

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Fakulta přírodovědecká

Katedra analytické chemie



MOŽNOSTI SPECIAČNÍ ANALÝZY V AAS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor práce:

Tomáš Pluháček

Studijní obor:

Chemie

Vedoucí bakalářské práce:

Ing. David Milde, Ph.D.

Olomouc 2011

SOUHRN

Tato práce podává literární přehled o využití atomové spektrometrie ke stanovení specií prvků. Uvádí definice a pojmy speciální analýzy. Charakterizuje vlastnosti, výskyt a toxicitu vybraných prvků. V práci jsou popsány základní principy metod, kterých se využívá ke stanovení specií prvků. V závěru práce jsou zpracovány možnosti využití atomové absorpční spektrometrie ke speciaci vybraných kovů v různých matricích (krevní séru, mléce, rašelině, vzorcích vody) za použití různých atomizačních technik.

SUMMARY

This thesis deals with the possibilities of using the atomic spectrometry to determine the species of elements. Definitions and terms of speciation analysis are determined and the properties, frequency and toxicity of some selected elements are characterised in the thesis. The basic principles of methods used in determining the species of elements are described. The conclusion of the thesis summarises the possibilities of using the atomic absorption spectrometry for the speciation of some selected metals in various matrices (blood serum, milk, peat, water samples) using various atomising techniques.

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou v seznamu použité literatury.

Souhlasím s tím, že práce je prezenčně zpřístupněna v knihovně Katedry analytické chemie, Přírodovědecké fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne

.....

Děkuji svému vedoucímu bakalářské práce Ing. Davidu Mildemu, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, připomínky a čas, který mi věnoval při konzultacích.

Obsah

Úvod	1
1. Speciační analýza	2
1.1 Doporučení IUPAC ⁵	3
2. Stanovované prvky	3
2.1 Antimon	4
2.2 Arsen	4
2.3 Chrom	5
2.4 Rtuť	6
2.5 Selen.....	7
2.6 Železo.....	8
3. Metody využívané ve speciační analýze	9
3.1 Separační metody.....	9
3.1.1 Chromatografie.....	9
3.1.1.1 Plynová chromatografie.....	10
3.1.1.2 Kapalinová chromatografie	10
3.1.2 Kapilární zónová elektroforéza	11
3.2 Atomová spektrometrie.....	12
3.2.1 Atomová absorpční spektrometrie	13
3.2.1.1 Zdroje záření.....	13
3.2.1.2 Atomizátory	16
3.2.1.3 Monochromátory	16
3.2.1.4 Detektory	16
3.2.1.5 AAS s atomizací v plameni	17
3.2.1.6 AAS s elektrotermickou atomizací.....	18
3.2.1.7 Generování těkavých sloučenin v AAS.....	19
3.2.1.8 Interference	21
3.2.2 Optická emisní spektrometrie	21
3.2.3 Atomová fluorescenční spektrometrie	22
3.2.4 Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem.....	23

4. Speciační analýza v atomové absorpční spektrometrii.....	24
4.1 Generování těkavých sloučenin v AAS	24
4.2 Elektrotermická atomizace v AAS.....	27
4.3 Atomizace v plameni v AAS	28
Závěr.....	29
Seznam použitých zkratk	30
Literatura	31

Úvod

Rozpoznání skutečnosti, že v chemii životního prostředí, výživě a medicíně jsou biologické, chemické a toxikologické vlastnosti prvku kriticky závislé na formě, ve které se prvek ve vzorku vyskytuje, mělo za důsledek urychlený vývoj oblasti analytické chemie označované jako speciační analýza. Termín speciační analýza v chemii odkazuje na distribuci prvku mezi definované chemické specie, tj. mezi specifické formy prvku definované izotopickým složením, elektronovým nebo oxidačním stavem, komplexní nebo molekulární strukturou.

Speciační analýza se vyvíjela v posledních 20 až 30 letech do podoboru analytické chemie mající značný dopad na monitorování stavu životního prostředí. Oblast nejčastějšího zkoumání speciační analýzy jsou antropogenní organokovové sloučeniny a produkty jejich degradace v životním prostředí jako např. methylrtuť, jednoduché organosloučeniny arsenu a selenu.^{1,2}

1. Speciační analýza

V životním prostředí se stopové prvky vyskytují v různých formách, studium jejich chování přineslo v minulosti mnoho informací o zdrojích kontaminace, výskytu, možnostech pohybu a toxických účincích na organismy. Z toxikologického hlediska nestačí znát jen celkový obsah toxického prvku ale i jednotlivé formy, ve kterých se ve vzorku nachází. Poznatky toxikologů o různé toxicitě a rozdílných vlivech jednotlivých sloučenin těžkých kovů na živé organismy vedl k analytické speciaci různých forem prvků v biologických materiálech i ve vzorcích ze životního prostředí.

Termín speciace se rozšířil v analytické literatuře na přelomu sedmdesátých a osmdesátých let. Slovo speciace je v současné době používáno ve dvou významech. První význam označuje postup, který má za cíl rozlišení, stanovení jednotlivých specií ve vzorku. Pak je slovo speciace synonymní s výrazem speciační analýza. Termín speciační analýza není přesně definován a autoři si jej vysvětlují různě. Speciační analýza dle Florence³ je definována jako stanovení koncentrací jednotlivých fyzikálně-chemických forem prvku, jejichž součet tvoří celkovou koncentraci prvku ve vzorku. Ure a Davidson⁴ definovali speciační analýzu jako proces identifikace a kvantifikace rozdílných, definovaných specií, forem a fází přítomných v látce. Templeton a spol⁵ definovali speciační analýzu jako analytické aktivity vedoucí k identifikaci a měření kvantitativního zastoupení jedné nebo více individuálních chemických specií ve vzorku. Druhý význam slova speciace je také forma nebo formy prvku, v nichž se ve vzorku vyskytuje, tedy fyzikálně-chemický stav.

Rozlišované specie prvku bývají většinou různá chemická individua (např. komplexy, ionty v různých oxidačních stavech, organokovové sloučeniny atd.). Někdy se specie definují, dělí na základě rozdílných fyzikálně-chemických vlastností jako je extrahovatelnost různými rozpouštědly, různá reaktivita, rozpustnost nebo afinita k modifikovaným fázím.

Speciační analýza je odpovědí na otázku v jakých formách je prvek ve vzorku obsažen.^{6,7}

1.1 Doporučení IUPAC⁵

Z důvodu sjednocení používané terminologie ve speciační analýze vydala Mezinárodní unie pro čistou a aplikovanou chemii (IUPAC) v roce 2000 doporučení, které prezentuje definice pojmů souvisejících se speciační analýzou a chemickými speciemi. Odlišuje frakcionaci od speciační analýzy a navrhuje třídění specií podle isotopického složení, oxidačního a elektronického stavu, komplexní a molekulové struktury.

Chemická specie prvku – specifická forma prvku definovaná izotopovým složením, elektronovým nebo oxidačním stavem nebo molekulovou strukturou

Speciační analýza – analytická činnost k identifikaci nebo stanovení specií

Speciace prvku – distribuce prvku mezi jednotlivé specie v systému

Frakcionace – proces klasifikace analytů na základě fyzikálních (velikost, rozpustnost) nebo chemických (vazby, reaktivita) vlastností

2. Stanovované prvky

Mezi stanovované prvky ve speciační analýze patří antimon, arsen, cín, chrom, hliník, kadmium, kobalt, křemík, mangan, měď, molybden, nikl, olovo, paladium, platina, rtuť, selen, síra, vanad, zinek, zlato, železo. Stanovení specií těchto prvků je velmi důležité, protože jejich toxicita, biodostupnost, akumulace, reaktivita a metabolismus jsou závislé na tom, v jaké formě se prvek v životním prostředí vyskytuje.²

2.1 Antimon

Antimon je relativně vzácný prvek, jeho výskyt je okolo 0,2-0,3 mg/kg v zemské kůře. Antimon se vyskytuje společně s jinými prvky (arsen a síra). V nekontaminované vodě je typicky koncentrace antimonu okolo nebo pod 1 µg/l. Maximální přípustná koncentrace v antimonu v pitných vodách byla ustanovená na 10 µg/l v Evropě a doporučená koncentrace pod 2 µg/l v Japonsku². Do životního prostředí se antimon dostává z přírodních zdrojů (sopečná činnost, zvětvávání hornin), ale i antropogenní činností (spalování fosilních paliv, těžba nerostných surovin a uhlí a při výrobě olova a mědi).

Speciační analýza antimonu je důležitá zvláště v životním prostředí a biomedicině, protože jeho toxicita, biodostupnost, reaktivita je závislá nejen na oxidačním stavu ale také na povaze specifické sloučeniny.

Obecně jsou anorganické formy antimonu více toxické než formy organické. Elementární antimon je více toxický než jeho soli. Trojmocný antimon má 10 krát větší toxicitu než pětimocný. Většina specií antimonu je vylučována v nezměněné podobě během 48 hodin po požití. Velká oblast pro speciační analýzu patří biomedicině kvůli použití antimonu jako terapeutické látky proti tropickým nemocím. Stanovované specie antimonu jsou Sb^{III} , Sb^{V} , $(\text{CH}_3)_3\text{SbCl}_2$.²

Antimon se používá jako tvrdidlo kulek z měkkého olova, přísada v procesu vulkanizace gumy a jako barvivo na keramické a skleněné zboží. Sloučeniny antimonu se používají v medicíně při léčbě AIDS a sifilisu.^{2,6,8,9}

2.2 Arsen

Arsen se nachází ve všech složkách životního prostředí. V půdě se arsen vyskytuje hlavně ve formě málo rozpustných arsenitanů a arseničnanů železa a hliníku a většinou v ložiskách sulfidických kovů. Nejběžnější minerál je arsenopyrit (FeAsS). Nekontaminované půdy obsahují obvykle 0,2-40 mg/kg arsenu, u kontaminovaných půd se obsah zvyšuje až na 550 mg/kg. Pohyblivost arsenu je ovlivňována pH a velikostí částic. Obvyklé koncentrace arsenu v podzemí vodě jsou v rozsahu od 0,5 do 10 µg/l.² Do životního prostředí se arsen dostává jednak antropogenní činností (spalování a těžba uhlí, hnojiva, preparáty na ochranu dřeva a při výrobě olova a mědi), ale i vulkanickou aktivitou a zvětváváním hornin.

Nebezpečí arsenu je závislé na fyzikálních a chemických vlastnostech, toxicitě, mobilitě a biotransformaci specií arsenu. Toxicita sloučenin arsenu je 10 krát větší než antimonu, což převážně závisí na oxidačním stavu a chemické struktuře. Obecně jsou anorganické formy arsenu více toxické než organické formy. Různé specie arsenu lze seřadit podle toxicity: arsan > anorganické arsenitany > organické trojmocné sloučeniny > anorganické arseničitany > organické pětímocné sloučeniny > elementární arsen. Arsenobetain a arsenocholin jsou považovány za netoxické. Mnohé práce prokazují, že sloučeniny arsenu jsou nejen toxické, ale mají i karcinogenní, mutagenní a teratogenní účinky. Stanovované specie arsenu jsou As^{III} , As^{V} , MMA (kyselina monomethylarseničná) a DMA (kyselina dimethylarseničná) v moči.²

Elementární arsen se používá jako přísada do speciálních slitin. Arsenidy se používají v mikroelektronice a polovodičovém průmyslu. Sloučeniny arsenu se využívají v zemědělství a lesnictví jako insekticidy nebo herbicidy. Oxid arsenitý je aplikován ve sklářském a keramickém průmyslu na bělení (odbarvování), přísada do olova při výrobě broků. Arsen a jeho sloučeniny mají využití i v medicíně. Z historického hlediska byl oxid arsenitý zneužíván pro vražedné a sebevražedné účely.^{2,6,8,10}

2.3 Chrom

Chrom je kovový prvek, který se převážně vyskytuje v zemské kůře ve formě chromitu $\text{Cr}_2\text{O}_3 \cdot x \text{FeO}$. Převážně se vyskytuje v oxidačním stupni III (jako chromitý kation) a VI (chromanový nebo dichromanový anion). V kyselém prostředí je šestimocný chrom silné oxidační činidlo, v přítomnosti dárců elektronů jako je organická hmota nebo anorganické redukující látky se redukuje na trojmocný chrom. V lidech a zvířatech je trojmocný chrom stopovým prvkem, který se podílí na metabolismu sacharidů a tuků, stimuluje aktivitu enzymů metabolizujících glukosu, syntézu mastných kyselin a cholesterolu.^{2,12}

Cr^{III} a Cr^{VI} se liší nábojem, fyzikálně-chemickými vlastnostmi, což má za důsledek rozdílnou chemickou a biochemickou reaktivitu. Biologická aktivita chromu závisí na oxidačním čísle kovu, kovový chrom (nulové mocenství) je biologicky netečný, trojmocný stav představuje základní prvek a šestimocný chrom považujeme za toxickou formu. Sloučeniny šestimocného chromu patří mezi karcinogenní a mutagenní látky. Stanovované specie chromu jsou Cr^{III} , Cr^{VI} .²

Chrom se používá při výrobě oceli, při povrchové úpravě chirurgických nástrojů (skalpely, sterilizátory), v elektrolytickém pokovování, výrobě pigmentů a kožedělném průmyslu. Feromagnetický CrO_2 je užíván jako materiál na zvukové pásky a videopásky.^{2,6,8,11,12}

2.4 Rtuť

Rtuť patří mezi nejvíce sledované kovy v životním prostředí a nejvíce bioakumulované stopové prvky v lidském potravním řetězci. Rtuť se nachází nejvíce v ovzduší (páry rtuti) a ve vodních ekosystémech, kde patří mezi nejtoxičtější látky. Hlavní cesta vystavení lidského organismu speciím rtuti je konzumace kontaminovaných ryb, dentální amalgám, ve speciálních případech pracovními podmínkami (prostředím). Koncentrace rtuti ve vzduchu se pohybuje od 2,5-15 ng/m^3 a ve vodě pod 1 ng/l .² Nedávné studie ukázaly, že velká většina rtuti je bioakumulovaná skrz potravní řetězec jako methylртуť. Z důsledku rozdílné toxicity jednotlivých forem rtuti je velmi důležité stanovit nejenom celkové obsahy rtuti, ale také zastoupení různých specií ve všech složkách životního prostředí a především v potravinách.

Nejdůležitější z toxikologického hlediska jsou elementární forma, Hg^{II} anorganické formy a organické formy rtuti, které jsou mnohem více toxické než formy anorganické. Elementární rtuť je značně toxická, jelikož má relativně vysoký tlak par (14 mg/m^3 při 20 °C, 31 mg/m^3 při 30 °C), dobrou rozpustnost v tukových tkáních. Hg^{II} je více toxický než elementární forma, což je způsobeno vyšší rozpustností ve vodě. Toxicitu rtuti způsobuje i reaktivita se sloučeninami, které obsahují koncové thiolové ($\text{SH}-$) a alkylové skupiny. Organické sloučeniny rtuti tvoří lineární struktury, které obsahují jeden nebo dva uhlovodíkové zbytky navázané na atom rtuti, tvoří tak sloučeniny typu RHgX nebo RHgR' , kde R a R' jsou uhlovodíkové zbytky (CH_3- , C_2H_5- , C_6H_5-) a X je anion (halogenid, sulfid, dusičnan). Organické kationty R-Hg^+ ve formě solí s anorganickými organickými kyselinami (např. chloridy a octany) jsou biologicky velmi reaktivní. Methylртуť je toxin negativně působící na centrální nervovou soustavu, který produkují mikroorganismy v sedimentech i řasách. Alkylртуťové sloučeniny jsou více odolné proti biodegradaci než arylртуťové sloučeniny (PhHg). Stanovované specie rtuti jsou Hg^{II} , methylртуť (MeHg^+), fenylртуť (PhHg^+), ethylртуť (EtHg^+).

Rtuť se používá na výrobu elektrod, teploměrů, dentálních amalgámů, fyzikálních přístrojů, výbojek, další využití při elektrolýze a v polarografii. HgO je používán jako fungicid a další sloučeniny rtuti jako detonátory (např. fulminát rtuťnatý). Fenyłrtuťové sloučeniny jsou součástí venkovních barev.^{2,6,8,13}

2.5 Selen

Obsah selenu v půdách se pohybuje v rozpětí 0,02-2 mg/kg.² Selen se vyskytuje hlavně ve formě selenidů ale i jako příměs sulfidických rud. Přítomnost v životním prostředí, biologických materiálech v anorganických a organických formách, vedla k použití speciální analýzy, protože biodostupnost a toxicita prvku závisí na formě, ve které se vyskytuje. Selen patří pro lidský organismus mezi esenciální prvky. Selen se váže do selenoproteinů, nejznámější je glutathionperoxidasa (GPx), které chrání buňky proti oxidačnímu poškození. Snížený obsah selenu v organismu zvyšuje riziko karcinomů, kardiovaskulárních a dalších onemocnění, jež způsobují volné radikály. Doporučená dávka pro dospělého člověka je 55 µg/den. Při příjmu 1000 µg/den nastává intoxikace, dávka vyšší než 5 mg/kg je smrtelná.¹⁴ Selen se do ovzduší uvolňuje při spalování uhlí, petroleje, při tavbě a čištění dalších kovů.

Ekotoxicita specií selenu spočívá v jejich bioakumulaci, metabolismu a přenosu skrz potravní řetězec. Živé organismy jsou schopny metabolizovat selen v různých chemických formách, kterým byly vystaveny zvláště organické sloučeniny selenu. Stanovované specíe selenu jsou Se^{IV}, Se^{VI}, selenomethionin (SeMet), selenocystein (SeCys), selenoethionin (SeEt), selenometylselenocystein (SeMeSeCys)¹⁴

Selen se uplatňuje v elektrotechnice (fotočlánky, usměrňovače), v ocelářství, gumárenství, farmacii a sklářském průmyslu. Selenidy různých kovů, které mají vlastnosti polovodičů, se používají při výrobě elektrotechnických a optoelektronických součástek.^{2,6,8,14,15}

2.6 Železo

Železo je v pořadí čtvrté v hojnosti výskytu prvků (po O, Si, Al), a na druhém místě v hojnosti výskytu kovů v zemské kůře. Významné železné rudy jsou hematit (Fe_2O_3), magnetit (Fe_3O_4), hnědel ($\text{FeO}(\text{OH})$) a ocelek (FeCO_3).^{2,8} Nejdůležitější oxidační stav v chemii je Fe^{II} a Fe^{III} , které se mohou snadno přecházet jeden v druhý což je ovlivňováno pH a teplotou. Rozpustnost solí obou forem se značně liší Fe^{2+} mají ve vodných roztocích značnou rozpustnost, zatímco soli Fe^{3+} díky postupné hydrolyze jsou málo rozpustné. Oba stavy tvoří mnoho různorodých komplexů. V čistých vodných roztocích se tvoří aqua-hydroxo-komplexy, při velmi nízkém pH je dominantní hexaaqua-komplex a při zvýšení pH převládají hydroxo-komplexy. Celkový obsah v minerálních vodách se pohybuje v koncentracích desítek mg/l, proto jsou zbavovány železa před stáčením. Obsah železa nesmí překročit hodnotu 0,5 mg/l ve vodárenských vodách a hodnotu 2,0 mg/l v ostatních tocích.¹⁶

Tělo dospělého člověka obsahuje 3-5 g železa, které je distribuováno mezi různé fyziologické části. Nejvíce železa přibližně 3 g je vázáno v kyslíkové rezervě a je přepravováno jako hemoglobin v červených krvinkách. Nedostatek železa v těle snižuje koncentraci hemoglobinu v krvi, což má za následek vznik nemoci, která se nazývá anémie. Stanovované specie železa jsou Fe^{II} , Fe^{III} .²

Železo našlo použití zejména jako konstrukční materiál. Další sloučeniny železa našly i jiné uplatnění, Fe_2O_3 pigment, Fe_3O_4 na výrobu elektrod pro tavné elektrolýzy. $\text{Fe}(\text{OH})_3$ se využívá při čištění vod (čeřidlo). Zelená skalice ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) se používá na výrobu berlínské modři (barvářství), konzervování dřevěných předmětů i jako insekticid. Bezvodý FeCl_3 našel využití jako katalyzátor Friedel-Craftsových syntéz, v elektrotechnice při výrobě tištěných spojů a v textilním průmyslu jako mořidlo. Termickým rozkladem $[\text{Fe}(\text{CO})_5]$ se získává velmi čisté železo.^{2,6,8,16}

3. Metody využívané ve speciální analýze

Nízké koncentrace toxických prvků a jiných specií, které se vyskytují v životním prostředí a v biologických materiálech, vedlo analytické chemiky kombinovat různé separační a citlivé detekční techniky. Pro prvkovou speciální analýzu se v současné době využívají převážně tandemové (kombinované) techniky, které spojují separační metody (vysoce účinnou kapalinovou chromatografii – HPLC, plynovou chromatografii – GC a kapilární zónovou elektroforézu – CZE) se selektivními detekcemi prvků. Použití těchto technik umožňuje stanovení stopových až ultrastopových koncentrací analyzovaných toxických a esenciálních prvků, ale i selektivní stanovení všech přítomných fyzikálně-chemických forem stanovovaného prvku.

Kombinace kapalinové chromatografie s různými detekcemi atomovou spektrometrií skýtá velmi kvalitní nástroj na speciaci prvků. Jedná se o spojení vysokoúčinné separační techniky se selektivními a citlivými detekčními technikami. Jelikož separace specií kovů, kromě přirozených organických forem, probíhá většinou v netěkavých formách, proto se kapalinová chromatografie používá pro speciální analýzu častěji než chromatografie plynová. V plynové chromatografii se musí totiž netěkavé specie před stanovením derivatizovat, což zvyšuje nebezpečí kontaminace.^{6,13}

3.1 Separační metody

3.1.1 Chromatografie

Chromatografie patří mezi nejvýznamnější separační metody. Chromatografie umožňuje dělení a následnou identifikaci, stanovení velkého počtu anorganických i organických látek. Princip chromatografie spočívá v postupném, mnohonásobně opakovaném ustavování rovnovážných stavů mezi stacionární a mobilní fází. Stacionární (nepohyblivá) fáze je umístěna v koloně v různých formách (částičky tuhé fáze, kapalina na inertním nosiči), mobilní (pohyblivá) fáze unáší separované látky přes stacionární fázi. Separované látky mohou být stacionární fází zachycovány, což způsobuje jejich zdržení. Látky, které jsou poutány stacionární fází silněji, se více zdržují v koloně, proto opouštějí kolonu později než látky zdržované méně. K identifikaci separované složky používáme retenční charakteristiky

(retenční čas, redukovaný retenční čas, retenční objem, redukovaný retenční objem, atd). Podle skupenství mobilní fáze se rozděluje chromatografie na plynovou a kapalinovou.^{17,18}

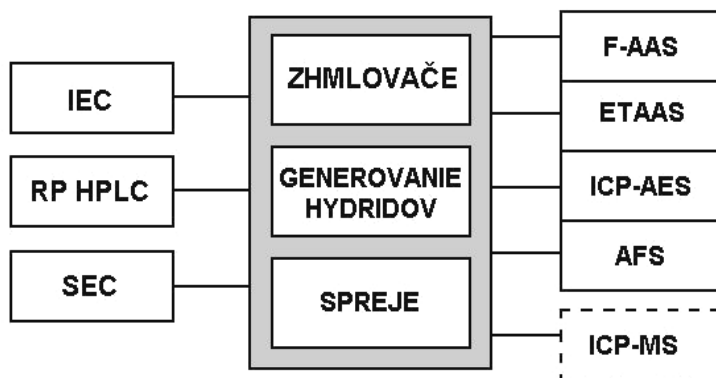
3.1.1.1 Plynová chromatografie

V plynové chromatografii je mobilní fáze plyn a taktéž separované látky jsou v plynném stavu, proto se při chromatografii vzorků ve stavu kapalném volí teplota, aby dělené složky byly ve formě par. Nejběžněji používané stacionární fáze jsou nepolární typy na bázi poly(dimethylsiloxanu). Běžně používané mobilní fáze jsou plyny dusík, argon, helium, vodík, které musí být čisté a zbavené vodní páry a kyslíku (nečistoty interagují se stacionární fází nebo separovanou látkou).

Omezenost použití plynové chromatografie spočívá v těkavosti a tepelné stabilitě separovaných látek.^{17,18,19}

3.1.1.2 Kapalinová chromatografie

Kapalinová kolonová chromatografie se uplatňuje při dělení všech méně těkavých organických kapalných a tuhých látek, které se rozpouští ve vodě, běžných organických rozpouštědlech nebo zředěných minerálních kyselinách. Nejběžněji používané stacionární fáze jsou ionosphere-C, superdex200 10/30, zorbax R_x- C₈, nucleosil atd. Běžně používané mobilní fáze jsou různá organická rozpouštědla ale i jejich směsi, které se liší eluční silou.^{17,18,19}



Obr. 1. Schéma propojení metod kapalinové chromatografie s metodami atomové spektrometrie použitím různých rozhraní⁶

Tabulka I: Vybrané aplikace kapalinové chromatografie a atomové spektrometrie pro speciální analýzu prvků⁶

Analyty	Matrice	Technika	LOD ^a
As(III), As(V)	prachové částice	IEC-HG-AFS	0,01-0,02 ng/m ³
As(III), As(V), MMA, DMA	moč	RP-LC-HG-ICP-AES	36-101 ng/ml ^b
As(III), As(V)	voda	IEC-HG-ETAAS	7,8-12 ng/ml
Se(IV), Se(VI), SeMet, SeMeSeCys, SeCys	rostlinný materiál	IEC-UV-HG-AFS	2-10 ng/g
Se(IV), Se(VI)	voda	IEC-HG-ETAAS	2,4-18,6 ng/ml
SeMet, SeEt, SeCys	biologické vzorky	RP-LC-ICP-AES	2-6 ng/ml
Sb(III), Sb(V), (CH ₃) ₂ SbCl ₂	mořská voda	IEC-HG-AFS	0,07-0,13 ng/ml
Hg(II), MeHg ⁺ , PhHg ⁺ , EtHg ⁺	vzorky ryb	RP-LC-CV-AFS	0,06-0,2 ng/ml
Cr(III), Cr(VI)	voda	RP-LC-F-AAS	2,0-3,7 ng/ml
Specie železa	mléko	SEC-ETAAS	1,4-4,7 ng/ml

^a Mez stanovitelnosti, ^b mez detekce, MMA- kyselina monomethylarseničná, DMA- kyselina dimethylarseničná, SeMet- selenometionin, SeMeSeCys- selenomethylselenocystin, SeCys- selenocystin, SeEt- selenoetionin, MeHg⁺- methylhydrargyrium, PhHg⁺- fenylhydrargyrium, EtHg⁺- ethylhydrargyrium.⁶

3.1.2 Kapilární zónová elektroforéza

Kapilární zónová elektroforéza patří mezi elektromigrační metody, použitelné na separaci organických a anorganických látek, jejichž molekuly mohou nést kladný náboj v důsledku disociace nebo protonizace (např. sodné, draselné, hořečnaté, vápenaté kationty, aminy, aminokyseliny), nebo záporný náboj v důsledku disociace (např. chloridy, sírany, dusičnany, fenoly, sulfonové a karboxylové kyseliny). Tato metoda je vhodná pro dělení a identifikaci iontů, které se liší svou molekulovou hmotností, nábojem a tvarem. Separace probíhá v kapiláře z taveného křemene, která má oba konce kapiláry ponořené do elektrodových nádobek naplněných základním separačním pufrem, jímž je sama naplněna.

Použitím vysokých intenzit elektrického pole (desítky kV/m) se dosahuje vysoké účinnosti a rychlosti separace. Kationty a anionty mohou být detekovány a stanoveny během jednoho experimentu. Metoda CZE je vhodná pro separaci a stanovení molekul, které nesou náboj, nevhodná je pro elektroneutrální molekuly.^{18,20}

3.2 Atomová spektrometrie

Metody atomové spektrometrie se v analytické chemii používají pro kvalitativní a kvantitativní stanovení jednotlivých prvků. Pro stanovení prvků pomocí atomové spektrometrie je nutné převést stanovované prvky z analyzovaného vzorku na volné atomy v plynném stavu. Tato podmínka je spojena s prací za vysokých teplot, poněvadž většina kovových a nekovových prvků stanovovaných pomocí těchto metod může existovat v podobě volných atomů v plynném stavu pouze při teplotách nad 2000 K (výjimku tvoří rtuť).

Poloha spektrální čáry ve spektru je ovlivňována celkovým systémem valenčních elektronů a je charakteristická pro jednotlivý prvek. Přechody elektronů, které ve spektrech poskytují spektrální čáry, se označují jako dovozené přechody. Přechody neposkytující spektrální čáry se označují jako zakázané.

Dovozené přechody se řídí výběrovými pravidly:

1. Při přechodu jsou povolené libovolné změny hlavního kvantového čísla n (dovozeny jsou přechody $1S - 2P$, $1S - 3P$, $1S - 4P$)
2. Vedlejší kvantové číslo L se při přechodu může měnit o jednotku $\Delta L = \pm 1$ (dovozeny jsou přechody $S - P$, $D - P$, ale ne $S - S$, $S - D$ apod.)
3. Při přechodu se nesmí měnit spin elektronu, tedy ani spinové kvantové číslo S , $\Delta S = 0$

Intenzita spektrálních čar především závisí na počtu atomů ve výchozím stavu, na statistické váze tohoto stavu, na pravděpodobnosti energetického přechodu z výchozího do výsledného stavu a dále je závislá na tom, zda je přechod dovozený či zakázaný, ale i na teplotě.^{20,21,22}

V atomové spektrometrii se setkáváme se čtyřmi ději, které vedou ke změně kvantové energie valenčních elektronů. Tyto děje našly analytické využití v metodách atomové spektrometrie.

- a) spontánní emise – samovolné vyzařování: optická emisní spektrometrie (OES)
- b) absorpce záření: atomová absorpční spektrometrie (AAS)
- c) sekundární emise – fluorescence: atomová fluorescenční spektrometrie (AFS)
- d) vynucená (stimulovaná) emise: lasery, použití jako zdroj záření

3.2.1 Atomová absorpční spektrometrie

Atomová absorpční spektrometrie patří mezi metody anorganické prvkové analýzy, umožňuje stanovení až 68 prvků v nízkých koncentracích. Princip atomové absorpční spektrometrie spočívá v pohlcení fotonu o dané energii atomy daného prvku v plynném stavu a tím k přechodu (excitaci) valenčního elektronu ze základní energetické hladiny na hladinu energeticky bohatší. Z Boltzmanova zákona vyplývá, že absolutní většina atomů je za teplot používaných při atomizaci v AAS v základním stavu, proto v absorpčních spektrech můžeme pozorovat jen přechody ze základního stavu do stavů excitovaných, což je spojeno s absorpcí energie. Počet spektrálních (absorpčních) čar je relativně nízký.

Atomový absorpční spektrometr se skládá ze zdroje záření, atomizátoru, monochromátoru, detektoru a zařízení na zpracování signálu.^{21,22}

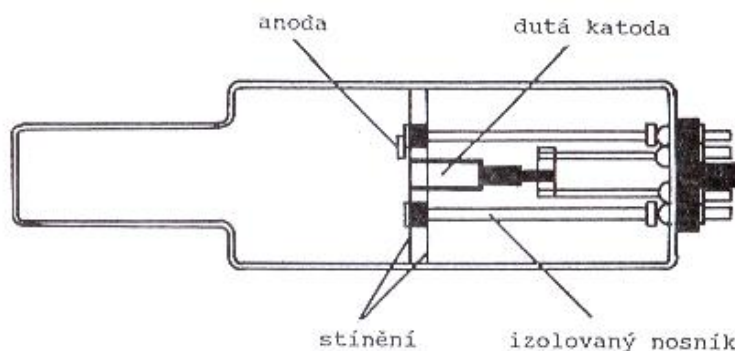
3.2.1.1 Zdroje záření

V AAS se výhradně uplatňují čárové zdroje záření, které emitují intenzivní zářivou energii do úzkých spektrálních intervalů. Jako čárové zdroje se uplatnily výbojky s dutou katodou (HCL – Hollow cathode lamp), bezelektrodové výbojky (EDL – Electrodeless discharge lamp), superlamps.

Výbojka s dutou katodou

Nejpoužívanějším zdrojem čárového záření je výbojka s dutou katodou, která emituje úzké čáry, jenž nejsou ovlivněny samoabsorpcí a ve spektru převažují čáry rezonanční. Výbojka s dutou katodou je evakuovaná baňka vyrobená ze skla, která je naplněna plynem

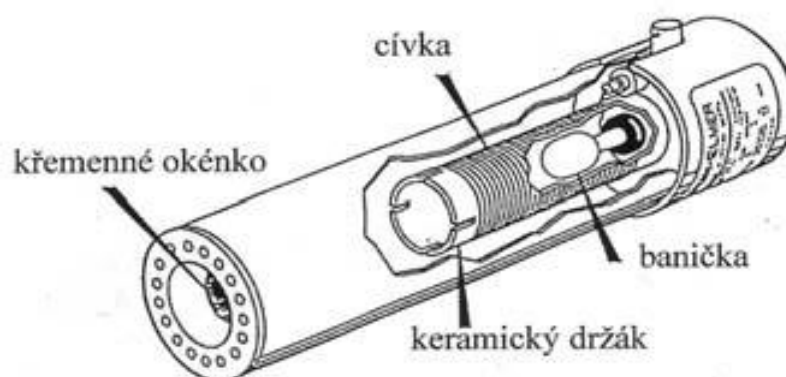
(neon, argon) na nízký tlak (100 - 200 Pa). Výstupní okénko je vyrobeno z optického křemene pro oblast do 240 nm, nad 240 nm ze speciálních druhů skla a nad 300 nm z běžného optického skla. Uvnitř výbojky je dutá katoda vyrobená buď přímo z velice čistého materiálu stanovovaného prvku (Cu, Zn, Ni,...), nebo je použit dutý váleček z materiálu s chudým emisním spektrem (Al). Do vnitřní dutiny válečku je vložena fólie kovu nebo je na váleček kov nanesen ve formě prášku, tato technologie je používána pro vzácné, drahé kovy a těžko obrobitelné prvky. Nad katodou je umístěna anoda z těžkotavitelného materiálu (Zr, Ti, W, Ta). Princip funkce je založen na tvorbě doutnavého výboje v duté katodě. Životnost je dána stabilitou tlaku plnicího plynu, pokles tlaku způsobí kolísání intenzity záření.^{21,22,23}



Obr. 2. Výbojka s dutou katodou²¹

Bezelektrodová výbojka

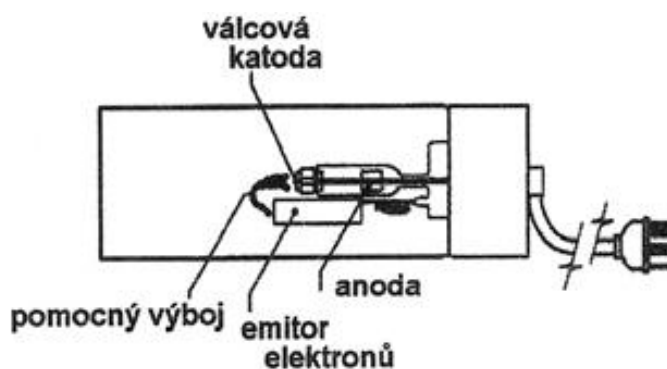
Výbojka je válcovitá banička vyrobená z křemene s vnitřním průměrem od 5 do 15 mm. V baničce je vhodné množství směsi čistého kovu s jeho těkavou sloučeninou (nejčastěji jodid) a je naplněna plnicím plynem (neon, argon, helium) na tlak 30 – 300 Pa. Banička je umístěna do pole cívky radiofrekvenčního generátoru (budící frekvence 20 až 50 MHz). Ve výbojce dochází při stěnách k vytvoření stabilního prstencového výboje, takže záření uvnitř výbojky projde zanedbatelnou vrstvou atomové páry a samoabsorpce rezonančních čar je minimální. Hlavní výhodou bezelektrodových výbojek je zvýšení intenzity emitovaného záření až o řád proti výbojkám s dutou katodou. Nevýhoda výbojek spočívá ve vysoké ceně, nižší životnosti výbojek.^{21,22,23}



Obr. 3. Bezelektrodová výbojka²¹

Superlampa

Superlampa se skládá z cylindrické katody beze dna, anody a emitru elektronů. K buzení dochází mezi cylindrickou katodou a anodou umístěnou pod ní, z opačné strany je prostor uvnitř katody bombardován elektrony z emitru elektronů, jenž způsobí homogenní buzení v celém objemu katody. Čímž je dána malá pravděpodobnost výskytu atomů dlouhodobě v základním energetickém stavu (potlačena samoabsorpce). Výhodou superlamp je velmi dlouhá životnost, vyšší intenzita čar (5 až 75 krát vyšší než u výbojek s dutou katodou), vyšší linearita kalibrace pro některé prvky a nižší pořizovací náklady než u bezelektrodoých výbojek.^{21,22}



Obr. 4. Superlampa²¹

3.2.1.2 Atomizátory

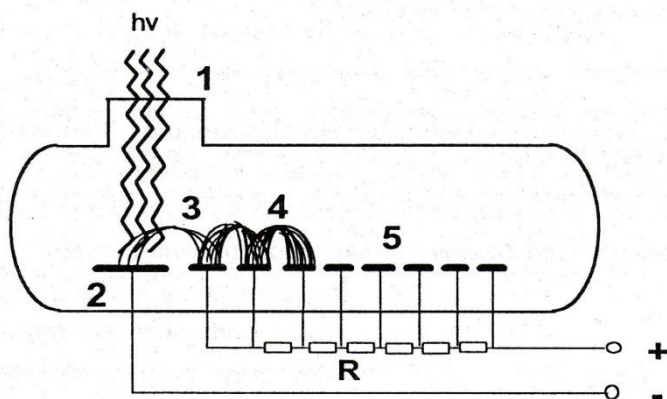
Atomizátor slouží jako zdroj, rezervoár volných atomů, ale i jako absorpční prostředí. Mezi nejčastěji používané atomizační techniky patří plamenová, elektrotermická atomizace nebo atomizace v křemenných atomizátorech.

3.2.1.3 Monochromátory

V AAS se jako disperzní prvky výhradně používají monochromátory. Hlavní funkce monochromátoru je separování určitého intervalu vlnových délek ze spektra, velikost tohoto intervalu se volí výstupní štěrbinou monochromátoru. Nejčastěji používané uspořádání je Ebbertovo nebo Czerny-Turner, kde jsou používány rovinné difrakční mřížky s počtem vrypů 1200 až 2400 mm. Většinou není nutná vysoká rozlišovací schopnost monochromátoru, protože částečně funkci disperzního prvku přebírá zdroj produkující čárové spektrum.^{21,22}

3.2.1.4 Detektory

Mezi nepoužívanější detektory patří fotonásobič. Fotonásobič je evakuovaná baňka ze skla se vstupním okénkem z křemene. Uvnitř baňky je fotocitlivá katoda, anoda a systém dynod (9 až 13). Fotonásobič je umístěn hned za výstupní štěrbinou monochromátoru a je uzavřen ve světlotěsném pouzdře. Princip fotonásobiče spočívá v dopadu fotonu na fotocitlivou katodu, ze které vyrazí elektron, jenž je urychlen v elektrickém poli a přitažen na první z dynod. Dopad elektronu na povrch dynody způsobí vyrazení sekundárních elektronů (maximálně čtyř), které jsou přitahovány další dynodou, což je způsobeno udržováním potenciálového spádu mezi dynodami (50 – 150 V). Tímto způsobem je zaručen lavinovitý nárůst počtu elektronů a měřitelnost výstupního proudu i při nízkých intenzitách dopadajícího záření. Použitelnost fotonásobiče omezuje materiál fotokatody, protože dopadající foton musí mít dostatečnou energii pro vyrazení elektronu z jejího povrchu. Pro celou spektrální oblast se používá pouze jeden fotonásobič.^{21,22,23}



Obr. 5. Schéma fotonásobiče²¹

1- křemenné okénko, 2- fotokatoda, 3- primární elektrony, 4- sekundární elektrony, 5- systém dynod

3.2.1.5 AAS s atomizací v plameni

Plamenová atomizace je nejstarší používaná technika. Princip spočívá v převedení roztoku ve zmlžovači na aerosol a zavádění aerosolu do laminárního předmíchávaného plamene. Ve zmlžovači vzniklý aerosol naráží na nárazovou kuličku, na které dojde k roztržení a odstranění kapek překračující určitou velikost, vznikající aerosol je smícháván se směsí paliva a oxidovadla a poté je směs vedena do hořáku. Celý proces probíhá v mlžné komoře vyrobené z inertního materiálu (teflon, polypropylen). Rychlost proudění štěrbinou v hořáku musí být 2 – 3 krát vyšší než rychlost hoření.

V AAS se pro zmlžování používají většinou pneumatické zmlžovače, které mají nižší účinnost, jenž je závislá na viskozitě vzorku. Pneumatické zmlžovače jsou vyrobeny z chemicky odolných materiálů (plasty, titan, slitiny Pt/Ir), skleněná nárazová kulička se při práci s kyselinou fluorovodíkovou nahrazuje kuličkou z korundu nebo plastu. Speciálním typem je vysokotlaký zmlžovač, který se používá pro přímé spojení atomové absorpční spektrometrie s vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií, kde spektrometr plní funkci detektoru prvků. Aerosol vzniká tříštěním velice tenkého paprsku kapaliny o nárazové tělísko. Tento způsob zmlžování má vyšší účinnost, menší spotřebu vzorku a umožňuje zmlžování viskózních kapalin.

Atomizace vzorku probíhá ve štěrbinových hořácích vyrobených z nerezů nebo titanu. Jako palivo se nejčastěji používá acetylén, ve speciálních případech propan/butan nebo vodík.

Oxidovadlem bývá většinou vzduch nebo oxid dusný. Délka štěrby závisí na použitém typu plamene, pro acetylén – vzduch má délku 100 mm a pro acetylén – oxid dusný délku 50 mm.

Proces atomizace kapalného vzorku lze popsat následujícími pochody:

- zmlžování kapalného vzorku (mokřý aerosol)
- odpaření rozpouštědla (suchý aerosol)
- vypaření částice
- chemické reakce se složkami přítomnými v plameni
- vznik volných atomů (atomizace)
- ionizace a rekombinace
- termická excitace a deexcitace

Nevýhodou plamenové atomizace je silné naředění vzorku spalnými plyny, nízká účinnost zmlžování a nízká citlivost.^{21,22,23,24}

3.2.1.6 AAS s elektrotermickou atomizací

Jelikož plamenová AAS nedosahuje detekčních mezí, jenž jsou dostačující pro řešení analytických problémů (analýza životního prostředí, čistých chemikálií,...), proto byly hledány další techniky atomizace. Možností je atomizace v elektrotermickém atomizátoru, což jsou speciální miniaturní trubičky vyhříváné pomocí elektrického proudu, buď účinkem vloženého napětí (odporově vyhříváné atomizátory), účinkem opačných elektrických nábojů (kapacitně vyhříváné atomizátory), případně indukci elektromagnetického pole.

Nejčastěji používaný materiál atomizátoru se používají různé modifikace grafitu (atomizační teploty až 3000 °C), případně může být použit i některý těžkovtavitelný kov- Ta, Mo, Pt, W (pro W atomizační teplota až 3200 °C).

Pro ochranu atomizátoru před oxidací za vysokých teplot se pracuje za použití ochranné atmosféry, nejběžněji se používá argon o vysoké čistotě (maximálně 1 ppm kyslíku). Atomizace nadávkovaného malého množství vzorku (10 až 40 µl) nastává postupným ohříváním kyvety v důsledku procházejícího elektrického proudu, kyveta se chová jako elektrický odpor.

Posloupnost procesů při teplotním programu:

- sušení -ohřev nad teplotu varu rozpouštědla
- pyrolýza -odstranění největší části matrice (anorganické soli, nerozložené organické zbytky matrice)
- atomizace -vytvoření oblaku volných atomů v plynném stavu
- čištění -krátkodobé zahřátí nad teplotu atomizace

Výhodou elektrotermické atomizace je značné zlepšení meze detekce ve srovnání s plamenovou atomizací.^{21,22,23,24}

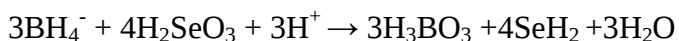
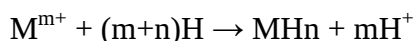
3.2.1.7 Generování těkavých sloučenin v AAS

Metoda generování těkavých hydridů je založena na převedení analytu na těkavou formu, nečastěji hydrid, který se oddělí od matrice a je atomizován ve speciálním křemenném atomizátoru.

Pro tuto metodu se používá:

- generování těkavých hydridů (As, Se, Bi, Ge, Sn, Te, In, Sb, Pb),
- metoda studených par-generování par Hg
- generování těkavých organokovových sloučenin, fluoridů a chelátů

Generování těkavých hydridů patří mezi nejrozšířenější metodu pro stanovení As, Sb, Se, Sn, které je založeno na převedení analytu kovu na plynný hydrid reakcí analytu ve vhodném oxidačním stupni s tetrahydridoboritanem sodným (stabilizovaný roztokem NaOH nebo KOH) v kyselém prostředí. Důležité je udržet optimální kyselost reakčního prostředí i oxidační stav analytu (As^{3+} , Sb^{3+} , Se^{4+}), je-li analyt ve vyšším oxidačním stavu (As^{5+} , Sb^{5+} , Se^{6+}) je nutné provést předredukci na nižší oxidační stav jodidem draselným nebo hydroxylaminem.



Alternativní metodou je elektrochemické generování, jenž je založeno na generování hydridů pomocí elektrického proudu v prostředí čistých minerálních kyselin. Tento postup řeší mnohé problémy chemického generování těkavých sloučenin (kontaminace vzorku interferujícími ionty, přímé generování těkavých sloučenin kovu z vyšších oxidačních stavů, úspora redukčního činidla).

V praxi se používají tři uspořádání generování hydridů, kontinuální dávkování (signál má konstantní charakter), dávkový generátor (časově závislý tvar signálu), dávkování do proudu FIA (zvýšení produktivity práce, snadná automatizace). K transportu hydridu do atomizátoru se užívá nuceného toku inertu (Ar , N_2), jelikož při transportu může docházet k sorpci nebo rozkladu hydridu na stěnách aparatury, tudíž je nutné minimalizovat povrch aparatury a transportní cestu do atomizátoru.

K atomizaci hydridu je využívána atomizace plamínkem v křemenné trubici, která je založena na atomizaci vodíkovými radikály vytvářejících se v plamínku vodík-kyslík. Atomizátor je složen z nevyhřívané křemenné trubice ve tvaru písmene "T", dalším používaným atomizátorem je křemenná trubice ve tvaru písmene "T" vyhřívaná plamenem nebo elektricky. Elektricky vyhřívané trubice dosahují lepších citlivostí a vyšších životností než křemenné trubice vyhřívané v plameni.^{21,22,23}

Metoda studených par

Metoda studených par je založena na faktu, že rtuť má za laboratorních podmínek dostatečně velkou tenzi par, proto jsme schopni měřit přímo absorpci odpovídající koncentraci volných atomů rtuti při této teplotě. V kapalně fázi je iontová dvojmocná rtuť redukována chloridem cínatým nebo tetrahydridoboritanem sodným na kovovou rtuť, jejíž páry jsou vypuzeny nosným plynem (N_2 , Ar) přes sušící vrstvu do měřicí cely. Při měření nízkých koncentrací rtuti je možné použít prekoncentrační krok na amalgátoru (křemelina potažená vrstvou zlata nebo stříbra), ze kterého je po zakoncentrování vypuzena zvýšením teploty na $1000\text{ }^{\circ}\text{C}$ do měřicí cely.^{21,22}

Termooxidační stanovení rtuti

Termooxidační stanovení rtuti je založeno na spálení vzorku v proudu kyslíku při teplotě 850 - 900 °C, vzniklé spaliny jsou vedeny do katalytické pece (650 °C), ve které dochází k dokončení oxidace a zachycení oxidů dusíku a síry na bazických složkách katalyzátoru. Ostatní spaliny se transportují v proudu kyslíku do amalgátoru, kde dojde k zachycení rtuti. Po zakoncentrování je rtuť zvýšením teploty vypuzena do tandemových kyvet, kde je změřena absorpce při 254,4 nm.^{21,22}

3.2.1.8 Interference

Interference definujeme jako rozdílné velikosti signálu, které získáme měřením roztoku o stejné koncentraci v čistém standardu a ve vzorku (v přítomnosti doprovodných složek). Interference způsobují doprovodné složky ve vzorku.

Interference Lze rozdělit na spektrální a nespektrální. Spektrální interference jsou zapříčiněny nedokonalou separací absorpčního signálu analytu od absorpčního signálu interferentu, překryvem dvou absorpčních pásů, absorpcí pozadí, rozptyl záření. Nespektrální interference jsou zapříčiněny ovlivněním ionizačních a disociačních rovnováhy, změnou hustoty či viskozity vzorků, vznik méně těkavých sloučenin.^{21,22}

3.2.2 Optická emisní spektrometrie

Princip optické emisní spektrometrie spočívá v registrování fotonů vznikajících při přechodu valenčních elektronů z energeticky bohatších stavů na stavy s nižší energií. Emisní spektrum má čárový charakter, poloha čary ve spektru určuje kvalitativní složení a intenzita čary v emisním spektru udává kvantitativní složení. S počtem valenčních elektronů roste i počet čar ve spektru, analyticky využívaná oblast spektra je od 110 - 900 nm.

Jako budící zdroje se v OES používají plamen, elektrický výboj, indukčně vázaná plazma, laser. Při buzení musíme dosáhnout teploty, při které je vzorek atomizován a převeden do plynného stavu, při této teplotě jsou atomy excitovány na vyšší energetickou hladinu a při deexcitaci vysílají záření (fotony) jenž registrujeme. V plamenové fotometrii se jako budící zdroj používá plamen (nízká teplota), proto se plamenová fotometrie používá pro

kvantitativní stanovení snadno excitovatelných prvků (Na, K, Li, Ca, Mg). V OES se jako budící zdroj hojně využívá indukčně vázané plazma. Plazma je ionizovaný plyn obsahující dostatečnou koncentraci elektricky nabitých částic, přičemž počet kladných a záporných iontů je stejný. Celá soustava je elektricky vodivá, ale celkově nevykazuje elektrický náboj. Výhody ICP OES jsou multielementární analýza, výborná reprodukovatelnost, dlouhodobá stabilita přístrojů, dobré detekční limity, vysoká linearita kalibrací, možnost analýzy organických látek ale i nekovových prvků (S, N, Cl, I, Br). Nevýhodou je značná spotřeba argonu.^{21,22,23,24}

Optická emisní spektrometrie se ve spojení s různými typy HPLC například využívá ke stanovení specií arsenu v moči a ke stanovení organických specií selenu v biologických vzorcích.⁶

3.2.3 Atomová fluorescenční spektrometrie

Atomová fluorescenční spektrometrie je založena na registraci fotonů vznikajících při přechodu valenčních elektronů z vyšší energetické hladiny na hladinu nižší. Fluorescence je proces s nízkou účinností, proto je potřeba intenzivních zdrojů záření. Jako zdroje budícího (excitačního) záření se používají výbojka s dutou katodou, bezelektrodová výbojka, lasery, xenonová výbojka.

Intenzita fluorescenčního záření je závislá na intenzitě zdroje a v reálných vzorcích je snižována srážkami atomů a molekul přítomnými ve vzorku (zhášení fluorescence), nebo rozptylem fluorescenčního záření na nevypařených částicích v atomizátoru a na optice spektrometru.

V AFS se využívá různých typů fluorescenčních mechanismů, rezonanční fluorescence (fluorescenční záření má stejnou vlnovou délku jako záření budící), přímá čárová fluorescence (excitovaný elektron se vrací z některého z vyšších energetických stavů), postupná fluorescence (elektron nejprve přechází bezradiačním přechodem na nižší hladinu, poté následuje vyzáření fluorescenčního záření), termicky asistovaná fluorescence (excitovaný atom je vlivem tepelné energie vybuzen ještě na vyšší energetickou hladinu, vyzáření fluorescenčního záření má vyšší energii než záření budící). Výhody AFS jsou jednoduchá instrumentace, velká linearita kalibrací, citlivost ovlivněná intenzitou excitačního zdroje.^{22,23,24}

Atomová fluorescenční spektrometrie se ve spojení s HPLC používá ke stanovení specií arsenu v pachových částicích, selenu a antimonu v mořské vodě.⁶

3.2.4 Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem

Metoda ICP-MS patří mezi techniky stopové, především ultrastopové multielementární analýzy, více než 50 prvků je ionizováno do prvního stupně z více než 90 %, nižší hodnoty poskytují nekovové prvky s vysokým ionizačním potenciálem (As, Se, P, Si). Prvky, které mají nízký druhý ionizační potenciál, vytváří dvakrát ionizované ionty (Ba). ICP-MS je založeno na atomizaci a následující ionizaci vzorku v argonovém indukčně vázaném plazmatu a na následné separaci vzniklých iontů na základě jejich efektivní hmotnosti m/z hmotnostním analyzátozem (kvadrupólovým, s vysokým rozlišením použití – magnetického a elektrického sektoru). Vzniklé ionty jsou detekovány detektorem, záznam detektoru se nazývá hmotnostní spektrum, ze kterého získáme informace o izotopickém složení a o koncentraci prvku. Problematický je u ICP-MS transport iontů z ICP do hmotnostního analyzátozu, jelikož ICP pracuje za atmosférického tlaku a hmotnostní analyzátoz za tlaku nízkého. Přenos iontů je zprostředkován pomocí speciálního interface tvořeného dvěma kónusy, které jsou chlazeny vodou, kde v prvním je otvor okolo 1 mm a ve druhém 0,75 mm. Tlak mezi kónusy se snižuje pomocí rotační vývěvy, tlak v hmotnostním analyzátozu pomocí turbomolekulárních pump, problém analýzy reálných vzorků spočívá v ucpávání otvorů v kónusech, proto tato technika není vhodná pro solné roztoky. Mezi používané detektory patří Faradayova klec, elektronový násobič s oddělenými dynodami, elektronový násobič s jednou elektrodou (Channeltron). Mezi výhody ICP-MS patří možnost stanovení velmi nízkých koncentrací, multielementární analýza, určení izotopického zastoupení prvků a snadné spojení s HPLC, GC a CZE. Mezi nevýhody patří vysoké pořizovací i provozní náklady a znemožnění detekce neutrálních částic.^{21,23,24,25}

Spojení HPLC s detekcí pomocí metody ICP/MS je vhodné například pro stanovení specií selenu v moči.¹⁴

4. Speciační analýza v atomové absorpční spektrometrii

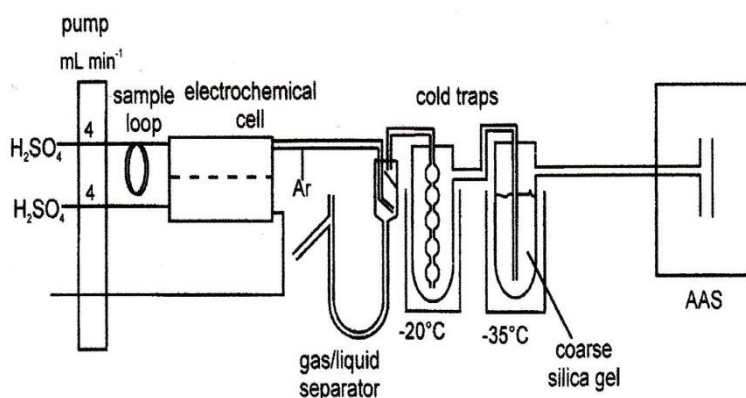
Mezi nejvýznamnější metody stanovení specií kovů pomocí AAS patří generování těkavých sloučenin. Nejčastěji se využívá pro speciaci arsenu, antimonu a selenu za použití předseparačních, prekoncentračních technik. Dále budou popsány metody stanovení specií založené na elektrotermické atomizaci a atomizaci v plameni.

4.1 Generování těkavých sloučenin v AAS

Stanovení antimonu v listech topolu, jehličí borovice a smrku je založeno na extrakci antimonu z listů a jehličí do 0,66 mol/l NaOH. Vzorek je následně mineralizován směsí kyselin (chlorovodíkové, sírové, dusičné, chloristé). Ke směsi kyselin se z důvodu rozložení křemičitanů, ve kterých je značná část antimonu vázána, přidává kyselina fluorovodíková. Ve vzniklém výluhu je Sb^{V} redukován na Sb^{III} roztokem KI a kyseliny askorbové, určení koncentrace kovu se provádí v homogenním roztoku metodou FI-HG-AAS. Hydrid byl generován pomocí 3 % roztoku NaBH_4 stabilizovaného 0,04 % roztokem NaOH, výbojka s dutou katodou byla použita jako zdroj záření a měření probíhalo při vlnové délce 217,6 nm. Účinnost extrakce specií antimonu do roztoku NaOH je nízká, proto se autoři chtějí zaměřit na použití jiných extrakčních postupů (mikrovlnná, ultrazvuková nebo superkritická fluidní extrakce) a testování jiných rozpouštědel.²⁶

Stanovení antimonu a arsenu v rašelině je založeno na mineralizaci vzorku při teplotě 310 °C směsí kyselin (dusičná, sírová, chloristá), koncentrace kovů je měřena ve vzniklém homogenním roztoku pomocí FI-HG-AAS. Ke směsi kyselin pro stanovení antimonu se přidává kyselina fluorovodíková z důvodu rozložení křemičitanů, ve kterých je značná část antimonu vázána. Hydridy kovů byly generovány pomocí 3 % roztoku NaBH_4 stabilizovaného 0,04 % roztokem NaOH. Zdrojem záření pro stanovení antimonu byla výbojka s dutou katodou a produkovaná vlnová délka záření 217,6 nm, pro stanovení arsenu byla zdrojem bezelektrodová výbojka a použitá vlnová délka záření 193,7 nm. Koncentrace antimonu v měřených vzorcích byla od 18 do 1500 ng/g, koncentrace arsenu od 300 do 5700 ng/g. Metoda FI-HG-AAS je vhodná pro stanovení stopových množství antimonu a arsenu v životním prostředí.²⁷

Detekce specií arsenu ve vzorcích připravených ze standardního roztoku o koncentraci 1g/l As^{III} je založena na elektrochemickém generování hydridů pomocí elektrolytické tenkovrstvé cely s katodovým prostorem vyrobeným z uhlíku v prostředí kyseliny sírové. Uhlíkový povrch katody je vhodný k selektivnímu generování As^{III} v prostředí As^{V} bez nutnosti předchozí redukce As^{V} L-cysteinem, použití vymrazování umožňuje eliminaci interferencí, které způsobují methylované specie arsenu (MMA, DMA). Interference způsobující arsenocholin a arsenobetain nejsou vzaty v úvahu z důvodu vysoké stability těchto specií. Elektrochemicky vygenerovaný hydrid je stanoven pomocí FI-HG-AAS. Detekční limit založený na kritériu 3σ pro stanovení As^{III} dle postupu je 0,4 $\mu\text{g/l}$.²⁸



Obr. 6. Schéma FI-HG-AAS používaného pro sociaci arsenu²⁸

Pump – pumpa, sample loop – smyčka na vzorek, electrochemical cell – elektrochemická ceta, cold traps – vymrazování, gas/liquid separator – separátor fází, coarse silica gel – hrubý silika gel

Stanovení As^{III} a celkového arsenu ve vzorcích fosfátových hnojiv a fosforečných horninách je založeno na mineralizaci vzorku kyselinou chlorovodíkovou a následné stanovení metodou HG-AAS. Stanovení celkové koncentrace arsenu se provádí v homogenním roztoku po předchozí redukci As^{V} na As^{III} roztokem jodidu draselného s kyselinou askorbovou. Stanovení As^{III} se provádí v prostředí citrátového pufru (kyselina citronová/citrát sodný), který maskuje As^{V} a tím brání jeho generování na hydrid. Koncentrace kovu byly stanoveny v homogenním roztoku metodou HG-AAS. Hydridy byly generovány 3 % roztokem NaBH_4 stabilizovaný 0,5 % roztokem NaOH . Zdrojem záření pro stanovení arsenu byla výbojka s dutou katodou a produkovaná vlnová délka záření 193,7 nm.

Ve vzorcích se koncentrace celkového arsenu pohybovala v rozmezí 5,2 až 20,0 mg/kg a koncentrace As^{III} v rozmezí 2,1 až 5,5 mg/kg. Limit detekce arsenu (III) je 0,1 $\mu\text{g/l}$ a limit stanovitelnosti 0,3 $\mu\text{g/l}$, přesnost metody byla potvrzena analýzou certifikovaných referenčních materiálů sedimentů.²⁹

Pro detekci specií arsenu v podzemní vodě se využívá metoda FI-HG-AAS. Stanovení As^{III} metodou generování hydridů je založeno na pomalé kinetice děje generování hydridu z As^{V} při použití nízké koncentrace roztoku tetrahydridoboritanu sodného v silně kyselém prostředí ($\text{pH} < 0$). Za těchto podmínek je účinnost generování hydridů z As^{V} mnohem nižší než z As^{III} , koncentrace As^{V} se vypočítá jako rozdíl celkové koncentrace a koncentrace As^{III} . Stanovení celkové koncentrace arsenu se provádí po předchozí redukci As^{V} na As^{III} roztokem jodidu draselného s kyselinou askorbovou. Pro selektivní stanovení As^{III} studie stanovila nejvhodnější koncentraci NaBH_4 na 0,035 %. Koncentrace celkového arsenu ve vzorcích byla v rozmezí 30 až 308 $\mu\text{g/l}$, z celkové koncentrace arsenu bylo 0 až 36 % zastoupeno As^{III} . Detekční limit celkového anorganického arsenu je 0,6 $\mu\text{g/l}$ při použití kritéria 3σ pro určení meze detekce.³⁰

Stanovení ultrastopových koncentrací selenu a arsenu v pitných vodách je založeno na elektrochemické generaci hydridů v tenkovrstvé cele složené z katodové a anodové části, které jsou propojené iontově výměnnou membránou. Katoda byla zhotovena z olověného bloku a elektrolytem v katodové části byla kyselina chlorovodíková, elektrolytem v anodové části byla kyselina sírová. Vzniklé hydridy byly stanoveny pomocí metody HG-AAS s křemenným atomizátorem. Rozsah stanovovaných koncentrací byl pro arsen 0,05 až 100 ng/ml a pro selen 0,5 až 250 ng/ml. Dosažená mez detekce metody pro arsen byla 0,07 ng/ml a mez stanovitelnosti 0,24 ng/ml. Pro selen byly tyto hodnoty 0,37 ng/ml a 1,23 ng/ml, z těchto hodnot vyplývá větší citlivost stanovení pro arsen. Přesnost metody byla ověřena pomocí referenčních materiálů.³¹

4.2 Elektrotermická atomizace v AAS

V literatuře se nepopisuje přímé stanovení specií chromu, stanovení je založeno na redukci Cr^{VI} na Cr^{III} , tímto postupem se stanoví celková koncentrace ve vzorku a koncentrace Cr^{III} se stanoví ve vzorku bez předchozí úpravy. Jiný způsob stanovení specií je založen na rozdílné rychlosti tvorby komplexu.

Detekce chromu v krevním séru je založeno na centrifugaci sražené krve, naředění vzorku krevního séra roztokem zředěné kyseliny dusičné, Tritonu X-100 a následném stanovení chromu metodou AAS s elektrotermickou atomizací. Při teplotním programu se musí dát pozor na dokonalé a pozvolné vysušení vzorku obsahující vysoký obsah bílkovin, jinak dochází k pěnění a následný únik vzorku z trubičky. Hlavním problémem metody je možnost kontaminace vzorku chromem vylouženým z odběrových zařízení. Mez detekce je 0,24 $\mu\text{g/l}$, pomocí referenčních materiálů byla ověřena správnost metody. U pacientů pravidelně docházejících na dialýzu byla koncentrace chromu v rozmezí 1,4-6,6 $\mu\text{g/l}$, u dobrovolných dárců v rozmezí 0,3-0,6 $\mu\text{g/l}$. Stanovení koncentrace chromu je velice důležité, protože umožňuje u pacientů zjistit jeho nedostatek, který je jeden z faktorů civilizačních chorob (diabetes mellitus, aterosklerosa).¹²

Detekce specií chromu v pitné vodě je založeno na předchozím zakoncentrování použitím mikrokolony naplněné aktivním uhlím, chrom byl eluován z kolony za použití 1 % kyseliny dusičné. Pro stanovení celkového chromu byl Cr^{VI} před zakoncentrováním redukován na Cr^{III} roztokem ethanolu a kyseliny chlorovodíkové. Obsah Cr^{VI} ve vzorku byl stanoven jako rozdíl koncentrace celkové a koncentrace Cr^{III} . Aktivní uhlí je použito pro zakoncentrování vzorku pitné vody bez použití komplexotvorného činidla, pH vhodné pro kvantitativní zakoncentrování chromu je v rozmezí od 4,5 do 5,5. Koncentrace chromu v zakoncentrovaném roztoku byla stanovena metodou ETAAS, zdrojem záření pro stanovení chromu byla výbojka s dutou katodou a produkovaná vlnová délka záření 357,9 nm. Detekční limit stanovení je 3,0 ng/l při použití kritéria 3 σ pro určení meze detekce.³²

Stanovení specií chromu v minerálních vodách spočívá v separaci Cr^{VI} a Cr^{III} za použití solid-phase extrakce s APDC a následném stanovení metodou ETAAS. Princip separace specií je založen na různé rychlosti tvoření komplexu s APDC (pyrrolidindithiokarbamat amonný), Cr^{VI} tvoří komplex s APDC velmi rychle, zatímco tvorba komplexu s Cr^{III} je pomalá z důvodu vysoké hydratace iontů. Cr^{VI} je z komplexu vyvázán kyselinou dusičnou a následně stanoven metodou ETAAS, celková koncentrace chromu byla

stanovena přímo ve vzorku, koncentrace Cr^{III} je určena jako rozdíl výše uvedených hodnot. Určená mez detekce metody je $0,03 \mu\text{g/l}$ pro Cr^{VI} a $0,3 \mu\text{g/l}$ pro stanovení celkového chromu. Přesnost stanovení chromu může být ovlivněna přítomností redukovačů (Fe^{II}), které mohou Cr^{VI} redukovat. Uvedená metoda je vhodná pro stanovení nízkých koncentrací ($\mu\text{g/l}$ a ng/l) chromu ve vzorcích minerálních vod.³³

Stanovení železa a selenu v kravském mléce je založeno na naředění vzorku mléka roztokem směsi vodou rozpustných terciárních amínů a následné stanovení metodou AAS s elektrotermickou atomizací. Zdrojem záření pro stanovení železa byla výbojka s dutou katodou a produkovaná vlnová délka záření $248,3 \text{ nm}$, pro stanovení selenu byla zdrojem výbojka s dutou katodou a použitá vlnová délka záření $196,0 \text{ nm}$. Rozsah stanovovaných koncentrací ve vzorcích mléka byl pro selen 17 až $122 \mu\text{g/l}$ a pro železo $0,6$ až $1,17 \mu\text{g/l}$. Detekční limit závisí na obsahu tuku v mléce, mez detekce železa byla v rozmezí $0,39$ až $0,6 \mu\text{g/l}$ a mez detekce pro selen $1,2$ až $2,5 \mu\text{g/l}$. Přesnost metody byla ověřena pomocí referenčních materiálů sušeného mléka.³⁴

4.3 Atomizace v plameni v AAS

Detekce specií chromu v mořské vodě spočívá v zakoncentrování specií pomocí mikrokolony naplněné sorbentem uhlovodíků C_{18} navázaných na silikagel. Zakoncentrování Cr^{VI} se provádí z okyseleného vzorku mořské vody o $\text{pH } 1,5$ v přítomnosti DDTC jako koncentračního činidla, zakoncentrování Cr^{III} je provedeno při $\text{pH } 7$ za použití DDTC a roztoku Mn^{II} , který zvyšuje 10 krát signál Cr^{III} . Eluce z kolony byla provedena methanolem. Separované specie byly stanoveny metodou FAAS. Autory uvedený pracovní rozsah metody je $0,02$ až $200 \mu\text{g/l}$, limit detekce byl stanoven na $0,02 \mu\text{g/l}$. Uvedená metoda je vhodná pro stanovení specií chromu ve vzorcích mořské vody.³⁵

Závěr

V práci byly popsány základní pojmy, definice a výrazy speciální analýzy. Dále vlastnosti, výskyt, biodostupnost, toxicita a zdroje znečištění vybraných kovů. Byly popsány vhodné separační metody sloužící k účinnému rozdělení vzorku na jednotlivé specie. Následně byly diskutovány metody, jenž jsou použitelným nástrojem k selektivní detekci specií kovů (AAS, OES, AFS, ICP-MS).

Závěr práce se věnoval možnostem využití atomové absorpční spektrometrie ke stanovení specií vybraných kovů ve skutečných vzorcích s využitím různých způsobů atomizace. Uvedené možnosti a postupy stanovení byly čerpány ze článků publikovaných v chemických časopisech.

Ze závěrečné kapitoly je možno usoudit, že generování těkavých hydridů patří k nejrozšířenějším metodám ke speciaci arsenu, selenu a antimonu v různých matricích. Metoda elektrotermické atomizace je vhodná pro stanovení specií chromu a železa i ve složitých matricích jako je mléko a krevní sérum.

Seznam použitých zkratk

AAS	atomová absorpční spektrometrie
AFS	atomová fluorescenční spektrometrie
APDC	pyrrolidindithiokarbamát amonný
CZE	kapilární zónová elektroforéza
DDTC	diethyldithiokarbamát diethylamonný
DMA	kyselina dimethylarseničná
ETAAS	atomová absorpční spektrometrie s elektrotermickou atomizací
F-AAS	atomová absorpční spektrometrie s atomizací v plameni
GC	plynová chromatografie
HG-AAS	generování těkavých sloučenin v atomové absorpční spektrometrii
HPLC	vysoce účinná kapalinová chromatografie
ICP-AES	optická emisní spektrofotometrie s indukčně vázaným plazmatem
ICP-MS	hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem
IEC	iontově výměnná chromatografie
MMA	kyselina monomethylarseničná
OES	optická emisní spektrofotometrie
RP HPLC	vysoce účinná kapalinová chromatografie na obrácených fázích
SEC	vylučovací chromatografie

Literatura

1. Cornelis R., Crews H., Caruso J., Heumann K.: *Handbook of Elemental Speciation: Techniques and Methodology*. John Wiley & Sons, Chichester 2003.
2. Cornelis R., Crews H., Caruso J., Heumann K.: *Handbook of Elemental Speciation II: Species in the Environment, Food, Medicine & Occupational Health*. John Wiley & Sons, Chichester 2005.
3. Florence T. ML.: *Talanta* **29**, 354 (1982).
4. Ure A. M., Davidson C. M.: *Chemical Speciation in the Environment*. Blackie, London 1990.
5. Templeton D. M., Ariese F., Cornelis R., Danielsson L. G., Muntau H., Van Leeuwen H. P., Lobinski R.: *Pure Appl. Chem.* **72**, 1453 (2000).
6. Halko R., Neuročný T., Hutta M.: *Chem. Listy* **104**, 223 (2010).
7. Koplík R., Čurdová E., Mestek O.: *Chem. Listy* **91**, 38 (1997).
8. Klikorka J., Hájek B., Votinský J.: *Obecná a anorganická chemie*. SNTL/ALFA, Praha 1985.
9. Hagarová I., Žemberyová M.: *Chem. Listy* **98**, 926 (2004).
10. Hagarová I., Žemberyová M.: *Chem. Listy* **99**, 578 (2005).
11. Janoš P., Kurán P., Řídká M.: *Chem. Listy* **101**, 406 (2007).
12. Mestek O., Zíma T., Suchánek M., Žilková J.: *Chem. listy* **92**, 746 (1998).
13. Houserová P., Matějček D., Kubán V., Pavlíčková J., Komárek J.: *Chem. Listy* **101**, 495 (2007).
14. Eichler Š., Mestek O.: *Chem. listy* **104**, 13 (2010).
15. Hlušek J., Jůzl M., Čepl J., Lošák T.: *Chem. Listy* **99**, 515 (2005).
16. Holbová M., Lubal P.: *Chem. Listy* **99**, 200 (2005).
17. Holzbecher Z., Churáček J. a kolektiv: *Analytická chemie*. SNTL/ALFA, Praha 1987.
18. Štulík K. a kolektiv: *Analytické separační metody*. Karolinum, Praha 2004.
19. Pedrero Z., Madrid Y.: *Anal. Chim. Acta* **634**, 135 (2009).
20. Kašička V.: *Chem. Listy* **91**, 320 (1997).
21. Černohorský T., Jandera P.: *Atomová spektroskopie*. Univerzita Pardubice, Pardubice 1997.

22. Němcová I., Čermáková L., Rychlovský P.: *Spektrometrické analytické metody I.* Karolinum, Praha 2004.
23. Broekaert J. A. C.: *Analytical atomic spektrometry with flames and plasmas, 2nd Ed.* WILEY-VCH, Weinheim 2005.
24. Ebdon L., Evans E. H., Fisher A. S., Hill S. J.: *An introduction to analytical atomic spektrometry.* John Wiley & Sons, Chichester 1998.
25. Dean J. R.: *Practical inductively coupled plasma spectroscopy.* John Wiley & Sons, Chichester 2005.
26. Krachler M., Emons H.: Fresenius' J. Anal. Chem. **368**, 702 (2000).
27. Krachler M., Shotyk W., Emons H.: Anal. Chim. Acta **432**, 303 (2001).
28. Pyell U., Dworschak A., Nitsche F., Neidhart B.: Fresenius' J. Anal. Chem. **363**, 495 (1999).
29. Macedo S. M., Jesus R. M., Garcia K. S., Hajte V., Queiroz A. F. S., Ferreira S. L. C.: Talanta **80**, 974 (2009).
30. Sigrist M. E., Beldoménico H. R.: Spectrochim. Acta, Part B **59**, 1041 (2004).
31. Hraníček J., Červený V., Rychlovský P.: Chem. listy **104**, 1196 (2010).
32. Gill R. A., Cerutti S., G'asquez J. A., Olsina R. A., Martinez L. D.: Talanta **68**, 1065 (2006).
33. Chwastowska J., Skwara W., Sterlinska E., Pszonicki L.: Talanta **66**, 1345 (2005).
34. Aleixo P. C., No'brega J. A.: Food Chem. **83**, 457 (2003).
35. Prasada Rao T., Karthikeyan S., Vijayalekshmy B., Iyer C.S.P.: Anal. Chim. Acta **369**, 69 (1998).