné účinnosti (účinnost CVG v dávkovém uspořádání).

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Optimalizace

Po sestavení aparatury bylo přikročeno k optimalizaci experimentálních parametrů kombinované metody UV-PVG/QF-AAS. Optimalizační studie s modelovým analytem ($5,0 \mu\text{g l}^{-1} \text{Se(IV)}$) byla provedena pro všechny čtyři typy UV-fotoreaktorů (Teflon I, II a Křemen I, II). Optimalizována byla délka reakční cívky, druh a koncentrace fotochemického činidla (testována byla kyselina mravenčí a kyselina octová), průtokové rychlosti použitých plynů (argon, vodík), průtoková rychlost vzorku, koncentrace kyseliny dusičné. Kyselina dusičná byla do analyzovaných vzorků přidávána za účelem až několikanásobného zvýšení analytického signálu selenu (většina experimentů byla prováděna jak s přídavkem kyseliny dusičné, tak bez něj). Je potřeba zdůraznit, že ono zvýšení bylo pozorováno pouze v úzkém koncentračním rozmezí kyseliny dusičné (cca $5,0 - 15,0 \text{ mmol l}^{-1}$ dle použitého UV-fotoreaktoru) a již malé odchylky od optimální hodnoty vedly k výrazným výkyvům signálu. To samé platilo i pro dusičnany. Funkce

HNO₃ zatím nebyla zcela objasněna. Za předpokladu, že bude přijata teorie o vzniku těkavých sloučenin v důsledku redukce analytu volnými radikály, kyselina dusičná by mohla ovlivňovat produkci/poměr radikálů, které se přímo podílí na redukci Se(IV). Navíc, těkavé produkty se při UV-PVG bez/s přidavkem kyseliny dusičné liší. Při UV-PVG pouze s kyselinou mravenčí je generován selenovodík a selenokarbonyl, přídavek kyseliny dusičné potlačuje vznik selenovodíku⁴.

Optimální hodnoty základních studovaných parametrů jsou shrnuty v **Tabulce 1**. Tradiční chemické generování těkavých sloučenin s redukčním činidlem NaBH₄ bylo zvoleno jako srovnávací metoda. Relevantní experimentální parametry CVG selenu byly v rámci studie taktéž optimalizovány (**Tabulka 2**).

Tabulka 1 Optimální pracovní podmínky pro stanovení selenu metodou UV-PVG/QF-AAS s kyselinou mravenčí jako fotochemickým činidlem^a

Typ UV-fotoreaktoru	Teflon I	Teflon II	Křemen I	Křemen II
Vnitřní/vnější průměr r. cívky (mm)	1,0/2,0	1,0/1,4	2,0/4,0	0,5/2,0
Délka reakční cívky (m)	1,5	3,5	2,8	4,5
Koncentrace HCOOH (mol l ⁻¹)	0,7	0,5	0,7	0,7
Průtoková rychlost argonu (ml min ⁻¹)	12/9	13/11	16/12	7/5
Průtoková rychlost vodíku (ml min ⁻¹)	2,0/3,0	2,0	3,0/4,0	2,0
Průtoková rychlost vzorku (ml min ⁻¹)	4,5	4,5	4,5	3,0
Koncentrace HNO ₃ (mmol l ⁻¹)	10,0	5,0	5,0	5,0

^a Hodnoty před/za lomítkem odpovídají stanovení selenu bez/s přidavkem HNO₃ do analyzovaných vzorků; kde není lomítko uvedeno, byly hodnoty stejné jako při generování pouze s HCOOH

Tabulka 2 Optimální experimentální podmínky pro stanovení selenu metodou CVG/QF-AAS

Parametr	Hodnota
Délka reakční cívky (m)	0,8
Koncentrace NaBH ₄ (hmot. %)	0,5 ^a
Průtoková rychlost NaBH ₄ (ml min ⁻¹)	0,7
Koncentrace HCl (mol l ⁻¹)	1,0
Průtoková rychlost vzorku (ml min ⁻¹)	4,5
Průtoková rychlost argonu (ml min ⁻¹)	20

^a Redukční činidlo NaBH₄ bylo stabilizováno 0,4% NaOH

4.2 Základní analytické charakteristiky

Za optimálních pracovních podmínek UV-PVG/QF-AAS byla provedena kalibrace. Pro všechny typy UV-fotoreaktorů byly kalibrační křivky lineární do koncentrace $15 \mu\text{g l}^{-1}$ Se(IV). Určeny byly základní analytické charakteristiky (**Tabulka 3**). Dle očekávání byly nižší meze detekce (LOD) a vyšší citlivosti dosaženy tehdy, pokud byla při generování využívána kyselina dusičná; LOD byly přibližně 1,5 – 3krát nižší oproti stavu bez přidavku této kyseliny. Opakovatelnost (relativní směrodatná odchylka – RSD (%)) byla na dobré úrovni, v žádném z případů nepřesáhla 2,4 % (měřeno pro $5,0 \mu\text{g l}^{-1}$ Se(IV)). Nejnižší hodnoty LOD a nejvyšší citlivosti (bez/s HNO_3) byly získány pro Teflon II. Teflon tedy v konkurenci pro UV-zářeni propustnějšího křemene obstál.

Pro porovnání jsou v posledním sloupci tabulky uvedeny hodnoty dosažené pro Se(IV) srovnávací metodou CVG/QF-AAS. Kalibrační křivka byla opět lineární do $15 \mu\text{g l}^{-1}$ Se(IV). Při CVG byly pozorovány vyšší odezvy na slepý pokus, což může souviset s omezenou čistotou redukčního činidla. Ve výsledku se tyto zvýšené absorbance projeví na dosažených mezích detekce. Platilo, že oproti UV-PVG s některými typy UV-fotoreaktorů byla při CVG dosažena horší mez detekce, ačkoliv citlivost byla vyšší.

Tabulka 3 Základní analytické charakteristiky dosažené pro Se(IV) metodami UV-PVG/QF-AAA a CVG/QF-AAS

UV-fotoreaktor	UV-PVG								CVG
	Teflon I		Teflon II		Křemen I		Křemen II		
Přídavek HNO_3	Ne	Ano	Ne	Ano	Ne	Ano	Ne	Ano	–
LOD (ng l^{-1})	102	36	46	27	48	33	81	44	50
LOQ (ng l^{-1})	341	121	153	89	160	111	271	147	165
Citlivost ($10^{-6} \text{ l ng}^{-1}$)	16	43	32	54	30	47	19	35	41
RSD (%)	0,8	1,6	1,5	1,4	1,1	1,9	2,4	2,2	1,5
LDR do ($\mu\text{g l}^{-1}$) (LOQ – do)	15	15	15	15	15	15	15	15	15

4.3 Analýza certifikovaného referenčního materiálu

Za účelem ověření správnosti navržené metody UV-PVG/QF-AAS byla provedena analýza certifikovaného referenčního materiálu (SRM NIST 1643e). Jak ukazují hodnoty v **Tabulce 4**, dosaženo bylo dobré shody mezi certifikovanou a experimentálně zjištěnou hodnotou.

Tabulka 4 Analýza standardního referenčního materiálu metodou UV-PVG/QF-AAS

SRM NIST 1643e	Obsah selenu ($\mu\text{g l}^{-1}$)
Certifikováno	$11,97 \pm 0,14$
Zjištěno (analýza bez HNO_3)	$11,42 \pm 0,40$
Zjištěno (analýza s HNO_3)	$11,33 \pm 0,44$

4.4 Účinnost generování těkavých sloučenin

Obecně je rozšířeno, že dílčí účinnosti pro tvorbu, separaci plyn-kapalina a transport těkavé sloučeniny (selenovodíku) jsou při CVG v podstatě kvantitativní, a proto může být daný přístup ke generování použit jako relativní měřítko účinnosti⁴. Při experimentech s radioaktivním indikátorem ^{75}Se , však byly řadou autorů dosaženy podstatně nižší hodnoty^{18,22,23}. Nekonzistentní výsledky mohou souviset s odlišnými přístupy k přípravě indikátoru či k jejich uchování²⁴. Navíc bylo zjištěno, že $^{75}\text{Se(IV)}$ uchovávaný v kyselině chlorovodíkové (běžný postup zvolený i pro potřeby disertační práce) může být poměrně rychle oxidován na hydridově neaktivní $^{75}\text{Se(VI)}$ ²⁵.

V rámci studie byla nejprve prostřednictvím chemického generování v dávkovém uspořádání ověřena nejvyšší možná účinnost generování dosažitelná s připraveným radioindikátorem ^{75}Se . V rozmezí několika týdnů byly zjištěny následující frakce ze vstupní aktivity použitého radioindikátoru: $76,6 \pm 0,9 \%$; $82,4 \pm 0,7 \%$; $80,1 \pm 3,3 \%$; $83,8 \pm 0,8 \%$; $79,0 \pm 0,8 \%$; $83,6 \pm 2,2 \%$. Dle očekávání se ani v jenom případě účinnost nepřibližovala 100 %.

Dále byla provedena série pokusů za účelem zhodnocení účinnosti UV-PVG. Zjišťovány byly frakce analytu (% vstupní aktivity) adsorbované na dvou sériově zapojených kolonkách naplněných aktivním uhlím. Žádná aktivita přitom nebyla zaznamenána na druhé kolonce, což svědčí o dobré sorpční schopnosti aktivního uhlí. Pro

získání celkové účinnosti UV-PVG selenu byly frakce analytu na kolonkách vztaženy k účinnosti CVG v dávkovém uspořádání (maximální dosažitelná účinnost). Po ukončení generování byla celá aparatura rozebrána a změřena byla aktivita jednotlivých jejích částí; měřena byla i aktivita kapalného odpadu. Tím bylo možné odhalit potenciální ztráty analytu v jednotlivých částech aparatury a otestovat vhodnost materiálů používaných k její konstrukci.

Dosažené výsledky jsou shrnuty v **Tabulce 5 A** (hodnoty pro UV-PVG bez kyseliny dusičné) a v **Tabulce 5 B** (hodnoty pro UV-PVG s kyselinou dusičnou). Celkové účinnosti se pohybovaly mezi 21,3 – 56,5 %. Průměrně vyšší účinnosti (57,7 – 67,1 %) byly zaznamenány při UV-PVG s navíc přidanou kyselinou dusičnou. Největší rozdíl v účinnostech mezi vzorky bez/s HNO₃ byl zaznamenán pro Teflon I, u něhož se hodnoty lišily více než dvojnásobně (cca 2,6krát). Takto významný nárůst poměrně dobře korespondoval s výsledky experimentů s neaktivním selenem (např. podobný rozdíl jako mezi LOD dosaženými při UV-PVG/QF-AAS). U ostatních cívek nebyl nárůst účinnosti v důsledku přidavku kyseliny dusičné tak výrazný, pohyboval se mezi 4,1 – 12,0 %.

Průměrně méně radioindikátoru selenu zůstávalo zachyceno v aparatuře tehdy, pokud byla do analyzovaných vzorků přidávána kyselina dusičná. To by mohlo souviset s vymývacími schopnostmi této kyseliny nebo s rozdílnými produkty generovanými bez/s HNO₃. Dle úvahy o rozdílných těkavých produktech by se tedy selenokarbonyl zachytával v aparatuře méně než selenovodík (při UV-PVG s kyselinou dusičnou vzniká pravděpodobně pouze selenokarbonyl)⁴.

Pokud jde o materiál reakční cívky UV-fotoreaktoru, nelze jednoznačně rozhodnout, zda se více analytu sorbovalo v teflonové nebo křemenné cívce. Ve většině případů byla ve výluzích z reaktoru nalezena frakce analytu do 1 % bez ohledu na použitý materiál. Osvědčily se i ostatní materiály použité k sestavení aparatury (Tygonové a Teflonové hadičky, spojky apod). Celkový součet změřených aktivit byl v dobré shodě se vstupní aktivitou, což znamená, že nebyly zpozorovány významné ztráty radioaktivity; ve všech případech bylo nalezeno minimálně 96,6 % vstupní aktivity.

Tabulka 5 Frakce radioaktivního indikátoru ^{75}Se nalezené v jednotlivých fázích a částech aparatury po UV-fotochemickém generování těkavých sloučenin selenu^a

A) UV-fotochemické generování bez kyseliny dusičné

UV-fotoreaktor	Teflon I	Teflon II	Křemen I	Křemen II
Frakce analytu (%)				
Plynná fáze	16,3 ± 0,3	44,6 ± 1,6	42,2 ± 1,8	42,1 ± 3,8
Kapalný odpad	77,5 ± 1,9	45,3 ± 0,9	47,1 ± 0,5	46,0 ± 5,2
Odpadní hadičky	3,0	3,7 ± 0,1	0,7	3,6
Reakční cívka	0,6	0,3	5,8 ± 0,1	0,5
Separátor fází	1,2	2,8 ± 0,1	0,9	3,6
Ostatní hadičky	0,2	0,8	2,3	1,8
Součet aktivit	98,8 ± 0,5	97,5 ± 0,6	99,0 ± 0,4	97,6 ± 0,4
Celková účinnost	21,3 ± 0,5	56,5 ± 2,2	55,1 ± 2,4	54,9 ± 5,1

B) UV-fotochemické generování s přidanou kyselinou dusičnou

UV-fotoreaktor	Teflon I	Teflon II	Křemen I	Křemen II
Frakce analytu (%)				
Plynná fáze	44,2 ± 2,6	47,8 ± 0,5	51,4 ± 0,5	47,4 ± 1,3
Kapalný odpad	52,2 ± 0,7	50,0 ± 1,3	41,7 ± 1,8	50,0 ± 0,8
Odpadní hadičky	1,6	0,7	1,7	2,2
Reakční cívka	0,1	0,0	1,0	0,7
Separátor fází	0,4	0,0	0,5	0,1
Ostatní hadičky	0,2	0,0	0,3	0,5
Součet aktivit	98,7 ± 0,5	98,5 ± 0,7	96,6 ± 0,4	100,9 ± 0,5
Celková účinnost	57,7 ± 3,4	60,5 ± 1,0	67,1 ± 1,0	61,8 ± 1,8

^a Hodnoty v řádce „Plynná fáze“ a „Kapalný odpad“ jsou aritmetickými průměry ze tří měření ± směrodatná odchylka. Nejistoty v ostatních řádcích byly vypočítány dle Kragtena²⁶; nejistoty pod 0,05 % nejsou zaznamenány. V posledním řádku tabulky je uvedena celková účinnost UV-PVG získaná po korekci na maximální dosažitelnou účinnost generování (76,6 % pro Teflon I, Křemen I, II nebo 79,0 % pro Teflon II).

Pro porovnání byla zjišťována také účinnost CVG v průtokovém uspořádání. Za podmínek shrnutých v **Tabulce 2** bylo na kolonkách (a tedy v plynné fázi) nalezeno pouze 35,1 ± 0,5 % vstupní aktivity. Po korekci na maximální dosažitelnou účinnost danou CVG

v dávkovém uspořádání činila účinnost CVG $44,4 \pm 0,8$ %. Oproti UV-PVG byla v aparatuře po CVG nalezena podstatně větší frakce radioindikátoru; $16,9 \pm 0,2$ % bylo zjištěno v odpadních hadičkách a $7,1 \pm 0,5$ % v reakční cívice a separátoru fází. Tyto výsledky by mohly podpořit výše uvedené tvrzení, že je selenovodík oproti selenokarbonylu pravděpodobně mnohem více zachytáván na stěnách aparatury; na rozdíl od UV-PVG je při CVG je generován pouze selenovodík. Více radioaktivního analytu zachyceného v systému by mohlo mít částečně vliv i na celkově nižší účinnost generování ve srovnání s UV-PVG.

Při následných pokusech bylo ověřeno, že se vzájemně liší pracovní podmínky vedoucí k dosažení maximální citlivosti (při UV-PVG/QF-AAS) a maximální účinnosti generování těkavých sloučenin. Celkovou účinnost se podařilo zvýšit o více než 12 %, pokud byl za pozměněných podmínek (tedy ne těch optimálních pro UV-PVG) proveden dodatečný experiment s radioindikátorem ^{75}Se .

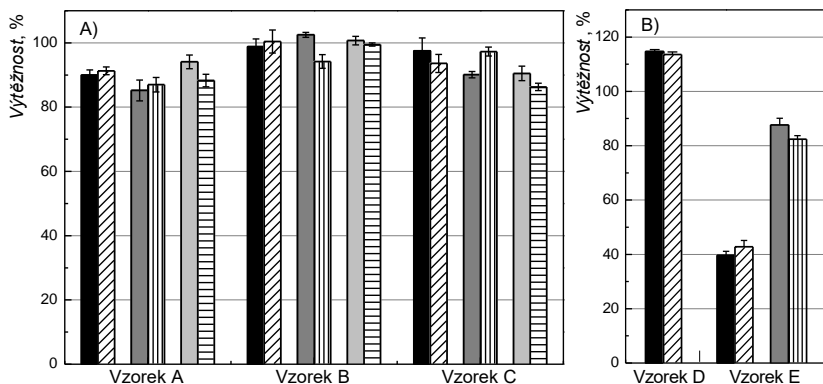
4.5 Analýza praktických vzorků

Další experimenty byly provedeny za účelem ověření aplikovatelnosti navržené metody UV-PVG/QF-AAS pro rutinní analýzu. Pro získání ucelenější představy o možném praktickém využití metody byly vybrány dva typy vzorků s různorodou matricí. Nejprve byl obsah selenu stanovován ve vzorcích pitných vod. Nalezeny byly hodnoty kolísající v okolí meze stanovitelnosti určené pro selen metodou UV-PVG/QF-AAS. Ukázalo se tedy, že pravděpodobně díky nízkému obsahu Se(IV) v analyzovaných vodách není navržená metoda pro podobný typ vzorků optimální.

Následovalo stanovení selenu v potravinových doplňcích. Analyzováno bylo pět komerčně dostupných preparátů (A – E). Získané výtěžnosti pro jednotlivé vzorky jsou na **Obr. 2** vyjádřeny ve formě sloupcových grafů. Až na jednu výjimku (vzorek E) jsou hodnoty v rozumné shodě s hodnotami deklarovanými výrobcí ($\pm 15\%$).

Protože se jednalo o doplňky stravy obsahující ve vodě rozpustné specie Se(IV) nebo Se(VI) , zvoleny byly relativně jednoduché úpravy vzorků před analýzou. Pokud byly analyzovány vzorky s obsahem seleničitých iontů, účinná byla pouhá ultrazvukem asistovaná extrakce Se(IV) z tablet deionizovanou vodou; pro všechny vzorky bylo zjištěno více než 90 % z množství selenu uvedeného v příbalových letáčích potravinových doplňků. Vedle deionizované vody byla k extrakci využita také $0,5 \text{ mol l}^{-1} \text{ HNO}_3$ a $50,0 \text{ mmol l}^{-1} \text{ HCl}$, přičemž dosaženy byly srovnatelné výsledky. U vzorků s obsahem Se(VI) bylo nutné

před vlastním stanovením metodou UV-PVG/QF-AAS zařadit předredukční krok. Předredukce na hydridově aktivní Se(IV) spočívala v povaření vzorku (30 min, 90 – 95 °C) v 6,0 mol l⁻¹ HCl. Vzorek E byl navíc podroben mikrovlnnému rozkladu v přítomnosti koncentrované kyseliny dusičné a peroxidu vodíku. Tato procedura byla zvolena z důvodu neuspokojivých výsledků získaných při úpravě vzorku pouze na základě jeho rozpouštění v deionizované vodě.



Obr. 2 Výtěžnosti selenu u jednotlivých testovaných potravinových doplňků

Hodnoty jsou vztaženy k obsahům deklarovaným výrobcí (považováno za 100 %); **A)** Vzorky s obsahem Se(IV); **B)** Vzorky s obsahem Se(VI)

Jednotlivé sloupce odpovídají využití různých extrakčních činidel:

H₂O: I (■) II (▨); HNO₃ (A, B, C) nebo HNO₃ + H₂O₂ (E): I (■) II (▨); HCl: I (■) II (▨)

I – První stanovení; II – Druhé stanovení

4.6 In situ záchyt těkavých sloučenin v grafitové kyvetě

Propojení techniky UV-fotochemického generování s *in situ* záchytem vygenerovaných těkavých sloučenin a následnou atomizací v grafitové kyvetě (UV-PVG/GF-AAS) bylo realizováno za účelem možného vylepšení mezi detekce a citlivostí oproti hodnotám dosaženým při UV-PVG s *on-line* atomizací v křemenném atomizátoru.

Prakticky bylo nezbytné sestavit několikafázový teplotní program zahrnující proces záchytu těkavých sloučenin, volatilizaci a atomizaci. Konkrétně byla optimalizována poloha zaváděcí kapiláry vůči dnu grafitové kyvety při záchytu (optimum 2 mm), kolečková teplota (optimum 350 °C), doba trvání záchytu (zvoleno 60 s) a teplota při atomizaci

(optimum 2 000 °C). Kvůli zvýšení účinnosti záchytu těkavých sloučenin v grafitové kyvetě byl její vnitřní povrch modifikován. Vybráno bylo iridium, jeden z tzv. permanentních modifikátorů. Vytvořený povlak nebylo nutné obnovovat před každým měřicím cyklem, byl stálý i po více než tisíci měřeních. Podmínky UV-PVG zůstaly až na průtokovou rychlost argonu stejné jako při UV-PVG/QF-AAS; průtok argonu byl optimálně nižší.

Zařazení *in situ* záchytu těkavých sloučenin splnilo svůj účel. Pokud byly hodnoceny výšky piků, meze detekce se podařilo snížit až o jeden řád ve srovnání s atomizací v křemenném atomizátoru. Dosažené výsledky jsou shrnuty v **Tabulce 6** (k porovnání s hodnotami v **Tabulce 3**, se sloupci příslušejícími Teflonu II). Ještě zřetelnějším vylepšení hodnot bránily zejména vyšší signály slepých pokusů při experimentech s grafitovou kyvetou. Tomu nasvědčují i rozdíly v citlivostech, kdy při UV-PVG/GF-AAS byly zjištěny až padesátkrát vyšší hodnoty oproti UV-PVG/QF-AAS. Navíc, další posun směrem k lepším citlivostem by byl možný tehdy, pokud by byla prodloužena kolekce těkavých sloučenin v grafitové kyvetě ze stávajících 60 s. Vedle koncentračních LOD/LOQ (ng l^{-1}) jsou v tabulce uvedeny absolutní LOD/LOQ (pg) zohledňující průtokovou rychlost vzorku a dobu kolekce těkavých sloučenin v grafitové kyvetě. Citlivost je vyjádřena jako směrnice kalibrační křivky, uvedena je také v souvislosti s GF-AAS obvykle upřednostňovaná charakteristická hmotnost (pg). Pro porovnání jsou v **Tabulce 6** uvedeny také hodnoty pro srovnávací metodu CVG/GF-AAS. Správnost metody byla opět ověřena analýzou certifikovaného referenčního materiálu a také analýzou dvou vzorků říčních vod.

Tabulka 6 Základní analytické charakteristiky dosažené pro selen metodami UV-PVG/GF-AAS s fotochemickým činidlem kyselinou mravenčí a CVG/GF-AAS

Parametr	UV-PVG s Teflonem II		CVG
	Bez HNO ₃	S HNO ₃	
Charakter. hmotnost (pg)	12	10	13
LOD (ng l^{-1})	6	4	8
LOQ (ng l^{-1})	19	14	28
Absolutní LOD (pg)	26	18	37
Absolutní LOQ (pg)	86	61	124
Citlivost ($10^{-6} \text{ l ng}^{-1}$)	1 616	1 989	1 556
RSD (%)	3,2	3,0	2,7
LDR do ($\mu\text{g l}^{-1}$) (LOQ – do)	1,0	1,0	1,0

K odhadu účinnosti UV-PVG bylo provedeno porovnání s přímým zaváděním kapalného vzorku do grafitové kyvety (považováno za 100%). Pokud by měly být účinnosti srovnány s hodnotami získanými na základě experimentů s radioindikátorem ^{75}Se , mohlo by být pro Teflon II vyřčeno následující: Lepší shody bylo dosaženo pro UV-PVG bez přídavku kyseliny dusičné, kdy byla v této části studie účinnost generování odhadnuta přibližně na 65 % a při experimentech s radioindikátorem selenu to bylo zhruba o 10 % méně. Při generování s kyselinou dusičnou byl rozdíl v účinnostech větší; přibližně o 20 % nižší účinnosti (hodnoceny výšky píku) byly určeny při objektivnějším způsobu kvantifikace účinnosti. Také v případě CVG byly nižší účinnosti zjištěny při experimentech s radioindikátorem selenu.

4.7 Interferenční studie

Hlavním cílem poslední části disertační práce bylo objasnit, jaký vliv mají na stanovení selenu metodou UV-PVG/QF-AAS (i UV-PVG/GF-AAS) různé anorganické ionty. Pro studium byly vybrány zástupci přechodných kovů (Co(II), Ni(II), Cu(II) Fe(III), Mn(II), Cr(III), Cd(II), Ag(I)) a ostatních hydridotvorných prvků (As(III), Sb(III) a Pb(II)). Zjišťován byl také vliv minerálních kyselin (HCl, H_2SO_4 , H_3PO_4) a příslušných solí (NaCl, Na_2SO_4 , Na_3PO_4) na analytický signál selenu.

Výsledky ukázaly, že v navrženém uspořádání je CVG oproti UV-PVG celkově odolnější vůči přítomnosti zkoušených interferentů; nejmenší odolnost vykazovalo UV-PVG s přídavkem kyseliny dusičné do analyzovaných roztoků. Pro praktická stanovení by mohla být problematická zejména nízká odolnost vůči minerálním kyselinám, které se často využívají k uchování či úpravám vzorků před analýzou. Vysoká citlivost stanovení by však mohla v mnoha případech umožnit vzorky vhodným způsobem naředit a minimalizovat tak možné komplikace plynoucí z přítomnosti rušivých složek matrice. K omezení vlivu interferentů by mohly být, teoreticky, využity i další známé způsoby (odpařování, metoda standardního přídavku, maskovací činidla apod.). Výsledky studie nepotvrdily tvrzení některých autorů, že právě vyšší tolerance vůči interferencím představuje jednu z výhod UV-PVG oproti CVG^{4,16}. Naopak v souladu s ostatními autory je poznatek, že řada interferentů způsobuje přechodný nárůst analytického signálu.

5 ZÁVĚRY

Disertační práce se zabývá UV-fotochemickým generováním těkavých sloučenin, které bylo aplikováno jako možná alternativa k doposud zavedeným přístupům ke generování těkavých sloučenin (tj. chemické či elektrochemické generování). Jako modelový analyt byl pro studii zvolen zástupce klasických hydridotvorných prvků selen (Se(IV)), těkavé sloučeniny byly detekovány atomovou absorpční spektrometrií.

V první fázi výzkumu byla sestavena aparatura pro UV-fotochemické generování v režimu kontinuální průtokové analýzy, která byla on-line propojena se zevně vyhřívaným křemenným atomizátorem (detekce QF-AAS). Důraz byl kladen na konstrukci generátoru těkavých sloučenin neboli na UV-fotoreaktor. Testováno bylo několik variant složených z nízkotlaké rtuťové UV-výbojky a k jejímu povrchu upevněné reakční cívky. Jako reakční cívky se uplatnily dva druhy teflonových hadiček a dva druhy křemenných kapilár lišící se svými rozměry (délka, vnitřní/vnější průměr) a způsobem přichycení k výbojce.

Po kompletaci aparatury byly optimalizovány základní pracovní podmínky procesu UV-PVG selenu. Za optimálních podmínek byly pro každý typ UV-fotoreaktoru určeny základní analytické charakteristiky stanovení selenu metodou UV-PVG/QF-AAS. Meze detekce se s využitím fotochemického činidla kyseliny mravenčí pohybovaly mezi 46 – 102 ng l⁻¹. Ukázalo se, že teflonové reakční cívky v navrženém uspořádání UV-fotoreaktoru velmi dobře konkurují těm křemenným, ačkoliv je křemen obecně (při stejné tloušťce stěn) podstatně lépe propustný pro UV-zářeni. Spíše než materiál reakční cívky měla na validační parametry vliv kyselina dusičná navíc přidaná do analyzovaných roztoků. Přídavek této kyseliny v úzkém koncentračním rozmezí (cca 5,0 – 10,0 mmol l⁻¹ v závislosti na UV-fotoreaktoru) vedl ke značnému vylepšení mezí detekce a citlivosti stanovení selenu metodou UV-PVG/QF-AAS. Konkrétně meze detekce se tímto krokem podařilo snížit na 27 – 44 ng l⁻¹. K vyzdvížení je celkově dobrá opakovatelnost měření, která pro žádný testovaný UV-fotoreaktor (bez/s kyselinou dusičnou) nepřesáhla 2,4 %. Správnost navržené metody byla úspěšně ověřena analýzou certifikovaného referenčního materiálu.

Na základě experimentů s radioaktivním indikátorem ⁷⁵Se byla pro jednotlivé typy UV-fotoreaktorů zjišťována účinnost UV-fotochemického generování. Opět byly vyšší účinnosti dosaženy v těch případech, kdy byly analyzovány vzorky s přídavkem kyseliny dusičné (21,3 – 56,5 % vs. 57,7 – 67,1 %). Většinou však rozdíly v hodnotách nebyly tak

markantní jako u mezi detekce či citlivostí. Kromě převodu analytu na těkavé sloučeniny umožnila metoda sledovat distribuci analytu do jednotlivých částí aparatury. Ukázalo se, že v systému bylo sorbováno relativně málo radioindikátoru. Navíc, pokud byla při generování využita kyselina dusičná, frakce analytu nalezená v aparatuře se ještě snížila. To mohlo souviset např. s vymývacími schopnostmi kyseliny dusičné nebo s rozdílnými těkavými produkty generovanými při UV-PVG bez/s touto kyselinou. Experimentálně bylo prokázáno, že spolu plně nekorespondují pracovní podmínky, za kterých je dosahováno maximálních citlivostí a maximálních účinností generování.

Praktická využitelnost navržené metody byla ověřována analýzou vzorků s různorodou maticí. Stanovován byl obsah selenu ve vzorcích pitných vod, kdy byly zjištěny hodnoty kolísající v okolí meze stanovitelnosti metody UV-PVG/QF-AAS. Pozitivnější výsledky přinesla analýza vybraných potravinových doplňků. Vzhledem k charakteru vzorků se osvědčila pouze jejich nenáročná předúprava zahrnující rozpouštění vzorku v deionizované vodě s využitím účinků ultrazvuku. Pro vzorky s obsahem Se(VI) bylo nutné zařadit navíc předredukční krok. Pro čtyři z pěti vzorků byla dosažena minimálně 85% shoda oproti výrobcem deklarovanému obsahu selenu.

Přestože byly meze detekce dosažené metodou UV-PVG/QF-AAS nízké, za účelem dalšího možného vylepšení hodnot bylo UV-fotochemické generování propojeno s *in situ* záchytem těkavých sloučenin před vlastní atomizací atomovou absorpční spektrometrií. Pro fázi záchytu a následnou elektrotermickou atomizací byla využita grafitová kyveta, jejíž vnitřní povrch byl pro zvýšení účinnosti záchytu modifikován iridiovým povlakem. Proces zavádění těkavých sloučenin do grafitové kyvety byl automatizován. V rámci optimalizace pracovních podmínek byla pozornost věnována sestavení několikafázového teplotního programu. Jak potvrdily dosažené analytické charakteristiky, záměr zařazení *in situ* záchytu těkavých sloučenin byl správný. Meze detekce se tímto krokem podařilo snížit až o jeden řád, výrazně vzrostly citlivosti. Přibližně 1% pokles byl zaznamenán v souvislosti s opakovatelností. Navržená metoda byla porovnána s přímým zaváděním kapalného vzorku do grafitové kyvety (stanovení selenu bez zařazení generování těkavých sloučenin).

V poslední části disertační práce byla provedena interferenční studie. Zkoumán byl vliv vybraných přechodných kovů a ostatních hydridotvorných prvků na stanovení selenu metodou UV-PVG s QF-AAS či GF-AAS detekcí. Zjišťován byl také účinek minerálních kyselin a příslušných solí. Jak se ukázalo, omezená odolnost vůči interferenčním vlivům je na současné úrovni poznání zřejmě největším nedostatkem UV-fotochemického generování těkavých sloučenin a mohla by být limitujícím faktorem při analýze některých typů

reálných vzorků. Vysoká citlivost stanovení by však mohla v mnoha případech umožnit vzorky vhodným způsobem naředit a minimalizovat tak možné komplikace plynoucí z přítomnosti rušivých složek. K omezení vlivu interferentů by mohly být teoreticky využity i další známé způsoby (odpařování, metoda standardního přídatku, maskovací činidla apod.). Pro značnou část zkoumaných interferentů platilo, že v určitém koncentračním rozmezí analytický signál selenu vlivem jejich přídatku podstatně roste. I tohoto poznatku by se dalo prakticky využít, stejně jako bylo v disertační práci využito účinků kyseliny dusičné.

Pro srovnání byla značná část výše uvedených experimentů provedena též s využitím chemického generování těkavých sloučenin s redukčním činidlem tetrahydridboritanem sodným. Za zoptimalizovaných pracovních podmínek dosažené analytické charakteristiky jasně ukázaly (pokusy s křemenným i grafitovým atomizátorem), že je UV-fotochemické generování plně alternativní k tradičnímu přístupu ke generování těkavých sloučenin. Zejména při UV-fotochemickém generování s kyselinou dusičnou bylo dosahováno lepších mezi detekce a citlivostí, lineární dynamický rozsah či opakovatelnost zůstaly přibližně zachovány. Porovnatelné byly i účinnosti vyčíslené na základě experimentů s radioaktivním indikátorem selenu; nižší hodnoty odpovídající chemickému generování v průtokovém uspořádání mohly částečně souviset s větším podílem radioaktivního analytu zjištěným v aparatuře po generování. Za výhodu chemického generování oproti UV-fotochemickému generování může být označena celkově vyšší odolnost vůči studovaným interferentům.

Závěrem lze konstatovat, že se úspěšně podařilo splnit vytyčené cíle disertační práce. Kromě činností obvyklých při zavádění nové metody (optimalizační studie, určení základních analytických charakteristik nebo třeba studium interferencí) byla řešena další témata přispívající k rozvoji studované problematiky. Jmenována může být např. kvantifikace účinnosti s využitím radioindikátoru selenu, aplikace metody UV-PVG/QF-AAS při analýze potravinových doplňků či zautomatizovaný *in situ* záchyt těkavých sloučenin v grafitové kyteti. O významu disertační práce svědčí fakt, že byly dosažené výsledky publikovány v několika odborných impaktovaných časopisech.

Celkový dojem z UV-fotochemického generování vytvořený na základě celé řady provedených pokusů je takový, že by tento citlivý a nenáročný přístup ke generování těkavých sloučenin mohl zaujmout rovnocenné postavení mezi ostatními způsoby generování (a to nejen v naší laboratoři spektrometrických metod). Vzhledem k omezené odolnosti vůči interferenčním vlivům lze očekávat, že v laboratorní praxi najde tato technika zavádění vzorku uplatnění zejména při analýze vzorků s jednodušší maticí.

6 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] Dumont, E.; Vanhaecke, F.; Cornelis, R.: Selenium speciation from food source to metabolites: a critical review. *Anal. Bioanal. Chem.* **385**, 1304–1323 (2006).
- [2] Guo, X.; Sturgeon, R. E.; Mester, Z.; Gardner, G. J.: Vapor generation by UV irradiation for sample introduction with atomic spectrometry. *Anal. Chem.* **76**, 2401–2405 (2004).
- [3] Wu, P.; He, L.; Zheng, C.; Hou, X.; Sturgeon, R. E.: Applications of chemical vapor generation in non-tetrahydroborate media to analytical atomic spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.* **25**, 1217–1246 (2010).
- [4] Guo, X.; Sturgeon, R. E.; Mester, Z.; Gardner, G. J.: UV vapor generation for determination of selenium by heated quartz tube atomic absorption spectrometry. *Anal. Chem.* **75**, 2092–2099 (2003).
- [5] Guo, X.; Sturgeon, R. E.; Mester, Z.; Gardner, G. J.: UV light-mediated alkylation of inorganic selenium. *Appl. Organomet. Chem.* **17**, 575–579 (2003).
- [6] Guo, X.; Sturgeon, R. E.; Mester, Z.; Gardner, G. J.: Photochemical alkylation of inorganic selenium in the presence of low molecular weight organic acids. *Environ. Sci. Technol.* **37**, 5645–5650 (2003).
- [7] Takatani, T.; Fitzgerald, N.; Galbraith, J. M.: Proposed reaction mechanisms for selenium UV photolysis vapor generation by computational methods. *Anal. Bioanal. Chem.* **388**, 859–862 (2007).
- [8] Dědina, J.; Tsalev, D.: *Hydride generation atomic absorption spectrometry*. England, John Wiley & Sons, 1995.
- [9] Deng, H.; Zheng, C.; Liu, L.; Wu, Li; Hou, X.; Lv, Y.: Photochemical vapor generation of carbonyl for ultrasensitive atomic fluorescence spectrometric determination of cobalt. *Microchem. J.* **96**, 277–282 (2010).
- [10] Zheng, C.; Sturgeon, R. E.; Hou, X.: UV photochemical vapor generation and in situ preconcentration for determination of ultra-trace nickel by flow injection graphite furnace atomic absorption spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.* **24**, 1452–1458 (2009).

- [11] Zhang, S.; Luo, H.; Peng, M.; Tian, Y.; Hou, X.; Jiang, X.; Zheng, C.: Determination of Hg, Fe, Ni, and Co by Miniaturized Optical Emission Spectrometry Integrated with Flow Injection Photochemical Vapor Generation and Point Discharge. *Anal. Chem.* **87**, 10712–10718 (2015).
- [12] Figueroa, R.; García, M.; Lavilla, I.; Bendicho, C.: Photoassisted vapor generation in the presence of organic acids for ultrasensitive determination of Se by electrothermal-atomic absorption spectrometry following headspace single-drop microextraction. *Spectrochim. Acta, Part B* **60**, 1556–1563 (2005).
- [13] Guo, X.; Sturgeon, R. E.; Mester, Z.; Gardner, G.: UV photosynthesis of nickel carbonyl. *Appl. Organomet. Chem.* **18**, 205–211 (2004).
- [14] Madden, J. T.; Fitzgerald, N.: Investigation of ultraviolet photolysis vapor generation with in-atomizer trapping graphite furnace atomic absorption spectrometry for the determination of mercury. *Spectrochim. Acta, Part B* **64**, 925–927 (2009).
- [15] García, M.; Figueroa, R.; Lavilla, I.; Bendicho, C.: On-line photoassisted vapour generation implemented in an automated flow-injection/stopped-flow manifold coupled to an atomic detector for determination of selenium. *J. Anal. At. Spectrom.* **21**, 582–587 (2006).
- [16] Zheng, C.; Wu, L.; Ma, Q.; Lv, Y.; Hou, X.: Temperature and nano-TiO₂ controlled photochemical vapor generation for inorganic selenium speciation analysis by AFS or ICP-MS without chromatographic separation. *J. Anal. At. Spectrom.* **23**, 514–520 (2008).
- [17] Šíma, J.; Rychlovský, P.; Dědina, J.: The efficiency of the electrochemical generation of volatile hydrides studied by radiometry and atomic absorption spectrometry. *Spectrochim. Acta, Part B* **59**, 125–133 (2004).
- [18] Hraníček, J.; Červený, V.; Kratzer, J.; Vobecký, M.; Rychlovský, P.: Characterization and mutual comparison of new electrolytic cell designs for hydride generation-atomic absorption spectrometry with a quartz tube atomizer using Se as a model analyte and ⁷⁵Se as a radioactive indicator. *J. Anal. At. Spectrom.* **27**, 1761–1771 (2012).
- [19] Welz, B.; Melcher, M.: Mechanisms of transition metal interferences in hydride generation atomic-absorption spectrometry. Part 1. Influence of cobalt, copper, iron and nickel on selenium determination. *Analyst* **109**, 569–572 (1984).

- [20] Bax, D.; Agterdenbos, J.; Worrell, E.; Kolmer, J. B.: The mechanism of transition metal interference in hydride generation atomic absorption spectrometry. *Spectrochim. Acta, Part B* **43**, 1349–1354 (1988).
- [21] Zheng, C.; Sturgeon, R. E.; Brophy, C. S.; He, S.; Hou, X.: High-yield UV-photochemical vapor generation of iron for sample introduction with inductively coupled plasma optical emission spectrometry. *Anal. Chem.* **82**, 2996–3001 (2010).
- [22] Dočekal, B.; Dědina, J.; Krivan, J.: Radiotracer investigation of hydride trapping efficiency within a graphite furnace. *Spectrochim. Acta, Part B* **52**, 787–794 (1997).
- [23] Dočekal, B.; Marek, P.: Investigation of in situ trapping of selenium and arsenic hydrides within a tungsten tube atomiser. *J. Anal. At. Spectrom.* **16**, 831–837 (2001).
- [24] May, T. W.; Kane, D. A.: Matrix-dependent instability of selenium(IV) stored in teflon containers. *Anal. Chim. Acta.* **161**, 387–391 (1984).
- [25] Krivan, V.; Petrick, K.; Welz, B.; Melcher, M.: Radiotracer error-diagnostic investigation of selenium determination by hydride-generation atomic absorption spectrometry involving treatment with hydrogen peroxide and hydrochloric acid. *Anal. Chem.* **57**, 1703–1706 (1985).
- [26] Kragten, J.: Tutorial review. Calculating standard deviations and confidence intervals with a universally applicable spreadsheet technique. *Analyst* **119**, 2161–2165 (1994).

CURRICULUM VITAE

Jméno: Marcela Rybínová

Datum narození: 22.7.1986

Místo narození: Nymburk

Vzdělání

2010 – dosud

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra analytické chemie;

Obor: Analytická chemie

2008 – 2010

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra analytické chemie;

Obor: Klinická a toxikologická analýza; Dosažený titul: Mgr.

2005 – 2008

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra analytické chemie;

Obor: Klinická a toxikologická analýza; Dosažený titul: Bc.

2001 – 2005

Gymnázium Nymburk

Grantové projekty

Členem řešitelského kolektivu v grantových projektech:

2014 – 2016

GA UK 228214: UV generování těkavých sloučenin pro potřeby stopové analýzy technikou QFAAS

2014 - 2016

GA CR P206/14-23532S: Generování a prekoncentrace těkavých sloučenin pro atomovou absorpční a atomovou fluorescenční spektrometrii

Jazykové znalosti

Anglický jazyk PET (Cambridge Certificate Preliminary English Test), 2012

Německý jazyk Začátečník

SEZNAM PUBLIKACÍ

1. Rybínová, M., Červený, V., Hraníček, J., Rychlovský, P.: UV-fotochemické generování těkavých sloučenin pro potřeby atomových spektrometrických metod. *Chem. Listy* **109**, 930–937 (2015).
2. Rybínová, M., Červený, V., Rychlovský, P.: UV-photochemical vapour generation with *in situ* trapping in a graphite tube atomizer for ultratrace determination of selenium. *J. Anal. At. Spectrom.*, **30**, 1752–1763 (2015).
3. Rybínová, M., Červený, V., Hraníček, J., Rychlovský, P.: UV-photochemical vapor generation with quartz furnace atomic absorption spectrometry for simple and sensitive determination of selenium in dietary supplements. *Microchem. J.* **124**, 584–593 (2016).
4. Rybínová, M., Musil, S., Červený, V., Vobecký, M., Rychlovský, P.: UV-photochemical vapor generation of selenium for atomic absorption spectrometry: optimization and ^{75}Se radiotracer efficiency study. *Spectrochim. Acta, Part B* **123**, 134–142 (2016).

SEZNAM PŘEDNÁŠEK A PLAKÁTOVÝCH SDĚLENÍ

PŘEDNÁŠKY

1. Rybínová, M., Kolorosová, A., Červený, V., Rychlovský, P.: *Determination of Selenium Using Photochemical Volatile Compounds Generation Coupled with Atomic Absorption Spectrometry*. 8th International Students Conference "Modern Analytical Chemistry". Praha, Česká republika (24. – 25.9. 2012).
2. Rybínová, M., Červený, V., Rychlovský, P.: *Comparison of UV-photochemical and Chemical Volatile Compounds Generation for the Determination of Selenium by Atomic Absorption Spectrometry*. 9th International Students Conference "Modern Analytical Chemistry". Praha, Česká republika (23. – 24.9. 2013).
3. Rybínová M., Červený V., Rychlovský P.: *Determination of Selenium Using UV-photochemical Volatile Compounds Generation in Combination with QF-AAS: From the construction of the apparatus to real samples*. 10th International Students Conference "Modern Analytical Chemistry". Praha, Česká republika (22. – 23.9. 2014).
4. Rybínová M., Červený V., Rychlovský P.: *Stanovení selenu kombinovanou technikou UV-fotochemického generování těkavých sloučenin a atomové absorpční spektrometrie s křemenným atomizátorem*. 66. Sjezd chemických společností – přednáška v sekci cena Shimadzu. Ostrava, Česká republika (7. – 10.9. 2014).

Ocenění - Cena Shimadzu 2014: 2. místo

5. Rybínová, M.: *Stanovení selenu kombinovanou technikou UV-fotochemického generování těkavých sloučenin a atomové absorpční spektrometrie s křemenným atomizátorem*. Seminář postgraduálních studentů analytické chemie pražských vysokých škol "Perspektivy v analytické chemii 2014". Ústav analytické chemie Fakulty chemicko-inženýrské VŠCHT, Praha, Česká republika (6.11. 2014).

PLAKÁTOVÁ SDĚLENÍ

1. Rybinova, M., Dvorakova, D., Kolorosova, A., Cervený, V., Hranicek, J., Rychlovsky, P.: *Photochemical volatile forms generation for determination of selenium by quartz furnace atomic absorption spectrometry*. 4th EuCheMS Chemistry Congress. Praha, Česká republika (26. – 30.8. 2012).
2. Rybínová, M., Kolorosová, A., Červený, V., Rychlovský, P.: *Determination of selenium using photochemical volatile compounds generation coupled with atomic absorption spectrometry*. SAS 2012; XXth SCSC. Tatranská Lomnice, Slovensko (7. – 12.10. 2012).
3. Rybinova, M., Cervený, V., Rychlovsky, P.: *Determination of selenium using chemical and photochemical volatile compounds generation coupled with atomic absorption spectrometry*. XXXVIII Colloquium Spectroscopicum Internationale. Tromsø, Norsko (16. – 20.6. 2013).
4. Rybínová, M., Červený, V., Rychlovský, P.: *Determination of Selenium in Food Supplements and Water Samples Using UV-photochemical Generation in Combination with QF-AAS detection*. Súčasný stav a perspektívy analytickej chémie v praxi. Bratislava, Slovensko (1. – 4.6. 2014)

Ocenění za poster: "Diplom za vynikající příspěvek v panelové sekci"

5. Rybinova, M., Musil, S., Cervený, V., Vobecky, M., Rychlovsky, P.: *The efficiency of UV-photochemical generation of selenium volatile compounds using radioactive indicator*. 13th Rio Symposium on Atomic Spectrometry. Mérida, Mexiko (19. – 24.10. 2014).
6. Rybínová, M., Nováková, E., Červený, V., Hraníček, J., Rychlovský, P.: *Vapour generation of Selenium: Interference Study and Comparison of Existing Approaches*. 13th Rio Symposium on Atomic Spectrometry. Mérida, Mexiko (19. – 24.10. 2014).

7. Rybínová, M., Červený, V., Rychlovský, P.: *UV-photochemical vapour generation with in-situ trapping in a graphite tube atomizer for ultratrace determination of selenium*. Colloquium spectroscopicum internationale XXXIX. Figueira da Foz, Portugalsko (30.8. – 3.9. 2015).

8. Rybínová, M., Červený, V., Rychlovský, P.: *Determination of selenium by UV-photochemical vapour generation coupled with graphite furnace atomic absorption spectrometry*. 67. Zjazd chemikov. Horní Smokovec, Vysoké Tatry, Slovensko (7. – 11.9. 2015).

Charles University in Prague, Faculty of Science
Department of analytical chemistry

Ph.D. study program: Analytical chemistry

Summary of the Ph.D. Thesis



**UV-photochemical generation of volatile selenium compounds
for ultratrace analysis by AAS**

Mgr. Marcela Rybínová

Supervisor: Doc. RNDr. Petr Rychlovský, CSc.

Supervisor-consultant: RNDr. Václav Červený, Ph.D.

Prague 2016

Ph.D. thesis was elaborated at the Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Charles University in Prague (Hlavova 2030/8, 128 43, Prague 2).

This work was financially supported by the Charles University in Prague – projects GAUK 228214, UNCE 204025/2012 a SVV (265201, 267215, 260084, 260205, 260317); and by the Grant Agency of the Czech Republic (project No.: P206/14-23532S).

Abstract

This thesis deals with the study of UV-photochemical generation of volatile compounds (UV-PVG) in connection with atomic absorption spectrometry (AAS). Selenium (Se(IV)) was selected as a model analyte and many experiments were carried out to expand the current sum of knowledge of the topic.

The study was commenced by assembling the UV-PVG apparatus in the continuous flow mode. The detection method used was AAS with externally heated quartz furnace atomizer. The focus of the first step of the study was on the construction of the volatile compounds generator (UV-photoreactor) with emphasis on the material used; tubes made of teflon or quartz of different diameters were tested. The construction of the apparatus was followed by optimization of the reaction conditions (the type and concentration of the photochemical agent and other agents, which increase the analytical signal; the carrier gas and the auxiliary hydrogen gas flow rate; the sample flow rate). Eventually, the analytical figures of merit of the selenium determination using the proposed method were found. The results showed that teflon reaction tubes are a good competitor to those made of quartz. The accuracy of the method has been successfully verified by analysis of certified reference material and its applicability has been further tested on analysis of samples in various matrices; selenium was determined in samples of drinking water and selected dietary supplements. Series of experiments using radiotracer ^{75}Se have been carried out to estimate the overall efficiency of the conversion of the analyte to the volatile compound. Moreover, it was possible to observe the distribution of the analyte in the apparatus. Further improvement of sensitivity and the limits of detection was achieved by combining the UV-PVG with *in situ* collection of the generated volatile compound in a graphite furnace prior to its electrothermal atomization. Another set of experiments carried out was an interference study addressing the effects of selected inorganic acids and salts, transition metals and other hydride forming elements on the determination of selenium.

For comparison, many experiments were performed using traditional chemical generation with sodium borohydride as a reducing agent. The figures of merit and the efficiency achieved with the optimized conditions clearly show that UV-PVG is fully comparable alternative to the conventional approach to the generation of volatile compounds. The main disadvantage at the current state of its research lies in the lower tolerance of UV-PVG to interference effects.

Table of content

1 INTRODUCTION	5
2 AIMS OF STUDY	7
3 MATERIAL AND METHODS	8
3.1 Instruments and equipment.....	8
3.1.1 UV-photoreactor.....	8
3.1.2 Atomic absorption spectrometer.....	9
3.1.3 Measurement of radioactivity.....	9
3.2 Procedure.....	9
3.2.1 Generation of volatile compounds.....	9
3.2.2 Experiments with ⁷⁵ Se radiotracer.....	11
4 RESULTS AND DISCUSSION	11
4.1 Optimization.....	11
4.2 Figures of merit.....	13
4.3 Analysis of certified reference material.....	14
4.4 Generation efficiency.....	14
4.5 Analysis of samples.....	17
4.6 <i>In situ</i> trapping.....	18
4.7 Interference study.....	20
5 CONCLUSIONS	21
6 REFERENCES	24

1 INTRODUCTION

Spectrometric methods rank among the most important analytical approaches used for (ultra)trace element analysis. Although especially methods utilizing inductively coupled plasma as an excitation source have come to the fore in recent years, atomic absorption spectrometry (AAS) is still successfully employed. It excels in a relatively easy arrangement and thus lower acquisition and operational costs. This method can be used in several variants, which differ in the atomization. Electrothermal atomization or atomization in a quartz furnace atomizer are suitable for (ultra)trace analysis. Both types can be effectively connected with the generation of volatile compounds.

Selenium is a very important and interesting trace element in terms of human body. It can be essential as well as toxic and the borderline between these states is relatively sharp¹. This dual behavior has led to selenium becoming the subject of many studies. Selenium is also one of the classical hydride forming elements that can be relatively simply converted to a volatile compound.

The generation techniques have been successfully used for several decades as an alternative to conventional liquid sample introduction. They have the advantage of high introduction efficiency of the analyte to the detection system and in effective separation of an analyte from the sample matrix. These phenomena often lead to prevention of interferences and reduction of limits of detection. There are several ways to convert the analyte from the condensed phase to the gaseous phase. Especially **chemical vapor generation (CVG)** has been extensively employed; in this process, the analyte is usually reduced to a volatile compound through the reaction with sodium borohydride in a hydrochloric acid medium (NaBH₄-HCl system). Despite its high popularity, CVG also has some drawbacks. For example, the reducing agent NaBH₄ is rather expensive, unstable and can be prepared only with limited purity (so it becomes a potential source of sample contamination)^{2,3}.

UV-photochemical generation of volatile compounds (= UV-photochemical vapor generation; UV-PVG) is a relatively new approach to vapor generation. The analyte is transferred to volatile compounds through the action of UV-radiation on the liquid sample. Conversion to the gaseous phase also requires the presence of a photochemical agent, usually a low molecular weight organic acid⁴⁻⁶. The reaction mechanism for the generation of volatile compounds is still a matter of discussion because of the complicated nature of photoreactions. Several theories have been proposed. One of them assumes the

formation of reactive free radicals as a result of photolytic decomposition of the photochemical agent, which subsequently reduces the studied analyte⁴. An alternative mechanism without the presence of these radicals has been suggested; computational methods were applied to determine the mechanism⁷.

There are two basic modes of generation – the direct transfer mode and the collection mode. In the direct transfer mode, volatile compounds released from a sample solution are directly transported to the atomizer⁸. These variants are currently employed: continuous flow^{4,9}, flow injection^{10,11} and batch arrangement^{2,12}; the batch arrangement is not so often used in UV-PVG. In the collection mode, volatile compounds are trapped in a collection device until the evolution is completed. Volatile compounds are then atomized all at once⁸. Collection techniques have been applied in the identification of volatile species (cryotrapping)^{4,13}. In order to increase the sensitivity, volatile compounds of certain analytes have been collected directly in an atomizer; *in situ trapping* and atomization in a heated graphite furnace (GF-AAS) has usually been used for this purpose^{10,14}. Besides the improvement in sensitivity, *in situ* trapping brings some additional advantages in comparison with the direct atomization. Elimination of influence of the kinetics of volatile compounds release from the phase separator, reduction of atomization interferences or reduction of fluctuations of the carrier gas flow on the analytical signal are considered to be benefits.

The UV-photoreactor (the generator of volatile compounds) is the main part of the apparatus for UV-PVG. Various design types have been described. In flow-through arrangements, it usually consists of a source of UV-radiation and a reaction coil through which the sample flows. Mercury UV-lamps with various pressures inside the tube and with various outputs are used as the source of radiation. The reaction coil is made of teflon^{4,15} or quartz tubes^{11,16}. It is usually wrapped around the source of UV-radiation, but it can be connected to the surface of the UV-lamp in some other way.

The whole generation process consists of several phases that include conversion of the analyte into a volatile compound, its release from the liquid phase to the gaseous phase (gas-liquid separation) and subsequent transport by a stream of the carrier gas into the detector. The resultant **generation efficiency** is dependent on the efficiencies of the individual steps. Several approaches can be used to evaluate it. Using radiotracer of the analyte (radioactive indicator) is the most trustworthy mean. The efficiency is determined based on comparison of the radioactivity of the relevant radioactive indicator measured in the solution (the sample solution before UV-PVG) and the activity of the same indicator in the form of the generated volatile compound trapped on a suitable sorbent. Furthermore,

this method can be used to map the distribution of the radioisotope (and thus also the studied analyte, because it is in the same form) – in addition to the fraction of the analyte converted to the volatile product, the fraction in the liquid waste or on the individual surfaces of the apparatus can be found^{17,18}.

One problem with the conventional chemical generation are **interferences** caused by the transition metals⁸. Such interferences typically occur during the generation step, due to the production of active metals (*e.g.* metallic state, colloidal forms) that adsorb and/or decompose the generated hydrides or the reducing agent NaBH_4 ^{8,19,20}. Other possible interferences include hydride forming elements, which may cause gas-phase interferences (in the atomizer). Tolerance to the potential interferences was investigated also for UV-PVG^{4,12,15}. It was found that serious interferences persist in this way of generation. Interference mechanisms are not fully understood yet, but it is likely that they partially coincide with those in CVG (*e.g.* competition between the analyte and interferents for the reducing radicals; co-precipitation of reduced forms of interferents with UV-PVG intermediates of analyte^{9,21}).

2 AIMS OF STUDY

The primary aim of this thesis was to implement UV-photochemical vapor generation into the laboratory of spectrometric methods (Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science) and to enrich the range of currently used sample introduction techniques with a new alternative. The intention was not only to use information from the literature, but also try to contribute to the further development of the technique. Several partial objectives have been defined:

1. To construct the apparatus for UV-photochemical vapor generation in a continuous flow mode and connect it with atomic absorption spectrometry with an externally heated quartz furnace atomizer (UV-PVG/QF-AAS).
2. To focus more on the possible construction of a volatile compounds generator.
3. To optimize the experimental conditions for the model element selenium and to determine the basic analytical characteristics.
4. To verify the accuracy of the studied method by the analysis of the certified reference material and to test the method for analysis of the selected real samples (water samples, food supplements).

5. To determine the efficiency of UV-photochemical vapor generation mainly based on the experiments with radioactive indicator ⁷⁵Se.
6. To reduce detection limits and increase the sensitivity of the selenium determination using *in situ* trapping of the generated volatile compounds in a graphite furnace of atomic absorption spectrometer (UV-PVG/GF-AAS) prior to the electrothermal atomization, if possible.
7. To perform interference study – to monitor the impact of the selected mineral acids and salts, transition metals or other hydride forming elements on the determination of selenium by the proposed method.
8. To perform overall comparison with the traditional chemical vapor generation based on reaction with the reducing agent sodium borohydride (to compare basic analytical characteristics, efficiency or resistance to interferences).

3 MATERIAL AND METHODS

3.1 Instruments and equipment

3.1.1 UV-photoreactor

In UV-PVG, the volatile compounds of selenium were generated in a flow-through reactor consisting of a source of UV-radiation with a reaction coil attached to its surface. A low-pressure mercury UV bench lamp (253.7 nm, 20 W; dimensions: 610 x 152 x 108 mm) (Ushio, Japan) was used as the radiation source. The reaction coil was made of teflon or quartz. The teflon tubing was tightly coiled around the UV-lamp; the quartz tubes bend in the shape of a letter "S" were interconnected by pieces of Tygon tubing and were attached to the surface of the mercury UV-lamp by common cable ties. For simplification, the individual reaction coils (and thus also the UV-photoreactors) are designated in this study according to the kind of material used and dimensions as:

- **Teflon I** (1.0 mm i.d./2.0 mm o.d.)
- **Teflon II** (1.0 mm i.d./1.4 mm o.d.)
- **Quartz I** (2.0 mm i.d./4.0 mm o.d.)
- **Quartz II** (0.5 mm i.d./2.0 mm o.d.)

3.1.2 Atomic absorption spectrometer

A Solaar 939 (Unicam, UK) atomic absorption spectrometer was used as a detector of volatile selenium compounds. Deuterium background correction was applied for all the experiments (Cathodeon, UK). A selenium hollow cathode lamp was mostly employed as a radiation source (operated with a current of 10 mA, band-pass of 0.5 nm) (Heraeus, UK). Radiation was detected at the selenium resonance wavelength of 196.0 nm. Only when analyzing real samples, a boosted discharge hollow cathode lamp (also called superlamp) was used as a radiation source (Photron, Australia).

Atomization of volatile compounds was carried out in a T-shaped quartz furnace externally heated to 950 °C. Atomization in a GF 90 graphite furnace atomizer was used (Unicam, UK) during UV-PVG with *in situ* trapping. The inner surface of the graphite furnace with an extended lifetime was coated with iridium.

3.1.3 Measurement of radioactivity

In experiments with ^{75}Se radioactive indicator, the radioactivity was measured *off-line* by a Minaxi Auto-Gamma 5000 series gamma-counter (Packard Instrument Co., USA) equipped with a scintillation NaI(Tl) well-type crystal detector. An energy window in the range from 60 to 467 keV was set on the analyzer and the counting time of 120 s was employed.

3.2 Procedure

3.2.1 Generation of volatile compounds

UV-photochemical vapor generation was realized in a continuous-flow mode. Before the analysis, the liquid samples containing selenium were *off-line* mixed with a photochemical agent. An additional agent (mostly nitric acid) was also added in some experiments. Samples/blanks were propelled with the aid of the peristaltic pump to the UV-photoreactor, where selenium volatile compounds were formed as a result of the UV-irradiation. Switching between sample and blank pumping was performed using a manually turned two-way valve. The reaction mixture enriched with generated volatile products was subsequently transported from the UV-photoreactor to the gas-liquid separator with the forced outlet. While the separated liquid phase was then withdrawn by the second peristaltic pump to the waste, the gases were purged by a stream of the carrier

gas (argon; introduced into the sample stream before the UV-photoreactor) to the externally heated quartz tube atomizer. To achieve effective atomization, a low flow of hydrogen was also introduced into the atomizer. A schematic diagram of the instrumental set-up for UV-PVG/QF-AAS is shown in **Fig. 1**.

During *in situ* trapping, the gases were directed from the gas–liquid separator via a three-way solenoid valve to the preheated graphite furnace (or to the waste). The work was facilitated using an automatically controlled sampling device. In this case, no hydrogen was introduced into the atomizer.

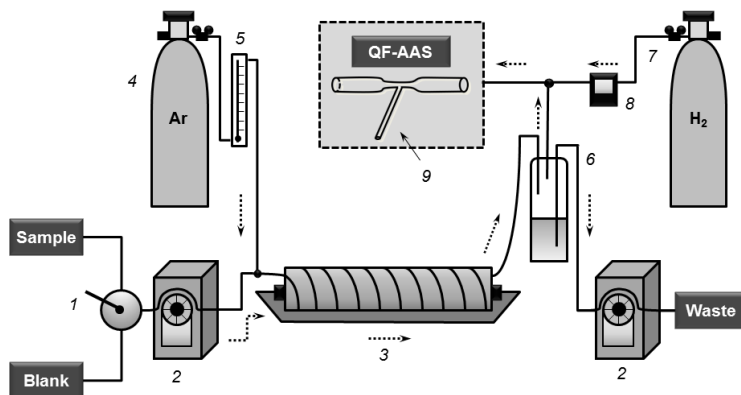


Fig. 1 Scheme of the instrumental arrangement for UV-PVG/QF-AAS

1 – manually turned two-way valve; 2 – peristaltic pump; 3 – UV-photoreactor; 4 – argon gas cylinder; 5 – rotameter; 6 – gas-liquid separator with a forced outlet; 7 – hydrogen gas cylinder; 8 – digital mass flow controller for gas; 9 – quartz furnace atomizer

A modified apparatus was used for comparative measurements, based on chemical generation with NaBH_4 (also in the continuous-flow mode). Primarily, the UV-photoreactor was not employed in CVG; it was replaced by the teflon reaction coil. Extra hydrogen was not added to the quartz furnace atomizer, because a sufficient amount was released through decomposition of the reducing agent. To determine the generation efficiency (radioexperiments), CVG in the batch mode was also performed.

3.2.2 Experiments with ^{75}Se radiotracer

The radiotracer measurements were carried out using the same instrumental set-up as was described above for UV-PVG/QF-AAS; however the gases were directed from the gas-liquid separator into two plastic columns in series, which were filled with activated charcoal sorbent instead of being transported to the quartz furnace atomizer. After the completion of the generation, the columns were placed in the measuring vials and the activity was measured. The radioactivity of the collected waste solution was also measured as was the radioactivity deposited on the surface of those parts of the apparatus that come into contact with the radioactive material (*e.g.* connecting tubes including connectors). Due to its dimensions, it was not possible to put the gas-liquid separator and reaction coils into the measuring vials, so it was repeatedly (three times) rinsed with aqua regia and the radioactivity in the leachates was subsequently counted.

The efficiency of UV-PVG was determined based on the analyte fraction (% of the input activity measured in the sample solution before UV-PVG) trapped on the columns. The analyte fraction retained in any part of the apparatus and in the waste was also quantified in the same manner. To obtain the overall efficiency of UV-PVG of selenium, the fraction of analyte on the columns was related to the maximum attainable efficiency (the efficiency of CVG in a batch mode).

4 RESULTS AND DISCUSSION

4.1 Optimization

Optimum experimental conditions of the combined method UV-PVG/QF-AAS were found after the completion of the apparatus. Optimization study with a model analyte ($5.0 \mu\text{g L}^{-1}$ of Se(IV)) was performed for all four types of UV-photoreactors (Teflon I, II and Quartz I, II). Following key parameters were optimized: the length of the reaction coil, concentration and type of the photochemical agent (formic acid and acetic acid were tested), flow rate of the gases employed (argon, hydrogen), sample flow rate, concentration of nitric acid. Nitric acid was added to the analysed samples to increase the analytical signal of selenium up to several folds (most experiments were performed with nitric acid as well as without it). It must be emphasized that an increase in the analytical signal was observed only in a narrow nitric acid concentration range (*ca.* $5.0 - 10.0 \text{ mmol L}^{-1}$ in dependence on the UV-photoreactor employed) and even small deviations from the optimum values led to

substantial fluctuations in the analytical signal. The same was true in case of nitrates. The role played by HNO_3 is not clear yet. Assuming that reduction of the analyte in UV-PVG is controlled by radicals produced during photolytic decomposition of the photochemical agent, nitric acid could affect the amount/ratio of these radicals, which directly contributes to the reduction of Se(IV) . Furthermore, different volatile compounds are generated without/with nitric acid. In UV-PVG without HNO_3 , both selenium hydride and selenocarbonyl are generated; formation of selenium hydride is inhibited when nitric acid is added⁴.

Table 1 summarizes the optimum values of the studied parameters. Traditional chemical generation with a reducing agent NaBH_4 was chosen as a comparative method; the relevant experimental conditions were also optimized within the study (**Table 2**).

Table 1 Optimum experimental conditions for the determination of selenium by UV-PVG/QF-AAS with formic acid as a reducing agent^a

Type of UV-photoreactor	Teflon I	Teflon II	Quartz I	Quartz II
Inner/outer diameter of r. coil (mm)	1.0/2.0	1.0/1.4	2.0/4.0	0.5/2.0
Reaction coil length (m)	1.5	3.5	2.8	4.5
HCOOH concentration (mol L^{-1})	0.7	0.5	0.7	0.7
Argon flow rate (mL min^{-1})	12/9	13/11	16/12	7/5
Hydrogen flow rate (mL min^{-1})	2/3	2	3/4	2
Sample flow rate (mL min^{-1})	4.5	4.5	4.5	3.0
HNO_3 concentration (mmol L^{-1})	10	5	5	5

^a Values corresponding to UV-PVG without/with addition of HNO_3 to the analysed samples; where slash is not specified, the values were the same as during generation only with HCOOH

Table 2 Optimum experimental conditions for the determination of selenium by CVG/QF-AAS

Parameter	Value
Reaction coil length (m)	0.8
NaBH_4 concentration (% w/v)	0.5 ^a
NaBH_4 flow rate (mL min^{-1})	0.7
HCl concentration (mol L^{-1})	1.0
Sample flow rate (mL min^{-1})	4.5
Argon flow rate (mL min^{-1})	20

^a Reducing agent NaBH_4 was stabilized in 0.4% NaOH

4.2 Figures of merit

Calibration curves were constructed under the optimum experimental conditions for UV-PVG/QF-AAS. The curves were linear up to a concentration $15 \mu\text{g L}^{-1}$ of Se(IV) for all studied UV-photoreactors. The basic analytical characteristics were determined (**Table 3**). As expected, lower limits of detection (LOD) and higher sensitivities were obtained when nitric acid was used; the LODs values were approximately 1.5 – 3 times lower compared to conditions without addition of this acid. The repeatability (relative standard deviation – RSD (%)) was good in all cases and did not exceed 2.4% (measured for $5.0 \mu\text{g L}^{-1}$ Se(IV)). Overall the lowest LODs and highest sensitivities (without/with addition of nitric acid) were obtained for Teflon II. Therefore, teflon was comparable with quartz.

For comparison, the values for Se(IV) determined by the comparative method CVG/QF-AAS are given in the last column of **Table 3**. The calibration curve was again linear up to $15 \mu\text{g L}^{-1}$ of Se(IV). Somewhat higher responses were obtained for blanks in CVG, which could be connected with the reduced purity of the reducing agent. As a consequence, the elevated blank levels could be manifested in the resultant LODs. Compared with some types of UV-photoreactors in UV-PVG worse LODs were obtained in CVG, even though the sensitivity of CVG was quite a bit higher.

Table 3 Analytical figures of merit for Se(IV) determined by UV-PVG/QF-AAS and by CVG/QF-AAS

UV-photoreactor	UV-PVG								CVG
	Teflon I		Teflon II		Quartz I		Quartz II		
Addition of HNO ₃	No	Yes	No	Yes	No	Yes	No	Yes	–
LOD (ng L ⁻¹)	102	36	46	27	48	33	81	44	50
LOQ (ng L ⁻¹)	341	121	153	89	160	111	271	147	165
Sensitivity (10 ⁻⁶ L ng ⁻¹)	16	43	32	54	30	47	19	35	41
RSD (%)	0.8	1.6	1.5	1.4	1.1	1.9	2.4	2.2	1.5
LDR to ($\mu\text{g L}^{-1}$) (LOQ – to)	15	15	15	15	15	15	15	15	15

4.3 Analysis of certified reference material

In order to verify the accuracy of the method UV-PVG/QF-AAS, the analysis of the certified reference material (SRM NIST 1643e) was performed. As indicated in **Table 4** good agreement between the certified and the experimentally found value was achieved.

Table 4 Analysis of the certified reference material by the UV-PVG/QF-AAS method

SRM NIST 1643e	Selenium content ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Certified	11.97 ± 0.14
Found (analysis without HNO_3)	11.42 ± 0.40
Found (analysis with HNO_3)	11.33 ± 0.44

4.4 Generation efficiency

In general, it is assumed that the individual efficiencies for formation, gas-liquid separation, and analyte transport of volatile compounds (selenium hydride) are essentially quantitative in CVG and the response can thus be used as a relative benchmark for performance⁴. However, in experiments with ^{75}Se significantly lower generation efficiencies have been published by some authors^{18,22,23}. Inconsistent results could be a consequence of a different approach to the preparation of the radioactive indicator or its storage²⁴. Furthermore, it was found that $^{75}\text{Se(IV)}$ prepared in hydrochloric acid medium (standard procedure also chosen for the needs of the dissertation), can be relatively fast oxidized to hydride non-active $^{75}\text{Se(VI)}$ ²⁵.

In this study, the maximum attainable generation efficiency of prepared ^{75}Se radiotracer was first determined by means of the batch CVG. Over several weeks, values of $76.6 \pm 0.9\%$; $82.4 \pm 0.7\%$; $80.1 \pm 3.3\%$; $83.8 \pm 0.8\%$; $79.0 \pm 0.8\%$; $83.6 \pm 2.2\%$ of the input activity were obtained for the used radioindicator. Thus, in no case did these values approach 100% efficiency.

A subsequent series of experiments was performed to determine the efficiency of UV-PVG. The efficiency was evaluated on the basis of the fraction of analyte (% of the input activity) adsorbed on two columns connected in series and filled with activated charcoal; no activity was detected on the second column which confirms the good adsorption ability of the charcoal. To obtain the overall efficiency of UV-PVG of selenium,

the fraction of analyte on the columns was related to the efficiency of CVG in a batch mode (the maximum attainable efficiency). The apparatus was disassembled after the generation and the radioactivity of the individual parts was measured, as well as the radioactivity of the liquid waste. So it was also possible to map potential losses of analyte in the individual parts of the apparatus and test the suitability of the materials used for its construction.

The results of the experiment are summarized in **Table 5 A** (values for UV-PVG without nitric acid) and in **Table 5 B** (values for UV-PVG with nitric acid). The overall generation efficiency varied between 21.3% – 67.1%. Higher values (57.7% – 67.1%) were obtained when nitric acid was added. The greatest difference in efficiencies between samples without/with addition of HNO₃ was found for Teflon I, for which the values differed more than twofold (*ca.* 2.6-fold). This significant increase corresponds quite well to the UV-PVG/QF-AAS measurements (*e.g.* a similar difference as between LODs achieved in UV-PVG/QF-AAS). Using the other reaction coils, the increase in the efficiency as a result of addition of nitric acid was not as significant and varied between 4.1% – 12.0%.

On average, less radiotracer remained in the individual parts of the apparatus when nitric acid was added to the analyzed samples. It could be connected with the flushing ability of nitric acid or with the different volatile compounds generated without/with HNO₃. Under consideration of the different volatile products, selenocarbonyl could be less captured on the walls of the apparatus than selenium hydride (only selenocarbonyl is formed in UV-PVG with nitric acid)⁴.

In terms of the material of the reaction coil, it is not possible to unambiguously determine whether more analyte was adsorbed in the teflon or quartz reaction coils. In most cases, the leachates from the UV-photoreactor were found to contain a fraction of analyte to 1% regardless of the material employed. Other materials used to construct the apparatus (Tygon and teflon tubings including connectors *etc.*) were also suitable for these purposes. Finally, the overall sum of ⁷⁵Se activities was in good agreement with the input activity. It means that substantial losses of ⁷⁵Se radiotracer were not observed; in all cases, at least 96.6% of the input activity was found.

Table 5 Fraction of ^{75}Se radiotracer found in the individual phases and parts of the apparatus after UV-photochemical generation of volatile selenium compounds ^a

A) UV-photochemical generation without nitric acid

UV-photoreactor	Teflon I	Teflon II	Quartz I	Quartz II
Analyte fraction (%)				
Gaseous phase	16.3 ± 0.3	44.6 ± 1.6	42.2 ± 1.8	42.1 ± 3.8
Liquid waste	77.5 ± 1.9	45.3 ± 0.9	47.1 ± 0.5	46.0 ± 5.2
Waste tubing	3.0	3.7 ± 0.1	0.7	3.6
Reaction coil	0.6	0.3	5.8 ± 0.1	0.5
Gas-liquid separator	1.2	2.8 ± 0.1	0.9	3.6
Other tubes	0.2	0.8	2.3	1.8
Sum of activities	98.8 ± 0.5	97.5 ± 0.6	99.0 ± 0.4	97.6 ± 0.4
Overall efficiency	21.3 ± 0.5	56.5 ± 2.2	55.1 ± 2.4	54.9 ± 5.1

B) UV-photochemical generation with added nitric acid

UV-photoreactor	Teflon I	Teflon II	Quartz I	Quartz II
Analyte fraction (%)				
Gaseous phase	44.2 ± 2.6	47.8 ± 0.5	51.4 ± 0.5	47.4 ± 1.3
Liquid waste	52.2 ± 0.7	50.0 ± 1.3	41.7 ± 1.8	50.0 ± 0.8
Waste tubing	1.6	0.7	1.7	2.2
Reaction coil	0.1	0.0	1.0	0.7
Gas-liquid separator	0.4	0.0	0.5	0.1
Other tubes	0.2	0.0	0.3	0.5
Sum of activities	98.7 ± 0.5	98.5 ± 0.7	96.6 ± 0.4	100.9 ± 0.5
Overall efficiency	57.7 ± 3.4	60.5 ± 1.0	67.1 ± 1.0	61.8 ± 1.8

^a The values given in the lines "Gaseous phase" and "Waste liquid" are the arithmetic averages of three values ± the standard deviations. The uncertainty values given in the rest of the table were calculated according to Kragten ²⁶; uncertainty below 0.05% is not shown. The last row of the table indicates the overall efficiency of UV-PVG obtained after the correction to the maximum attainable efficiency of generation (76.6% for Teflon I, Quartz I, II, or 79.0% for Teflon II).

The efficiency of continuous CVG was investigated for comparison as well. Under the conditions summarized in **Table 2**, only 35.1 ± 0.5% of the input activity was found on the columns (*i.e.* in the gaseous phase). This value can be translated to the overall

efficiency of $44.4 \pm 0.8\%$ after correction to the maximum attainable efficiency (efficiency of CVG in the batch mode). Much higher fraction of the input activity remained in the CVG apparatus; $16.9 \pm 0.2\%$ was found in the waste tubing and $7.1 \pm 0.5\%$ in total in the reaction coil and gas-liquid separator. Since only selenium hydride is generated in CVG, this result could support the above statement that selenium hydride is probably more captured on the walls of the apparatus than selenocarbonyl formed in UV-PVG. The greater amount of radioactive analyte adsorbed in the system in CVG could have a partial effect on the lower obtained efficiency in comparison with the efficiency of UV-PVG.

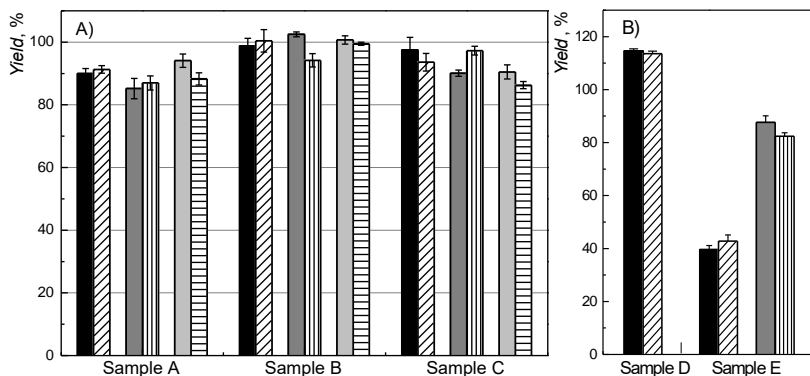
Finally, it was experimentally demonstrated that the working conditions for the maximum sensitivity in UV-PVG/QF-AAS and for the maximum possible generation efficiencies did not fully correspond to one another. The experiment with the radioindicator ^{75}Se was again performed under the modified experimental conditions (it means conditions not optimal for UV-PVG/QF-AAS) and the efficiency was improved by more than 12%.

4.5 Analysis of samples

Further experiments were performed to verify the applicability of UV-PVG/ QF-AAS for routine analysis. Two types of samples with heterogeneous matrix were chosen to obtain a better picture of the practical utilization of the developed method. First, the selenium content in samples of drinking water was determined. Found values were fluctuating around the limit of quantification obtained for selenium by UV-PVG/QF-AAS. Therefore, probably due to the low content of Se(IV) in the analyzed waters, the proposed method is not suitable for similar types of samples.

In the next step, determination of selenium in food supplements was performed. Five commercially available dietary supplements (A – E) were analyzed. The overall yields are shown in the bar graph (**Fig. 2**). With one exception (sample E), the attained values were in reasonable accordance ($\pm 15\%$) with those declared by the producers. Due to the selection of preparations containing water-soluble inorganic selenium species, relatively simple pre-treatment procedures were carried out with the supplements. When analyzing products with selenite ions, mere ultrasonic-assisted extraction of Se(IV) from the tablets by deionized water was found to be effective; more than 90% of the selenium quantity reported in the supplement package leaflets was obtained from all the samples. In addition to deionized water, $0.5 \text{ mol L}^{-1} \text{ HNO}_3$ a $50.0 \text{ mmol L}^{-1} \text{ HCl}$ was also tested to extract selenium from the analyzed preparations; comparable yields of Se(IV) were obtained. It was necessary to

incorporate a pre-reduction step for samples containing Se(VI) before analysis by UV-PVG/QFAAS. Pre-reduction to hydride active Se(IV) was performed by heating the sample (30 min, 90 – 95 °C) in 6.0 mol L⁻¹ HCl. Sample E was additionally subjected to microwave-assisted digestion with nitric acid and hydrogen peroxide; this procedure was chosen due to unsatisfactory results obtained during the pretreatment of the sample only on the basis its dissolution in deionized water.



Obz. 2 Recovery of selenium from dietary supplements

Values are relative to the manufacturer's declared amount of selenium (taken as 100%);

A) Samples containing Se(IV); B) Samples containing Se(VI)

The columns correspond to the use of various extraction agents:

H₂O₂: I II ; HNO₃ (A, B, C) or HNO₃ + H₂O₂ (E): I II ; HCl: I II

I – First batch; II – Second batch

4.6 *In situ* trapping in a graphite tube atomizer

UV-photochemical vapor generation in combination with *in situ* trapping of the generated volatile compounds and subsequent atomization in the graphite tube atomizer (UV-PVG/GF-AAS) was realized to improve the detection limit and the sensitivity, which were obtained during UV-PVG with *on-line* atomization in a quartz furnace atomizer.

Practically, a multiphase temperature program including the process of volatile compounds collection, volatilization and atomization was optimized. These parameters were optimized: the position of the introduction capillary inside the graphite tube during the collection (optimum 2 mm); collection temperature (optimum 350 °C); collection time (60 s was selected) and atomization temperature (optimum 2 000 °C). The inner surface of the

graphite furnace was modified to improve the trapping efficiency. One of the permanent modifiers, iridium, was used for this purpose. Thereby repeated dosing of the modifier in each measurement cycle has been eliminated; the coverage was stable for more than a thousand experiments. Experimental conditions for UV-PVG remained the same as in the UV-PVG/QF-AAS. The flow rate of argon was the exception; it was optimally lower.

Implementation of *in situ* trapping has fulfilled its purpose. When peak heights were evaluated, LODs were reduced by up to one order of magnitude compared to the atomization in a quartz furnace atomizer. The obtained results are summarized in **Table 6** (compare with the values in **Table 3**, with columns for Teflon II). More evident improvement of values was suppressed due to higher signals of the blanks in experiments with the graphite furnace. This also indicates differences in sensitivity; up to fifty times higher sensitivities were determined in UV-PVG/GF-AAS compared to UV-PVG/QF-AAS. In addition, a further shift towards better sensitivities would be possible if collection of volatile compounds in the graphite furnace was extended from the current 60 s. Besides the concentration LODs/LOQs (ng L^{-1}), the table shows the absolute LODs/LOQs (pg) taking into account the sample flow rate or the collection time in the graphite furnace. The sensitivity is expressed as the slope of the calibration curve; characteristic mass (pg) usually preferred in GF-AAS is also shown. The values for the comparative method CVG/GF-AAS, are also given in **Table 6**. The accuracy of the method was successfully verified by the analysis of the certified reference material and two spiked river water samples.

Table 6 Analytical figures of merit obtained for selenium by the method of UV-PVG/GF-AAS with formic acid as a photochemical agent and CVG/GF-AAS

Parameter	UV-PVG with Teflon II		CVG
	No HNO_3	With HNO_3	
Characteristic mass (pg)	12	10	13
LOD (ng L^{-1})	6	4	8
LOQ (ng L^{-1})	19	14	28
Absolute LOD (pg)	26	18	37
Absolute LOQ (pg)	86	61	124
Sensitivity ($10^{-6} \text{ L ng}^{-1}$)	1 616	1 989	1 556
RSD (%)	3.2	3.0	2.7
LDR to ($\mu\text{g L}^{-1}$) (LOQ – to)	1.0	1.0	1.0

Estimation of the UV-PVG efficiency was carried out based on comparison with direct liquid sample introduction of standard solutions into the graphite furnace (considered as 100%). When comparing the efficiencies with the values obtained in experiments with radiotracer ^{75}Se , the following could be said for Teflon II: Better agreement has been reached for UV-PVG without the addition of nitric acid; in this part of the study the efficiency of generation was estimated to be approximately 65%, and it was about 10% less in experiments with the radiotracer of selenium. Greater difference in efficiency was found in generation with nitric acid; approximately 20% lower (peak height were evaluated) efficiency were determined in a more objective approach to quantification of the efficiency. In CVG, lower efficiency was also observed in experiments with the radioindicator ^{75}Se .

4.7 Interference study

The aim of the last part of the dissertation was to investigate the influence of different inorganic ions on the determination of selenium by UV-PVG/QF-AAS (or UV-PVG/GF-AAS). Representatives of transition metals (Co(II), Ni(II), Cu(II), Fe(III), Mn(II), Cr(III), Cd(II), Ag(I)) and other hydride forming elements (As(III), Sb(III) and Pb(II)) were selected for the study. The effect of mineral acids (HCl, H_2SO_4 , H_3PO_4) and appropriate salts (NaCl, Na_2SO_4 , Na_3PO_4) on the analytical signal of selenium was also studied.

The results showed that in the proposed arrangement of the methods, CVG is generally more resistant to the presence of tested interferents compared to UV-PVG; the lowest resistance was observed during UV-PVG with the addition of nitric acid to the analyzed solution. The strong influence of mineral acids on the selenium determination could be a drawback for routine applications, in particular because these acids are often used for stabilization or for pre-treatment of real samples before analysis. However, due to very high sensitivity of the method, dilution could be performed in many cases, to minimize possible complications arising from the presence of interfering matrix components. To reduce the influence of interferents other known ways could be, theoretically, used (evaporation, standard addition method, masking agents *etc.*). On the one hand, the results of the study did not confirm the claim of some authors about the higher tolerance to interference is one of the advantages of UV-PVG in comparison with CVG^{4,16}. On the other hand, the observation that a number of interferents cause a transient increase of the analytic signal is in accordance with other authors.

5 CONCLUSIONS

This thesis deals with UV-photochemical vapor generation (UV-PVG), which was used as an alternative to the previously established approaches to the generation of volatile compounds (*i.e.* chemical or electrochemical generation). Selenium (Se(IV)), one of the classical hydride forming elements, was chosen as the model analyte for the study. The generated volatile compounds were detected by atomic absorption spectrometry.

The apparatus for UV-PVG in the continuous flow mode was first assembled, and then it was *on-line* connected with the externally heated quartz furnace atomizer (QF-AAS detection). The construction of the volatile compounds generator (UV-photoreactor) was studied in detail. Several variants composed of a low-pressure mercury UV-lamp and a reaction coil fixed to its surface were tested. Especially, two types of teflon tubing and two types of quartz tubes differing in their dimensions (length, inner/outer diameter) and the way of attachment to the lamp were employed as reaction coils.

The relevant working parameters affecting the UV-PVG process were optimized after the completion of the apparatus. The basic analytical characteristics of selenium determination by UV-PVG/QF-AAS were found under the optimum conditions for each type of UV photoreactor. Using formic acid as the photochemical agent, limits of detection ranged between 46 – 102 ng L⁻¹. It was confirmed that in the proposed arrangement of UV-photoreactor teflon reaction coils well competed with those of quartz; although quartz is generally more permeable (at the same wall thickness) for UV-radiation. Unlike the reaction coil material, the validation parameters were influenced more by the addition of nitric acid to the photochemical agent. The addition of this acid in the narrow concentration range (about 5.0 to 10.0 mmol L⁻¹, depending on the UV-photoreactor) resulted in the significant improvement of detection limits and sensitivity in determination of selenium by UV-PVG/QF-AAS. Specifically, the detection limits were reduced to 27 - 44 ng L⁻¹ by this step. It can be pointed out that the repeatability was good in all cases and did not exceed 2.4% for any tested UV-photoreactor (without/with nitric acid). The accuracy of the method was successfully verified by the analysis of certified reference material.

The efficiency of UV-photochemical generation was evaluated (for all types of UV-photoreactors) on the basis of experiments with radioactive indicator ⁷⁵Se. Higher efficiencies were again achieved in those cases, where samples with the addition of nitric acid were analyzed (21.3 - 56.5% vs. 57.7 - 67.1%). Differences in the efficiency values were mostly less significant than for detection limits or sensitivities. Besides the study of

efficiency of conversion into volatile compounds the method enables to monitor the distribution of the analyte in the individual parts of the apparatus. In addition, the fraction of adsorbed analyte was even lower when nitric acid was used. These results can be associated with the flushing ability of nitric acid or with the difference of volatile compounds generated in UV-PVG without/with this acid. It was experimentally demonstrated that the working conditions for the maximum sensitivity and for the maximum possible generation efficiency did not fully correspond to one another.

The practical applicability of the method was verified by the analysis of samples with heterogeneous matrix. The selenium content in the samples of drinking water was determined, values fluctuating around the limit of quantification were achieved by UV-PVG/QF-AAS. More positive results were obtained in the analysis of dietary supplements. Due to the nature of the samples, only simple sample pre-treatment was chosen. Mere ultrasonic-assisted dissolution of samples in deionized water was found to be effective; pre-reduction step was additionally included for samples containing Se(VI). At least 85% of manufacturer's declared selenium content was obtained for four of the five supplements.

Although limits of detection achieved by UV-PVG/QF-AAS were low, UV-PVG was further connected with *in situ* trapping of volatile compounds prior to detection by atomic absorption spectrometry; this step was included because of possible improvements of the values. The graphite furnace was employed for the collection and subsequent electrothermal atomization; its inner surface was coated with iridium to improve the trapping efficiency. Introduction of volatile compounds into the graphite tube was automated. Attention was paid especially to the multiphase temperature program during optimization of working conditions. Obtained figures of merit confirmed that the including *in situ* trapping of volatile compounds had been a proper improvement. Detection limits were reduced by nearly one order of magnitude by this step, the sensitivity increased significantly. Approximately 1% decline was recorded in relation with repeatability. The proposed method was compared with the direct liquid sample introduction into the graphite furnace (determination of selenium without generation of volatile compounds).

Interference study was carried out in the last part of the dissertation. The effect of selected transition metals and other hydride-forming elements on the determination of selenium by UV-PVG with QF-AAS or GF-AAS detection was investigated. The influence of mineral acids and corresponding salts was also studied. The results showed that the limited resistance to interference effects is probably the greatest drawback of UV-PVG at the current level of knowledge, and could be a limiting factor in the analysis of certain

types of real samples. However, high sensitivity of the method could allow dilution of samples and thereby minimization of possible complications arising from the presence of interfering components. Other known methods (evaporation, standard addition method, masking agents *etc.*) could theoretically be used to reduce the effect of interferents. The analytical signal of selenium was substantially increased as a consequence of the addition of some interferents in the certain concentration ranges. This finding could be practically utilized in the future, as well as the effect of nitric acid was utilized in this study.

For comparison, many of the above experiments were also carried out using chemical vapor generation with the sodium borohydride reducing agent. Analytical characteristics achieved under the optimum working conditions clearly showed (for both methods of atomization) that the UV-PVG is fully alternative to the traditional approach to the volatile compounds generation. Better limits of detection and sensitivity were obtained in UV-PVG with nitric acid, linear dynamic range or repeatability remained approximately the same. Efficiencies quantified on the basis of experiments with radioactive indicator of selenium were also comparable; lower values during chemical generation in the continuous flow mode can be partly attributed to a larger fraction of the radioactive analyte detected in the apparatus after generation. A higher resistance to the interferents can be considered as an advantage of chemical generation in comparison with UV-photochemical generation.

It can be concluded that aims of the study were successfully fulfilled. Besides the activities commonly performed when introducing a new method (optimization study, determination of basic analytical characteristics or interference study) also other important themes related to the method were studied. For example: quantification of the generation efficiency using the Se radiotracer; the application of UV-PVG/QF-AAS in analysis of dietary supplements and the automated *in situ* trapping of volatile compounds in the graphite furnace. The obtained results were published in several specialized impacted journals, which demonstrates the importance of the thesis.

The overall impression of UV-photochemical generation, formed on the basis of a number of experiments carried out, is as follows: this sensitive and simple approach to the generation of volatile compounds could take an equal position among other methods of generation (not only in our laboratory of spectrometric methods). Due to the limited resistance to interference effects it can be expected that this technique of sample introduction could find its application in laboratory practice, particularly in the analysis of samples with a simple matrix.

6 REFERENCES

- [1] Dumont, E.; Vanhaecke, F.; Cornelis, R.: Selenium speciation from food source to metabolites: a critical review. *Anal. Bioanal. Chem.* **385**, 1304–1323 (2006).
- [2] Guo, X.; Sturgeon, R. E.; Mester, Z.; Gardner, G. J.: Vapor generation by UV irradiation for sample introduction with atomic spectrometry. *Anal. Chem.* **76**, 2401–2405 (2004).
- [3] Wu, P.; He, L.; Zheng, C.; Hou, X.; Sturgeon, R. E.: Applications of chemical vapor generation in non-tetrahydroborate media to analytical atomic spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.* **25**, 1217–1246 (2010).
- [4] Guo, X.; Sturgeon, R. E.; Mester, Z.; Gardner, G. J.: UV vapor generation for determination of selenium by heated quartz tube atomic absorption spectrometry. *Anal. Chem.* **75**, 2092–2099 (2003).
- [5] Guo, X.; Sturgeon, R. E.; Mester, Z.; Gardner, G. J.: UV light-mediated alkylation of inorganic selenium. *Appl. Organomet. Chem.* **17**, 575–579 (2003).
- [6] Guo, X.; Sturgeon, R. E.; Mester, Z.; Gardner, G. J.: Photochemical alkylation of inorganic selenium in the presence of low molecular weight organic acids. *Environ. Sci. Technol.* **37**, 5645–5650 (2003).
- [7] Takatani, T.; Fitzgerald, N.; Galbraith, J. M.: Proposed reaction mechanisms for selenium UV photolysis vapor generation by computational methods. *Anal. Bioanal. Chem.* **388**, 859–862 (2007).
- [8] Dědina, J.; Tsalev, D.: *Hydride generation atomic absorption spectrometry*. England, John Wiley & Sons, 1995.
- [9] Deng, H.; Zheng, C.; Liu, L.; Wu, Li; Hou, X.; Lv, Y.: Photochemical vapor generation of carbonyl for ultrasensitive atomic fluorescence spectrometric determination of cobalt. *Microchem. J.* **96**, 277–282 (2010).
- [10] Zheng, C.; Sturgeon, R. E.; Hou, X.: UV photochemical vapor generation and in situ preconcentration for determination of ultra-trace nickel by flow injection graphite furnace atomic absorption spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.* **24**, 1452–1458 (2009).

- [11] Zhang, S.; Luo, H.; Peng, M.; Tian, Y.; Hou, X.; Jiang, X.; Zheng, C.: Determination of Hg, Fe, Ni, and Co by Miniaturized Optical Emission Spectrometry Integrated with Flow Injection Photochemical Vapor Generation and Point Discharge. *Anal. Chem.* **87**, 10712–10718 (2015).
- [12] Figueroa, R.; García, M.; Lavilla, I.; Bendicho, C.: Photoassisted vapor generation in the presence of organic acids for ultrasensitive determination of Se by electrothermal-atomic absorption spectrometry following headspace single-drop microextraction. *Spectrochim. Acta, Part B* **60**, 1556–1563 (2005).
- [13] Guo, X.; Sturgeon, R. E.; Mester, Z.; Gardner, G.: UV photosynthesis of nickel carbonyl. *Appl. Organomet. Chem.* **18**, 205–211 (2004).
- [14] Madden, J. T.; Fitzgerald, N.: Investigation of ultraviolet photolysis vapor generation with in-atomizer trapping graphite furnace atomic absorption spectrometry for the determination of mercury. *Spectrochim. Acta, Part B* **64**, 925–927 (2009).
- [15] García, M.; Figueroa, R.; Lavilla, I.; Bendicho, C.: On-line photoassisted vapour generation implemented in an automated flow-injection/stopped-flow manifold coupled to an atomic detector for determination of selenium. *J. Anal. At. Spectrom.* **21**, 582–587 (2006).
- [16] Zheng, C.; Wu, L.; Ma, Q.; Lv, Y.; Hou, X.: Temperature and nano-TiO₂ controlled photochemical vapor generation for inorganic selenium speciation analysis by AFS or ICP-MS without chromatographic separation. *J. Anal. At. Spectrom.* **23**, 514–520 (2008).
- [17] Šíma, J.; Rychlovský, P.; Dědina, J.: The efficiency of the electrochemical generation of volatile hydrides studied by radiometry and atomic absorption spectrometry. *Spectrochim. Acta, Part B* **59**, 125–133 (2004).
- [18] Hraníček, J.; Červený, V.; Kratzer, J.; Vobecký, M.; Rychlovský, P.: Characterization and mutual comparison of new electrolytic cell designs for hydride generation-atomic absorption spectrometry with a quartz tube atomizer using Se as a model analyte and ⁷⁵Se as a radioactive indicator. *J. Anal. At. Spectrom.* **27**, 1761–1771 (2012).
- [19] Welz, B.; Melcher, M.: Mechanisms of transition metal interferences in hydride generation atomic-absorption spectrometry. Part 1. Influence of cobalt, copper, iron and nickel on selenium determination. *Analyst* **109**, 569–572 (1984).

- [20] Bax, D.; Agterdenbos, J.; Worrell, E.; Kolmer, J. B.: The mechanism of transition metal interference in hydride generation atomic absorption spectrometry. *Spectrochim. Acta, Part B* **43**, 1349–1354 (1988).
- [21] Zheng, C.; Sturgeon, R. E.; Brophy, C. S.; He, S.; Hou, X.: High-yield UV-photochemical vapor generation of iron for sample introduction with inductively coupled plasma optical emission spectrometry. *Anal. Chem.* **82**, 2996–3001 (2010).
- [22] Dočekal, B.; Dědina, J.; Krivan, J.: Radiotracer investigation of hydride trapping efficiency within a graphite furnace. *Spectrochim. Acta, Part B* **52**, 787–794 (1997).
- [23] Dočekal, B.; Marek, P.: Investigation of in situ trapping of selenium and arsenic hydrides within a tungsten tube atomiser. *J. Anal. At. Spectrom.* **16**, 831–837 (2001).
- [24] May, T. W.; Kane, D. A.: Matrix-dependent instability of selenium(IV) stored in teflon containers. *Anal. Chim. Acta.* **161**, 387–391 (1984).
- [25] Krivan, V.; Petrick, K.; Welz, B.; Melcher, M.: Radiotracer error-diagnostic investigation of selenium determination by hydride-generation atomic absorption spectrometry involving treatment with hydrogen peroxide and hydrochloric acid. *Anal. Chem.* **57**, 1703–1706 (1985).
- [26] Kragten, J.: Tutorial review. Calculating standard deviations and confidence intervals with a universally applicable spreadsheet technique. *Analyst* **119**, 2161–2165 (1994).

CURRICULUM VITAE

Name: Marcela Rybínová

Date of birth: 22th July 1986

Place of birth: Nymburk

Education

2010 – present

Charles University in Prague, Faculty of Science, Dept. of Analytical Chemistry;
Study program: Analytical chemistry

2008 – 2010

Charles University in Prague, Faculty of Science, Dept. of Analytical Chemistry;
Study program: Clinical and Toxicological Analysis; Degree: master

2005 – 2008

Charles University in Prague, Faculty of Science, Dept. of Analytical Chemistry;
Study program: Clinical and Toxicological Analysis; Degree: bachelor

2001 – 2005

Grammar school in Nymburk

Grants Projects

Member of research team of the following grant projects:

2014 – present

GA UK 228214: UV vapor generation of volatile compounds for use in ultratrace analysis
by QFAAS

2014 – present

GA CR P206/14-23532S: Generation and preconcentration of volatile compounds for
atomic absorption and atomic fluorescence spectrometry

Language skills

English PET (Cambridge Certificate Preliminary English Test), 2012

German Beginner

LIST OF PUBLICATIONS

5. Rybínová, M., Červený, V., Hraníček, J., Rychlovský, P.: UV-fotochemické generování těkavých sloučenin pro potřeby atomových spektrometrických metod. *Chem. Listy* **109**, 930–937 (2015).
6. Rybínová, M., Červený, V., Rychlovský, P.: UV-photochemical vapour generation with *in situ* trapping in a graphite tube atomizer for ultratrace determination of selenium. *J. Anal. At. Spectrom.*, **30**, 1752–1763 (2015).
7. Rybínová, M., Červený, V., Hraníček, J., Rychlovský, P.: UV-photochemical vapor generation with quartz furnace atomic absorption spectrometry for simple and sensitive determination of selenium in dietary supplements. *Microchem. J.* **124**, 584–593 (2016).
8. Rybínová, M., Musil, S., Červený, V., Vobecký, M., Rychlovský, P.: UV-photochemical vapor generation of selenium for atomic absorption spectrometry: optimization and ^{75}Se radiotracer efficiency study. *Spectrochim. Acta, Part B* **123**, 134–142 (2016).

LIST OF LECTURES AND POSTERS

ORAL CONFERENCE CONTRIBUTIONS

1. Rybínová, M., Kolorosová, A., Červený, V., Rychlovský, P.: *Determination of Selenium Using Photochemical Volatile Compounds Generation Coupled with Atomic Absorption Spectrometry*. 8th International Students Conference "Modern Analytical Chemistry". Prague, Czech Republic (24 – 25 September, 2012).
2. Rybínová, M., Červený, V., Rychlovský, P.: *Comparison of UV-photochemical and Chemical Volatile Compounds Generation for the Determination of Selenium by Atomic Absorption Spectrometry*. 9th International Students Conference "Modern Analytical Chemistry". Prague, Czech Republic (23 – 24 September, 2013).
3. Rybínová M., Červený V., Rychlovský P.: *Determination of Selenium Using UV-photochemical Volatile Compounds Generation in Combination with QF-AAS: From the construction of the apparatus to real samples*. 10th International Students Conference "Modern Analytical Chemistry". Prague, Czech Republic (22 – 23 September, 2014).
4. Rybínová M., Červený V., Rychlovský P.: *Stanovení selenu kombinovanou technikou UV-fotochemického generování těkavých sloučenin a atomové absorpční spektrometrie s křemenným atomizátorem*. 66. Sjezd chemických společností – lecture in Shimadzu prize section. Ostrava, Czech Republic (7 – 10 September, 2014).
Award - Shimadzu prize 2014: 2nd prize
5. Rybínová, M.: *Stanovení selenu kombinovanou technikou UV-fotochemického generování těkavých sloučenin a atomové absorpční spektrometrie s křemenným atomizátorem*. Seminar of postgraduate students of analytical chemistry (Prague universities) "Perspektivy v analytické chemii 2014". Department of Analytical Chemistry Faculty of chemical engineering UCT Prague. Prague, Czech Republic (6 November, 2014).

POSTERS

1. Rybinova, M., Dvorakova, D., Kolorosova, A., Cerveny, V., Hranicek, J., Rychlovsky, P.: *Photochemical volatile forms generation for determination of selenium by quartz furnace atomic absorption spectrometry*. 4th EuCheMS Chemistry Congress. Prague, Czech Republic (26 – 30 August, 2012).
2. Rybínová, M., Kolorosová, A., Červený, V., Rychlovský, P.: *Determination of selenium using photochemical volatile compounds generation coupled with atomic absorption spectrometry*. SAS 2012; XXth SCSC. Tatranská Lomnica, Slovakia (7 – 12 October, 2012).
3. Rybinova, M., Cerveny, V., Rychlovsky, P.: *Determination of selenium using chemical and photochemical volatile compounds generation coupled with atomic absorption spectrometry*. XXXVIII Colloquium Spectroscopicum Internationale. Tromsø, Norway (16 – 20 June, 2013).
4. Rybínová, M., Červený, V., Rychlovský, P.: *Determination of Selenium in Food Supplements and Water Samples Using UV-photochemical Generation in Combination with QF-AAS detection*. Súčasný stav a perspektívy analytickej chémie v praxi. Bratislava, Slovakia (1 – 4 June, 2014)
Poster prize: "Diplom za vynikajúci príspevok v panelovej sekcii"
5. Rybinova, M., Musil, S., Cerveny, V., Vobecky, M., Rychlovsky, P.: *The efficiency of UV-photochemical generation of selenium volatile compounds using radioactive indicator*. 13th Rio Symposium on Atomic Spectrometry. Mérida, Mexico (19 – 24 October, 2014).
6. Rybínová, M., Nováková, E., Červený, V., Hraníček, J., Rychlovský, P.: *Vapour generation of Selenium: Interference Study and Comparison of Existing Approaches*. 13th Rio Symposium on Atomic Spectrometry. Mérida, Mexico (19 – 24 October, 2014).

7. Rybínová, M., Červený, V., Rychlovský, P.: *UV-photochemical vapour generation with in-situ trapping in a graphite tube atomizer for ultratrace determination of selenium*. Colloquium spectroscopicum internationale XXXIX. Figueira da Foz, Portugal (30 August – 3 September, 2015).

8. Rybínová, M., Červený, V., Rychlovský, P.: *Determination of selenium by UV-photochemical vapour generation coupled with graphite furnace atomic absorption spectrometry*. 67. Zjazd chemikov. Horný Smokovec, High Tatras, Slovakia (7 – 11 October, 2015).