

INOVACE V ATOMOVÉ ABSORPČNÍ A FLUORESCENČNÍ SPEKTROSKOPII

Praha

2007

Tato skripta vznikla pro potřeby kurzu **Inovace v atomové absorpční a fluorescenční spektroskopii**, pořádaného v rámci projektu "Pražské analytické centrum inovací" CZ.04.3.07/4.2.01.1/0002 v grantovém schématu JPD3: Spolupráce výzkumných a vývojových pracovišť s podnikatelskou sférou, podpora inovací". Projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a Státním rozpočtem České republiky.

Odborný garant RNDr. Jiří Dědina, CSc., technická redakce RNDr. Eva Juláková, CSc.

ISBN 978-80-86238-33-3

OBSAH

1.	Atomová absorpční spektrometrie s využitím laserových diod 3 B. Dočekal
2.	Detektory v atomové absorpční spektrometrii 11 <i>B. Dočekal</i>
3.	Principles and applications of high-resolution continuum source AAS
4.	Vliv proměnné síly magnetického pole na parametry Zemanovy korekce pozadí, optimalizace podmínek analýzy systémů s proměnnou silou magnetického pole
5.	Přímá analýza pevných vzorků atomovou absorpční spektrometrií s elektrotermickou atomizací
6.	On-line metody úpravy a zpracování vzorků v atomové spektrometrii 61 <i>V. Kubáň</i>
7.	Aplikace elektrodepozice analytu v metodě ET-AAS pro jeho prekoncentraci a separaci od matrice vzorku
	J. Komarek, P. Rychlovský
8.	Atom traps in atomic absorption spectrometry
	O. Y. Ataman
9.	Atomové absorpční a fluorescenční detektory pro speciační analýzu založenou na generování těkavých sloučenin
	J. Dědina
10.	Stanovení chemických forem rtuti plynovou a kapalinovou chromatografií s detekcí atomovou fluorescenční spektrometrií 125
	J. Komárek, P. Pelcová a R. Červenka
11.	Trends in sample preparation: innovative strategies from trace elements to metalloproteins

M. A. Z. Arruda

PŘEDMLUVA

Tato skripta vznikla pro potřeby kursu **Inovace v atomové absorpční a fluorescenční spektroskopii**, pořádaného ve dnech 20. a 21. listopadu 2007 v rámci projektu "**P**ražské analytické centrum inovací" cz.04.3.07/4.2.01.1/0002 v grantovém schématu jpd3 "Spolupráce výzkumných a vývojových pracovišť s podnikatelskou sférou, podpora inovací". Jako poslední kapitola byl zažazen text přednášky prof. Arrudy, **Trends in sample preparation: innovative strategies from trace elements to metalloproteins**, která byla v rámci téhož projektu proslovena dne 19. září 2007.

Cílem celého projektu je přispět k rozšíření komunikace mezi výzkumnou a vývojovou sférou na straně jedné a sférou podnikatelskou na straně druhé, a tím i k urychlení přenosu nových poznatků vzniklých ve výzkumné sféře do oblasti praktických aplikací. Autoři jednotlivých kapitol budou proto vděčni za jakékoliv kritické připomínky k jejich koncepci i provedení, zejména za jakékoliv náměty vedoucí k realizaci prezentovaných poznatků v praxi.

Jiří Dědina

1. ATOMOVÁ ABSORPČNÍ SPEKTROMETRIE S VYUŽITÍM LASEROVÝCH DIOD

doc. RNDr. Bohumil Dočekal, CSc. Ústav analytické chemie AV ČR, v.v.i., Brno, <u>docekal@iach.cz.</u>

V osmdesátých letech minulého století ukázal K. Niemax se svými spolupracovníky z Institutu pro spektrochemii a aplikovanou spektroskopii (ISAS) v Dortmundu, že lze výhodně využít miniaturní polovodičové laserové diody v různých oblastech atomové spektroskopie, jako např. v atomové absorpční spektroskopii, spektroskopii s vysokým rozlišením umožňující stanovení jednotlivých isotopů, spektroskopii s eliminací Dopplerova jevu, laserem indukované fluorescenci, prvkově selektivní detekci v plynové chromatografii a rovněž v dalších technikách souvisejících s laserem indukovanou ionizací [1, 2].

Polovodičové miniaturní laserové diody (LASER – *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*) pracují na principu stimulované emise záření, a to vyvolané fotony o stejné frekvenci záření jak to odpovídá příslušnému přechodu atomu z vyšší energetické hladiny na hladinu nižší. Přitom jsou emitovány fotony se stejnou fází (koherentní záření) jakou mají fotony stimulujícího záření. Ke stimulované emisi dochází jen tehdy, je-li zastoupení atomů na příslušné vyšší energetické hladině větší než na hladině nižší. Za běžné termické rovnováhy je však větší zastoupení atomů na hladině nižší. Proto k dosažení potřebné inverzní populace stavů je třeba "přečerpávat" elektrony do odpovídajících vyšších energetických hladin. To se děje v polovodičových laserových diodách průchodem proudu přechodem P - N polovodiče, většinou na bázi materiálů GaAlAs nebo InGaAsP.

V laserových diodách odpovídá emitované záření přechodu elektronů mezi vodivostním a valenčním pásem polovodiče (viz obr. 1.1). Elektrony ve vodivostním pásu, odpovídající excitovanému stavu, rekombinují s pozitivními dírami ve valenčním pásu a tím se uvolňují fotony odpovídající rozdílu energií obou stavů. Poměr složek polovodiče (např. Al a Ga) určuje energetický rozdíl mezi pásem vodivostním a valenčním, a tedy i vlnovou délku záření vycházejícího z aktivní vrstvy přechodu (viz obr. 1.2). Běžně dostupné diody emitují záření v oblasti 630-1 600 nm. Laserový paprsek použitelný v praxi vzniká v oscilátoru laseru (Fabry-Perotův rezonátor), v aktivní vrstvě mezi dvěma planparalelními odraznými ploškami vzniklými na aktivní laserové vrstvě ve směru optické osy (viz obr. 1.3 a). Záření směřující ve směru optické osy je odrazy mezi zrcadlovými ploškami zesilováno (viz obr. 1.3c-f), zatímco záření odchylující se od optické osy uniká z rezonátoru (viz obr. 1.3b) a je absorbováno substrátem diody. Při dopadu na odrazné plošky proniká ve směru optic

ké osy část záření mimo aktivní vrstvu. Jakmile se množství zesíleného záření vyrovná množství záření ztraceného v bocích rezonátoru, absorpcí v polovodiči a únikem přes zrcadlové plošky dostává se laser do stavu oscilací.

Záření vycházející z laserových diod má vysoký stupeň časové i prostorové koherence, což umožňuje vytvářet velmi úzké svazky paralelních paprsků vhodných pro spektroskopické aplikace.



Obr. 1.1: Schéma energetických hladin v polovodičové laserové diodě



Obr. 1.2: Schéma polovodičové laserové diody typu Ga_{1-x}Al_xAs



Obr. 1.3: Schéma procesů probíhajících v laseru

Polovodičové miniaturní (o rozměrech 0, 3 x 0, 3 x 0, 15 mm) nízkovýkonové $(10^0 \text{ až } 10^1 \text{ mW})$ laserové diody nejsou běžně vyráběny pro spektroskopické účely, ale převážně v masovém měřítku pro použití ve sdělovací technice, v technologii čtení a záznamu kompaktních disků (CD, DVD), při záznamu na optických nebo thermo-magneto-optických paměťových médiích, v laserových tiskárnách, ve čtecích zařízeních čárkových kódů, ve faxech a skenerech, apod. Konstrukce diody je schematicky zobrazena na obr. 1.2. Spektroskopické vlastnosti těchto běžně dostupných levných diod byly podrobně studovány a popsáno jejich možné využití v atomové spektroskopii [3].

Důležitou vlastností těchto diod je, že vlnová délka vycházejícího záření může být v určitém rozsahu modulována v požadovaném úzkém spektrálním intervalu změnou teploty či s vysokou frekvencí (až 10⁰ GHz) změnou napájecího proudu (viz obr. 1.4). Snadnější regulaci teploty laserové diody umožňuje integrace diody a Peltierova článku v jednom čipu (viz obr. 1.2). Životnost polovodičových laserových diod za běžného provozu je řádu několika desítek tisíc hodin.

V klasickém uspořádání měření absorpce záření atomy analytu, jak bylo postulováno zakladatelem atomové absorpční spektrometrie sirem A. Walshem v padesátých letech minulého století s ohledem na tehdejší technické možnosti, se doposud převážně využívají čárové zdroje primárního, prvkově specifického záření. Tyto zdroje běžně tvoří výbojky s dutou katodou (HCL - *hollow cathode lamp*) nebo bezelektrodové výbojky (EDL - *electrode*



Obr. 1.4: Schéma ladění vlnové délky záření vycházejícího z polovodičové laserové diody:)(a) napájecí zdroj, chladič s diodou a kolimační čočkou, (b) ladění změnou teploty, (c) ladění změnou procházejícího proudu

less discharge lamp) pracující na principu doutnavého výboje. Zmíněné klasické čárové zdroje lze s jistými omezeními výhodně nahradit polovodičovými laserovými diodami. Oproti klasickému uspořádání se však absorpce atomy neměří na monochromátorem vymezené čáře analytu v úzkém spektrálním rozsahu několika desetin nanometru, ale s rozmítáním vlnové délky záření emitovaným diodou s typickou spektrální šíří 40 fm (tj. 10krát až 100krát užší než je běžná spektrální šíře absorbujících atomů v atomizátoru). Tak je možné koncipovat atomovou absorpční spektrometrii s modulací vlnové délky záření [4]. Rozmítáním vlnové délky záření s vysokou frekvencí v blízkém okolí analytické čáry (podle typu diody a způsobu modulace v rozsahu 10^{-1} až 10^{1} nm) se tak proměřuje absorpční profil absorbujících atomů s vysokým rozlišením (viz obr. 1.5). Odpadá tak nutnost použití optických disperzích prvků, čímž se měřící aparatura podstatně zjednodušuje a zlevňuje. Srovnání klasického uspořádání pro AAS a s použitím laserových diod je znázorněno na obr. 1.6. Detekční systém s laserovými diodami je možné kombinovat s libovolným vhodným typem atomizátoru. S ohledem na konstrukční jednoduchost detekčního systému není významně omezována konstrukce atomizátoru popřípadě jeho justace do optické osy. S použitím několika diod (diodových modulů) a jedním polovodičovým detektorem lze rovněž sestavit jednoduchý vícekanálový měřící systém pro simultánní stanovení více prvků (viz obr. 1.7) [1, 5]. Při specifickém měření jednotlivých prvků ve vícekanálovém uspořádání ovládá multiplexer napájení laserových diod pracujících s rozdílnými frekvencemi a zároveň měření detektorem (*lock-in* zesilovač). Díky vysokému rozlišení je možné současně měřit úroveň neselektivní absorpce v blízkosti absorpčního profilu analytické čáry a tak kompenzovat příspěvek pozadí, a to v reálném čase ($10^1 \mu$ s) vzhledem k časovému průběhu procesů probíhajících v atomizátoru.



Obr. 1.5: Signály měřené v AAS s polovodičovou laserovou diodou a s modulací vlnové délky. Absorpční spektra měřena přímo (a), s první (b) a druhou (c) harmonickou modulační frekvencí



Obr. 1.6: Srovnání experimentálního uspořádání v AAS při měření na analytické čáře pomocí výbojky s dutou katodou a při měření s polovodičovou laserovou diodou s modulací vlnové délky

Proudová modulace vlnové délky záření vycházejícího z diody zároveň umožňuje výrazně snížit šum měření. Pracuje-li se s vysokou modulační frekvencí napájení diody v megahertzovém rozsahu a detekuje-li se s první nebo druhou harmonické frekvence modulace (viz obr. 1.5), je možné měřit přesně i absorbance na úrovni 10^{-7} až 10^{-8} . V závislosti na druhu analytu a typu použité diody to přináší ve srovnání s konvenční atomovou absorpční spektrometrií 10 až 1000-násobné snížení detekčních limitů a zároveň i podstatné rozšíření dynamického rozsahu měření až o několik řádů. Detekční limity metody s modulací laserové diody v kombinaci s plamenovou technikou tak dosahují detekčních limitů konveční atomové absorpční spektrometrie s elektrotermickými atomizátory. Jako příklad je na obr. 1.8 uvedena kalibrační křivka pro stanovení Cr plamenovou technikou s běžným pneumatickým zamlžovačem. V kombinaci s elektrotermickými atomizátory lze pak dosáhnout i detekční schopnosti srovnatelné s instrumentálně nákladnou ICP MS.



Obr. 1.7: Schéma experimentálního uspořádání pro simultánní stanovení prvků AAS s více polovodičovými laserovými diodami



Obr. 1.8: Kalibrační křivka pro Cr při měření s polovodičovou laserovou diodou na čáře 425,44 nm a s atomizací v plameni acetylen–vzduch (převzato z práce [4])

Významným omezením pro aplikaci polovodičových laserových diod je zatím nedostupnost diod vyzařujících v UV-oblasti (pod 400 nm), kde leží podstatná část resonančních analytických linií mnoha prvků. Jsou vyvíjeny nové diody na bázi ZnSe vyzařující v "modrozeleném" rozsahu vlnových délek (470-515 nm) a také na bázi InGaN vyzařující v "tmavě modrém" rozsahu vlnových délek okolo 420 nm. Je jen otázkou času, kdy budou tyto nové typy diod uvolněny z výzkumu pro vojenské účely či kosmický výzkum a budou tak komerčně dostupné. Nicméně zmíněnou nevýhodu nedostupnosti "modrých" diod lze obejít použitím prvků nelineární optiky (tzv. násobičů frekvence, např. krystalu LiIO₃) přímo integrovaných na dostupné diody (630 nm). Tak lze rozšířit spektrální rozsah měření a dosáhnout až vlnových délek emitovaného záření těsně nad 300 nm. Snížené výkony druhé harmonické frekvence záření na úrovni 10^{-1} µW přitom plně postačují k měření absorpce atomy. Místo běžných prominentních resonančních čar lze pak k měření využít i jiné vhodné analytické čary a stanovovat velmi citlivě většinu prvků. Přehled možností stanovení s uvedením detekčních mezí je uveden v pracích [1-2]. Zásadní omezení této techniky platí pro stanovení prvků v blízkosti 200 nm, především prvků tvořících těkavé kovalentní hydridy (As, Bi, Ge, Hg, Sb, Se, Sn, Te), a dále pro stanovení Au, Be, Mg, P, Si a Zn.

Následovníci K. Niemaxe se podíleli na vývoji komerčně dostupné instrumentace využívající polovodičových laserových diod [6]. Především jsou konstruovány jednoduché jednoúčelové přístroje pro řešení specifických analytických úloh. Příkladem je instrumentace pro speciační analýzu Cr(III) a Cr(VI) - viz obr. 1.9. Aktuální informace o přístrojích pro různé analytické aplikace lze nalézt na internetových stránkách (www.laserspec.de).



Obr. 1.9: Instrumentace pro separaci HPLC a stanovení Cr(III) a Cr(VI) atomovou absorpční spektrometrií s laserovou diodou a atomizací v plameni acetylenvzduch. Chromatogramy byly získány pro vzorky deionizované vody (převzato z práce [2])

Literatura

- 1. K. Niemax, H. Groll, Ch. Schnűrer-Patschan: Spectrochim. Acta. Rev., 15, 349-377 (1993).
- 2. K. Niemax, A. Zybin, Ch. Schnűrer-Patschan, H. Groll: Anal. Chem., 68, 351A-356A (1996).
- 3. J. Franzke, A. Schnell, K. Niemax: Spectrochim. Acta. Rev., 15, 379-395 (1993).
- 4. H. Groll, Ch. Schnűrer-Patschan, Yu. Kuritsin, K. Niemax: Spectrochim. Acta. Part. B., **49B**, 1463-1472 (1994).
- 5. H. Groll, K. Niemax: Spectrochim. Acta. Part. B., 48B, 633-641 (1993).
- 6. Ch. Schnűrer-Patschan, H. Groll, W. Hrosch: LaborPraxis, No. 3/1997.

2. DETEKTORY V ATOMOVÉ ABSORPČNÍ SPEKTROMETRII

doc. RNDr. Bohumil Dočekal, CSc. Ústav analytické chemie AV ČR, v.v.i., Brno, <u>docekal@iach.cz,</u>

Pro měření v atomové absorpční spektrometrii s čarovými zdroji specifického záření se běžně užívá fotonásobiče (*Photo-multiplier tube – PMT*) (obr. 2.1) jako detektoru propuštěného záření. Fotonásobiče mívají rozšířený spektrální detekční rozsah fotokatody do dlouhovlnné oblasti, a to pro zvýšení citlivosti měření některých alkalických prvků (K, Cs). Fotony dopadající na fotokatodu vyrážejí z jejího povrchu v důsledku fotoelektrického jevu elektrony, které se pak lavinovitě množí při dopadu na kaskádu dynod s vloženým rostoucím napětím a tím vytvářejí měřitelný elektrický proud. Elektrický signál se pak zesiluje a dále zpracovává do formy absorbančního údaje.



Obr. 2.1: Schéma tradičního principu měření v atomové absorpční spektrometrii s čarovým zdrojem záření (nahoře) a schéma fotonásobiče (vpravo)



Některé moderní přístroje využívají s výhodou křemíkových fotodiod (*silicone photodio-des*) (obr. 2.2), které se vyznačují vysokou linearitou a dynamickým rozsahem 6-8 řádů (www. oriel. com). Jejich rozsah citlivosti pokrývá celou spektrální oblast UV-VIS a blízkou infračervenou v rozmezí 185-1 100 nm. Fotony dopadající na aktivní povrch diody (obr. 2.2a) generují elektrony a pozitivní díry v blízkosti přechodu mezi n- a p-typem dopovaného křemíkového materiálu, přičemž se díry posouvají do p-materiálu a elektrony do n-materiálu. Tím se vytváří potenciálový spád na rozhraní a následně i elektrický proud, je-li dioda připojena do elektrického obvodu.



Obr. 2.2: Schéma křemíkové fotodiody (a), řady fotodiod (b), seskupení devíti fotodiod pro současné měření v měrném a referenčním paprsku a pro různé výšky výstupní štěrbiny monochromátoru u přístrojů řady AAnalyst 600-800 Perkin-Elmer (c) a snímek elektronického uspořádání těchto diod na čipu (d)

Tyto individuální fotodiodové prvky jsou velmi často seskupovány (obr. 2.2 b až d) technologií integrovaných obvodů do lineárních řad fotodiodových prvků (lineární zobrazovací senzory, *Photodiode Arrays - PDA*) nebo jiných speciálních sestav. Při měření se analogový signál z každého fotodiodového prvku (pixelu) postupně v řadě po sobě odečítá pomocí individuálních FET přepínačů (*field-effect* transistorů). Velikost signálu odpovídá množství dopadajícího záření na jednotlivé pixely. Pro spektroskopické účely jsou prvky vytvářeny na čipu jako vysoké, úzké pixely tak, aby korelovaly s geometrií/obrazem štěrbiny spektroskopických systémů. Pro použití v AAS (AAnalyst 600, 700 a 800 firmy Perkin-Elmer) byl vyvinut (Hamamatsu Photronics) speciální monolitický segmentovaný fotodiodový detektor (*"Solid-State Detector"*) (obr. 2.2 c, d). Je složen z devíti segmentů (obr. 2.2d vpravo), které jsou opatřeny zesilovači na bázi technologie CMOS (obr. 2.2d vlevo). Tento detektor se vyznačuje zlepšeným poměrem signál/šum, zvýšenou citlivostí detekce (kvantovou účinností) ve srovnání s běžnými fotonásobiči (např. řady P 982), což vede k podstatnému zlepšení instrumentálních limitů detekce. Signály z určitých segmentů seskupení fotodiod mohou být současně, nezávisle vyhodnocovány pomocí společně integrovaných elektronických obvodů na čipu. Ve spektrometru AAnalyst 700 umožňuje segmentovaný detektor současně měřit změny signálu v měrném a referenčním paprsku. Měření nejsou tak separována v čase, ale jsou separována v prostoru (referenční paprsek je veden nezávisle vláknovou optikou). Během běžné měřící periody je pak možné zdvojnásobit integrační dobu. Tyto výhodné vlastnosti detektoru vedou k výraznému snížení instrumentálních limitů.

Speciálně navržený plošný fotodiodový detektor se 61 segmenty a zesilovačem s nízkým šumem byl využit v kombinaci s echelle polychromátorem (viz obr. 2.3) ke konstrukci simultánního přístroje pro atomovou absorpční spektrometrii (SIMAA 6000 - *Simultaneous multielement AAS* - Perkin-Elmer). Tento detektor umožňuje měřit současně až v šesti libovolně volitelných kanálech.



Obr. 2.3: Schéma spektrometru SIMAA 6000 firmy Perkin-Elmer (vlevo) a zvětšený snímek plošného detektoru s 61 fotodiodovými segmenty sloužícími k současnému až šestikanálovému měření
1 - výbojky s dutou katodou nebo bezelektrodové výbojky, 2 - slučovač paprsků, 3 - atomizátor, 4 - vymezovací štěrbiny, 5 - echelle polychromátor

(a - hranol, b - echelle mřížka), 6 - plošný polovodičový detektor

V současnosti také získávají na významu v různých technologiích detekce záření a pro zobrazovací účely detekční zařízení pracující na principu přenosu náboje "Charge Transfer Devices". Mezi tato zařízení využitelná pro spektroskopické účely patří plošné detektory *CCD – Charge Coupled Devices.* U těchto typů detektorů jsou na kompaktním čipu vytvářeny jednotlivé fotocitlivé prvky (pixely) o rozměrech přibližně 25 x 25 µm pomocí tří hradel (elektrod) s proměnným potenciálem, přičemž prostřední mívá nejvyšší potenciál (obr. 2.4). Fotocitlivé prvky jsou uspořádány v řadách a sloupcích tak, že vytvářejí plošný detektor. Záření dopadající na prvek uvolňuje elektrony, které migrují do sběrného místa (potenciálové studny, vytvořené prostřední elektrodou), kde jsou shromažďovány. Změnou potenciálů na elektrodách se nashromážděný náboj posouvá mezi pixely až do čtecího registru (ve směru šipek vpravo na obr. 2.4), kde se měří jeho velikost. Při vyhodnocování lze náboje z jednotlivých, po sobě odečítaných pixelů sčítat (binning), což umožňuje s výhodou snižovat příspěvek šumu měření a také vyhodnocovat příslušné obrazy analytických čar na plošném detektoru. Pro účely optické spektroskopie je citlivost CCD detektorů při výrobě účelově zvýšena pro UV oblast, čímž detektory získávají potřebnou vysokou kvantovou účinnost až 90 % (backthinned CCD - fotony a následně fotoelektrony dosahují snadněji na ztenčeném čipu aktivní zóny - depletion region). Zmíněné detektory se vyznačují dostatečně vysokou saturační kapacitou pixelů a nízkým šumem při rychlém odečítání, a tím i vysokým dynamickým rozsahem detekce záření.



Obr. 2.4: Schéma funkce jednoho fotocitlivého prvku (vlevo) a integrace prvků na čipu *CCD detektoru (vpravo)*

V současnosti je detektoru CCD, speciálně vyvinutého firmou Hamamatsu, s 576 pixely využíváno jako lineárního detekčního prvku pro spektrální rozsah přibližně 1 nm v přístrojích pro HR-CS AAS (*High Resolution Continuum Source Atomic Absorption Spectrometry*) řady *contrAA* (modely 300 a 700) firmy Analytik Jena pro simultánní měření s vysokým spektrálním rozlišením (viz obr. 2.5).



Obr. 2.5: Schéma spektrometru řady contrAA pracujícím na principu HR-CS-AAS se spektrálním rozsahem 189-900 nm a dvojitým monochromátorem

1 - xenonová vysokotlaká výbojka s krátkým obloukem, 3 - eliptická zrcadla, 4 - atomizátor, 5 - vstupní štěrbina, 6 - parabolická zrcadla, 7 - Littrowův hranol pro separaci řádů spektra, 8 - zrcadlo s meziclonou, 9 - echelle mřížka, 10 - CCD-detektor

3. PRINCIPLES AND APPLICATIONS OF HIGH-RESOLUTION CONTINUUM SOURCE AAS

Dr. Uwe Heitmann,

Technical University of Berlin, Institute for Optics and Atomic Physics, Hardenbergstr. 36, 10623 Berlin, Germany, <u>uwe.heitmann@online.de</u>

This Chapter should give a brief overview about the principles, present features and new applications possible by means of the use of high-resolution continuum source atomic absorption spectrometry (HR-CS AAS). It is neither intended to cover the entire field of this outstanding analytical technique, which recently became commercially available, nor to give detailed descriptions of all individual parts of a corresponding spectrometer. Most of the material presented in this script has already been published during the last years in numerous papers as well as a book in a more comprehensive manner. Thus, the reader is advised to take a closer look to the full references listed in part 3.5 in order to obtain additional information regarding the different topics of HR-CS AAS he especially is interested in.

3.1 Fundamentals

Atomic absorption spectrometry (AAS) is, without any doubt, one of the oldest optical techniques applied for element analysis. Despite its mature age, even nowadays AAS still has an increasing global spread and is the most widely used analytical technique. This is mainly due to its simplicity in instrumentation, straightforwardness in operation and cost effectiveness.

Basically AAS can be accomplished with both continuum and line radiation sources, either in continuous or pulsed operation. Even so in the very beginning of spectroscopic investigations, which dates back to the 19th century, exclusively continuum sources, i.e., radiation sources emitting a continuous spectrum over a large wavelength range were used. Already in 1814 J. von Fraunhofer investigated the spectrum of the sun, the most prominent continuum source known, and observed more than 550 dark lines. Later on in 1860 R.W. Bunsen and G.R. Kirchhoff carried out their fundamental investigations on the line reversal in emission spectra of alkali and alkaline earth elements and compared these lines with the solar spectrum. For signal registration photographic plates were used at that time since they allowed the registration of the entire spectrum.

However, in particular because of the use of continuum sources and photographic plates spectroscopists in the following decades increasingly gave preference to atomic emission over atomic absorption for quantitative measurements since it was obviously much easier to detect a weak emission signal against a dark background than a slight reduction in emission intensity over a narrow spectral interval against a bright background. Moreover, in order to separate individual atomic absorption lines a spectral resolution of only a few picometer would be required, which was far beyond the capabilities of the best spectrometers available at that time. Thus, continuum source instrumentation lost more and more in interest and almost completely disappeared.

3.1.1 Conventional line source AAS

A completely new approach for AAS investigations was made by A. Walsh in 1952 (refer to Fig. 3.1). He proposed the use of a radiation source emitting a very narrow spectral profile, a so-called line source (LS), which preferably only emits the lines of the element of interest. With the availability of the first sealed-off hollow cathode lamps in 1955 his desire became reality and Walsh could demonstrate first applications of LS AAS to chemical analysis.



Fig. 3.1: First sketch of an atomic absorption spectrometer drawn by A. Walsh in 1952 (© Australian Academy of Science)

In this configuration only a low-resolution monochromator was required and its task was now reduced to the separation of the analytical line from other lines emitted by the LS. However, a modulation of the emission of the LS and the use of a selective detection system, i.e., an amplifier synchronously tuned to the modulation frequency, was necessary in order to eliminate any emission from the atomizer, which was obviously not modulated and hence disregarded by the amplifier.

In conclusion, the combination of the use of a LS and the modulation principle provides the advantage of a high specifity and selectivity, but at the same time restricts LS AAS to a one-element-at-a-time technique. Nevertheless, Walsh's approach quasi re-invented AAS and made LS AAS a simple, inexpensive and very popular technique, and even nowadays almost every commercial AAS instrument is based on this approach.

3.1.2 Atomic absorption with a continuum source

As previously mentioned, first AAS investigations were performed by means of continuum sources (CS) as they were the only reliable radiation sources available in these ages. But due to the difficulties in handling of the early instruments CS AAS played only a negligible role in spectroscopic research during the first half of the 20th century.

Fortunately, the idea of using a CS as a primary radiation source for AAS was never given up, and there were many famous spectroscopists among those who worked in that field. However, substitution of the LS by a CS, without changing the rest of the instrument, was not a reasonable approach. Especially the instability of the most intense CS, i.e. xenon arc lamps, and their dramatic decrease in intensity at wavelengths below 280 nm resulted in elevated baseline noise and poorer limits of detection (LOD). In addition, the lowresolution monochromators normally used in LS AAS provided a much too large spectral bandwidth for use with a CS. Thus, only poor sensitivity and specificity, non-linear calibration curves and higher susceptibility to spectral interferences was obtained.

In view of these drawbacks a kind of turning point could be reached in 1975 when Keliher and Wohlers for the first time used a high-resolution echelle grating spectrometer. In the following years several groups continuously improved the CS AAS principle by introducing wavelength modulations, pulsed CS and solid-state detectors, i.e., linear photodiode arrays. However, in the end all these attempts still suffered from some limitations and never found their way to the instrument market. The main reason for this failure was the fact that all groups started from individual commercially available equipment, which they assembled and modified according to their needs.



Fig. 3.2: Schematic setup of the HR-CS AAS prototype spectrometer at ISAS Berlin, Germany (hollow cathode only necessary for direct comparison with LS AAS)

Consequently, CS AAS required a complete re-design of the whole spectrometer with all its individual components. This goal was finally reached in 1996 by Becker-Ross and coworkers at ISAS – Institute for Analytical Sciences in Berlin, who came up with a new approach, taking into consideration the special requirements of CS AAS [1,2]. The spectrometer they designed is schematically depicted in Fig. 3.2. It consists of a single highintensity xenon short-arc lamp as CS. The emitted continuous radiation is focused into an atomizer, known from conventional LS AAS instruments, and subsequently imaged onto the entrance slit of a compact, high-resolution double monochromator. At first the incoming light will be dispersed by a prism / echelle grating combination and finally a certain spectral interval around the analytical line of interest is recorded by means of a linear charge coupled device (CCD) array detector. The features and specifications of the individual components of the HR-CS AAS spectrometer are described in more detail in Part 3.2.

3.1.3 Signal registration and background correction principles

Due to the distinct differences in optical setup and the individual components used in LS and CS AAS both techniques have totally different measurement principles.

LS AAS spectrometers, independent of a single- or double-beam arrangement, must be seen as instruments having only a single measurement 'channel' for registration of the analytical signal. The radiation of the element-specific LS is conducted through the absorption volume and, after passing the low-resolution monochromator, recorded by a single detector, in most cases a photomultiplier. Thus, the absorption is measured only over the very narrow spectral interval corresponding to the width of the atomic line emitted by the LS, i.e., over a few picometer, and no information is available about the spectral environment. However, the absorption measured at the analytical line might well consist not only of atomic absorption due to the element of interest, but also to background absorption caused by matrix constituents. Since it is only possible to measure the total absorption has to be determined in a second, independent measurement and afterwards subtracted from the total absorption for obtaining the net atomic absorption. These two measurements have to be made in rapid sequence, particularly in the case of fast transient signals, i.e., electrothermal atomization, in order to minimize artifacts, namely 'bracketing' effects.

Therefore, in LS AAS, an additional background correction (BC) system is essential for correct signal registration. Over the years this need has resulted in the design of a variety of BC systems, using deuterium (D_2) lamps as a second source, which emit a continuous spectrum, high-current pulsing of the primary source, the so-called Smith-Hieftje BC method, or the Zeeman-effect BC, where the absorption profile is split under the influence of a magnetic field. All these approaches can handle not too fast changing 'continuous' effects reasonably well, but have certain problems with structured background. In addition,

all of them have made LS AAS spectrometers more complex and expensive, and none of the approaches is ideal.

From the optical point of view HR-CS AAS spectrometers are also belonging to singlebeam instruments, as there is only one beam passing the atomizer and going to the detector. However, due to the use of a linear CCD array detector, which consists of several hundred pixels, HR-CS AAS must be considered as a technique with multiple measurement 'channels'. All individual pixels act as independent detectors covering a certain wavelength interval, are illuminated at the same time by the CS and simultaneously read out. As only a few of these pixels are typically used to measure the analyte absorption, any other pixel or set of pixels can be used for other analytical or BC purposes.

This means that the wavelength-resolved measurement principle of HR-CS AAS has at least two mayor advantages in comparison to conventional LS AAS. Firstly, the entire spectral environment of the analytical line becomes visible, i.e., instead of getting absorbance information over time only, as is usual in LS AAS, one now gets three-dimensional information (absorbance over time and over wavelength). This obviously greatly helps to recognize and to avoid spectral interferences and to facilitate method development in general. Moreover, the nature and spectral distribution of the background become visible, which makes it much easier to take the appropriate action for its removal or correction. Secondly, the measurement of atomic and background absorption takes place at the same time, so that no artifacts, like 'bracketing' effects, are observed, even for the most rapidly changing background signals.

On the basis of Fig 3.3 the simplified computer-aided signal processing and background correction scheme of an analytical cycle in HR-CS AAS will be explained [10]: In the first step, before the dosing of the sample into the graphite furnace or the aspiration of a sample into the flame, a given number of sequential reference intensity spectra without any analyte absorption is recorded. These spectra are averaged and used as the reference intensity signal. Then a series of analytical intensity spectra during the analytical cycle is recorded (see Fig. 3.3a) and subsequently each individual spectrum is normalized to the reference intensity signal, giving an intensity correction factor, which is a measure of the non-specific background absorption and similar to LS AAS systems. In this way, all 'continuous' effects, such as broadband absorption and lamp fluctuations, as well as systematic errors, such as pixel errors, are removed and a series of transmittance spectra is obtained (refer to Fig. 3.3b). In the second step, the absorbance is calculated from the transmittance spectra, resulting in a three-dimensional plot of absorbance versus wavelength and time, as shown in Fig. 3.3c. Once the 'continuous' background is eliminated, the rotational fine structure of molecular absorption due to electron excitation becomes visible, as well as possible atomic absorption due to concomitant elements. In most cases it is not necessary to take further action in order to remove this residual fine-structured background, as long

as it is not directly overlapping with the analyte absorption in wavelength and time. For the rare case that analyte and background absorption coincide both spectrally and temporally, it is possible to correct for the fine-structured background in a third step. This is accomplished by means of previously recorded reference spectra, which can be stored in the software of the HR-CS AAS spectrometer. These spectra may then be subtracted from each individual spectrum measured for the actual sample using a least-squares algorithm, resulting in background-free absorbance spectra (Fig. 3.3d).



Fig. 3.3: Simplified signal processing and background correction scheme in HR-CS AAS; (a) uncorrected analyte intensity spectra, (b) continuous background corrected transmittance spectra, (c) continuous background corrected absorbance spectra, (d) absorbance spectra after correction for continuous and fine-structured background

Practical examples of the effectiveness the background correction principle of HR-CS AAS will be given later on in Part 3.3.

3.1.4 Multi-pixel signal evaluation schemes in HR-CS AAS

One of the major detractions of LS AAS spectrometers for applications in real sample analysis is their limited linear working range, which typically covers not more than two orders of magnitude in concentration. These limitations arises from stray radiation and the finite width of the emission lines of the radiation source, which is not monochromatic and just three to five times narrower than the absorption profile.

In contrast, with HR-CS AAS there is no theoretical limit to the calibration range, only the practical limits imposed by the size of the array detector, the increasing possibility of spectral interferences, and the ability to clean the atomizer after extremely high analyte concentrations have been introduced. However, HR-CS AAS inherently provides an elegant way to extend the linear working range, since signal evaluation cannot only be done at the center pixel M, corresponding to the line core, as in conventional LS AAS, but also using the volume Mx of the absorption peak with an increasing number x of pixels, the so-called peak volume evaluation, or the side pixels Nx only, the so-called side-pixel evaluation. The differences and individual advantages of these schemes are demonstrated in Fig. 3.4 by means of the In absorption line at 303.936 nm, which extends over more than five detector pixels.

In case of peak volume evaluation, i.e., the addition of more and more wing pixels of the absorption line, the sensitivity obtained in HR-CS AAS is at first significantly lower than that in LS AAS when solely the center pixel M is used for signal evaluation (see Fig. 3.4a). But a significant improvement in sensitivity can be obtained in HR-CS AAS for M1 evaluation. Even up to M5 evaluation the sensitivity can still be improved. However, further extension of the peak volume evaluation does not make sense, as the line profile drops, and only noise would be summed up. In summary, peak volume evaluation provides increased sensitivities and in consequence, when assuming a constant noise level, the possibility for an extension of the linear working range towards lower element concentrations as well as an achievement of better LOD.

On the other hand, the use of side pixels (Nx) only at increasing distance from the line core for evaluation results in reduced sensitivity but better linearity (refer to Fig. 3.4b). Therefore, side-pixel evaluation allows the determination of higher analyte amounts without the need for a sample dilution, which is especially delicate in case of solid sample analysis, and enables the extension of the linear working range of HR-CS AAS to at least five orders of magnitude in concentration, as claimed for ICP AES and ICP-MS.



Fig. 3.4:Influence of peak volume (a) and side-pixel evaluation (b) on the sensitivity
and working range of HR-CS AAS in case of the In absorption line at
303.936 nm
(HCL indicates the corresponding measurement with a LS)

Each evaluation scheme yields an individual sensitivity and linear working range, and quasi represents an own calibration curve. All of them are available at the same time due to the use of a multitude of pixels for signal registration. Since the whole data sets are stored by the software of the HR-CS AAS spectrometer for each individual analytical measure-

ment, all this information is steadily available. Moreover the software offers comfortable post-processing capabilities, i.e., all the data can be recalled at a future date and reprocessed using the desired evaluation scheme, which dramatically reduces the need for additional measurements of the sample.

In this context special care must be taken when comparing the numerical values of the absorbances calculated using the different evaluation schemes in HR-CS AAS with those of LS AAS [32]. In general, the absorbance is defined as the negative decadic logarithm of the absorption factor. This is the classical definition and is typically used in flame measurements. In case of sample atomization with a graphite furnace, the absorbance signal varies in time. Here, the area under the absorbance signal is proportional to the analyte mass and the integrated absorbance, having the unit 'second', has to be evaluated.

The introduction of a pixel detector for signal registration in HR-CS AAS yields an additional dimension, the spectral interval over which the absorbance is recorded. Although the principle problem of different (absorption and emission) line widths is known for several decades in conventional LS AAS, it is usually disregarded. Especially changes in the operating current of the LS make this effect obvious. By choosing a certain number of pixels in HR-CS AAS a defined wavelength interval can be selected over which the absorbance is recorded. With a steady-state signal, as in flame AAS, the individual pixel absorbances can be added, resulting in the wavelength-selected absorbance (WSA) or integrated, resulting in the wavelength-integrated absorbance (WIA), respectively. While the first one is again unit-free, the latter one now has a wavelength unit, such as 'picometer'. Finally, adding the transient component, as in graphite furnace AAS, one can add-up or integrate the individual integrated absorbance values of the selected pixels to obtain the volume under the absorbance peak. This results in the definitions peak volume selected absorbance (PVSA) and peak volume integrated absorbance (PVIA), having the units 'second' and 'picometer second', respectively.

The numerical values of some of these definitions can reach fairly high numbers, but must be seen individually according to their calculation and are not directly comparable with the conventional absorbance or integrated absorbance, as known from LS AAS. Furthermore, care must be taken when simply adding individual pixel absorbance values, as in the case of WSA and PVSA evaluation, since these values may vary between different HR-CS AAS spectrometers.

However, in order to make a fair comparison between absorbance values obtained with instrumentation from different manufacturers, values integrated over the entire wavelength interval, i.e., WIA or PVIA in case of flame or furnace measurements, respectively, should be used. These absorbance values are independent from the pixel scheme, i.e., the spectral resolution of the individual spectrometer or the number of pixels used for signal evalua-

tion. Moreover, these values can be directly related to the ones measured with conventional LS AAS, when taking the actual emission line width of the hollow cathode lamp or electrodeless discharge lamp into account.

3.2 Instrumentation for HR-CS AAS

As already mentioned above, the final breakthrough of HR-CS AAS was only possible because of the selective development and optimization of its individual components. The three key elements necessary in order to set up a HR-CS AAS spectrometer which can at least compete with the performance, i.e., the sensitivities and LOD, of conventional LS AAS instrumentation, are:

- a continuum radiation source, emitting a very high spectral radiance even in the far-UV wavelength region;
- a compact monochromator, having a very high spectral resolution in the order of the linewidths of atomic absorption lines and, at the same time, offering a high light throughput, an extreme wavelength accuracy, as well as the possibility for observing a certain spectral interval around the analytical line under investigation; and
- a state-of-the-art detector, enabling a fast signal readout, high UV quantum efficiency and registration with multiple 'channels'.

All these components, which are described in more detail in the following parts, are nowadays available and made HR-CS AAS a ready-for-the-market technique.

3.2.1 Continuum radiation source

The most obvious advantage of using a CS in AAS is that only one single radiation source is required for all elements and lines, which covers the entire wavelength range of analytical interest. This is a great simplification compared to LS AAS, and also a significant cost saving when more than just a few elements have to be determined.

In principle, incandescent sources, such as halogen lamps and different types of arc lamps filled with deuterium or xenon may be used for HR-CS AAS. However, all these commercially available CS have a notoriously weak emission in the far-UV below 250 nm, which is the most critical parameter for the selection of the radiation source. In order to achieve similar LOD as in LS AAS the spectral radiance per picometer bandwidth increment of the CS should be at least one order of magnitude higher than that of the narrow emission lines of hollow cathode lamps, since the geometrical conductance of a HR-CS AAS spectrometer is lower by the same order of magnitude.

Hence, this problem had to be solved by the development of an improved CS lamp type with increased UV emission and was done in close cooperation with the lamp manufacturer GLE (Berlin, Germany). The new lamp is based on the conventional design and still

looks like a classical xenon short-arc lamp (refer to left image of Fig 3.5), as for example used for stadium illumination, but has been optimized to operate in a so-called hot-spot mode, i.e., the discharge of the lamp is characterized by the formation of a small plasma spot close to the surface of the lamp cathode, as depicted in the right image of Fig. 3.5. The contraction of the plasma is mainly achieved by selection of a reduced electrode distance (typically less than 1 mm), an increased gas pressure of about 16 bar in cold condition, and a special temperature regime induced by optimized electrode geometries. Under normal operating conditions the inner pressure of the lamp increases to about 50 bar, and a hot-spot with a diameter of approximately 0.2 mm and a plasma temperature of about 10,000 K develops.

Although the lamp is only operated at a nominal power of 300 W, the formation of the hotspot results in significantly higher radiation intensity, particularly in the far-UV, where the spectral radiance is some two orders of magnitude higher than that of conventional xenon arc lamps operating in diffuse mode, and about three orders of magnitude higher than that of deuterium arc lamps, which are typically used in LS AAS for BC purposes.



Fig. 3.5: Xenon short-arc lamp operating in hot-spot mode (GLE, Berlin, Germany); photos of the complete lamp (left) and a typical profile of the discharge (right)

As the hot-spot xenon short-arc lamp roughly provides the same spectral radiance over the whole wavelength range between 190 nm and 900 nm, the use of such a CS in AAS leads directly to another advantage: From LS AAS it is well known that lines emitted by a LS, such as a hollow cathode lamp, can have significantly different intensities. Thus, spectroscopists in some cases, like Pb, tend to use secondary absorption lines of an element in order to get better signal-to-noise ratios (SNR). This problem of 'weak' lines does not exist

in HR-CS AAS and secondary lines can be used without compromises and without a sacrifice of precision. Furthermore, as literally radiation is available from a CS over the entire spectral range without any gap, it is possible to determine elements or even molecules, as will be discussed in part 3.3.4, for which no LS are available.

3.2.2 Echelle monochromator with high spectral resolution

The second, but even more sophisticated component in HR-CS AAS is the monochromator. In particular, its instrumental resolving power has to be about two orders of magnitude higher than in conventional LS AAS in order to avoid loss of sensitivity and excessive curvature of the calibration curve, and to ensure the greatest possible freedom from spectral interferences due to line overlap. It has been shown for several elements [1] that the sensitivity continuously increases with increasing resolution until the spectral bandwidth is in the order of the width of the atomic absorption line, and that no further improvement in sensitivity is possible beyond that level. Thus, optimum conditions are obtained for HR-CS AAS when the resolving power $\lambda/\Delta\lambda$ is of about 110,000.

In addition to a high spectral resolution, the monochromator should provide adequate geometrical conductance and diffraction efficiency to guarantee low LOD, primarily in the far-UV region. Moreover, the capability for a truly simultaneous measurement of any analytical line and its spectral vicinity is essential for accurate BC. Last but not least, the overall dimensions of the monochromator should almost remain the same as of low-resolution ones in order to be compatible with the layout of conventional instrumentation.

Therefore, preference was made to a system based on an echelle grating, since it perfectly fits to the requirements of HR-CS AAS (refer to Fig. 3.6). The new developed double echelle monochromator (DEMON) comprises a prism monochromator creating the order pre-selection in front of a simple echelle monochromator. Both components have a similar Littrow-arrangement and they are coupled with each other by two folding mirrors. The radiation entering the entrance slit is reflected by the first off-axis parabolic mirror towards the prism, which has a reflective coating on its rear side. After the collimated beam is refracted by the prism a small segment of the low-dispersed continuum spectrum passes the intermediate slit, which is, moreover, the entrance slit of the echelle monochromator. Rotation of the prism ensures that exactly the spectral interval, which involves the analytical line of interest and its spectral vicinity, is transmitted. Subsequently the echelle monochromator acts like a magnifying glass and spreads the pre-selected section of one echelle order with substantially higher dispersion. Finally, by rotation of the grating the spectral interval of interest can be selected, which is then recorded by a linear CCD array detector.



Fig. 3.6: Optical scheme of the double echelle monochromator (DEMON); 1: entrance slit, 2: off-axis parabolic mirrors, 3: Littrow-prism, 4: intermediate slit, 5: folding mirrors, 6: echelle grating, 7: linear CCD array detector, 8: neon lamp

Obviously, such a high-resolution monochromator requires active wavelength stabilization in order to avoid drift problems and to ensure high absolute wavelength accuracy. This has been accomplished through an internal neon lamp, mounted on an adjustable stand in front of the intermediate slit between the prism pre- and echelle-monochromator, so that it can be moved into the beam automatically if necessary. The neon lamp emits many relatively narrow lines in the red wavelength region, and, in the absence of any pre-selection, these lines are separated by the echelle grating into various superimposed orders. This means that without pre-dispersion at least two neon lines for every grating position surely fall on the detector, and can be used for stabilization. The precision of this stabilization is only limited by the stepper motor for grating adjustment, and is better than one-tenth of the pixel width.

3.2.3 State-of-the-art solid-state detector

The requirements on the third component of the high-resolution spectrometer, the detector for signal registration, are very complex in order to exploit fully the methodical potential of HR-CS AAS. Among several other features, an adequate detector should offer at the same time fast readout at low noise levels, high quantum efficiency and dynamic range, as well a good spatial resolution and a sufficiently large number of pixels. Some of these criteria are already fulfilled by currently available detectors, others are still critical or subject to trade-offs. Hence, the development of HR-CS AAS was and still is strongly influenced by the progress in detector technology [27].

The performance of a detector is described in particular by its dynamic range, which means the application area of the detector, where shot-noise limited absorbance measurements are possible. It depends on basic detector parameters and is calculated by the ratio between the saturation capacity and the square of the readout noise. The importance of a large dynamic range becomes obvious when taking into account measurements with strong background absorption as well as simultaneous measurements over a wide spectral region.

From this point of view, a CCD detector is the most favored detector for HR-CS AAS and, therefore, was selected for the actual setup. Furthermore, the implementation of a so-called 'back-thinned' CCD removes sensitivity limitations of classical front-illuminated and UV-coated version and yields quantum efficiency in the UV of up to 90 %, which is much better than the one of photomultiplier used in conventional LS AAS.

In contrast to a less expensive photodiode array detector, which has a sequential readout scheme, the utilization of a CCD, at the same time, guarantees a truly simultaneous registration of the absorbance values at the position of the analytical line and its spectral vicinity. Modern CCD detectors are offered in different outlines, either with a linear or a two-dimensional arrangement. However, since simply a limited spectral interval has to be recorded in the present configuration, it is only necessary to apply a linear CCD array detector.



Fig. 3.7: Functional readout principle of a linear CCD array detector

A typical layout of such a detector type is shown in Fig. 3.7. The corresponding readout scheme is truly simultaneous, because each individual photosensitive pixel simultaneously converts the incident photons into photoelectrons and stores them during the illumination time. The stored charge pattern of all pixels is then very rapidly simultaneously transferred into the non-photosensitive readout register. In this way, using the so-called full vertical binning procedure, all charges within a specific column, which represent the same wave-

length, are collected in a single element of the readout register. Subsequently, these binned charges are converted into charge-proportional voltage impulses by means of an on-chip amplifier, which are finally further amplified and digitalized.

This detector layout has the advantage that the next illumination cycle can already take place, while to the readout is still going on. Thus, dead times are eliminated and it is guaranteed that proportional variations in the intensity are precisely converted into proportional changes in the digitalized signals for each individual wavelength position.

3.3 Specific application

During a time period covering the last ten years, numerous investigations have been performed using the fascinating, newly available technique of HR-CS AAS. All this research work was carried out using identical HR-CS AAS prototype spectrometers, built at ISAS Berlin. The systems are based on conventional LS AAS instruments (model AAS 6 Vario from Analytik Jena AG, Jena, Germany), from which the entire optical compartment including detector and associated controls were removed and replaced by a high-resolution double monochromator (DEMON) as well as the additional components mentioned in the previous part. The prototype spectrometers were controlled by personal computers, running an in-house developed data acquisition program.

All the applications possible with conventional LS AAS instrumentation can also be performed with the HR-CS AAS systems. And since only the optical compartment has been modified, all the experiences regarding sample handling and atomization can directly be transferred to the new spectrometers. However, HR-CS AAS offers a lot of new possibilities for sample analysis, which are even now not fully exploited.

It is far beyond the scope of this Chapter to discuss all the new features of HR-CS AAS in detail and the reader is referred to the corresponding publications. Nevertheless, at least the two most outstanding ones, i.e., least-squares BC as well as the possibility for the determination of non-metals via molecular absorption, shall be presented in the following.

3.3.1 Correction of molecular background in the flame

In part 3.1.3 the sophisticated BC scheme of HR-CS AAS to correct for 'continuous' and 'structured' effects during sample atomization has already been discussed. However, even in absence of any sample background structures may be present, which are originating from the atomizer itself.

One prominent example for this is the diatomic molecule OH. It is present everywhere in flame AAS, independent of the type of gases used, and generates huge fine-structured bands separated into four groups in the wavelength region of analytical interest. These bands are due to electronic transitions between different energy states and the strongest structure is lying in the wavelength region around 310 nm.

Fortunately, the existence of these OH bands is normally not a general problem for the BC systems of conventional LS AAS instruments since they are present during sample as well as blank measurement and are of the same order on average over time. Nevertheless, when the matrix is not matched for both recordings, the OH concentrations are different, and the structures can occur as additional absorptions or negative absorptions (like 'emissions'), depending on their ratio. However, in case of LS AAS investigations close to the LOD, even the statistical fluctuations of the flame itself are high enough to increase the background noise levels or to result in small BC errors due to the fact that the D_2 correction is not wavelength selective.

This problem can be overcome when using HR-CS AAS instrumentation. Its correction capability for this kind of background is shown in Fig. 3.8 in the case of Bi determination at the 306.772 nm line doublet in a standard air-acetylene flame. This line doublet directly overlaps with a molecular absorption band of the OH radical. As the molecular absorption is not stable over time, but subject to short-term fluctuations, it contributes significantly to the overall noise level of the measurement, as is shown in Fig. 3.8a. With the spectrometer software it is possible to record the molecular spectrum of OH over the spectral range under consideration by measuring the flame absorption without any analyte. This spectrum can be stored in the computer and subtracted from the measurement of a real sample using the least-squares BC algorithm previously mentioned.

The measurement corrected in this way is shown in Fig. 3.8b, where all the flame noise has disappeared, resulting in a significantly improved SNR of the measurement and hence a better LOD.

3.3.2 Correction for direct line overlap

Not only the existence of molecules during sample atomization can result in interfering structures, but also the presence of a concomitant element can lead to additional absorption lines within the recorded spectral interval. However, they are only of interest when they directly overlap with the analyte line and cannot be separated in time in the case of GF measurements.

Even in this rare case HR-CS AAS can eliminate the interference due to direct line overlap presupposing that the interfering element has at least one additional absorption line within the recorded spectral interval. Since the line strengths are directly correlated to each other, the unknown contribution of the overlapping line to the total absorbance signal at the analyte wavelength position can be determined by using the additional absorption line of the interfering element for BC. This is accomplished in a way similar to the correction for molecular structures and demonstrated for the example of the direct line overlap of the 213.859 nm Fe line with the resonance line of Zn at 213.856 nm (refer to Fig. 3.9).



Fig. 3.8: Correction for OH molecular structures of an air-acetylene flame in the case of Bi determination at 306.772 nm; (a) without BC, (b) with least-squares BC



Fig. 3.9: Correction for direct line overlap of Zn and Fe (sample: 0.3 mg L⁻¹ Zn in 1000 mg L⁻¹ Fe matrix, atomization: air-acetylene flame); (a) without correction, (b) Zn-free iron matrix, (c) with least-squares BC

After recording the absorbance pattern of the interfering element alone (Fig. 3.9b), this reference spectrum can be stored and used as a linear function in the least-squares fitting procedure. Finally, the undisturbed Zn absorbance signal can be obtained by subtracting the fitted reference spectrum from the actual absorption pattern (Fig. 3.9c).

3.3.3 Correction of molecular background in real sample analysis

Full advantage of the outstanding BC capabilities of HR-CS AAS is especially gained in the case of real sample analysis, which shall be finally demonstrated for the example of the determination of Se in human urine [3] (refer to Fig. 3.10). Here the Se absorption is interfered by two independent molecular structures, which can be ascribed to the NO and PO radicals present during sample atomization in the graphite furnace.



Fig. 3.10: Time-resolved absorbance spectrum of a human urine sample in the vicinity of the Se resonance line at 196.026 nm

(sample: $5 \ \mu L$ undiluted urine + 10 μL Ni 10 g L^{-1} , atomization: 2 300 °C); (a) without BC, (b) with least-squares BC

As these structures are partially shifted under the influence of a magnetic field, even the powerful Zeeman-effect BC system of conventional LS AAS instrumentation is not capable of handling this kind of interference and yields erroneous results. However, this prob-
lem can again be eliminated with the HR-CS AAS spectrometer by making use of the spectral information provided.

In the present case two molecular reference spectra (see Fig. 3.11) have at the same time to be taken into account for the least-squares BC procedure. But once more, after subtraction of both spectra, a 'clean' spectrum containing solely the Se absorption line is obtained.



Fig. 3.11: Time-integrated reference spectra of NO (100 μ g urea, CH₄N₂O) and PO (20 μ g NH₄H₂PO₄) in the vicinity of the Se resonance line at 196.026 nm (dashed)

3.3.4 Determination of non-metals via molecular absorption

Up to now fine-structured spectra of molecules have only been considered as non-specific background that should be removed by means of the sophisticated BC algorithms previously mentioned.

However, by using a CS not only atomic lines but also molecular absorption structures can be used for element determination, provided that their spectral widths are comparable to those of atomic lines, as is typically the case for diatomic molecules, and that their bands lie within the accessible wavelength range of the spectrometer. In this way the determination of important non-metals, like phosphorus, sulphur, fluorine and chlorine, becomes possible, which normally is refused to conventional LS AAS instrumentation because of the fact that all their main resonance lines are in the non-accessible vacuum-UV region.

Up to the present, the determination of several non-metals has been investigated using sharp molecular absorption 'lines' selected from the fine structure of electron transition spectra produced in an air-acetylene flame [13,15,16,18,21,25,34]. The advantage of the flame in this case is that its stoichiometry can be modified in order to make it oxidizing for the production of an oxide, such as PO, or reducing in order to produce carbide, such as CS. The buffer effect of the flame gases can hence be used to produce the analyte molecule of choice, a possibility that does not exist to the same extent in a graphite furnace. Nevertheless, it was also shown that this kind of molecular absorption spectrometry is even feasible in a graphite furnace and offers the possibility for determination of chlorine via the AlCl molecule, fluorine via GaF, phosphorus via PO and sulfur via the CS molecule [23,24,29]. This obviously opens a completely new field of application for HR-CS AAS. The figures of merit obtained during the investigation are compiled in Tab. 3.1 for atomization in an air-acetylene flame and in Tab. 3.2 for electrothermal atomization.

Tab. 3.1:Figures of merit for non-metal determination via molecular absorption in
case of atomization in an air-acetylene flame

Element	Wavelength / nm	LOD / mg L ⁻¹	Linearity up to / mg L ⁻¹	Alternative
P via PO	324.620	2.6	4,000	(P)
S via CS	258.056	2.4	3,200	
Cl via InCl	267.240	3.0	1,800	AlCl
F via GaF	211.248	1.0	4,500	AlF

Tab. 3.2:	Figures of merit for non-metal determination via molecular absorption in
	case of electrothermal atomization

Element	Wavelength / nm	LOD / pg	Linearity up to / mg L ⁻¹	Improvement to flame*
P via PO	246.40	900	300,000	29
S via CS	258.056	2300	1,000,000	10
Cl via AlCl	261.420	70	25,000	430
F via GaF	211.248	9	> 5,000	1,100

* based on 10 µL sample volume

Just to give an impression of the potential of this kind of application, the determination of sulphur via the CS molecule in an air-acetylene flame will be briefly discussed on the following pages.

The CS molecule exhibits several typical molecular absorption bands in the far-UV, the most pronounced part of which in the wavelength region around 258 nm is shown in Fig. 3.12. However, for the successful generation of CS spectra in the air-acetylene flame, flame composition and observation height are decisive factors, and CS molecular absorption can only be observed with very fuel-rich flame conditions.



Fig. 3.12: CS molecular absorption band head at 258 nm, generated in a fuel-rich airacetylene flame (sample: 1% sulfuric acid)

In principle, all the rotational absorption lines in Fig. 3.12 could be used for the determination of sulfur, as most of them have line widths of about 5 pm, i.e., are of the same magnitude as atomic lines. Nevertheless, two of the lines should be favored for investigations, the line at 257.594 nm, because it exhibits the best sensitivity, and the line at 258.056 nm, because it can be very well isolated from the other absorption lines and hence provides best LOD. By using the latter absorption line for signal evaluation, values of 12 ng for the characteristic mass and 2.3 ng for the LOD were obtained in case of electrothermal atomization, and values of 130 mg L⁻¹ for the characteristic concentration and 2.4 mg L⁻¹ for the LOD in case of atomization in the air-acetylene flame.

Since the selected CS band consists of several rotational lines with similar absorption strengths, a simultaneous evaluation of them would be useful in order to improve the overall performance. By taking more CS lines into account, i.e., summing up the PVSA values of individual rotational lines, the sensitivity as well as the SNR can be significantly improved. This effect is shown in Fig. 3.13, where, for a series of 10 subsequent measurements, the means of the summed PVSA values of a certain number of rotational lines around the main line at 258.056 nm and the corresponding relative standard deviations (RSD) are depicted. For simplicity and in order to show the basic effect of a multi-line evaluation, only the strong and 'isolated' rotational lines of the CS molecule were selected for the calculations.

Starting from a single CS line and adding each time the next strongest one, the summed PVSA value increases by almost one order of magnitude. In return, the RSD is reduced by a factor of two, which is reached for the strongest five lines, and the achievable LOD can be improved accordingly. Further enlargement of the line ensemble, however, is not beneficial since the increase in summed PVSA becomes smaller and the RSD will start to increase again, when too many rotational lines are summed up.



Fig. 3.13: Influence of simultaneous multi-line evaluation of several CS lines (summed according to their strength) on the means of the summed individual PVSA values and on the corresponding RSD

3.4 Present status of HR-CS AAS and future developments

In essence, HR-CS AAS is a very fascinating and promising technique, which offers only advantages over conventional LS AAS and eliminates most of its notorious limitations.

Firstly, as the instrument uses a CCD array with several hundred pixels, it is equipped with hundreds of independent detectors, which are all illuminated and read out simultaneously.

Since only a few pixels are necessary to measure atomic absorption, the rest of them are available for other purposes. The first duty of these detectors is to correct for all the spectral events that occur simultaneously on all pixels, the so-called 'continuous' effects. This correction creates a simultaneous double-beam or even multiple-beam system that results in shot-noise limited readout. In addition, measurement of atomic and background absorption is truly simultaneous so that even a very high and rapidly changing background can be corrected without problems.

Secondly, because of the much higher radiation intensity of the CS compared to conventional LS, the LOD obtained with HR-CS AAS are typically a factor of 5 better than those of LS AAS. On the other hand, it is possible to reduce the sensitivity by using pairs of side pixels to measure the absorbance in the line wings only. This way several working curves of significantly different sensitivity can be established simultaneously, extending the linear working range to at least 5 orders of magnitude.

Thirdly, while in LS AAS only the absorbance (with flame atomizers) or the absorbance over time (with electrothermal atomizers) is measured, the CCD array detector adds the wavelength as a third dimension in HR-CS AAS. This three-dimensional imaging obviously enhances the information about the spectral environment of the analytical line dramatically, which is of particular advantage in the case of dynamic signals, as they are produced in electrothermal atomizers. Potential spectral interferences due to other atomic lines, and particularly due to electron excitation spectra of diatomic molecules, which exhibit a pronounced fine structure, can now be easily recognized, and often avoided by optimization of the analytical method. In cases where this is not possible, there is the option to store complete molecular spectra in the software and subtract them from the measured spectrum using least-squares fitting algorithms, so that only the net atomic absorption signal is left.

Fourthly, as a continuous radiation source is used in HR-CS AAS, any line in the entire wavelength range of analytical interest is available, and even rotational absorption 'lines' caused by molecules can be used for quantitative determination.

Fifthly, although truly simultaneous multi-element measurement is not yet possible because of some instrumental limitations and the limited readout rate of currently available CCD detectors, especially with the transient signals of electrothermal atomizers, fast sequential measurements are possible using flame atomizers. The echelle double monochromator design supports a rapid wavelength change, and the sequential approach has the clear advantage that flame stoichiometry and observation height can be adjusted automatically for each element, avoiding 'compromised conditions', typical of the simultaneous approach.

Last but not least, it is obvious that HR-CS AAS will redefine not only AAS, but the entire field of atomic spectroscopy, as it combines the simplicity, ease of operation, relatively

low cost and freedom from interferences of classical AAS with a number of features unavailable until now, or available only with much more sophisticated instrumentation. This is also only the beginning of a new era, so that much more might be expected with future instrumentation in this field.

Meanwhile first commercial HR-CS AAS spectrometers are on the market (refer to Fig. 3.14), which enable flame and electrothermal atomization as well as the generation of hydrates in quartz-cells, and which in principle offer all the features previously described. These instruments are waiting for new challenges and spectroscopists that are open-minded for the new technology. Therefore, HR-CS AAS is not any longer limited to a small group of scientists working in research laboratories, but available for everyone.



Fig. 3.14: First commercially available HR-CS AAS spectrometers (manufactured by Analytik Jena AG, Jena, Germany); (top) ContrAA 300 – flame spectrometer, (bottom) ContrAA 700 – simultaneous flame and graphite furnace spectrometer

In the opinion of the author, the most obvious area for future development relates to simultaneous HR-CS AAS for routine analytical work. In general, all the preconditions for truly simultaneous multi-element analysis are inhered in the physical principle of HR-CS AAS. The CS operating in hot-spot mode provides a sufficient spectral radiance and covers the entire wavelength range of interest for AAS measurements. Even compact, high-resolution spectrographs, which are mainly based on echelle grating arrangements with internal cross-dispersion, are available and offer an adequate optical throughput.

Unfortunately, as already mentioned above, the use of state-of-the-art CCD array detectors for HR-CS AAS, placed in the focal plane of echelle spectrographs with a two-dimensional spectrum pattern (see Fig. 3.15), is still restricted to research applications. The problem arises from the well-known trade-off between the required pixel number and the resulting readout time of common CCD arrays. The higher the pixel number of the array detector, which is strongly correlated with the simultaneously recorded wavelength interval, the longer it takes to read out the full image with the required dynamic range. Furthermore, the ratio between the spectrum illumination time, resulting from the high radiance of the CS, and the detector readout time also gets worse with increasing detector area. Although there is ongoing progress in the field of solid-state technology, an appropriate array detector for HR-CS AAS is not available at present.

However, even at this stage HR-CS AAS is a serious technique that sooner or later will replace, especially in laboratories where not only daily routine work is made, for the most part the conventional LS AAS spectrometers. Moreover, in some aspects HR-CS AAS can even compete with the performance of ICP-AES instrumentation.



Fig. 3.15: Modern version of the spectrum of the sun recorded with an echelle spectrograph (ISAS Berlin), clearly showing the so-called Fraunhofer lines

References

The following list of references is a compilation of the publications related to the topics mentioned in this Chapter as well as additional investigations in the field of HR-CS AAS. Therein the reader should find the answers to all the questions left over and, hopefully, will get suggestions for new research work.

- H. Becker-Ross, S. Florek, U. Heitmann, R. Weisse, *Influence of the Spectral Bandwidth of the Spectrometer on the Sensitivity using Continuum Source AAS*, Fresenius J. Anal. Chem. 355 (1996) 300-303.
- [2] U. Heitmann, M. Schuetz, H. Becker-Ross, S. Florek, *Measurements on the Zeeman-splitting of analytical lines by means of a continuum source graphite furnace spectrometer with a linear charge coupled device array*, Spectrochim. Acta Part B 51 (1996) 1095-1105.
- [3] H. Becker-Ross, S. Florek, U. Heitmann, *Observation, identification and correction of structured molecular background by means of continuum source AAS Determination of selenium and arsenic in human urine*, J. Anal. Atom. Spectrom. 15 (2000) 137-141.
- [4] S. Salomon, P. Giamarchi, A. Le Bihan, H. Becker-Ross, U. Heitmann, *Improvements in the determination of nanomolar concentrations of aluminium in seawater by electrother-mal atomic absorption spectromtry*, Spectrochim. Acta Part B 55 (2000) 1337-1350.
- [5] B. Welz, M. G. R. Vale, M. M. Silva, H. Becker-Ross, M. D. Huang, S. Florek, U. Heitmann, *Investigation of interferences in the determination of thallium in marine sediment reference materials using high-resolution continuum-source atomic absorption spectrometry and electrothermal atomization*, Spectrochim. Acta Part B 57 (2002) 1043-1055.
- [6] H. Becker-Ross, M. Okruss, S. Florek, U. Heitmann, M. D. Huang, *Echelle-Spectrograph* as a tool for studies of structured background in flame atomic absorption spectrometry, Spectrochim. Acta Part B 57 (2002) 1493-1504.
- [7] B. Welz, H. Becker-Ross, S. Florek, U. Heitmann, M. G. R. Vale, *High-resolution contin-uum-source atomic absorption spectrometry what can we expect?*, J. Braz. Chem. Soc. 14 (2003) 220-229.
- [8] A. F. Silva, D. L. G. Borges, B. Welz, M. G. R. Vale, M. M. Silva, A. Klassen, U. Heitmann, Method development for the determination of thallium in coal using solid sampling graphite furnace atomic absorption spectrometry with continuum source, high-resolution monochromator and CCD array detector, Spectrochim. Acta Part B 59 (2004) 841-850.
- [9] M. G. R. Vale, I. C. F. Damin, A. Klassen, M. M. Silva, B. Welz, A. F. Silva, F. G. Lepri, D. L. G. Borges, U. Heitmann, *Method development for the determination of nickel in petroleum using line-source and high-resolution continuum-source graphite furnace atomic absorption*, Microchem. J. 77 (2004) 131-140.
- [10] B. Welz, H. Becker-Ross, S. Florek, U. Heitmann, *High-resolution continuum source AAS: The better way to do atomic absorption spectrometry*, Wiley-VCH, Weinheim, Germany (2005).
- [11] A. S. Ribeiro, M. A. Vieira, A. F. da Silva, D. L. G. Borges, B. Welz, U. Heitmann, A. J. Curtius, *Determination of cobalt in biological samples by line-source and high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry using solid sampling or alkaline treatment*, Spectrochim. Acta Part B 60 (2005) 693-698.
- [12] A. F. Silva, D. L. G. Borges, F. G. Lepri, B. Welz, A. J. Curtius, U. Heitmann, *Determination of cadmium in coal using solid sampling graphite furnace high-resolution continuum source atomic absorption spectrometry*, Anal. Bioanal. Chem. 382 (2005) 1835-1841.

- [13] M. D. Huang, H. Becker-Ross, S. Florek, U. Heitmann, M. Okruss, Direct determination of total sulfur in wine using a continuum source atomic absorption spectrometer and an airacetylene flame, Anal. Bioanal. Chem. 382 (2005) 1877-1881.
- [14] F. G. Lepri, B. Welz, D. L. G. Borges, A. F. Silva, M. G. R. Vale, U. Heitmann, *Speciation analysis of volatile and non-volatile vanadium compounds in Brazilian crude oils using high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry*, Anal. Chim. Acta 558 (2006) 195-200.
- [15] M. D. Huang, H. Becker-Ross, S. Florek, U. Heitmann, M. Okruss, *Determination of phos-phorus by molecular absorption of phosphorus monoxide using a high-resolution continuum source absorption spectrometer and an air-acetylene flame*, J. Anal. Atom. Spectrom. 21 (2006) 338-345.
- [16] M. D. Huang, H. Becker-Ross, S. Florek, U. Heitmann, M. Okruss, *The influence of calcium and magnesium on the phosphorus monoxide molecular absorption signal in the determination of phosphorus using a continuum source absorption spectrometer and an airacetylene flame*, J. Anal. Atom. Spectrom. 21 (2006) 346-349.
- [17] L. Bianchin, D. Nadvorny, A. F. Silva, M. G. R. Vale, M. M. Silva, W. N. L. Santos, S. L. C. Ferriera, B. Welz, U. Heitmann, *Feasibility of employing permanent chemical modifiers for the determination of cadmium in coal using slurry sampling electrothermal atomic absorption spectrometry*, Microchem. J. 82 (2006) 174-182.
- [18] M. D. Huang, H. Becker-Ross, S. Florek, U. Heitmann, M. Okruss, *Determination of sulfur by molecular absorption of carbon monosulfide using a high-resolution continuum source absorption spectrometer and an air-acetylene flame*, Spectrochim. Acta Part B 61 (2006) 181-188.
- [19] D. L. G. Borges, A. F. da Silva, A. J. Curtius, B. Welz, U. Heitmann, Determination of Lead in Coal Using Direct Solid Sampling and High-Resolution Continuum Source Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry, Microchim. Acta 154 (2006) 101-107.
- [20] U. Heitmann, H. Becker-Ross, D. Katskov, Feasibility of filter atomization in highresolution continuum source atomic absorption spectrometry, Spectrochim. Acta Part B 61 (2006) 351-360.
- [21] M. D. Huang, H. Becker-Ross, S. Florek, U. Heitmann, M. Okruss, *Determination of Halogens via Molecules in the Air-Acetylene Flame Using High-Resolution Continuum Source Absorption Spectrometry, Part I: Fluorine*, Spectrochim. Acta Part B 61 (2006) 572-578.
- [22] D. L. G. Borges, A. F. da Silva, B. Welz, A. J. Curtius, U. Heitmann, Determination of lead in biological samples by high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry with direct solid sampling, J. Anal. Atom. Spectrom. 21 (2006) 763-769.
- [23] U. Heitmann, H. Becker-Ross, S. Florek, M. D. Huang, M. Okruss, *Determination of Non-Metals via Molecular Absorption Using High-Resolution Continuum Source Absorption Spectrometry and Graphite Furnace Atomization*, J. Anal. Atom. Spectrom. 21 (2006) 1314-1320.
- [24] F. G. Lepri, M. B. Dessuy, M. G. R. Vale, D. L. G. Borges, B. Welz, U. Heitmann, *Investigation of chemical modifiers for the determination of phosphorus in a graphite furnace using high-resolution continuum source atomic absorption spectrometry*, Spectrochim. Acta Part B 61 (2006) 934-944.
- [25] M. D. Huang, H. Becker-Ross, S. Florek, U. Heitmann, M. Okruss, Determination of Halogens via Molecules in the Air-Acetylene Flame Using High-Resolution Continuum Source Absorption Spectrometry, Part II: Chlorine, Spectrochim. Acta Part B 61 (2006) 959-964.

- [26] A. F. da Silva, F. G. Lepri, D. L. G. Borges, B. Welz, A. J. Curtius, U. Heitmann, Determination of mercury in biological samples using solid sampling high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry and calibration against aqueous standards, J. Anal. Atom. Spectrom. 21 (2006) 1321-1326.
- [27] H. Becker-Ross, S. Florek, U. Heitmann, M. D. Huang, M. Okruss, B. Radzuik, Continuum source atomic absorption spectrometry and detector technology: A historical perspective, Spectrochim. Acta Part B 61 (2006) 1015-1030.
- [28] B. Welz, D. L. G. Borges, U. Heitmann, *High-resolution continuum source AAS and its application to food analysis* in *The determination of chemical elements in food: Applica-tions for atomic and mass spectrometry*, Wiley, New York, USA (2007).
- [29] M. B. Dessuy, M. G. R. Vale, F. G. Lepri, B. Welz, U. Heitmann, *Investigation of phosphorus atomization using high-resolution continuum source electrothermal atomic absorption spectrometry*, Spectrochim. Acta Part B 62 (2007) 429-434.
- [30] D. Bohrer, U. Heitmann, M. D. Huang, H. Becker-Ross, S. Florek, B. Welz, D. Bertagnolli, *Determination of aluminum in highly concentrated iron samples: Study of interferences by means of high resolution continuum source atomic absorption spectrometry*, Spectrochim. Acta Part B 62 (2007) 1012-1018.
- [31] B. Welz, D. L. G. Borges, F. G. Lepri, M. G. R. Vale, U. Heitmann, *High-resolution continuum source electrothermal atomic absorption spectrometry – an analytical and diagnostic tool for trace analysis*, Spectrochim. Acta Part B 62 (2007) 873-883.
- [32] U. Heitmann, B. Welz, D. L. G. Borges, F. G. Lepri, *Feasibility of peak volume, side pixel and multiple peak registration in high-resolution continuum source atomic absorption spectrometry*, Spectrochim. Acta Part B 62 (2007) 1222-1230.
- [33] B. Welz, M. G. R. Vale, D. L. G. Borges, U. Heitmann, Progress in direct solid sampling analysis using line source and high-resolution continuum source electrothermal atomic absorption spectrometry, Anal. Bioanal. Chem. 389 (2007) 2085-2095. doi:10. 1007/s00216-007-1555-x.
- [34] M. D. Huang, H. Becker-Ross, S. Florek, U. Heitmann, M. Okruss, C. D. Patz, Determination of sulfur forms in wine including free and total sulfur dioxide based on molecular absorption of carbon monosulfide in the air-acetylene flame, Anal. Bioanal. Chem., in press (2007) doi: 10. 1007/s00216-007-1669-1.

4. VLIV PROMĚNNÉ SÍLY MAGNETICKÉHO POLE NA PARAMETRY ZEMANOVY KOREKCE POZADÍ, OPTIMALIZACE PODMÍNEK ANALÝZY SYSTÉMŮ S PROMĚNNOU SILOU MAGNETICKÉHO POLE

Ing. Tomáš Černohorský CSc., Ing. Milan Dvorský, Dr. Anna Krejčová Univerzita Pardubice, Ústav ochrany životního prostředí, Laboratoř atomové spektroskopie, Čs. Legii 565, 532 10 Pardubice <u>tomas. cernohorsky@upce. cz</u>

Korekce nespecifické absorbce (absorbce pozadí) v AAS se může provádět několika způsoby. Nejčastější je použití kontinuálního zdroje záření a Zeemanova korekce pozadí. Korekce pozadí využívající Zeemanova jevu (štěpení čar ve vnějším magnetickém poli), poskytuje principiálně nejspolehlivější výsledky, protože korekce pozadí se provádí přesně v místě absorpční čáry (uspořádání s atomizátorem v magnetickém poli a střídavým magnetickým polem). Tento typ korekce je schopen korigovat i strukturované pozadí, případně eliminovat problémy s blízkou absorpční čarou jiného prvku. V současnosti se používají dvě uspořádání: "příčná" Zeemanova korekce, kdy je magnetické pole orientováno kolmo na směr optické osy (starší typ) a "podélná" Zeemanova korekce, kdy je magnetické pole orientováno souhlasně s optickou osou (novější typ). Výhodnější je podélný typ korekce, který nepotřebuje polarizační filtr a má tak výrazně lepší energetickou prostupnost optického systému. Tento typ korekce funguje tak, že v nepřítomnosti vnějšího magnetického pole není absorpční čára štěpena (odpovídá více energeticky degenerovaným orbitalům) a měří se celková absorpce záření. V přítomnosti vnějšího magnetického pole dojde k rozštěpení absorpční čáry na komponenty zvané π a σ (rozdělí se energeticky degenerované orbitaly lišící se magnetickým kvantovým číslem). Komponenta π není posunuta a komponenty σ jsou posunuty symetricky k π -komponentě, komponenty π a σ se liší svojí polarizací. V případě tzv. anomálního Zeemanova jevu dojde k rozštěpení vlivem spinorbitální interakce na více komponent π a σ , ale i v tomto případě je posun π -komponent minimální. Přehled typu štěpení pro běžně analyzované prvky a sílu magnetického pole do 1,5 T uvádí obr. 4.1. Velikost posunu σ -komponent závisí na síle magnetického pole, jak je ukázáno na příkladu mědi a normálního Zemanova jevu (obr. 4.2). V případě podélného uspořádání jsou π -komponenty neviditelné ve směru optické osy, takže při zapnutém magnetické poli nám vlastně "zmizí" absorpční čára analyzovaného prvku a měříme pouze absorpci pozadí. U příčné varianty je nutné za atomizátor umístit pevný polarizační filtr (způsobuje ztráty záření větší než 50 %) který eliminuje ze záření čárového zdroje spektrometru složku souhlasně polarizovanou s polarizací π -komponenty absorpční čáry.



Obr. 4.1: Přehled typů štěpení čar pro normální a anomální Zemanův jev, síla vnějšího magnetického pole do 1,5 T



Obr. 4.2: Vliv síly magnetického pole na separaci komponent $\pi a \sigma Cu$ na čáře 324,8 nm

Dříve bylo hlavní nevýhodou Zeemanovy korekce snížení citlivosti a zhoršení linearity kalibrací pro některé prvky. To je způsobeno tím, že při nedostatečné separaci komponent π a σ (viz. obr. 4.2) měříme v přítomnosti magnetického pole nejen pozadí, ale i určitý příspěvek σ -komponenty absorpční čáry analyzovaného prvku. Je jasné, že se vzrůstající

koncentrací analytu se budou zvětšovat také σ -komponenty a tím i podíl měřené části těchto komponent. To je příčinou zhoršení citlivosti a linearity kalibrací u Zeemanovy korekce pro některé prvky. Jak vyplývá z obr. 4.2, který ukazuje příklad pro Cu, řešením je použití větší síly magnetického pole. Problémem ale je, že pro některé prvky (například Ag) způsobí zvýšení síly již naopak zhoršení citlivosti¹. Optimálním řešením je tedy použití systému Zemanovy korekce s nastavitelnou silou magnetického pole, tato myšlenka není nová, již v roce 1980 byla publikována práce podrobně popisující vliv nastavitelné síly magnetického pole na citlivost stanovení, lineární a pracovní rozsah kalibračních závislostí pro řadu prvků¹. Poměrně dlouhou dobu ale trvalo než se tato myšlenka prosadila u komerčních systémů, první dostupný spektrometr s nastavitelnou silou magnetického pole se objevil teprve v roce 1998. Starší systémy Zeemanovy korekce používají jednu kompromisní sílu magnetického pole, která je kompromisem pro všechny prvky a pro řadu prvků je tak příčinou významného zhoršení linearity kalibrací a jejich pracovního rozsahu. Novější systémy umožňují nastavení síly magnetického pole, v případě dostatečného rozsahu síly magnetického pole je tak možné optimalizovat tuto hodnotu tak, aby bylo dosaženo optimální citlivosti a linearity kalibrace pro většinu analyzovaných prvků. Vliv síly magnetického pole na citlivost a linearitu kalibrace pro Cu ukazuje obr. 4.3.



Obr. 4.3: Vliv síly magnetického pole na citlivost, linearitu a pracovní rozsah kalibrační závislosti pro Cu měřené na čáře 324, 8 nm na spektrometru Avanata Ultra Z (GBC)

Rozdílné citlivosti v závislosti na síle magnetického pole je možné využít v omezené míře také k rozšíření dynamického rozsahu kalibrací u elektrotermické atomizace. V průběhu měření se cyklicky mění dvě až tři síly magnetického pole a tím se simultánně může provádět měření až pro tři kalibrační závislosti. Hlavním omezením této techniky je snížení

¹ F. J. Fernandez, S. A. Myers, W. Slavin: Anal. Chem. 1980, 52, 741-746.

rychlosti korekce pozadí a tím zvýšené riziko překorigování signálu pro rychle vzrůstající signály absorpce pozadí. Technika tak není vhodná pro vzorky s vyšším obsahem snadno těkavé matrice způsobující nespecifickou absorpci pozadí a pro nejmodernější generaci izotermických atomizátorů s vysokou rychlostí ohřevu.

Ze starších dat publikovaných zejména výrobci přístrojů vyplývá další negativní vliv Zeemanovy korekce – horší citlivost analýzy pro některé modifikátory ve srovnání s ostatními typy korekce pozadí při použití stejného modifikátoru a stejného typu elektrotermického atomizátoru. Všechny data se byla uváděna pro spektrometry s jednou kompromisní silou magnetického pole. Protože doposud nebyla publikována data týkající se spektrometrů s nastavitelným magnetickým polem, zabývalo se naše pracoviště studiem vlivu typu modifikátoru na optimální hodnotu síly magnetického pole. Byl použit spektrometr GBC Avanta Ultra Z s příčně uchyceným elektrotermickým atomizátorem a ultrarychlou podélnou Zeemanovou korekcí. Sílu magnetického pole je možné měnit v rozmezí od 0,6 do 1,1 T. Pro As a Pb byly použity SuperLampy, ostatní prvky byly měřeny se standardními výbojkami s dutou katodou.

Pro testování byly vybrány často analyzované prvky As, Pb, Cd, Cr a Se. Jako modelová matrice byl zvolen extrémní případ silně zasolené matrice s vysokým obsahem kyseliny dusičné (10 % HNO₃, 5 000 mg l⁻¹ NaCl), který simuluje typický mineralizát problémových potravinových vzorků (instantní polévky, aditiva do potravin, uzeniny nebo nasolené ryby). Pro každý prvek bylo testováno několik nejvhodnějších modifikátorů a pro každý modifikátor byl optimalizován teplotní program, koncentrace modifikátoru a síla magnetického pole. Z naměřených závislostí jednoznačně vyplývá, že typ modifikátoru významně ovlivňuje i optimální hodnotu síly magnetického pole. Obr. 4.4 a 4.5 přinášejí ukázku pro tři nejvýhodnější modifikátory a prvky As a Cr. Z obrázků je patrné, že optimum síly magnetického pole může být i u jednoho prvku různé v závislosti na typu použitého modifikátoru. Zároveň se prokázalo, že nejvyšší změnu citlivosti v závislosti na síle magnetického pole vykazují ty modifikátory, které zároveň nejlépe stabilizují analyzovaný prvek do vyšších teplot termické úpravy (např. Rh při analýze Cr).

Z naměřených průběhů je zároveň jasné, proč u systémů s jednou kompromisní silou magnetického pole není možné použít všechny typy modifikátorů – kompromisní síla může ležet zcela mimo optimum citlivosti daného modifikátoru.

V případě analýzy komplikovaných matric netypických vzorků často narážíme na nutnost hledání vhodného modifikátoru matrice a následnou optimalizaci metody pro dosažení maximální citlivosti nebo robustnosti metody.

Nejsme-li schopni z dostupné literatury najít dostatečné množství informací o vhodném modifikátoru (modifikátorech) pro námi analyzovanou matrici, musíme provést kompletní optimalizační postup pro celou řadu modifikátorů matrice. Vlastní optimalizaci provádíme

vždy na reálný vzorek, případně na vhodném modelovém roztoku, pokud nejsme schopni zajistit dostatečné množství reálného vzorku. Použití modelových roztoků ale občas naráží na značné problémy s čistotou dostupných chemikálií, kdy kontaminace použitých solí mohou být vyšší než u reálných vzorků. Na základě našich zkušeností jsme navrhli kompletní postup optimalizace metody elektrotermické atomizace při hledání vhodného modifikátoru u systémů s možností nastavitelné síly magnetického pole.



Obr. 4.4: Závislost integrované absorbance Cr na síle použitého magnetického pole po tři různé modifikátory matrice. Matrice vzorku 5 000 mg l⁻¹ NaCl, 10 % HNO₃ (m/v). Spektrometr Avanta Ultra Z (GBC)



Obr. 4.5: Závislost absorbance As na čáře 193,7 nm na síle magnetického pole pro tři nejvýhodnější modifikátory. Modelový roztok s obsahem 20 μg l⁻¹ As, 5 000 mg l⁻¹ NaCl a 10% HNO₃

Kompletní optimalizace metody elektrotermické atomizace:

- zjištění TP (teploty pyrolýzy) a TA (teploty atomizace) analyzovaného prvku při měření reálného nebo modelového vzorku bez aplikování modifikátoru (tento krok je důležitý pro srovnání vlivu modifikátoru na analýzu);
- optimalizace indukce magnetického pole (IMP) u systémů se Zemanovou korekcí pozadí a nastavitelnou velikostí indukce magnetického pole pro matrici bez aplikace modifikátoru;
- výběr vhodných modifikátorů a jejich koncentrace pro počáteční testování;
- optimalizace teplotního programu pro počáteční koncentraci modifikátoru;
- optimalizace koncentrace (resp. množství) testovaného modifikátoru;
- optimalizace indukce magnetického pole (IMP) u systémů se Zemanovou korekcí pozadí a nastavitelnou velikostí indukce magnetického pole pro každý studovaný modifikátor;
- výběr vhodného modifikátoru ze všech testovaných modifikátorů;
- ověření robustnosti vhodného modifikátoru pro různé koncentrace interferentu;
- určení nejvhodnějšího modifikátoru pro analyzovaný prvek a danou matrici vzorku dle požadavků analýzy (maximální detekční limity nebo robustnost metody?).

Výběr vhodných modifikátorů pro testování

Provádí se na základě dostupných literárních podkladů, je vhodné zařadit i perspektivní kombinace modifikátorů (směsné modifikátory) a hledat případné analogie pro prvky s podobným chováním jako má námi sledovaný prvek.

Optimalizace teplotního programu

Hlavním předpokladem úspěšné analýzy je správné nastavení všech parametrů teplotního programu. Parametry teplotního programu ale úzce souvisí s matricí vzorku a typem použitého modifikátoru. Velmi často hraje také významnou roli konstrukce zařízení a typ grafitového atomizátoru.

Optimalizace koncentrace modifikátoru

Nesprávně zvolená koncentrace modifikátoru je příčinou celé řady negativních jevů. Se vzrůstající koncentrací modifikátoru se mění charakteristika působení testovaného modifikátoru, případně dochází k interkalaci modifikátoru do struktury grafitu. Tyto jevy nepříznivě ovlivňují vlastní analýzu. Příliš vysoká koncentrace modifikátoru může být příčinou následujících negativních jevů: zhoršení citlivosti a reprodukovatelnosti analýzy, dlouhodobá nestabilita citlivosti analýzy nebo náhlé zhoršení citlivosti po určitém počtu atomizačních cyklů, případně zvýšená koroze pyrolytického povrchu atomizátoru. Optimální koncentrace modifikátoru se zjišťuje ze závislosti specifického a nespecifického signálu

absorbance na vzrůstající koncentraci použitého modifikátoru. Koncentrační řadu, respektive ředění modifikátoru od výchozí koncentrace, často volíme v geometrické posloupnosti (např. 1x; 2x; 4x; 8x; 16x; 32x; 64x; 128x atd.). Zejména u moderních izotermických atomizátorů s vysokou rychlostí ohřevu mohou být vhodné koncentrace modifikátoru výrazně nižší než je běžné uváděno v literatuře. Jako optimální volíme takovou koncentraci, kdy je dosahováno nejlepších mezí detekce a zároveň je akceptovatelná výše nespecifické absorbance. Při příliš vysoké hodnotě nebo rychlosti nárůstu nespecifické absorbance dochází k překorigování signálu. Limitní hodnota a je závislá na konstrukčním uspořádání spektrometru, zejména na rychlosti odečtu hodnot celkové a nespecifické absorbance).

Optimalizace indukce magnetického pole (IMP)

Jak bylo prokázáno výše, optimální hodnota IMP jednoho prvku se liší i v závislosti na použitém typu modifikátoru. Je proto nutné změřit optimalizační křivky závislosti síly magnetického pole pro jednotlivé typy modifikátorů a danou matrici.

Výběr nejvhodnějšího modifikátoru

Optimální modifikátor by měl být vybrán podle následujících kritérií:

- schopnost modifikátoru eliminovat interference matrice,
- vliv modifikátoru na citlivost stanovení, resp. na limitu detekce,
- vliv modifikátoru na absorpci pozadí,
- korozivní vlivy modifikátoru na povrch atomizátoru,
- dostupnost modifikátoru v patřičné čistotě a jeho cena,
- množství použitého modifikátoru.

Tab. 4.1:Přehled optimálních hodnot magnetické indukce pro vybrané typy modi-
fikátorů

Modifikátor	Analyt					
Wibulikator	As	Cd	Cr	Pb	Se	
NH ₄ NO ₃	Х	Х	Х	1,05	Х	
NH ₄ H ₂ PO ₄	Х	Х	Х	1,10	Х	
$NH_4H_2PO_4 + Pd$	Х	1,10	Х	Х	Х	
Pd	0,80	1,00	1,00	1,05	1,05	
Pd + Mg	Х	Х	Х	1,10	1,10	
$Pd + NH_4NO_3$	0,80	1,00	Х	0,95	1,10	
Rh	0,95	0,90	0,95	1,05	1,10	
Rh + Mg	1,00	1,00	Х	1,10	1,05	
Rh + Li	0,90	1,00	Х	1,10	1,05	
Rh + askorbová kyselina	0,90	1,00	Х	1,05	1,05	
V	0,80	0,85	1,00	1,00	Х	
Li	0,95	0,90	Х	1,10	Х	

Spektrometr Avanta Ultra Z; X = modifikátor není vhodný pro daný prvek

5. PŘÍMÁ ANALÝZA PEVNÝCH VZORKŮ ATOMOVOU ABSORPČNÍ SPEKTROMETRIÍ S ELEKTRO-TERMICKOU ATOMIZACÍ

doc. RNDr. Bohumil Dočekal, CSc. Ústav analytické chemie AV ČR, v.v.i., Brno, <u>docekal@iach.cz,</u>

V mnoha případech je velmi obtížné připravit roztok vzorku k analýze, a to buď vzhledem k chemické odolnosti analyzovaného materiálu (keramické materiály [1]) nebo s ohledem na vysoké riziko kontaminace vzorku (ultračisté materiály pro mikroelektroniku [2, 3]) či ztrátu analytu (např. rtuti) během procesu rozkladu. Příklad obtížného postupu analýzy vysokočistých materiálů je uveden na obr. 5.1. V řadě případů je rovněž z různých příčin nutné urychlit postup analýzy. Proto jsou často preferovány přímé postupy vnášení pevného vzorku do atomizátoru [4]. S ohledem na účinnost atomizačního procesu jsou výlučně použitelné jen elektrotermické atomizátory.



Obr. 5.1: Fluktuace slepých pokusů při stanovení Ca a Mg v práškovitém vysokočistém molybdenu čistoty 6N. Výsledky obdržené v průběhu několika měsíců představují v každé sérii průměrné hodnoty šesti měření slepého pokusu, chybové úsečky směrodatnou odchylku. Podobné výsledky byly získány pro Na a K. Celý analytický postup zahrnující rozklad vzorku a stanovení prvků Na, K, Ca a Mg pomocí ET AAS podléhá vysokému riziku kontaminace a obnáší minimálně jeden týden experimentálně náročné práce. Schéma ukazuje, ve kterých případech jsou výsledky získané pro vzorek signifikantně odlišitelné od úrovně slepých pokusů. Sloupce D.L. reprezentují aktuálně naměřené detekční limity. Obrázek demonstruje obtížnost provádění analýzy na mokré cestě (převzato z prací [2, 3])

V zásadě mohou být vzorky dávkovány do atomizátoru buď ve formě suspenze nebo přímo v původní pevné formě. Je-li potřebná či účelná desintegrace nebo homogenizace vzorku, jsou vzorky ještě vhodným způsobem předem mechanicky upravovány, např. mletím, dr-cením, řezáním ap. Suspenzní technikou (*slurry sampling technique*) lze snadno analyzovat jemně práškovité vzorky jako např. materiály užívané v moderních technologiích pro vý-robu speciální keramiky či materiály pro mikroelektronické aplikace (oxid hlinitý [5], titaničitý, křemičitý, zirkoničitý, hořečnatý, molybdenový [2] a wolframový, karbid křemičitý [6], nitrid křemičitý a boritý aj.), dále živočišné či rostlinné produkty potravinářského průmyslu (mouku, sušené mléko, práškové limonády, aj.), také i materiály související s charakterizací životního prostředí (poletavý prach, popílky, sedimenty, aj.). Při dávkování suspenzí je důležité zabezpečit kontinuální homogenizaci směsi. Často k tomu postačuje obyčejná laboratorní míchačka nebo ultrazvuková lázeň. S minimální úpravou lze také s výhodou pro suspenzní techniku použít běžnou instrumentaci určenou k analýze roztoků vzorků včetně dávkovačů. Pro automatické dávkování s využitím dávkovače byly sestrojeny různé typy miniaturních míchaček [7, 8] (viz např. obr. 5.2).



Obr. 5.2: Schéma (vlevo) turbínkové magnetické míchačky: (a), horní část s přívodem a odvodem hnacího média; (b), dva magnetické válečky upevněné s opačnou polaritou; (c), v rotoru; (d), těleso statoru s tangenciálně vrtanými kanálky. Pohled (vpravo) na vloženou míchačku do talíře dávkovače AS-70 Perkin-Elmer. (převzato z práce [8])

Také bylo popsáno použití ultrazvukových sond [9, 10], před časem komerčně dostupných např. prostřednictvím firmy Perkin-Elmer *(ultrasonic slurry sampler USS-100)* (obr. 5.3).

Před dávkováním je pro rozbití aglomerátů částeček v disperzním médiu účelné nádobku se suspenzí vzorku ponechat po dobu několik minut působení ultrazvukových vln v lázni. Vzorky jsou obvykle dispergovány v běžně dostupné vysokočisté vodě. Analýzou disperzního media ještě před přídavkem analyzovaného práškovitého materiálu lze rychle a snadno zjistit úroveň kontaminace z okolí, nádobek a homogenizačního zařízení, což je zvláště důležité při analýze ultračistých materiálů (viz obr. 5.4). Tento postup podstatně redukuje dobu analýzy a její náklady.



Obr. 5.3: Homogenizace suspenze vzorku špičkou titanové ultrazvukové sondy přímo v běžné nádobce určené pro dávkování roztoků



Obr. 5.4: Fluktuace slepých pokusů při přípravě suspenzí oxidu molybdenového vysoké čistoty 6N pro stanovení Ca. Nádobky se zanedbatelnou úrovní slepého pokusu jsou vybrány k přípravě 1 % suspenzí vzorku. Pro srovnání je uveden signál Ca naměřený pro alikvot o hmotnosti 200 µg vzorku. Diagram ukazuje, jak je obtížné řídit úroveň slepého pokusu při stanovení běžných prvků (Na, K, Mg, Ca) za podmínek práce v laminárních boxech třídy 100. Kontaminace pochází z manipulace s nádobkami, z teflonem pokrytých míchadel a dávkování disperzního média (přejato z práce [2])

Pro zvýšení smáčivosti práškového materiálu se přidává do vody vhodné organické rozpouštědlo (ethanol, isopropanol, apod.) nebo tenzid (Triton). Přídavkem kyseliny je možné dosáhnout v kombinaci s působením ultrazvuku účinné extrakce analytu z pevné do kapalné fáze, což vede ke zlepšení reprodukovatelnosti a správnosti analýzy. Nečistoty bývají totiž velmi často vázány na povrchu částeček vzorku. Tak se sníží vliv nehomogenity vzorku popř. vliv matrice vzorku, kterou je možné předem oddělit prostou sedimentací, dosahuje-li účinnost extrakce 100 %.

Pro přímé vnášení pevných vzorků do atomizátoru bývaly upravovány konvenční atomizátory (obr. 5.5). V současné době se prakticky využívá jen lodičkové techniky. Komerčně dostupné jsou momentálně jen přístroje řady AAS Contra 700, Zeenit 60, AAS Vario 6 firmy Analytik Jena, SRN, vybavené buď manuálním dávkovačem s pinzetou (*manual solid sampler SSA 6z*) (viz obr. 5.6) nebo speciálním automatickým robotem s integrovanou mikrováhou (*automatic solid sampler SSA 61z*) (viz obr. 5.7). (Aktuální informace o dostupné instrumentaci lze nalézt na Internetové stránce www. analytik-jena.com). Vzorek je obsluhou odvažován na nosič vzorku (lodičku) a pomocí nosiče vnesen do atomizátoru. Atomizace pak probíhá přímo z platformy nosiče vzorku, čímž se podstatně prodlužuje životnost atomizátoru, a to podle typu analytu až na několik stovek atomizačních zážehů. Zbytky vzorku ulpívají na lodičce. Lze je snadno odstranit z atomizátoru vyjmutím lodičky. Výměna opotřebované lodičky je z ekonomického hlediska typicky o řád levnější než výměna samotné trubice atomizátoru. Lodička současně plní roli platformy, a tak se lehce dosahuje požadavků STPF konceptu, izotermické atomizace, důležité také s ohledem na možnosti kalibrace.



Obr. 5.5: Komerčně dostupné systémy pro přímou analýzu pevných látek

a - boat/platform (Analytik Jena), b - cup in tube (Perkin-Elmer), c - cupcarbon-rod (Varian), d - platform boat (Pye Unicam), e - microboat (Thermo Jarrell Ash), f - miniature cup (Hitachi)





Obr. 5.6: Manuální dávkovač s titanovou pinzetou (Manual solid sampler SSA 6z, Analytik Jena). Detail vpravo ukazuje grafitovou lodičku s naváženým vzorkem)



Obr. 5.7: Automatický robot vybavený keramickou pinzetou, deseti pozicemi pro umístění lodiček a integrovanou mikrováhou (Automatic solid sampler SSA 61z, Analytik Jena)

Techniku přímého dávkování je vhodné aplikovat nejen pro analýzu práškovitých materiálů ale zvláště v těch případech, kdy je obtížné připravit suspenzi vzorku, např. pro vysokou hustotu vzorku (kovové materiály), nebo kdy není materiál k dispozici ve vhodné práškovité formě a ani jej nelze snadno mechanicky či bez rizika kontaminace do této formy převést. Ukazuje se dokonce, že lze přímo analyzovat i malé kousky vzorků, např. žáruvzdorného kovu, a to v případech kdy jsou sledované nečistoty vázány na povrch krystalů [3] nebo jsou uvolňovány reakcí matrice analyzovaného materiálu s modifikátorem, nejčastěji spektrálně čistým grafitem či grafitem nosiče vzorku [11].

Přesnost a správnost výsledků přímé analýzy souvisí bezprostředně s procedurou vážení, transportem vzorku, distribucí částic ve vzorku, jeho homogenitou, velikostí odebíraného alikvotu atd. Velmi často je dosahováno srovnatelných přesností jako při analýze roztoků. Pro omezenou dostupnost referenčních vzorků, jako je obtížná nebo nemožná příprava umělých standardů zvláště u biologických vzorků či materiálů životního prostředí, popř. i některých keramických materiálů, či malá nabídka certifikovaných referenčních materiálů, je třeba provádět standardizaci pomocí metody kalibrační křivky. Pak oprávněnost použití tohoto postupu kalibrace je vždy třeba předem validovat při vývoji metody. V řadě případů u zavedených technologií výroby některých produktů (např. oxidu titaničitého) je v rutinních laboratořích dostupná celá řada vzorků analyzovaných již klasickými postupy na mokré cestě, které mohou pak posloužit po výběru vhodných šarží jako interní referenční materiály v širokém kalibračním rozsahu [6] (viz obr. 5.8). Obvykle lze také použít jediného referenčního vzorku ke kalibraci různými množstvími tohoto vzorku [6] (viz obr. 5.9). Při vyhodnocování výsledků měření je v zásadě nejsprávnější vycházet z hodnot integrované absorbance, neboť tyto hodnoty na rozdíl od výšky signálu nebývají zpravidla ovlivněny rozdílným průběhem procesů odehrávajících se v atomizátoru během atomizace.



Obr. 5.8: Kalibrační funkce pro stanovení Pb v oxidu titaničitém na čáře 283,3 nm za použití šesti analyzovaných vzorků s obsahem 2,8; 5,2; 5,8; 6,3; 6,7 a 9,0 mg kg⁻¹ Pb



Obr. 5.9: Kalibrační funkce pro stanovení Zn v oxidu titaničitém, čistoty požadované pro výrobu cigaretového papíru, na čáře 213, 9 nm se Zeemanovskou korekcí nespecifické absorpce s využitím tří úrovní intenzity magnetického pole (0; 0,6 a 0,8 T – 3-field dynamic mode) na přístroji ZEENIT 60 firmy Analytik Jena. Obsah Zn v referenčním vzorku je 0, 21 ± 0, 02 mg kg⁻¹

Zmíněné typy vzorků obsahují obvykle žáruvzdorné komponenty (tzv. "heavy matrix"), které nelze během pyrolytického kroku odstranit. Ty pak přetrvávají na nosiči až do kroku atomizace, kdy mohou interferovat. Nebezpečí interference narůstá rovněž proto, že bývá přímo dávkováno více pevného materiálu než při dávkování roztoku vzorku (efekt ředění vzorku, přítomnost vysokého obsahu korozívních kyselin v roztoku vzorku). Proto bývá ve většině případů bezpodmínečně nutné pracovat na přístrojích vybavených velmi kvalitní kompenzací nespecifické absorpce (tzv. pozadí). V současné době je to nejčastěji instrumentace využívající principu Zeemanova jevu. Nejmodernější konstrukce přístrojů se Zeemanovskou kompenzací nespecifické absorpce (např. řady Zeenit 60) nabízí i možnost pracovat se třemi úrovněmi intenzity magnetického pole (3-field dynamic mode). Tak lze velmi dobře eliminovat typické kalibrační problémy při přímé analýze pevných vzorků, vyplývající z obtížnosti ředit vzorek nebo odvažovat nepatrná množství vzorku (méně než 0, 1 mg) k uskutečnění měření v optimálním rozsahu kalibrační křivky. Moderní instrumentace se třemi úrovněmi intenzity magnetického pole dovoluje během jednoho měření (atomizace) bez opakovaného dávkování pracovat současně se dvěma kalibračními funkcemi a tak měřit ve velmi širokém koncentračním rozsahu (viz obr. 5.9). Volbou intenzity pole je možné redukovat citlivost stanovení, což má velký význam u prvků s omezeným výběrem různě citlivých analytických linií (např. Na, Zn aj.).

Literatura

- 1. B. Dočekal, P. Tschőpel, J. A. C. Broekaert, et al. : Fresenius J. Anal. Chem. 342, 113 (1992).
- 2. B. Dočekal, V. Krivan: J. Anal. Atom. Spectrom. 8, 637 (1993).
- 3. B. Dočekal, V. Krivan : Spectrochim. Acta 50B, 517 (1995).
- 4. C. Bendicho, M. T. C. de Loos-Vollebregt: J. Anal. At. Spectrom., 6, 353 (1991).
- 5. Z. Slovák, B. Dočekal: Anal. Chim. Acta 129, 263 (1981).
- 6. B. Dočekal, V. Krivan: J. Anal. Atom. Spectrom. 7, 521 (1992).
- 7. S. Lynch, D. Littlejohn: J. Anal. At. Spectrom., 4, 157 (1989).
- 8. B. Dočekal: J. Anal. At. Spectrom., 8, 763 (1993).
- 9. N. J. Miller-Ihli: J. Anal. At. Spectrom., 3, 73 (1988).
- 10. N. J. Miller-Ihli: J. Anal. At. Spectrom., 4, 295 (1989).
- 11. H. M. Dong, V. Krivan : J. Anal. Atom. Spectrom. 18, 367 (2003).

6. ON-LINE METODY ÚPRAVY A ZPRACOVÁNÍ VZORKŮ V ATOMOVÉ SPEKTROMETRII

prof. RNDr. Vlastimil Kubáň, DrSc. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Agronomická fakulta, Ústav chemie a biochemie, Zemědělská 1, 613 00 Brno <u>kuban@mendelu. cz</u>

6.1 Úvod

Neustálý rozvoj takových oblastí, jako je ochrana a tvorba životního prostředí, kontrola průmyslové a zemědělské výroby atd. kladou stále vyšší nároky na množství a kvalitu prováděných chemických analýz, kdy je požadována především dostatečná přesnost, správnost a rychlost při použití dostupné, jednoduché a cenově přijatelné aparatury s minimální spotřebou vzorků a chemikálií.

V současné době nalezly široké uplatnění kontinuální metody, které jsou založeny na přesném a opakovaném dávkování analyzovaného vzorku do segmentovaného (průtoková analýza se segmentovaným tokem kapaliny, *segmented continuous flow analysis* – SCFA) nebo do plynulého toku reakční směsi (průtoková injekční analýza, *flow injection analysis* – FIA) a tzv. sekvenční injekční analýza (*sequntial injection analysis* – SIA). Především posledně jmenované metody jsou vhodné i pro zařazení nejrůznějších separačních a obohacovacích technik (mikrokolonové a membránové techniky, extrakce v systémech l/l, l/s atd.) v kombinaci s celou řadou detekčních systémů, včetně atomové spektrometrie. Výhody a obtíže spojené s uplatněním těchto metod byly podrobně popsány v řadě přehledných referátů a monografií (viz seznam).

6.2 Aplikace průtokových metod v atomové spektrometrii

6.2.1 Průtoková injekční analýza (FIA)

Průtoková injekční analýza (FIA) je založena na koncepci kontrolované disperze v kontinuálním toku, která dovoluje reprodukovatelnou tvorbu reakční zony vzorku. Nezbytným předpokladem pro tuto techniku je přesné a opakované dodržení definovaných experimentálních podmínek pro každý jednotlivý vzorek. Vzorek je pak podroben procesu disperze v laminárním toku reakční směsi, přičemž se tvoří typický koncentrační profil, který je zaznamenáván detekčním systémem ve formě charakteristických píků (obr. 6.1b). Velikost odezvy ve formě výšky (H), pološířky (W) nebo plochy (A) píku je pro stejné nebo podobné vzorky obvykle lineární funkcí koncentrace analytu ve vzorku.

Pro stanovení majoritních i minoritních koncentrací prvků lze využít jednokanálové zařízení pro FIA analýzu (obr. 6.1a) s detekcí pomocí plamenové atomové absorpční spektrometrie (FI-FAAS). Použití vzduchu jako nosného média pro transport vzorku, objemů vzorků vyšších než 0.05 ml a použití optimální průtokové objemové rychlosti a kalibračního postupu zvyšuje výrazně citlivost a přesnost stanovení oproti klasickému postupu zmlžování vodných roztoků. Zařízení je rovněž velmi vhodné pro kalibraci přístroje pomocí jediného roztoku standardu, kdy se využívá tvorby vysoce reprodukovatelného koncentračního gradientu (viz dále). V řadě případů lze tyto FIA postupy aplikovat i pro systémy s elektrotermickou atomizací ET-AAS a v poslední době i pro ICP OES, ICP-MS aj. K rozvoji aplikací přispělo i to, že vedle "home-made" zařízení jsou v mnoha laboratořích používány komerčně dostupné systémy od firmy Perkin Elmer (FIAS 100, 400) a dalších.





P – peristaltická pumpa, S – vzorek, T – reakční doba, A – plocha píku, W - šířka píku, H výška píku, t_b – doba měření signálu

6.2.2 Sekvenční injekční analýza (SIA)

SIA představuje plně automatizovaný přístup ke zpracování vzorku umožňující plně nahradit manuální procesy zahrnuté v tradičních analytických postupech rychlým, přesným a účinným způsobem. Sekvenční injekční analýza (SIA) je založena na koncepci kontrolované disperze mezi úzkými, vzájemně navazujícími zónami vzorků a reakčních činidel o přesně definovaných objemech v reakční cívce o malém vnitřním průměru (obr. 6.2). Tyto zóny s ostrým rozhraním jsou v prvním (plnícím - *filling*) cyklu nasávány v přesně definované sekvenci přes 6- až 10-pozicový selekční ventil (*multi-position selection valve*) do kapiláry zvané zadržovací cívka (*holding coil*) pomocí mikropístové (i peristaltické) reverzní pumpy poháněné přesným krokovým motorem řízeným počítačem (obr. 6.2 B). Před vlastním měřením je do dutiny pístové pumpy nasáto nosné médium (*carrier*) event. obsahující příslušný reagent. Ve druhé měřící (*measurring*) fázi jsou pomocí nosného media zóny zavedeny přes multipozicový selekční ventil do reakční cívky SIA aparatury, přičemž dojde ke kontrolované disperzi vlivem difúze, konvekce a míchání (obr. 6.2 C). Na rozhraní mezi zónami se ustaví přesně definovaný koncentrační gradient (obr. 6.2 D). Vytvořený reakční produkt je unášen nosnou kapalinou do detektoru, kde je zaznamenávám přechodový signál. Aparatura může být vedle reakční a zadržovací cívky doplněna o celou řadu dalších zařízení umožňujících provádění separačních procesů (viz dále).



Obr. 6.2: Schéma zařízení pro sekvenční injekční analýzu (a) se zobrazením zón v zadržovací (b) a reakční (c) cívce a znázorněním koncetračního gradientu na mezifází zón (d)

HC – zadržovací cívka (holding coil), D – detektor (AAS...), S – vzorek, R – reagent, H – výška píku, I – okamžik druhé periody, t_d – reakční doba

6.3 Úprava vzorků

Většina klasických postupů předúpravy vzorků je časově i materiálně velmi náročná a v řadě případů rovněž spojena s manipulací s toxickými nebo agresivními chemikáliemi. Velký počet pracovních operací vede ke zvyšování pravděpodobnosti výskytu chyb a v neposlední řadě i k vyšší pravděpodobnosti kontaminace vzorků z atmosféry a použitého chemického nádobí. Předúprava vzorku se tak stává limitujícím faktorem chemické analýzy z hlediska přesnosti, správnosti, citlivosti i rychlosti. Uplatnění průtokových analyzátorů, které tvoří uzavřené systémy, klade menší nároky na čistotu pracovního prostředí a v řadě případů tak může nahradit nákladné "čisté laboratoře" s komplikovanou vzduchotechnikou.



Obr. 6.3: Schéma zařízení pro sekvenční injekční analýzu s dvěma detektory (A), s dilutorem pro ředění vzorku (B), se zařízením pro provádění mikrokolonové nebo (ko-(precipitační (C) a membránové separace (D)



Obr. 6.4: Schéma FIA zařízení pro mineralizaci vzorků mikrovlnnou energií v průtokovém systému FIA (A) a schéma FIA zařízení pro fotooxidační destrukci (B) v UV-reaktoru (C)

> P – pumpa, B – tlumič, R – fotooxidační činidlo, Q – průtoková objemová rychlost v ml/min, S – vzorek, I – dávkovací ventil, UV – UV- fotoreaktor, PS – separátor plynné fáze, D – detektor, W – odpad

6.3.1 Mineralizace vzorků

Zařazením UV-fotolytického reaktoru s jednoduchým zdrojem UV záření a kapilárním systémem (křemen, PTFE, FEP) nebo umístěním reakční kapiláry (PTFE) do mikrovlnné pece lze provádět kontinuální předúpravu (dekomposici) vzorků. V těchto případech je vesměs vhodné za (a případně i před) tato digesční zařízení umístit separátor fází, který zaručí dokonalé oddělení plynné (pevné) fáze po provedené operaci. Pro urychlení fotooxidačních procesů je často výhodné použít silných oxidačních činidel (H₂O₂, K₂S₂O₈ aj.). Oba postupy jsou vhodné především pro vzorky se složitou osnovou. Zařízení byla odzkoušena na příkladě stanovení celkového dusíku nebo fosforu v odpadních a říčních vodách a dalších příkladech.

6.3.2 Ředění vzorků a kalibrace

Díky kontrolované disperzi na rozhraní vzorek/činidlo nebo vzorek/nosné medium se vlivem difúze, konvekce a míchání ustaví přesně definovaný koncentrační gradient, který je za daných experimentálních podmínek vysoce reprodukovatelný a lze jej matematicky popsat. Toho lze využít pro ředění vzorku použitím spřaženého, časovým spínačem ovládaného dávkovacího ventilu, který z primární zóny nadávkuje definovaný objem kapaliny z přesně určeného místa dispergované zóny do sekundárního zařízení (FIA, SIA). Jinou možností je využití vysoce reprodukovatelného časového signálu ke kalibraci přístroje z jednoho jediného nadávkování (obr. 6.5 A), použitím dvou nebo více zřeďovacích cívek (obr. 6.5 B, C) nebo současného nadávkování zóny vzorku a ředidla (obr. 6.5 D). V případě využití SIA analyzátoru je nejčastěji využíván tzv. dilutor (obr. 6.3 B), který je představován míchanou mikrocelou.

6.4 Separační a zakoncentrovávací metody

Průtoková i sekvenční injekční analýza (FIA, SIA) jsou díky nepřítomnosti kompresibilní fáze mnohem flexibilnější pro aplikaci nejrůznějších separačních a zkoncentrovávacích technik než varianta se segmentovaným tokem (SCFA). Význam spojení kontinuální úpravy vzorků je zvláště významný při aplikaci různých hybridních technik v oblasti stopové a ultrastopové analýzy (viz. obr. 6.3, 6.6 až 6.9). Nezanedbatelným faktorem je také možnost využití těchto technik pro chemickou speciaci různých forem výskytu analytu v komplikované matrici vzorku.



Obr. 6.5: Charakteristický tvar píku (a) umožňuje sestrojení kalibrační křivky (b) odečtem koncentrací při vhodně volených časech (A) na základě znalosti matematického popisu tvaru píku, použitím dvou nebo více zřeďovacích cívek (B, C) nebo současného nadávkování zóny vzorku a ředidla (D)

C – nosné medium, P, SP – pumpa, W – odpad, SV – přepínací kohout, I – dávkovací kohout, R – činidlo

6.4.1 Precipitační techniky

Řadu látek iontového charakteru lze stanovit po separaci nebo zkoncentrování pomocí srážecích reakcí nebo koprecipitace na vhodném nosiči. Pevná fáze je separována pomocí "inline" filtru (pro SIA např. zabudovaného v čtyřcestném kohoutu – obr. 6.3 C) a koncentrace analytu je stanovována nepřímo z úbytku koncentrace srážecího činidla (nepřímé stanovení – obr. 6.6 Ba) nebo přímo (obr. 6.6 Bb) a nebo po rozpuštění pevné fáze vhodným rozpouštědlem nebo reakčním činidlem (přímé metody – obr. 6.6 C). Jako detektor lze s výhodou použít F-AAS spektrometr, ICP spektrometr, UV-VIS spektrofotometr atd. Postup je vhodný pro stanovení iontů kovů (Pb, Ag atd.), anorganických aniontů (Cl⁻, Br⁻, SO_4^{2-} aj.) i organických látek (léčiva, surfaktanty aj.).



Obr. 6.6: Typy filtračních jednotek (A) a schéma FIA zařízení pro úpravu vzorků filtrací (B) a pro (ko-)precipitační techniky užívané pro nepřímé (Ca) a přímé (Cb) stanovení anorganických i organických látek AAS a jejich stanovení po rozpuštění sraženiny (D)

FU – filtrační jednotka, W – odpad, MC – směšovací cívka, D – detektor, RC – reakční cívka, P – pumpa, R – reagent, S – vzorek



Obr. 6.7: *Schéma membránové koaxiální jednotky (A) a FIA zařízení pro membránové separace (B, C)*

A – teflonová kapilára, B – tygonová hadička, C – T-kus, D – teflonová hadička, MU – membránová jednotka, P1 – peristaltická pumpa, M – membrána

6.4.2 Techniky membránových separací a zkoncentrování

Techniky membránových separací iontových (dialýza, iontová výměna), plynných (difúze, permeace) i lehce těkavých nepolárních látek (pervaporizace) mohou být použity k separaci analytu od nežádoucích složek matrice (interferujících složek, mechanických částic atd.), zkoncentrování analytu ve stacionárním nebo proudícím akceptorovém toku a konečně i k případnému ředění vzorků nebo dávkování činidel bez nežádoucího zředění.

Transport přes semipermeabilní membrány je jednou z velmi výhodných technik pro řadu iontových sloučenin při použití membrán s chemicky vázanými iontově výměnnými skupinami nebo kapalinových membrán s nosičem (supported liquid membranes - SLM) po jejich selektivní separaci a případném zkoncentrování z kapalné nebo plynné fáze. Nadávkovaný analyt je transportován donorovým tokem k membránové separační jednotce ve formě diskrétní zóny nebo kontinuálně. Donorový tok obtéká jednu stěnu semipermeabilní membrány. Analyt je selektivně transportován přes membránu vhodných vlastností do akceptorového toku, který obvykle obsahuje organické analytické činidlo tvořící s analytem detekovatelný produkt nebo činidlo usnadňující absorpci analytu v akceptorové tekutině. Rychlost, kvantitativnost a selektivitu transportu lze ovlivňovat experimentálními podmínkami na obou stranách membrány, typem membrány a dalšími faktory.



A

B

C



Obr. 6.8: Schéma FIA zařízení pro extrakci v systému kapalina/kapalina (A) a jeho principu činnosti (A dole) a zařízení pro kontinuální záznam signálu (B – F-AAS) nebo diskontinuální záznam signálu (C – ET-AAS)

> P – pumpa, C(R) - nosné medium event. reagent, org – organická fáze, S – vzorek, MRC – mísící a/nebo reakční cívka, TS – segmenor, EC – extrakční cívka, PS – separátor fází, D – detektor, DB – vytěsnovací láhev, FC – sběrač frakcí, RC – restrikční (odporová) cívka



Obr. 6.9: Schéma kombinace předúpravy vzorku FIA s následnou separací a kvantifikací metodou kapilární elektroforézy (FI-CE)

> B – tlaková láhev nebo pumpa, I – dávkovací kohout, S – vzorek, C – separační křemenná kapilára, Pt – platinová elektroda, HV – zdroj vysokého napětí, W – odpad, E – elektrolyt, CCD – detektor.

Vhodnou volbou typu membrány a acidity donorového toku lze výrazně měnit selektivitu transportu jednotlivých složek analyzované směsi v závislosti na jejich acidobasických vlastnostech. Tzv. pH diskriminací transportu interferujících komponent matrice lze často změnit selektivitu stanovení až o několik řádů. Rovněž oxidačně-redukční nebo komplexo-tvorné vlastnosti analytu mohou v mnoha případech výrazně ovlivnit selektivitu transportu a umožnit tak speciaci analytu. Volbou průtokových rychlostí donorového a akceptorového toku nebo spojením difúzní cely s dávkovací smyčkou lze měnit koncentraci analytu v akceptorovém toku v širokém rozmezí, takže lze dosáhnout silného zředění nebo zkoncentrování analytu až o několik řádů.

6.4.3 Mikorokolonová separace a zkoncentrování

Zkoncentrování na sorbentech, ať už klasického typu měničů iontů, sorbentech chemicky modifikovaných nebo modernějších s chemicky vázanými chelatačními skupinami je jednou z nejperspektivnějších metodik. V klasickém provedení je poměrně zdlouhavá oproti vlastnímu měření analytického signálu. Proto byly spojeny výhody "on-line" zkoncentrování a případně i separace na mikrokoloně vhodného sorbentu nebo na tzv. extrakčních discích a průtokových detektorů v konstrukci hybridních systémů (schéma viz obr. 6.3 C, 6). Uplatňují se různé konstrukce modulů se sorbenty nebo extrakčními disky (SPE) a způsoby jejich zapojení do FIA nebo SIA (obr. 6.3 C) systému, využívá se rozdílných vlastnosti různých typů chelatačních sorbentů a vlivů různých faktorů na efektivitu sorpce a eluce a na charakter výsledného analytického signálu v atomové spektrometrii, spektrofotometrii aj. Metodu lze rovněž použít k určení fyzikálně-chemických forem existence – speciaci – především tam, kde se tyto formy liší svými vlastnostmi (náboj, oxidační stupeň, stabilita atd.)

Použití jednokolonového FIA zařízení je málo efektivní, zvláště pak při použití delších časů, nutných pro sorpci stopových koncentrací analytů z velkého objemu vzorku. Pro zvý-
šení efektivity sorpce lze použít sorpční zařízení s vícekanálovým sorpčním modulem s mikrokolonami plněnými vhodným sorbentem. To umožňuje stanovení stopových koncentrací iontů kovů s detekcí plamenovou atomovou absorpční spektrometrií a optimalizaci časového harmonogramu sorpce, promývání a eluce.

Parametry FI-FAAS stanovení jsou srovnatelné nebo lepší než u metody stanovení ET-AAS při podstatně jednodušší instrumentaci a nižších provozních nákladech a lepší než údaje získané pomocí FIA zařízení pro kontinuální extrakci v systému kapalina/kapalina s detekcí pomocí plamenové AAS.

6.4.4 Extrakce v systému kapalina-kapalina

Významný pokrok byl dosažen i v oblasti uplatnění extrakcí v systému kapalina/kapalina (v literatuře často označováno FIE). Metoda kontinuální extrakce v systému kapalina/kapalina zvyšuje selektivitu i citlivost metod a umožňuje stanovení stopových koncentrací pomocí F-AAS po separaci fází i ET-AAS po extrakci do organické fáze a následné re-extrakci do fáze vodné. Navíc umožňuje i stanovení některých organických látek iontového charakteru po jejich interakci v systému ion kovu - analyt eventuálně i s iontově párovým činidlem. Metoda je rovněž vhodná pro stanovení dostupných (labilních) forem iontů kovů vedle tzv. kineticky robustních částic (komplexně vázané ionty kovů - OH[–], X[–] atd.).

6.5 Speciační analýza

Vedle výše uvedených separačních technik aplikovaných v systémech FIA AAS se stále častěji setkáváme s aplikací kombinovaných technik, kdy FIA zařízení může sloužit pouze k předúpravě vzorku nebo k současné předúpravě vzorku s následnou aplikací některé z výše uvedených separačních a zkoncentrovávacích FIA technik (viz odst. 6.3.1 až 6.3.4) až po kombinaci předúpravy vzorku pomocí FIA zařízení spojeného s on-line separací pomocí chromatografických (IC, HPLC, GC aj.) nebo elektromigračních (CZE, MEKC aj.) technik s detekcí pomocí atomové spektrometrie (AAS, AFS, ICP OES, ICP/MS aj.), případně elektrochemických technik (ISE, voltamperometrie, konduktometrie). Obdobně může být FIA zařízení zařazeno jako postkolonový reaktor u chromatografických (IC, LC) nebo elektromigračních (CZE, MEKC aj.) technik s řadou významných funkcí, především unifikace valenčního stavu a formy jednotlivých separovaných specií prvků. Tato část aplikací atomové spektrometrie ve speciační analýze je zpracována podrobněji na jiném místě.

6.6 Závěr

Některé speciální separační a zkoncentrovávací FIA techniky s použitím mikrokolon plněných vhodnými sorbenty, extrakce na tzv. extrakčních discích (SPE), precipitace, extrakce v systému kapalina/kapalina, semipermeabilních membrán atd. lze uplatnit pro zvýšení přesnosti, správnosti, selektivity a citlivosti metod stanovení. Jednoduché FIA zařízení lze aplikovat na stanovení analytů ve vzorcích vysokého technologického významu a ve vzorcích biologických materiálů a životního prostředí. Ve spojení se separačními (chromatografickými a elektromigračními) postupy se průtokové metody stávají mnohem atraktivnější především z hlediska speciační analýzy. Řadu metod lze aplikovat přímo v technologickém procesu v tzv. procesní analytice.

Doporučená literatura

Růžička J., Hansen E. H.: Flow Injection Analysis, J. Wiley, New York, 1988.

- Valcárcel M., Luque de Castro M. D.: Flow Injection Analysis. Principles and Applications, J. Wiley, New York, 1987.
- Karlberg B., Pacey G. E.: Flow Injection Analysis, A Practical Guide, Elsevier Publ., Amsterodam, 1989.
- Burguera J. L., Burguera M.: Flow Injection Analysis in Atomic Absorption Spectrometry, M. Dekker, New York, 1989
- Valcárcel M., Luque de Castro M. D.: Automatic Methods of Analysis. Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry, Vol. 9, Elsevier Publ., Amsterodam, 1988.
- Fang Z.: Flow Injection Separation and Preconcentration, WCH, Weinheim, 1993
- Fang Z.: Flow Injection Atomic Absorption Spectrometry, J. Wiley and Sons, Chichester, 1995
- Sanz-Medel A .: Flow Analysis Atomic Spectrometric Detection, Elsevier, Amsterdam, 1999
- Valcárcel M., Luque de Castro M. D.: Continuous Separation Techniques in Flow Injection Analysis, J. Chromatogr. 393 (1987) 3.
- Clark G. D., Whittman D. A., Christian G. D., Růžička J.: Sample Handling and Pretreatment in Flow Injection Analysis. Crit. Revs. Anal. Chem. 21 (1990) 357.
- Růžička J., Hansen E. H.: Homogeneous and Heterogeneous Systems. Flow Injection Analysis Today and Tomorrow, Anal. Chim. Acta 214 (1988) 3.
- Kubáň V.: Liquid-Liquid Extraction Flow Injection Analysis, Crit. Revs. Anal. Chem., 22 (1991) 477.
- Fang Z., Zhu Z., Zhang S., Xu S., Guo L., Sun L.: On-line Separation and Preconcentration in Flow Injection Analysis. Anal. Chim. Acta 214 (1988) 41.
- Tyson J. F., Adeeyinwo C. E., Appleton J. M. H., Bysouth S. R., Idris A. B., Sarkissian L. L.: Flow Injection Techniques of Method Development for Flame Atomic Absorption Spectrometry, Analyst 110 (1985) 487.
- Kubáň V.: Continuous Precipitation Techniques in Flow Injection Analysis A Review, Fresenius J. Anal. Chem. 346 (1993) 873.
- Kubáň P., Guchardi R., Hauser P. C.: Trace-Metal Analysis with Separation Methods. TrAC Trend Anal. Chem. 24 (2005) 192-195.

7. APLIKACE ELEKTRODEPOZICE ANALYTU V METODĚ ET-AAS PRO JEHO PREKONCENTRACI A SEPARACI OD MATRICE VZORKU

prof. RNDr. Josef Komárek, DrSc.^a, doc. RNDr. Petr Rychlovský, CSc.^b

^a Masarykova Univerzita v Brně, Ústav chemie, Kotlářská 2, 611 37 Brno ^b Univerzita Karlova v Praze, Katedra analytické chemie, Albertov 2030, Praha 2

komarek@chemi.muni.cz; rychlov@natur.cuni.cz

7.1 Úvod

Atomová absorpční spektrometrie s elektrotermickou atomizací patří dosud k nejrozšířenějším a nejpoužívanějším analytickým technikám pro stanovení stopových koncentrací kovů. Při ultrastopové analýze environmentálních a biologických vzorků touto metodou se však uplatňují interference způsobené komplexní matricí vzorku. Velmi často je jedinou možností správné analýzy těchto vzorků předchozí separace analytu od rušivé matrice.

Za speciální separaci analytu ze vzorku (vedle spolusrážení, sorpce, iontové výměny, selektivního rozpouštění, destilace, extrakce kapalina-kapalina aj.) je možno označit elektrodepozici analytu. Při elektrochemické depozici může být za vhodných experimentálních podmínek analyt i zkoncentrován a tím zvýšena citlivost stanovení.

Techniky elektrochemické prekoncentrace prvků s následným stanovením AAS mohou být použity pro všechny prvky, které podléhají elektrochemické redukci nebo oxidaci ve vhodném rozmezí potenciálů. Při spojení elektrodepozice s AAS je analyt elektrochemicky vylučován na vhodné elektrodě a následně stanoven AAS.

K výhodám techniky elektrodepozice analytu patří:

- prvek se vylučuje z roztoku v definované formě;
- je dosaženo separace analytu od matrice;
- volbou vhodného pracovního potenciálu lze rozlišit prvek volný a prvek vázaný v komplexech, nebo jednotlivé specie prvku;
- ve srovnání s konvenční ET-AAS lze za vhodných podmínek dosáhnout několika násobného zvýšení citlivosti;
- je možno pracovat v širokém rozsahu koncentrací analytu, neboť volbou doby elektrolýzy lze ovlivnit množství vyloučeného analytu.

K nevýhodám patří složitost a pracnost postupů, horší reprodukovatelnost ovlivněná velkým množstvím proměnných parametrů, často nízký výtěžek a pomalé vylučování analytu.

7.2 Uspořádání elektrolýzy při elektrodepoziční technice

Elektrolýza roztoku vzorku může být obecně prováděna za konstantního proudu (galvanostaticky) nebo za konstantního potenciálu (potenciostaticky).

Galvanostatická elektrolýza je prováděna ve dvouelektrodovém zapojení, které je tvořeno pracovní a pomocnou elektrodou. Výhodou této metody je vyšší depoziční výtěžek analytu v porovnání s potenciostatickou elektrolýzou. Nevýhodou je malá selektivita.

Potenciostatické vylučování kovu vyžaduje tříelektrodové zapojení, tvořené pracovní elektrodou, pomocnou elektrodou a referentní elektrodou. Elektrolýzou při kontrolovaném potenciálu lze dosáhnout určité selektivity při vylučování kovů s různým vylučovacím potenciálem, při vylučování různých specií prvku nebo prvku vázaného v různých komplexech [1,2]. Nevýhodou jsou nízké depoziční výtěžky.

Elektrodepozici analytu je možné obecně provádět mimo optickou osu AA spektrometru nebo přímo v optické ose (*in situ*). Jednotlivé metody depozice se odlišují materiálem pracovních elektrod, technikou zpracování depozitu vyloučeného na elektrodě nebo způsobem atomizace.

7.3 Pracovní elektrody

Elektrody pro elektrodepozici mohou být zhotoveny z různých materiálů a mohou být nejrůznějších tvarů. Od materiálu pracovních elektrod se požaduje dostatečně vysoká teplota tání, chemická i mechanická odolnost, konstantní povrch, dobrá elektrická i tepelná vodivost a také vysoké přepětí vodíku. Elektrody musí být konstruovány tak, aby měly konstantní povrch, reprodukovatelné elektrochemické vlastnosti, jejich povrch musí být snadno mechanicky obnovitelný a aby byly přístupny chemické nebo elektrochemické aktivaci.

Pracovní elektrody mohou být tuhé nebo kapalné. Tuhé elektrody mohou být vyrobeny z grafitu nebo z vysokotajících kovů (obr. 7.1), jako jsou W, Ta, Mo, Ir, Rh, Os, Nb a Ru. Mezi kapalné elektrody patří rtuťová stacionární kapková elektroda nebo rtuťová filmová elektroda. Pracovní elektrody používané pro spojení s AAS jsou většinou z uhlíku (pyrolytický grafit, skelný uhlík) nebo kovu (W, Pt, Ir).

Výhodou tuhých elektrod je, že mohou být dobře použity i pro pozitivní potenciály, kdy už se rtuť anodicky rozpouští a také pro vylučování kovů, které netvoří amalgamy. Jejich nevýhodou ve srovnání s Hg-elektrodami je hůře definovatelný povrch a horší reprodukovatelnost v jeho obnovování.



Obr. 7.1: Wolframová drátová elektroda [3]

7.4 Zpracování depozitu vyloučeného na pracovní elektrodě

Analyt vyloučený na elektrodě může být zpracován několika způsoby. Elektrodepoziční podložku (wolframový drát, rtuťovou kapku, grafitovou tyčku, grafitovou trubici, grafitovou sondu) s deponovaným analytem je nutné přenést do atomizátoru nebo mezi kontakty pece v AA spektrometru. Kromě elektrotermického atomizátoru [4, 5] může být použit též speciální křemenný atomizátor [6].

Grafitová tyčinka může být vkládána do elektrotermického atomizátoru těsným kontaktem [7], ve formě uříznutého disku s depozitem [7] nebo je rozdrcena a dávkována ve formě grafitového prášku [8], případně je povlak rozpuštěn a dávkován ve formě roztoku. Při elektrodepozici v on-line uspořádání se do atomizátoru dávkuje většinou vhodným způsobem rozpuštěný depozit [9-12].

7.5 Elektrolytické cely

Při konstrukci elektrolytické cely je nutné splnit požadavek reprodukovatelnosti polohy elektrody v roztoku. Konstrukce elektrolytické cely tedy musí dovolovat přesnou kontrolu pozice elektrod a vzdálenosti mezi nimi. Dále by elektrolytická cela měla umožňovat rychlé a snadné vyjmutí pracovní elektrody bez nutnosti rozložit celý elektrolytický systém. K dosažení maximálních prekoncentračních výtěžků je také nutné, aby cela měla minimální vnitřní objem a maximální plochu pracovní elektrody. Materiálem pro konstrukci nádobek je často teflon. Sklo je méně vhodné při stopových koncentracích, neboť dochází k sorpci na stěny. Kromě teflonu a skla se používají elektrolytické nádobky křemenné, z Perspexu, z polyethylenu a jiných plastů. Elektrodepozici je možné provádět buď ve stacionárním uspořádání nebo v průtoku.

Při stacionárním uspořádání se může použít elektroda ve formě sondy využívané k dosažení izotermických podmínek atomizace. Lze využít grafitovou diskovou sondu nebo komerční hřebenovou sondu [5, 13-15]. Speciální grafitová disková sonda je zhotovena z grafitové tyčky o průměru 3 mm [5, 13]. Elektrodepozice probíhá na disku umístěném na tenkém stonku (obr. 7.2). Do atomizátoru se elektroda vkládá pomocí ramínka automatického dávkovače přes rozšířený dávkovací otvor grafitové trubice.



Obr. 7.2: Schéma grafitové diskové sondy

Při použití stacionárního uspořádání s elektrodou ve formě hřebenové sondy (Unicam) se vylučuje depozit na části před hřebenem [14,15]. Elektrodepozice probíhá z roztoku míchaného magnetickým míchadlem. Po depozici a omytí vodou se sonda zabuduje do držáku sondy u atomizátoru. Pro 10 min elektrodepozici byly dosaženy charakteristické koncentrace (vyvolávající absorbanci 0,004 4) 26 ng l⁻¹ Cu, 1,4 ng l⁻¹ Cd, 4,7 ng l⁻¹ Pb a 62 ng l⁻¹ Ni [14]. Grafitový povrch sondy může být modifikován. Elektrochemické pokrytí povrchu sondy Pd, Re nebo jejich směsí může sloužit jako trvalé pokrytí povrchu. Depozit prostupuje do vnitřních vrstev grafitu. Pomocí takto pokrytých sond lze při 2 min elektrodepozici z 20 ml vzorku dosáhnout mezí detekce 30 až 50 ng l⁻¹ Au [15]. S dobou elektrodepozici roste citlivost stanovení a lze dosáhnout lepších mezí detekce.



Obr. 7.3: Schéma průtokové elektrolytické cely [16]

1 - katoda z grafitové kyvety; 2 - kontakt; 3 - anoda ze skelného uhlíku; 4 - čerpadlo; 5 - zásobník; 6 - trubička z PTFE; 7 - ventilační otvor

Obr. 7.4: Schéma průtokového systému s grafitovou trubicí plněnou retikulárním skelným uhlíkem (RVC) [4]

1 - pyrolyticky potažená grafitová kyveta; 2 - RVC-náplň; 3 - teflonový kolíček; 4 - skleněná tyčinka; 5 - grafitová pomocná elektroda; 6 - referentní elektroda Ag/AgCl; 7 - vstup elektrolytu; 8 - výstup elektrolytu; 9 - iontově výměnná membrána; 10 - vstup vzorku; 11 - výstup vzorku; 12 - Pt-kontakt V průtokovém off-line uspořádání je míchání elektrolytu zajištěno cirkulací roztoku přes elektrodu. Elektrodou může být grafitová trubice zapojená jako katoda [1, 16-18]. Roztok protéká vnitřkem trubice a k vylučování depozitu dochází na její vnitřní stěně (obr. 7.3) nebo na náplni retikulárního skelného grafitu (obr. 7.4) [4, 10]. Průtoková cela může být konstruována tak, aby depozice probíhala pouze ve střední části atomizační trubice a aby roztok vzorku protékal těsně podél vnitřní stěny trubice a neustále se obnovoval (obr. 7.5) [19, 20]. Při použití této cely se 3 ml roztoku vzorku o průtokové rychlosti 0,5 ml min⁻¹ byly získány charakteristické koncentrace 0,023 μ g l⁻¹ Pd a 0,27 μ g l⁻¹ Pt [19]. Anoda je ponořena do roztoku [1] nebo bez dotyku vložena v ose trubice atomizátoru [16, 18], případně je od katody oddělena ionexovou membránou (Nafion) [4, 10]. Po depozici je trubice promyta vodou, odstraněna z cely, vysušena a umístěna do grafitové pece pro měření podle zvoleného programu.



Obr. 7.5: Schéma cely s depozicí ve střední části grafitové trubice v průtokovém systému [20]

1 - vedení vzorku, 2 - grafitová trubice, 3 - těsnění, 4 - výstup vzorku, 5 - membrána

Výhodou stacionárního a průtokového off-line uspořádání je možné zkoncentrování analytu při použití většího objemu vzorku. Nevýhodou je možná kontaminace z prostředí laboratoře vzhledem k manipulaci s elektrodami. Proto jsou tato uspořádání výhodná pro stanovení prvků méně běžných. Příkladem může být stanovení zlata a platiny.

Při on-line průtokovém uspořádání se do atomizátoru dávkuje vhodným způsobem rozpuštěný depozit. Cela může být tvořena kostkou z plexiskla, ve které jsou umístěny elektrody o průměru 5 mm zalité v epoxidové pryskyřici (obr. 7.6). Tato konstrukce umožňuje snadné nastavení vzdálenosti elektrod a tím i vymezení objemu elektrolyzovaného roztoku. Po elektrolýze v mikrocele může být vyloučený kov rozpuštěn v malém objemu kyseliny a celý objem přímo dávkován do elektrotermického atomizátoru [11].



Obr. 7.6: Schema průtokové elektrolytické mikrocely [9] 1 - pracovní grafitová elektroda, 2 - protielektroda, 3 - plexisklo, 4 - PTFE těsnění

7.6 In situ elektrodepozice

Technika *in situ* elektrodepozice využívá její provedení v nadávkovaném objemu vzorku řádu desítek mikrolitrů na vnitřní stěně grafitového atomizátoru umístěného přímo v optické ose AA spektrometru, následné odsátí matrice vzorku a vlastní analýzu vyloučeného analytu zvoleným teplotním programem [21-25].

Použití této elektrodepoziční techniky znamená odstranění jakékoliv manipulace s elektrodou pokrytou deponovaným analytem, a tím snížení pracnosti, odstranění možnosti sekundární kontaminace deponovaného analytu během přenosu a odstranění nereprodukovatelnosti způsobené nejednotným umístěním elektrody v atomizátoru vzhledem k optické ose AA spektrometru [21]. Při *in situ* elektrodepozici analytu je za vhodných experimentálních podmínek (neřízený potenciál, napětí mezi pracovní a pomocnou elektrodou 4 až 6 V, elektrolytický proud cca 50 mA) prováděna vyčerpávající elektrolýza s účinností větší než 95 % v krátkém časovém intervalu (cca 60-90 s).

Při *in situ* elektrodepozici (obr. 7.7) je vnitřní stěna grafitového atomizátoru v místě styku s nadávkovaným roztokem katodou a dávkovací kapilára dávkovače (Pt, Pt/Ir) ponořená do roztoku je anodou. Proces analýzy vzorku s komplexní matricí metodou ETA-AS s *in situ* elektrodepozicí probíhá v několika krocích (obr. 7.8):

- dávkování palladiového modifikátoru a jeho predepozice;
- odsátí zbytkového roztoku palladia, promytí deionizovanou vodou, odsátí a vysušení;
- dávkování vzorku (po přechozí predepozici modifikátoru) nebo dávkování vzorku s palladiovým modifikátorem (kodepozice) and jeho elektrodepozice;
- odsátí vzorku (elektrolytu) po elektrodepozici se zbylou matricí, promytí vodou, odsátí a vysušení;
- elektrotermická atomizace podle teplotního programu.



Obr. 7.7: Uspořádání pro in situ electrodepozici [24]



Obr. 7.8: Operační sekvence při in situ elektrodepozici [23]

Elektrodepozice může probíhat při laboratorní teplotě nebo za zvýšené teploty (asi 45 °C), aby se zvýšilo konvektivní míchaní vzorku během elektrodepozice, které je normálně podporováno vznikajícími plyny. Odsátí roztoku vzorku obsahujícího matriční složky po kompletní elektrodepozici analytu přímo dávkovací kapilárou znamená prakticky úplné odstranění rušící matrice [23]. Tím, že je možné celý cyklus nadávkování vzorku, elektrodepozice, odsátí roztoku po elektrodepozici, promýtí deponovaného analytu vícenásobně opakovat s jedním vzorkem, je možné dosáhnout vysokých prekoncentračních faktorů a snížit tak významně mez detekce.

Tuto elektrodepoziční techniku lze díky použití dávkovače elektrotermického atomizátoru úspěšně automatizovat a její ovládání začlenit přímo do řídícího softwaru daného atomového absorpčního spektrometru [21,22]. To ovšem vyžaduje spolupráci s výrobcem. Jinou možností je technická úprava komerčního autosampleru (zařazení odsávacího zařízení mezi dávkovací kapiláru a vlastní dávkovač grafitového atomizátoru) [23,24].

Významnou výhodou elektrodepozice v optické ose AA spektrometru je možnost rychlé předúpravy povrchu atomizátoru např. elektrolytickým vyloučením modifikátoru, nejčastěji palladia; které tak kromě své základní funkce účinně chrání povrchovou vrstvu pyrolytického grafitu v atomizátoru. Vyloučená vrstva kovového palladia na grafitu také omezuje případné interakce analytu s grafitem. Přítomnost palladia také výrazně urychluje vyloučení analytu na podložce - elektrodě.

7.7 Charakteristiky kombinovaného stanovení s elektrodepozicí analytu

Citlivost stanovení analytu při elektrodepozici je daná stupněm zkoncentrování při elektrolýze. Stupeň prekoncentrace je ovlivněn tvarem a velikostí pracovní elektrody [6] a délkou depozičních časů [26]. Pro citlivost stanovení ET-AAS je důležitý typ atomizátoru a rychlost ohřevu.

Mez detekce elektrodepoziční techniky je stejně jako citlivost závislá na době elektrolýzy a na experimentálních parametrech jako je tvar a velikost plochy pracovní elektrody, geometrie elektrolytické cely, rychlost míchání, objem a složení elektrolytu.

Přesnost a reprodukovatelnost je ovlivněna tvarem, plochou a porositou pracovní elektrody a její polohou v elektrolytické cele. Stanovení analytu musí probíhat vždy ze stejné plochy. Poloha elektrody v atomizátoru vzhledem ke světelnému paprsku musí být vždy stejná.

Hlavní zdroje chyb elektrodepozičních technik spočívají v oplachování elektrod po skončené elektrolýze, kdy i při vloženém napětí dochází ke ztrátám analytu, a ve vlastním přenosu elektrody do atomizátoru.

7.8 Praktické využití elektrodepozice

Elektrodepoziční techniky byly využity pro stanovení a speciaci kovů ve vzorcích s jednoduchou i velmi složitou matricí. Byly vyzkoušeny pro stanovení stopových koncentrací kovů ve vodovodní, říční, minerální a mořské vodě [7, 13-15, 18, 20, 21], v moči [3, 25], v krvi a v krevním séru [21, 22], v komerčně dostupných solích [6, 16] a pro rozlišení specií kovu v mořské vodě [1, 14].

Literatura

- 1. G. E. Batley, J. P. Matousek, Determination of chromium speciation in natural waters by electrodeposition on graphite tubes for electrothermal atomization, Anal. Chem. 52 (1980), 1570-1574.
- 2. J. P. Matousek, K. J. Powell, Analyte preconcentration and separation from small volumes by electrodeposition for electrothermal atomic absorption spectroscopy, Talanta 40 (1993), 1829-1831.
- 3. G. Zhang, J. Li, D. Fu, D. Hao, P. Xiang, Atomic absorption determination of traces of cadmium in urine after electrodeposition onto a tungsten wire, Talanta 40 (1993), 409-413.
- 4. E. Beinrohr, M.L. Lee, P. Tschöpel, G. Tölg, Determination of platinum in biotic and environmental samples by graphite furnace atomic absorption spectrometry after its electrodeposition into a graphite tube packed with reticulated vitreous carbon, Fresenius J. Anal. Chem. 346 (1993), 689-692.
- 5. J. Komárek, P. Stavinoha, S. Gomišček, L. Sommer, Determination of copper by electrothermal AAS after electrodeposition on a graphite disk electrode, Talanta 43 (1996), 1321-1326.
- 6. W. Lund, B. V. Larsen, The application of electrodeposition techniques to flameless atomic absorption spectrometry. Part I. The determination of cadmium with a tungsten filament, Anal. Chim. Acta 70 (1974), 299-310.
- 7. M. Veber, S. Gomišček, V. Streško, Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry of Elements after Electrochemical Deposition on Graphite Electrodes, Anal. Chim. Acta 193 (1987), 157-167.
- Y. Thomassen, B.V. Larsen, F.J. Langmyhr, W. Lund, The application of electrodeposition techniques to flameless atomic absorption spectrometry. Part IV. Separation and preconcentration on graphite, Anal. Chim. Acta 83 (1976), 103-110.
- 9. E. Bulska, W. Jedral, ETAAS Determination of Lead with On-line Preconcentration Using a Flowthrough Electrochemical Microcell, Atomic Spectroscopy 18 (1997), 202-204.
- E. Beinrohr, E. Bulska, P. Tschöpel, G. Tölg, Determination of Lead by Electrothermal Vaporization Microwave-Induced Plasma Atomic Emission Spectrometry after Flow-through Electrolytic Deposition in a Graphite Tube Packed with Reticulated Vitreous Carbon, J. Anal. At. Spectrom. 8 (1993), 965-968
- J. Knápek, J. Komárek, P. Krásenský, Determination of Cadmium by Electrothermal Atomic Absorption tion Spectrometry by Using of Electrochemical Separation in Microcell, Spectrochim. Acta Part B 60 (2005) 393-398.
- 12. E. Beinrohr, M. Rapta, M-L. Lee, P. Tschöpel, G. Tölg, On line Electrochemical Preconcentration on Manganese for graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry Using a Flow-through Electrochemical Cell, Mikrochim. Acta 110 (1993), 1-12.
- 13. A. Vraná, J. Komárek, Determination of Cadmium and Copper with ET AAS after Electrochemical Deposition on a Graphite Electrode, Fresenius J. Anal. Chem. 355 (1996), 321-323.
- 14. J. Komárek, J. Holý, Determination of Heavy Metals by Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry after Electrodeposition on a Graphite Probe. Spectrochim. Acta Part B 54 (1999) 733-738.
- 15. M. Konečná, J. Komárek, Utilization of Electrodeposition for Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry Determination of Gold, Spectrochim. Acta Part B 62 (2007) 283-287.
- K. Hoppstock, R.P.H. Garten, P. Tschöpel, G. Tölg, Purification of Reagents and Separation of Element Traces by Electrodeposition onto a Graphite Tube Cathode, Fresenius J. Anal. Chem. 343 (1992), 778-781.
- H. Matusiewicz, M. Lesiński, A. Ciszewski, B. Lewandowska, Electrolytic Preconcentration of Platinum for Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry Using a Flow-through Graphite Tube Cell, Chem. Anal. (Warsaw) 46 (2001), 199-205.
- G. E. Batley, J. P. Matousek, Determination of heavy metals in seawater by atomic absorption spectrometry after electrodeposition on pyrolytic graphite-coated tubes, Anal. Chem. 49 (1977), 2031-2035.
- J. Komárek, P. Krásenský, J. Balcar, P. Řehulka, Determination of Palladium and Platinum by Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry after Deposition on a Graphite Tube, Spectrochim. Acta Part B 54 (1999) 739-743.

- 20. J. Komárek, P. Houserová, Determination of Gold by Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry after Electrodeposition on a Graphite Tube, Spectrochim. Acta Part B, 58 (2003) 1525-1530.
- 21. J.P. Matousek, K.J. Powell, Coupled *In situ* Electrodeposition-Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry: A New Approach in Quantitative Matrix Free Analysis, Spectrochim. Acta Part B 50 (1995), 857-872.
- J.P. Matousek, K.J. Powell, Direct Analysis of Reference Biofluids by Coupled In Situ Electrodeposition-Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry, Spectrochim. Acta Part B 54 (1999), 2105-2113.
- 23. M. Krenželok, P. Rychlovský, M. Volný, J.P. Matousek, Optimization of Conditions and Evaluation of "in situ" Electrodeposition Techniques in ETAAS, Analyst 128 (2003), 293-300.
- 24. Z. Čánský, P. Rychlovský, Z. Petrová and J.P. Matousek: A technique coupling the analyte electrodeposition followed by *in situ* stripping with electrothermal atomic absorption spectrometry for analysis of samples with high NaCl contents, Spectrochim. Acta Part B, 62 (2007), 250-257.
- E. Čurdová, R. Koplík, J.P. Matousek, M. Suchánek, Direct determination of cadmium in urine by electrothermal atomic absorption spectrometry after in situ electrodeposition, Talanta 67 (2005), 926– 932.
- 26. E. J. Czobik, J. P. Matousek, The application of electrodeposition on a tungsten wire to furnace atomic absorption spectrometry, Spectrochim. Acta Part B 35 (1980), 741-751.

Práce vznikla za podpory výzkumného záměru MŠMT ČR MSM 0021622412 (J. Komárek) a MSM 0021620857 (P. Rychlovský)

8. ATOM TRAPS IN ATOMIC ABSORPTION SPECTROMETRY

O. Yavuz Ataman Department of Chemistry, Middle East Technical University, 06531 Ankara, Turkey <u>ataman@metu.edu.tr</u>

8.1 Introduction to atomic absorption spectrometry and historical evolution of atom traps

Atomic absorption spectrometry (AAS) has been introduced into the world of analytical chemistry in mid 50's. Its introduction was very timely since determination of elements was then a very important analytical issue regarding especially analysis of minerals, metals and alloys. The domain of analytical chemistry in those days was covering mostly inorganic samples. The technique was welcome by analytical chemists as a powerful alternative to spectrophotometric methods requiring usually some chemical pretreatment of samples such as buffering, complexation etc.

AAS was initially applied with a flame atomizer; mostly air/acetylene, less commonly nitrous oxide/acetylene, flames were popular; the compositions of flames is still the same today in common practice, although other kinds of flames have been used for mostly research purposes. As a sample introduction technique, nebulization was and is used. Introduction of AAS and the related milestones are given in Table 8.1 with references [1-10].

Introduced Technique	Year	Reference
AAS with flame atomizer	1955	1, 2
Electrothermal atomization	1961	3
Cold vapor technique for Hg	1964	4
Zeeman background correction	1964	5
D2 background correction	1965	6
Hydride generation technique	1969	7
Continuum source AAS	1976	8, 9
Smith-Hieftje background correction	1983	10

Table 8.1:	Some of the	milestones in	development of	f atomic (absorption	spectrometry
------------	-------------	---------------	----------------	------------	------------	--------------

.

Since the early days of flame AAS technique, two important negative aspects of this approach became to the attention of researchers. One of these was the relatively low efficiency of the sample introduction system, nebulization that is 1-10 % only; therefore most of

the sample is not transported to the atomizer and there is a great dilution of the sample available by flame gases; resulting concentration is relatively low. Second deficiency noticed was the short residence time of analyte atoms in the measurement zone that is where the source lamp beam and atoms occupy the same volume for signal formation. For a typical air/acetylene flame, the flame velocity is about 200 cm s⁻¹ [11]; combining this with a beam thickness of 5 mm, estimated residence time for analyte atoms will be 2.5 ms. Both of these deficiencies limit the sensitivity of flame AAS technique. Actually developing and using AAS systems more sensitive than flame atomization, actually the merit of dilution with flame gases could be appreciated because this system, although not very sensitive, provided the conveniently diluted environment that is responsible for almost an interference-free analysis. Such a freedom from interferences could never be attained again for other systems where sensitivity is higher as compared with flame atomization.

As the domain of the analytical problems shifted more to problems related to environment, food and health, higher sensitivity became more important. Graphite furnace or electrothermal atomization (ETAAS), vapor generation techniques such as cold vapor (CVAAS) and hydride generation (HGAAS) provided a sensitivity improvement that is 100-1000 fold as compared with flame AAS. History, theory and practical aspects of AAS have been the subject of several books, among these the monograph written by Welz and Sperling can be mentioned [12]. Another very useful monograph on vapor generation AAS methods has been written by Dědina and Tsalev [13].

Although the sensitivity problem has been solved by several techniques as mentioned above, flame AAS is so simple and straightforward as compared to other atomization techniques that researchers tried to introduce novel sensitive systems based on flame atomization. Most of these initial systems had designs to provide a longer residence time for analyte atoms; therefore the term trap was occasionally used, mostly meaning a delay for atomic species in measurement zone. In more recent versions of atom trapping, the analyte species are actually immobilized on a suitable material that is a part of the apparatus and thus actually a preconcentration takes place in a collection period prior to a revolatilization and reatomization process to obtain the enhanced signal. The last two terms should be used carefully since either term can be used depending on the kind of atom trapping.

It should be mentioned that the atom trapping to be discussed in this text is not the only way to improve the sensitivity of FAAS; a rich variety of chemical preconcentration techniques exist and there are still researchers actively working on this subject. These works will not be included here.

Two kinds of atom trapping will be handled in this text. The first one is slotted quartz tube atom trap (SQT-AT) and the other class is quartz or tungsten traps used with vapor generation techniques. Both traps are used with AAS; the purpose is to enhance sensitivity by

using a simple flame AA spectrometer. It should be remembered that the second kind of quartz and metal traps can easily be adapted to ICPOES, ICPMS or AFS techniques.

On the pathway from simple flame AAS to SQT-AT devices, there are some milestones to be mentioned. A device called long-path absorption tube or Fuwa's tube could be as long as a meter; in order to improve sensitivity, the upper end of a tubular flame was directed into a silica or vycor tube through which the source beam was passing [14]. This approach did depend on the life time of the analyte atoms formed in the flame; although sensitivity was improved, background absorption problems were experienced. The technique is illustrated as a simple diagram in Fig. 8.1.



Fig. 8.1: Long-path absorption tube technique

Another well-known approach was called Delves' microsampling cup technique that consisted of a spoon-like nickel cup containing sample that could be mechanically pushed into the flame where rapid atomization and the transient signal was obtained [15]. A quartz tube having a slot at the lower surface was positioned on the top of the inserted cup to improve sensitivity. The device was introduced for lead determination in human blood by using 10 μ L of untreated sample [15]. Delves' cup was used by many laboratories before and even few years after ETAAS technique became available and popular.



Fig. 8.2: Delves' microsampling cup technique 1 - quartz tube, 2 - nickel cup, 3 - laminar flame, 4 - source beam

Slotted quartz tube (SQT) was introduced by Watling and his colleague de Villiers in 1977; their report contains the most important analytical features with details for Cu, Pb, Zn, Cd, Bi, Co, Fe, Mn, Ni, Ag, As, Se, Sb and Hg [16]. An article that was published in the same year covers its application to As, Sb, Se and Hg [17]. The device was a simple hollow quartz tube that was positioned on the laminar flame so that the lower slot coincided with the flame; another slot was made on the tube at an angle of 120° with respect to the lower slot that is accepting the analyte atoms in flame. SQT caused a sensitivity enhancement of 2-5 times depending on the element. Working principle of SQT is schematically given in Fig. 8.3. Although in these preliminary studies the SQT device was used with various flames such as air/acetylene, air/hydrogen and argon (entrained air)/hydrogen, once the device was fairly popular, only air/acetylene has been used in most of the works; its use and application can find its way to scientific journals even in recent years [18]. Several AA spectrometer manufacturers included this device under different commercial names. Since its use with air/acetylene flame does not necessitate the use of unconventional systems, SQT became a part of some of the application laboratories.



Fig. 8.3: Slotted quartz tube (SQT) and its working principle

Almost simultaneously with the introduction of SQT, another device, that was later called as water cooled U-tube atom trap was suggested by Canadian researchers [19]. As SQT provided a momentary enhancement with conventional use of flame aspiration, U-tube technique involved atom trapping and preconcentration. A quartz U-tube was positioned on the laminar flame so that its lower side was in contact with the flame; the source beam was parallel and flush to the upper side of the quartz tube. The trapping tube was parallel to the optical axis, its ends were shaped to form a U-shape to allow entrance and exit for water or air into the system. The technique consisted of the following stages:

i. Pass water through the quartz U-tube so that its surface has a relatively lower temperature as compared with that of flame.

- ii. Apply conventional aspiration of sample as the water is passed. This stage may be called as collection. The analyte species are condensed on relatively cool surface of quartz tube.
- iii. At the end of the collection step, by the help of a manifold, replace cooling water with pressurized air. This will cause rapid heating and release of analyte species back into the flame where a transient absorption signal is obtained and recorded. Although it is not known whether the analyte species re-atomize or re-volatilize from the surface with subsequent atomization in the flame, it would be safer to call this stage revolatilization.

The device is schematically shown in Fig. 8.4.



Fig. 8.4: Water cooled U-tube atom trap and its working principle

This device provided a sensitivity enhancement by 1-2 orders of magnitude depending on the element and collection period. U-tube is probably the first example of atom trapping on quartz surfaces. One important disadvantage was that the source beam had to be very near the atom trap so that there was some obscuration; this resulted in degradation of signal to noise ratio to partially offset the sensitivity enhancements due to preconcentration effect; therefore, slopes of calibration plots were higher as compared with simple flame operation, but the improvement in detection limit values were not as high. Roberts and Turner suggested placing U-tube trap in an SQT device in order to combine the advantages of both techniques; however, the system suffered from water droplets condensing on the cold silica surface, which dropped on SQT, producing excessive amounts of water vapor and thus much noise in signal [20]. Combination of U-tube and SQT was further used and developed by Matusiewicz who named his device as an integrated atom trap (IAT) [21]. Some researchers employed materials other than silica for U-tube atom trap; among these, an example may be given where a stainless steel tarp surface was used [22].

In 1993, during a conference presentation a novel way of releasing analyte species from the surface of silica was presented [23]. In this work, instead of replacing water flow by air, it was suggested that the composition of the flame should be momentarily altered; the authors called this process as flame alteration [23]. The same research group proposed another and simpler way of revolatilization that is called organic solvent aspiration/atomization [24, 25]. The flame alteration approach was applied to SQT device by a Chinese group [26]. From all these studies, SQT atom trapping technique has evolved as an alternative for in situ preconcentration of atoms for sensitivity enhancement with FAAS. A very useful and informative review article by Matusiewicz describes atom traps used in this trail of evolution although it does not include SQT-AT [27].

8.2 Slotted quartz tube atom trap

As described above, SQT has now become an atom trap (SQT-AT) when used in the mode of in situ preconcentration. Its introduction as a novel device [28], studies regarding revolatilization mechanisms [29] and interferences [30] have been reported.

8.2.1 Principles of operation for SQT-AT and important parameters.

In principle, steps of collection and revolatilization are similar with the way U-tube atom trap is used. SQT-AT is used as follows:

- i. Using an optimized flame, sample solution is aspirated while SQT is positioned above the flame. This step usually takes few minutes. Analyte atoms are trapped in the inner surface of SQT.
- ii. A rather low volume, 10-50 μ L, of an organic solvent, often MIBK (methylisobutyl ketone) is introduced to flame. This alters the flame composition for a very short period of time. This is sufficient to release analyte species from quartz surface.
- iii. Revolatilization is followed by rapid atomization and a transient signal is obtained.

Some transient signals using SQT-AT are shown in Fig. 8.5.

Use of SQT-AT offers several advantages because of its simple set-up as well as the novel and easy ways for revolatilization. These are summarized below:

- i. U-tube design suffers from beam obscuration affecting signal to noise ratio adversely. In SQT-AT, the slotted quartz tube can be conveniently designed considering the beam profile of the AA spectrometer. Therefore, there is no beam obscuration and S/N is similar to that in simple flame operation.
- ii. In U-tube atom trap, repetitive heating and cooling causes the tube to soften; momentary sagging alters the zeroing and may cause errors in absorption signal. Use of either flame alteration or organic solvent revolatilization eliminates this effect both in U-tube trap and SQT. Revolatilization takes only few seconds and signal is sharper as compared to water/air system.
- iii. SQT-AT does not require any water or air flow and complex manifolds to control these. The apparatus is as simple as SQT itself as shown in Fig. 8.3.



Fig. 8.5: SQT-AT signals

(i) Organic solvent revolatilization, $100 \ \mu g \ L^{-1} \ Pb$; (ii) Flame alteration, $100 \ \mu g \ L^{-1} \ Pb$; (iii) Organic solvent revolatilization, $10 \ \mu g \ L^{-1} \ Cd$; (iv) Flame alteration, $10 \ \mu g \ L^{-1} \ Cd$; (iv) Flame alteration, $10 \ \mu g \ L^{-1} \ Cd$. Samples were collected at a suction rate of 6.0 mL min⁻¹ for 2.0 minutes [28]

Organic solvent revolatilization should be and was preferred in studies, because it is simpler; flame alteration requires another acetylene gas flow line and a manifold to introduce excess acetylene when needed. Ten to 50 μ L of isobutyl methyl ketone (IBMK) was used in most of the studies. MIBK was used initially as it was readily available; however, other organic solvents such as iso-octane, n-hexane, acetonitrile, acetone, methyl ethyl ketone were also successfully used for organic solvent revolatilization technique. IBMK has been chosen again after some evaluations; as compared with the others, this solvent gave the best performance regarding complete atomization (no memory effects) and the largest linear range for calibration [28].

The following experimental parameters were found to be critical in SQT-AT technique. These must be carefully optimized.

- i. Flame composition. Usually a lean or stoichiometric flame is used.
- ii. Distance between the flame head and SQT.
- iii. Suction rate. It has been found that lower suction rate gives better sensitivity for a defined volume of sample; nebulization efficiency is improved at lower suction rates and so are the trapping efficiency and sensitivity.

Sampling can be performed on basis of time or sample volume. After a decision is taken, either a constant period of time or a defined volume of sample can be used. Suctions of sample can be realized by using a large plastic pipette tip attached to sampling capillary tubing of the flame atomizer. A constant volume of sample is injected into the receiving tip; measurement for period of sampling in this case is not needed. On the other hand, a timing device is needed for constant period of time during which the sampling capillary is inserted into the sample solution. Sampling for all the standard and sample solutions

must be carried out in the same fashion. Adhering to these conditions is necessary to obtain meaningful calibration plots.

Suction rate can be therefore lowered to provide a better sensitivity for a constant volume of sample; although collection in this case will take a longer time. On the other hand, if constant period of time is chosen, lowered suction rate will result in collection of a lower volume and sensitivity will be lowered. Examples of relations between sensitivity and suction rate in both cases are shown in Figs 8.6 and 8.7. It should be remembered that suction rate from solution can be adjusted in only some of the brands of AA spectrometers.

Regarding sensitivity of SQT-AT system, different approaches can be taken based on whether the time or sample is limited; a high suction rate should be preferred in case of the former while just as opposite, a low suction rate is beneficial if limitation is on the latter.

8.2.2 Nonthermal nature of revolatilization.

The process of revolatilization is certainly based on the change in quartz surface temperature when a U-tube atom trap is used. Therefore, in this device, collection is caused by the cooler surface and revolatilization is effected by heating the surface. The mechanisms for collection and revolatilization stages for SQT-AT, are not necessarily the same as those in U-tube trap. Several experiments were designed and performed in order to understand the processes taking place in SQT-AT.



Fig. 8.6: Variation of SQT-AT signal with suction rate of the nebulizer using a constant period of 2.0 min for collection. 4.0 μ g L⁻¹ Cd and 50 μ g L⁻¹ Pb [28]



Fig. 8.7: Variation of SQT-AT signal with suction rate of the nebulizer using a constant volume of 2.0 mL for collection. 4.0 μ g L⁻¹ Cd and 50 μ g L⁻¹ Pb [28]

Although it must be separately optimized for each element, best conditions for collection stage involve usually a lean or stoichiometric air/acetylene flame. At the end of the collection period, either using flame alteration or organic solvent revolatilization techniques, amount of fuel in the flame gases is momentarily increased. Resulting flame is now a reducing flame. At this point, it was questioned whether an increase in temperature or a reduction by flame gases of surface species was more important for revolatilization. First, it was investigated whether any increase in temperature is involved for organic solvent aspiration technique. A hollow quartz tube was located on top of the flame whose composition was chosen for collection. Using a thermocouple inserted, the temperature inside the quartz tube was measured. Then, the organic solvent was aspirated into the flame not in a small and discrete volume, but in a continuous fashion. This experiment was performed for several analytes, results for Pb are shown in Fig. 8.8. The measured temperatures are lower than those experienced in an SQT-AT since there are no slots on the quartz tube. However, the purpose of the experiment has been achieved since the relative changes were important. Both for the case of Pb and for the experiments with other analytes such as Bi, Mn, Au and Cd have shown that introduction of organic solvent into the air/acetylene flame either decreases the temperature or increases it at a rather insignificant level.

It could be, therefore, concluded that the process of revolatilization in SQT-AT using organic solvent aspiration is not thermal. A momentary change in flame composition making it more reducing is probably effective.



Fig. 8.8: Time-temperature profile of Pb collection flame upon aspiration of organic solvents; n-Hex, n-hexane; MEK, methyl ethyl ketone; ACN, acetonitrile, MIBK, isobutyl methyl ketone [29]

Another experiment was designed to test whether a contact between the flame gases and the quartz surface was needed for revolatilization [29]. Illustration of this experiment is given in Fig. 8.9. After the collection in the proper configuration, the SQT was rotated 90° around its longer axis thereby preventing the contact between the quartz surface and the flame. Revolatilization attempts by either flame alteration or organic solvent aspiration failed. The SQT-AT was then rotated by another 90° to assume the original configuration; revolatilization by either technique was then successful. The experiment has clearly shown that a physical contact is needed between the flame gases and quartz surface [29]. This is supportive of the former experiments where it was questioned whether SQT-AT heats up or not during revolatilization using organic solvent aspiration.

8.2.3 Investigations on surface species

Although some idea was obtained regarding the process of revolatilization and its rather chemical and non-thermal character, the nature of analyte species on quartz surface was not known. A series of experiments using X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) has revealed that there is close relation between the oxidation states of the surface species and their standard reduction potentials [31, 32]. U-tube atom trap was used in these experiments. A comparison between Au, Bi and Mn was made where these analytes have different standard reduction potentials, indicating the relative stability of an oxidation state in any environment. A correlation was found indeed, Au with the most positive standard reduction potential value existed as the free metal without any charge. Bismuth existed in forms of Bi0 and Bi3+ while Mn assumed an oxidation state of +2 on the surface. These relations are given in Table 8.2.



Fig. 8.9: Illustration of the experiment to show whether a physical contact between the flame and the quartz surface is needed. Cross section of SQT-AT is shown; point A is a reference for the position of SQT-AT [29]

 Table 8.2: Standard reduction potentials and species on quartz surface [32]

Valency on quartz surface	E_0, \mathbf{V}	
Au^0	+1.42	$Au^{3+} + 3e \Leftrightarrow Au^0$
${\rm Bi}^{3+}, {\rm Bi}^{0}$	+0.32	$\operatorname{BiO}^{+} + 2\operatorname{H}^{+} + 3e \Leftrightarrow \operatorname{Bi}^{0}$
Mn^{2+}	-1.029	$\mathrm{Mn}^{2+} + 3\mathrm{e} \Leftrightarrow \mathrm{Mn}^{0}$

As these are fairly expected results based on redox properties of analytes, there are serious uncertainties regarding the experiments carried out. XPS is not a very sensitive technique; only about a 1% of atoms on the surface can be detected. This level is much higher than what we have on a U-tube trap or SQT-AT. Therefore, quartz surface was loaded with analyte by aspirating a solution containing about 1000 mg L^{-1} for several minutes prior to examination by XPS. The analyte concentration in these experiments, are much higher than the actual level. Therefore, although the results are meaningful in the sense that the species are as expected from their standard reduction potential values, it is difficult to assume that exactly the same species would exist on quartz surface during an actual collection step.

8.2.4 Analytical figures of merit

Some of the analytical figures of merit for SQT-AT system are given in Table 8.3. The detection limits reported come close to the performance of ETAAS. Enhancement values were found by the ratio of characteristic concentration for flame operation to that by SQT-AT. The peak height values were used for the signals. The most important figure of merit here is E, enhancement; because, limit of detection and sensitivity is largely dependent on the age of the instrument and the conditions of the source lamp as these parameters directly affect signal to noise ratio.

Analyte	LOD (3 <i>s</i>), $\mu g L^{-1}$	E (Enhancement)	Conditions of collection	Reference
Cd	0.4	137	$2.0 \text{ min}, 6.0 \text{ mL min}^{-1}$	[28]
Cu	3.7	51	2.0 min, 8.0 mL min ⁻¹	[33]
Pb	3.7	90	$2.0 \text{ min}, 6.0 \text{ mL min}^{-1}$	[28]
Zn	0.8	73	2.0 min, 8.0 mL min ⁻¹	[33]

 Table 8.3: Analytical figures of merit for some analytes

8.2.5 Possibility of application to a vapor generation system

Following the observations that analye atoms can be successfully trapped on the inner surface of SQT, it was then suggested that similar trapping can be done using vapor generation methods and either quartz or metal traps. In some preliminary experiments, slots were opened on a T-tube commonly used in HGAAS, analyte in hydride form was introduced through the inlet arm of the system, some trapping and subsequent revolatilization was observed for antimony.

8.3 Quartz and metal atom traps with vapor generation

8.3.1 Principles of operation, experimental set-ups and important parameters

Following the experiments with vapor generation and SQT in the last section, the next design did consist of a usual HGAAS set-up; some quartz particles obtained by crushing were placed in the inlet arm, near its connection point to the horizontal arm. The location where the quartz particles are positioned served as the trap. This location was heated externally using a resistively heated wire. In a frontier study [34] trapping and signal formation consisted of the following stages:

- i. Lead hydride (PbH₄) was formed by reaction of analyte in HCl solution with sodium tetrahydroborate (III) in a continuous flow (CF) system.
- ii. Analyte vapor separated from liquid stream by a gas-liquid separator (GLS) is directed to quartz T-tube and passes through the trap held at optimized collection temperature (500 °C); some of the analyte hydride molecules are trapped here.
- iii. At the end of collection stage, peristaltic pump and thus analyte flow is stopped.
- iv. The trap is rapidly heated to revolatilization temperature (900 °C), release of analyte species takes place when pumps are reactivated, transporting and mixing HCl carrier and NaBH4 flows to produce H2 gas. Formed volatile species are transported to Ttube quartz atomizer.
- v. Signal is formed and recorded as a result of analyte atomization in measurement zone.

In the first quartz trap design, a few pieces of quartz were used as the trapping location that was heated externally by resistance wires; distance between the T-junction and the quartz trap was optimized as shown in Fig. 8.10. The quartz trap away from the T-junction was termed as separated trap. The flow system is shown in Fig. 8.11 and Pb signals using quartz trap and with CF-HGAAS are shown in Fig. 8.12. It could be easily observed that trap signal is sharp despite external and rather slow heating. Peak height measurements were used that is justified as the peaks are very narrow; half width is less than 0.5 s.



Fig. 8.10: Top view of quartz T-tube with quartz trap that is (a) close to and (b) away from T-junction [34]



Fig. 8.11: Continuous flow system for separated quartz trap with hydride generation for Pb determination [34]



Fig. 8.12: Time profile of atomization signals of Pb: a) using separated quartz trap, 6.0 mL of 1.0 μ g L⁻¹ Pb collected in 60 s; and b) continuous flow HGAAS signals, 1.0 μ g L⁻¹ Pb [34]

It has been found that the most critical analytical parameters for quartz trap are the temperature of trap for collection and revolatilization, position of trap and composition of carrier gas at both stages of collection and revolatilization. Other parameters such as acidity, sample and gas flow rates, length of reaction and stripping coils, design of gas-liquid separator and quartz T-tube atomizer are common to both ordinary HGAAS and Trap-HGAAS systems.

Following the determination of Pb, on-line trapping on quartz surface has been used for determination of Sb both by chemical [35, 36] and electrochemical hydride generation [37]; the technique has also been applied for determination of Bi [38], As and Se [39]. Cold vapor generation (CVAAS) with a quartz trap has been used for determination of Cd where the quartz atom cell was not heated [40].

Another alternative for on-line trapping and HGAAS is using a W-coil as a trap. W-coil atom trap can be resistively heated by passing electricity directly through this device while external heating is required for the quartz trap; therefore, higher heating rates can be achieved for the former. Tungsten coil is taken from a commercial visible tungsten lamp; it can be readily and economically obtained, used and replaced when a new one is needed. The use of a W-coil from a commercial lamp is dated back to 1972 [41]; after the first application there has been a wide interest in use of W-coil as an atomizer [42, 43] mostly as an alternative to graphite furnace. W-coil has been used as a trap for determination of Bi [44] and Se [45] by two independent groups at about the same time. W-coil atom trap has the principals similar to quartz atom trap. The tungsten trap is located in the inlet arm of

a conventional T-tube quartz atomizer. The trap temperature is conveniently adjusted to optimized values for collection and revolatilization stages. W-coil atom trap has also been used for determination of Cd in CVAAS mode [46]. The W-coil trap system is similar to quartz atom trap; a simple flow chart is shown in Fig. 8.13 for Cd determination [46].



Fig. 8.13: Flow chart for W-coil atom trap for Cd using CVAAS [46]



Fig. 8.14: W-coil atom trap details for Cd determination using CVAAS [46]

As mentioned above, temperatures of W-coil trap should be optimized for both collection and revolatilization steps; this feature is common to both quartz and W-coil traps. This is done in a similar fashion to ash-atomize plots of ETAAS. However, although the graph for revolatilization looks like atomization plot, graph for collection does not have any similarity to ash-plots of ETAAS, since at low temperatures trapping does not takes place and there is no analyte in the system when revolatilization cycle is activated. An example for optimization curves for these temperature values is shown in Fig. 8.15.

As a result of data shown in Fig. 8.15, collection and revolatilization temperatures were selected as 110 °C and 850 °C, respectively for W-coil-CVAAS determination of Cd [46].



 Fig. 8.15: Graph for optimization of collection and revolatilization temperatures. A constant revolatilization temperature of 1 000 °C was employed as the col- lection temperature was varied. Similarly, a constant collection temperature of 150 °C was applied during the variation of release (revolatilization) tempe- ratures. The signals were recorded by collecting 0.70 mL of 5.0 μg L⁻¹ Cd in 0.20 mol L⁻¹ HCl solution [46]

Alternative materials have also been suggested for on-line trapping and vapor generation systems using metal traps; molybdenum strip for determination of As and Se [47] and antimony and bismuth [48], resistively heated platinum for Cd [49] and externally heated Au wire for Se [50] can be mentioned among these studies.

On the other hand, research group of Matusiewicz in Poland continues to study on development and applications of integrated atom traps in conjunction with vapor generation techniques; the device has recently been used in determination of Cd and Pb [51], In and Tl [52], Te [53] and Sb [54].

8.3.2 Considerations for carrier gas composition

The main function of carrier gas is to transport gaseous species from gas-liquid separator (GLS) to the observation zone in vapor generation techniques. Ar is most frequently used as it provides the inert atmosphere to protect hydride species from being oxidized. Using trap systems, however, carrier gas has additional functions. Depending on the trap material requirements for carrier gas may be different. For example despite the inert atmosphere provided by argon gas, oxygen is inevitably present in most flow systems; transported water vapor, impurities in Ar and oxygen bearing acids and sample itself are among these oxygen sources. W-coil trap differs from quartz trap regarding the fact that it is easily oxidized as a result of minute amounts of oxygen provided by these mentioned sources. Therefore, H₂ gas must be added at all stages in order to protect W-coil from oxidation. It has been observed that presence of hydrogen gas may have even a healing effect on the oxidized tungsten surfaces, rendering them usable again [44].

Another important function of hydrogen gas, especially in revolatilization step, is its reducing character to help remove the analyte from trap surface; possibly a reduction process is involved. Hydrogen may be directly added to Ar flow from a gas cylinder; on the other hand, it should not be forgotten that mixing of reductant and acid solutions also produce hydrogen gas both in presence and absence of sample. Therefore, a small amount of hydrogen may be introduced during revolatilization by reactivating the solution pumps. If larger amounts are needed, however, this will not be sufficient and external sources must be used.

Since the heating rate of quartz trap is significantly lower as compared to W-coil trap, during the revolatilization step the gas flow may be interrupted by stopping the peristaltic pump; once the trap is heated to its optimum temperature for revolatilization, pumps may be reactivated so that gaseous analyte species are transported by produced hydrogen to obtain a sharp signal. In this case, the half width of the signal depends on the rapid transport of analyte species, rather than their formation.

There is no solid information regarding the chemical nature of analyte species when they are trapped on the surface and also after they are revolatilized. The term revolatilization is used to be on the safe side, because it is not known in most of the cases whether the analyte is revolatilized or atomized as it is released from the trap surface. The exceptions are the use of quartz [40] and W-coil trap [46] in conjunction with CVAAS for Cd determination; in both of these systems the quartz atom cell is not heated. As a matter of fact, the atom cell in these cases does not have to be made of quartz at all; because, the analyte is released from the trap surface in the form of free atoms. During the determination of lead using a quartz separated trap with HGAAS, a small but definite portion of the revolatilized analyte species were found to be atomic [34]. This can be easily investigated by using an unheated quartz atom cell during revolatilization.

Dědina and coworkers had an interesting approach for quartz atom traps; they modulated stream of oxygen and hydrogen gas for collection and revolatilization steps [38, 39]. During collection, by sending excess oxygen to consume the hydrogen in the system efficient trapping was obtained. During revolatilization, oxygen stream was stopped and excess hydrogen was sent to the system for efficient release of analyte species. The authors have reported 99 % overall efficiency for Bi [38].

8.3.3 Analytical figures of merits

Quartz or W-coil atom traps provide detection limits in the order of ng L^{-1} . Some of the examples regarding sensitivity are shown in Table 8.4. Although limit of detection gives a definite idea about the sensitivity of the system, this figure is dependent on the conditions of the spectrometer, especially the source lamp. Improvement in characteristic concentrations may be a better way to express the enhancement in sensitivity. In order to accomplish this, the characteristic concentration for HGAAS measurement should be divided by the same figure for trap-HGAAS. There are, however, difficulties in making this comparison. The HGAAS measurements are in continuous flow (CF) mode and height of the signal in absorbance units is measured. The output of a trap experiment is a transient signal. Although many users use peak height of these signals, some researchers object to this application, suggesting that peak area instead should be taken. When peak area is taken, comparison is not meaningful since HGAAS measurement is based on height. In order to compute efficiency, a flow injection (FI) signal may be obtained by locating a sampling loop on the liquid transport line for conventional HGAAS. Volume of the loop is adjusted so that the height of the signal is the same as the CF signal; characteristic concentration values computed by peak areas of both signals can be used to find efficiency of the system.

An enhancement factor, as a ratio of characteristic concentration values, C_0 , would have some practical value. However, depending on the reproducibility, the enhancement regarding C_0 values and LOD values may be different.

Regarding characteristic mass values, m_0 , when calculated using peak area, this value should not change providing that efficiency of the trap system is 100 % overall as compared to HGAAS measurements.

It may be suggested that HGAAS signal in FI form and transient signal obtained by trap may be used to compute the overall trap efficiency. This will include efficiency factors for trapping and revolatilization of analyte if we assume that the efficiency for atomization is the same for the both systems. Another important factor regarding losses is the distance by which the revolatilized species survive without being lost on the walls of tubing and other parts of the flow system.

		-			
Analyte	Trap	Vapor generation technique	$LOD(3s)$, ng L^{-1}	Reference	
Pb	Quartz	HGAAS	19	[34]	
Sb	Quartz	HGAAS	3.9	[35]	
Cd	Quartz	CVAAS	1.8	[40]	
Bi	W-coil	HGAAS	2.7	[44]	
Cd	W-coil	CVAAS	4.0	[46]	

Table 8.4: Examples from performances for quartz and W-coil atom trapping used with
vapor generation techniques

8.3.4 Discussions on trapping efficiency

During Bi determination by W-coil atom trap and HGAAS, it was found that the revolatilized species could be efficiently transported through a tubing as long as 200 cm between the trap and the atomizer; as this distance was varied from 10 to 200 cm, peak height decreased significantly to one third of its starting point but the peak area did not change much, indicating an efficient analyte transport with broadening [44]. Providing that the distance between the trap and the atomizer is small, the loss during the transport was not significant for this case; however, this point should be validated for each analyte and trap system.

If we assume that the efficiency consists of collection and revolatilization in a trap system, then the comparisons of peak areas from HGAAS may give an idea about the overall trap efficiency. However, such comparisons will have errors since the gas flows during HGAAS operation and trap operation are usually different. Therefore the conditions in measurement zone are not the same.

Dědina and co-workers have reported total efficiencies of 50 % and 70 % for As and Se, respectively [39], while this figure was 98 % for Bi [38]; gas flows and compositions were held constant for the cases to be compared.

8.3.5 Suggested criteria for analytical figures of merit for atom traps

Several criteria have been used to show the sensitivity enhancement obtained using traps. Ratio of LOD values certainly is valid one as both the slope of calibration plot (calibration sensitivity) and reproducibility of the system is taken into consideration.

Another approach is to compute an enhancement factor, E, by taking the ratio of characteristic concentration values for the systems with and without the trap. Since LOD will be dependent on the conditions of the spectrometer and the intensity and noise level of the source beam, the value E may be a better measure of enhancement.

However, as the values in Table 8.4 are considered, it becomes more difficult to make a direct comparison, because authors usually select the sample volume and/or the sampling time quite arbitrarily. During discussions in articles, most authors state that the enhancement could be even better if a larger volume or longer period of time for sampling were used. This may be true, however, in most of the cases blank values put a practical limit to sample size and time; therefore, the enhancement can never be infinitely improved. In this text, a proposal will be made regarding a healthy comparison of enhancement values.

<i>E</i> :	Enhancement factor (ratio of characteristic concentrations)

 E_t or $E_t = 1$ E/minutes of sampling unit: min⁻¹

 E_v or $E_v = 1$ E/milliliters of sample unit: mL⁻¹

Table 8.5 has been constructed by using some data from Table 8.4 with some additions.

Table 8.5: Comparison of some trap performances using E_t and E_v values.Q: quartz, W: tungsten trap

Analyte	Trap-	E_t	E_{v}	Ε	t, min	V, mL	LOD (3 <i>s</i>)	Reference
	technique	\min^{-1}	mL^{-1}				ng L^{-1}	
Pb	Q-HGAAS	10	1.7	10.3	1.0	6	19	[34]
Cd	Q-CVAAS	2.4	1.2	7.18	3.0	6.0	1.8	[40]
Bi	W-HGAAS	43	7.2	130	3.0	18	2.7	[44]
Cd	W-CVAAS	16	7.4	31	2.0	4.2	4.0	[46]
Bi	Q-HGAAS	106	27	530	5.0	20	3.9	[38]

The proposed terminology allows a better comparison of enhancement values and will be helpful to have decision in cases where time or sample is limited.

8.4 Conclusions

Quartz and W-coil traps used in conjunction with vapor generation techniques provide a novel way of trace analysis. Detection limits are almost comparable to those obtained by ICPMS in many occasions. However, there are still many unknowns regarding mechanisms of collection and revolatilization. Powerful on-line surface techniques may be helpful in solving some of the problems.

These devices also offer very economical alternatives for trace analysis. A simple AA flame spectrometer, a peristaltic pump and simple gadgets made from quartz and metal are all needed. The problems are also challenging for the interested researcher.

REFERENCES

- 1. A.Walsh, The application of atomic absorption spectra to chemical analysis, Spectrochim. Acta 7 (1955) 108-117.
- C.Th.J. Alkemade and J.M.W. Milatz, Double-beam method of spectral selection with flames, J. Opt. Soc. Am. 45(1955) 583-584.
- 3. B.V. L'vov, The analytical use of atomic absorption spectra, Spectrochim. Acta 17 (1961) 761-770.

- 4. W.R. Hatch and W.L. Ott, Determination of sub-microgram quantities of mercury by atomic absorption spectrophotometry, Anal. Chem. 40 (1968) 2085-2087.
- 5. M. Prugger and R. Torge, Patent, Ger. Offen. DE,1,964,469, 1969.
- 6. S.R. Koirtyohann, Background corrections in long path atomic absorption spectrometry, Anal. Chem. 37 (1965) 601-603.
- 7. W. Holak, Gas-sampling technique for arsenic determination by atomic absorption spectrophotometry, Anal. Chem. 41 (1969) 1712-1713.
- 8. A.T. Zander, T.C. O'Haver and P.N. Keliher, Continuum source atomic absorption spectrometry with high resolution and wavelength modulation, Anal. Chem. 48 (1976) 1166-1175.
- 9. A.T. Zander, T.C. O'Haver and P.N. Keliher, Correction for interferences of spectral origin with continuum source, Echelle wavelength modulated atomic absorption spectrometry, Anal. Chem. 49 (1977) 838-842.
- 10. S.B. Smith, Jr. and G.M. Hieftje, A new background-correction method for atomic-absorption spectrometry, Appl. Spectrosc. 37 (1983) 419-424.
- 11. J.D. Ingle, Jr. and S.R. Crouch, Spectrochemical Analysis, Prentice-Hall, New Jersey, 1988, p. 229.
- 12. A.Welz and M. Sperling, Atomic Absorption Spectrometry, 3rd edn., Wley-VCH, New York, 1999.
- 13. J. Dědina and D.L. Tsalev, *Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry*, Wiley&Sons, Chicester, 1995.
- 14. K. Fuwa and B.L. Vallee, The physical basis of analytical atomic absorption spectrometry. The pertinence of the Beer-Lambert law, Anal. Chem. 35 (1963) 942-946.
- 15. H.T. Delves, A micro-sampling method for the rapid determination of lead in blood by atomicabsorption spectrometry, Analyst 95 (1970) 431-438.
- 16. R.J. Watling and D.J. de Villiers, A slotted quartz tube for increasing sensitivity in flame absorption analysis, Special Report FIS 108, National Physical Research Laboratory, CSIR, Pretoria, South Africa, August 1977.
- 17. R. J. Watling, Use of a slotted quartz tube for determination of arsenic, antimony, selenium and mercury, Anal. Chim Acta 94 (1977) 181-186.
- 18. M. Yaman, Determination of cadmium and lead in human urine by STAT-FAAS after enrichment on activated carbon, J. Anal. At. Spectrom. 14 (1999) 275-278.
- 19. A.Lau, A. Held and R. Stephens, Sensitivity enhancement to flame AAS by use of a flame atom trap, Can. J. Spectrosc. 21 (1976) 100-104.
- 20. A.D. Turner and D.J. Roberts, Metal determinations with a novel slotted-tube water cooled atom trap, J. Anal. At. Spectrom. 11 (1996) 231-234.
- H. Matusiewicz and M. Kopras, Methods for improving the sensitivity in atom trapping flame atomic absorption spectrometry: Analytical scheme for the direct determination of trace elements in beer, J. Anal. At. Spectrom. 12 (1997) 1287-1291.
- H. Sun, L. Yang, D. Zhang and J. Sun, Direct determination of cadmium at parts-per-billion level in waters by derivative atomic absorption spectrometry using atom trapping technique, Talanta 44 (1997) 1979-1986.
- 23. N. Ertaş, R.S. Helles, S. Kumser and O.Y. Ataman, "Alternative Atomization Techniques in Atom Trapping Atomic Absorption Spectrometry", Federation of Analytical Chemistry and Spectroscopy Societies, FACSS XX, Annual Conference, October 17-22, 1993, Detroit, Michigan, USA.
- 24. Suat Kumser, M.S., "Atom Trapping Atomic Absorption Spectrometry Using Organic Solvent Atomization", Middle East Technical University, Ankara, Turkey, 1995.
- 25. S. Kumser, N. Ertaş, D. Karadeniz, R.S. Helles, H. Çalık and O.Y. Ataman, Atom Trapping AAS Using Organic Solvent Atomization Federation of Analytical Chemistry and Spectroscopy Societies, FACSS XXIII, Annual Conference, September 29-October 4, 1996, Kansas City, Missouri, USA.
- 26. G. Huang, S. Qian and H. Yang, Study of slotted quartz tube atom-trapping atomic absorption spectrometry, Ziran Kexueban Hua Xue Fen Xi 41 (1995) 707-712.
- 27. H. Matusiewicz, Atom trapping and in situ preconcentration techniques for flame atomic absorption spectrometry, Spectrochim. Acta, Part B 52 (1997) 1711-1736.
- 28. N. Ertaş, D. Korkmaz, S. Kumser and O. Y. Ataman, Novel Traps and Atomization Techniques for Flame AAS, J. Anal. At. Spectrom. 17 (2002) 1415-1420.
- 29. A.Korkmaz, S. Kumser, N. Ertaş, M. Mahmut and O.Yavuz Ataman, Investigations on Nature of Revolatilization from Atom Trap Surfaces in Flame AAS", J. Anal. At. Spectrom. 17 (2002) 1610-1614.
- A.Korkmaz, M. Mahmut, R. Helles, N. Ertaş and O. Yavuz Ataman, "Interference Studies in Slotted Silica Tube Trap Technique", J. Anal. At. Spectrom. 18 (2003) 99-104.
- Ş. Süzer, N. Ertaş, S. Kumser and O. Y. Ataman, X-ray Photoelectron Spectroscopic Characterization of Au Collected with Atom Trapping on Silica for Atomic Absorption Spectrometry, Appl. Spectrosc. 51 (1997) 1537-1539.

- 32. Ş. Süzer, N. Ertaş and O. Y. Ataman, "XPS Characterization of Bi and Mn Collected on Atom-Trapping Silica for AAS", Appl. Spectrosc. 53 (1999) 479-482.
- 33. Rafik Sobhy Helles, M.S. thesis, "Interference Studies in Atom Trapping Atomic Absorption Spectrometry", Middle East Technical University, Ankara, Turkey, 1993.
- 34. D. K. Korkmaz, N. Ertaş and O. Y. Ataman, A novel silica trap for lead determination by hydride generation atomic absorption spectrometry, Spectrochim. Acta Part B 57 (2002) 571-580.
- D. Korkmaz, J. Dědina and O. Y. Ataman, Stibine preconcentration in a quartz trap with subsequent atomization in the quartz multiatomizer for atomic absorption spectrometry, J. Anal. At. Spectrom. 19 (2004) 255-259.
- 36. J. Kratzer and J. Dědina, In situ trapping of stibine in externally heated quartz tube atomizers for atomic absorption spectrometry, Spectrochim. Acta Part B 60 (2005), 859-864.
- I. Menemencioğlu, D. Korkmaz and O. Y. Ataman, Determination of antimony by using a quartz atom trap and electrochemical hydride generation atomic absorption spectrometry, Spectrochim. Acta Part B 62 (2007) 40-47.
- 38. J. Kratzer and J. Dědina, In situ trapping of bismuthine in externally heated quartz tube atomizers for atomic absorption spectrometry, J. Anal. At. Spectrom. 21 (2006) 208-210.
- 39. J. Kratzer and J. Dědina, Arsine and selenium hydride trapping in a novel quartz device for atomic absorption spectrometry Anal. Bioanal. Chem., 388 (2007) 793-800.
- 40. D. Korkmaz, C. Demir, F. Aydın and O. Y. Ataman, Cold vapor generation and on-line trapping of cadmium species on quartz surface prior to detection by atomic absorption spectrometry, J. Anal. At. Spectrom. 20 (2005) 46-52.
- 41. M. Williams and E.H. Piepmeier, Commercial tungsten filament atomizer for analytical atomic spectrometry, Anal. Chem. 44 (1972) 1342-1344.
- 42. H. Berndt and G. Schaldach, Simple low-cost tungsten-coil atomizer for electrothermal-atomic absorption spectrometry, J. Anal. At. Spectrom. 3 (1988) 709-712.
- P.J. Parsons, H.C. Qiao, K.M. Aldous, E. Mills and W. Slavin, A low-cost tungsten filament atomizer for measuring lead in blood by atomic absorption spectrometry, Spectrochim. Acta Part B 50 (1995) 1475-1480.
- 44. O. Cankur, N. Ertaş and O. Y. Ataman, Determination of bismuth after on-line preconcentration by trapping on resistively heated W-coil and hydride generation atomic absorption spectrometry J. Anal. At. Spectrom. 17 (2002) 603-609.
- A. Barbosa Jr., S. Simião de Souza and F. J. Krug, In situ trapping of selenium hydride in rhodiumcoated tunsten coil electrothermal atomic absorption spectrometry, J. Anal. At. Spectrom. 17 (2002) 382-388.
- 46. O. Cankur and O. Y. Ataman, Chemical vapor generation of Cd and on-line preconcentration on resistively heated W-coil prior to determination by atomic absorption spectrometry using unheated quartz absorption cell, J. Anal. At. Spectrom. 22 (2007) 791-799.
- Dočekal, Ş. Güçer and A. Selecká, Trapping of hydride elements within miniature electrothermal devices: Part 1. Investigation of collection of arsenic and selenium hydrides on a molybdenum foil strip, Spectrochim. Acta Part B 59 (2004) 487-495.
- 48. P Krejči, B. Dočekal and Z Hrušovská, Trapping of hydride elements within miniature electrothermal devices: Part 3. Investigation of collection of antimony and bismuth on a molybdenum foil strip following hydride generation, Spectrochim. Acta Part B 61 (2006) 444-449.
- 49. Osama İsmail, M.S. thesis, "Determination of Cadmium by Cold Vapour Generation Atom Trapping Atomic Absorption Spectrometry", Middle East Technical University, Ankara, Turkey, 2000.
- 50. X.-M. Guo and X.-W Guo, Determination of ultra-trace amounts of selenium by continuous flow hydride generation AFS and AAS with collection on gold wire, J. Anal. At. Spectrom. 16 (2001) 1414-1418.
- A.Matusiewicz and M. Krawczyk, Determination of cadmium and lead in reference materials by volatile species generation with in situ trapping in flame atomic absorption spectrometry, Microchem. J. 83 (2006) 17-23.
- 52. A. Matusiewicz and M. Krawczyk, Hydride generation-in situ trapping-flame atomic absorption spectrometry hybridization for indium and thallium determination, J. Braz. Chem. Soc. 18 (2007) 304-311.
- A. Matusiewicz and M. Krawczyk, Determination of tellurium by hydride generation with in situ trapping flame atomic absorption spectrometry, Spectrochim. Acta Part B (2007), doi:10.1016/j.sab.2006.12.003
- 54. H. Matusiewicz and M. Krawczyk, Determination of total antimony and inorganic antimony species by hydride generation in situ trapping flame atomic absorption spectrometry: a new way to (ultra)trace speciation analysis, J. Anal. At. Spectrom. (2007) DOI:10.1039/b710460j.

9. ATOMOVÉ ABSORPČNÍ A FLUORESCENČNÍ DETEKTORY PRO SPECIAČNÍ ANALÝZU ZALOŽENOU NA GENEROVÁNÍ TĚKAVÝCH SLOUČENIN

RNDr. Jiří Dědina, CSc., Ústav analytické chemie AV ČR, v.v.i., Praha

dedina@biomed.cas.cz,

Podle platné definice [1] se speciační analýzou rozumí analytické aktivity směřující k identifikaci nebo ke stanovení jedné nebo více jednotlivých chemických specií ve vzorku. Chemická species je specifická forma prvku definovaná izotopickým složením, elektronickým nebo oxidačním stavem, případně strukturou komplexu nebo molekuly. Speciace nějakého prvku znamená rozložení jednotlivých definovaných chemických specií tohoto prvku v daném systému.

Teprve nedávné dramatické pokroky v instrumentaci, především v oboru hmotnostní a atomové spektrometrie daly analytickým chemikům nástroj, který jim umožňuje se vypořádat s nároky řady vědních disciplin (od farmakologie a nejrůznějších lékařských disciplín přes vědy o životním prostředí až po zemědělské vědy) na speciační analýzu prvků ve stopových a ultrastopových koncentracích. Všechny aspekty speciační analýzy jsou diskutovány v nedávno vydaných knihách [2-5].

Z výše uvedené definice plyne, že za "kvalitativní" nebo "identifikační" speciační analýzu můžeme považovat analytické aktivity vedoucí k identifikaci jednotlivých chemických specií ve vzorku, kdežto za "kvantitativní" speciační analýzu aktivity směřující ke stanovení koncentrace (nebo hmoty) jedné nebo více z identifikovaných chemických specií ve vzorku. V tomto textu se věnujeme pouze kvantitativní speciační analýze a proto adjektiv kvantitativní nebude nadále uváděn. Vlastní provedení speciační analýzy se obvykle skládá ze dvou kroků. Prvním krokem je separace jednotlivých specií. K tomu jsou obvykle využívány chromatografické nebo elektromigrační techniky. Druhým krokem je detekce - stanovení příslušného prvku ve frakci vzorku obsahující příslušnou species. K tomu jsou obvykle využívány metody analytické atomové spektrometrie. Tyto oba kroky speciační analýzy mohou v principu být provedeny s časovým odstupem - off-line. Výhodnějším přístupem ke speciační analýze je "on-line" uspořádání, obvykle označované v literatuře jako "hyphenated" technika.

Existuje mnoho variant pro on-line spojení separační techniky s prvkově specifickým detektorem zahrnující různé typy HPLC nebo elektromigračních metod pro separaci a atomové spektrometrie pro detekci. Výběr separační techniky i detektoru je dán charakterem analyzovaného materiálu, analytem a požadavky na rozlišení jednotlivých specií a jejich koncentrací ve vzorku. Pro separaci lze použít i kombinace dvou nebo i více separačních zařízení zapojených za sebou. Výběr prvkově selektivního detektoru je kritický v tom případě, kdy koncentrace analytu ve vzorku je velmi nízká a vyžaduje patřičně nízký detekční limit. Důležitá je i konstrukce vlastního spojení mezi separačním zařízením a spektrometrem.

Účelem tohoto textu není probrat speciační analýzu obecně, ale věnovat se těm přístupům ke speciační analýze, které využívají generování těkavých sloučenin a atomovou absorpční spektrometrii (AAS) případně atomovou fluorescenční spektrometrii (AFS) jako detekční metodu.

Pro metody atomové spektrometrie obecně platí, že vzorek může být přiváděn do atomizátoru/detektoru buď v kondenzované, nebo v plynné fázi. K převedení analytu do plynné fáze se obvykle využívá generování těkavých sloučenin, které spočívá v selektivním převedení analytu z kapalného vzorku do plynné fáze pomocí vhodné chemické reakce vedoucí ke vzniku těkavé sloučeniny analytu. Generování těkavých sloučenin vděčí za svoji popularitu poměrné jednoduchosti a nízké ceně potřebného vybavení. Jeho hlavní předností je separace analytu od matrice vedoucí k významnému potlačení interferencí při atomizaci/detekci. Kromě toho vysoká účinnost transportu analytu ze vzorku do detektoru poskytuje mimořádnou detekční mohutnost. Proto i AAS detektor, a tím spíše inherentně citlivější AFS, může ve spojení s generováním těkavých sloučenin poskytnout detekční limity dostatečně nízké pro řešení širokého spektra aplikací speciační analýzy. Ačkoliv jako detektory pro speciační analýzu založenou na generování těkavých sloučenin mohou být použity všechny metody analytické atomové spektrometrie v čele s nejcitlivější, ale i nejnákladnější hmotnostní spektrometrií buzenou indukčně vázaným plazmatem (ICPMS), výhodou AAS i AFS jsou nízké investiční i provozní náklady.

Potenciál generování těkavých sloučenin pro "klasická" stanovení celkového obsahu prvků i pro speciační analýzu tedy spočívá v dosažení vynikající citlivosti s relativně jednoduchou a lacinou instrumentací. Specifickou výhodou generování těkavých sloučenin pro speciační analýzu je, že kromě obvyklého schématu speciační analýzy separace + detekce umožňuje dva další přístupy, jak je podrobně rozvedeno níže.

Nejčastěji generovanou skupinou těkavých sloučenin jsou kovalentní binární hydridy As, Bi, Ge, Pb, Se, Sb, Sn a Te. Vedle binárních hydridů má větší analytický význam generování atomárních par Hg a Cd, methyl substituovaných hydridů a ethylderivátů. Kovalentní binární hydridy a methyl substituované hydridy v tomto textu slouží jako modely pro všechny těkavé sloučeniny, protože tyto hydridy tvoří nejdůležitější skupinu těkavých sloučenin. Kromě toho prakticky všechny novinky ve speciační analýze založené na generování těkavých sloučenin byly vyvinuty a testovány na těchto hydridech. Proto se v násle-
dujícím textu hovoří výhradně o hydridech, i když mnohé závěry platí pro těkavé sloučeniny obecně.

Jednotlivé přístupy k využití generování hydridů pro speciační analýzu budou probrány níže. Předtím budou shrnuty ty poznatky o generování a atomizaci hydridů pro AAS a AFS, které jsou užitečné pro speciační analýzu. Pro kompletní popis teorie, instrumentace, metodologie a aplikací generování a atomizace hydridů viz monografii [6] a novější přehledná sdělení [7-28].

9.1 Generování hydridů

Generování spočívá v uvolnění hydridu z roztoku vzorku (t.j. v konverzi analytu na hydrid a v jeho přechodu do plynné fáze) a v transportu uvolněného hydridu proudem nosného plynu do atomizátoru. Kvůli maximálnímu uvolnění hydridu musí být vzorek náležitě připraven. Tab. 9.1 podává přehled analyticky důležitých hydridotvorných prvků a optimálních podmínek pro jejich konverzi na příslušné binární hydridy. V dalších odstavcích této pasáže je diskutováno uvolnění hydridu z roztoku, transport hydridu a experimentální přístupy ke generování hydridů.

	Optimální oxi- dační číslo	Optimální acidita reakční směsi vyjádřená jako pH nebo jako konc. HCl	Hydrid	
Analyt			název	vzorec
antimon	Sb(III)	pH 9 až 9 mol l^{-1}	stiban	SbH ₃
arsen	As(III)	pH 6 až 9 mol l ^{–1}	arsan	AsH_3
bismut	Bi(III)	pH 6 až 9 mol l ⁻¹	bismutan	BiH ₃
germanium	Ge(IV)	pH 7 až pH 1	german	GeH ₄
olovo	Pb(II)	pH 2 až pH 1	plumban	PbH ₄
selen	Se(IV)	0,2 až 9 mol l^{-1}	selan	SeH ₂
telur	Te(IV)	0,2 až 7 mol l ⁻¹	tellan	TeH ₂
cín	Sn(II); Sn(IV)	0,1 až 1 mol l ⁻¹	stannan	SnH ₄

Tab. 9.1: Hydridotvorné prvky

9.1.1 Uvolnění hydridu z roztoku

Ke konverzi analytu na hydrid se prakticky výhradně používá redukce tetrahydroboratem sodným (NaBH₄) v kyselém (obvykle HCl) prostředí. Za těchto podmínek dochází k postupné hydrolýze tetrahydroboratu. Konečnými produkty jsou kyselina boritá a vodík. Podle nejnovějších poznatků je analyt postupně redukován meziprodukty hydrolýzy tetrahydroboratu na příslušný hydrid (viz tab. 9.1). Technicky je redukce obvykle prováděna smícháním kyselého vzorku s roztokem tetrahydroboratu tak, aby reakční směs byla kyselá i po proběhnutí reakce. Hrubý odhad optimální acidity reakční směsi pro jednotlivé analyty je uveden v tab. 9.1. K redukci je používán alkalický (obvykle s přídavkem NaOH) roztok tetrahydroboratu. Tetrahydroborat je vzhledem k analytu obvykle přidáván v mnohařádovém přebytku. Plynný vodík vznikající jeho rozkladem (z 1 g tetrahydroboratu vznikne asi 2,4 l vodíku) pomáhá uvolnit vznikající hydrid do plynné fáze. Pokud je analyt převeden do anorganické formy s optimálním oxidačním číslem (viz tab. 9.1), jsou hydridy v nepřítomnosti interferentů uvolněny s účinností blížící se 100 %.

9.1.2 Transport hydridu uvolněného z reakční směsi

Hydrid uvolněný z reakční směsi je transportován proudem nosného plynu do atomizátoru. Obvykle je užíván argon nebo dusík. V případě kolekce vymrazováním (viz níže) se užívá helium. Při transportu může docházet ke ztrátám sorpcí nebo rozkladem hydridu na površích, s kterými přichází transportovaný hydrid do styku. V optimalizovaném uspořádání lze transportním ztrátám prakticky zamezit. Optimalizace zahrnuje volbu dostatečně velkého průtoku nosného plynu, minimalizaci povrchu aparatury přicházejícího do styku s hydridem a eventuálně sililaci skleněných součástí. Trubice sloužící k transportu by měly být co nejkratší a co nejužší. Příliš úzké hadičky však způsobují nežádoucí přetlak v aparatuře; nejvhodnější vnitřní průměr je proto kolem 1 mm.

Spolu s hydridem se do proudu nosného plynu obvykle dostává jisté množství spreje reakční směsi. Usazování kapiček spreje, jakožto i kondenzace vodní páry na stěnách hadiček vede ke ztrátám transportovaných hydridů. Sprej i vodní pára mohou kromě toho negativně ovlivnit funkci atomizátorů. Proto je žádoucí zamezit tvorbě spreje. Elegantní metodou jak se zbavit spreje je využít membránového separátoru fází [6] nebo "hygroscopic membrane dryer tube". Další možností je nechat procházet generovaný hydrid spolu s proudem nosného plynu přes membránu propouštějící plyny, ale ne kapalinu.

9.1.3 Metody generování hydridů

Experimentální uspořádání generování hydridů zahrnuje vlastní reakci vzorku s tetrahydroboratem, separaci plynné fáze od reakční směsi a event. kolekci hydridu. Generování může být realizováno v uspořádání dávkovém nebo průtokovém. Průtokové uspořádání je buď kontinuální, nebo flow injection (FI). Generovaný hydrid může být veden přímo k atomizaci (přímý přenos), nebo může být veden do kryogenní pasti, kde je shromažďován a z kterého je najednou uvolněn až po ukončení reakce vzorku s tetrahydroboratem (kolekce).

Jednotlivé metody generování hydridů jsou detailněji popsány v následujících odstavcích.

9.1.4 Dávkové generování

Dávkový generátor je nádoba sloužící jako reaktor a současně jako separátor fází. Dávka okyseleného vzorku je umístěna dovnitř a roztok tetrahydroboratu je pak přidán buď pomocí peristaltické pumpy nebo manuálně injekční stříkačkou. Nosný plyn je přidáván zpravidla do volného objemu generátoru. Uvolněný hydrid je pak transportován proudem nosného plynu spolu s vodíkem tvořeným rozkladem tetrahydroboratu do atomizátoru. Po skončení reakce je zreagovaná směs odstraněna do odpadu a generátor je vypláchnut a pak může být přidána další dávka vzorku. Dávkový generátor tedy slouží jako reaktor i jako separátor plynů od kapalné reakční směsi. Jinými slovy, dávkové generování zahrnuje diskontinuální uspořádání chemické reakce i diskontinuální uspořádání fyzikální separace plynné fáze od kapaliny. Koncentrace kyseliny, tetrahydoboratu a jednotlivych mezipro-duktů hydrolýzy tetrahydroboratu se tudíž mění s časem. Toto uspořádání evidentně zne-snadňuje kontrolu či ovlivňování chemických reakcí vedoucích ke konverzi analytu na hydrid.

9.1.5 Průtokové uspořádání generování hydridů

Schéma kontinuálního generátoru ukazuje obr. 9.1. Konstantní tok vzorku je míchán s konstantním tokem reakčního média a posléze i roztoku tetrahydroboratu a reagující směs pak protéká reakční cívkou, která slouží k tomu, aby směs měla dost času k reakci a uvolnění hydridu z kapalné do plynné fáze. Proud nosného plynu je přiváděn obvykle za reakční cívkou. Průtok nosného plynu musí být zvolen s ohledem na optimální funkci atomizátoru - obvykle mezi 50 a 500 ml min⁻¹. Obecně totiž platí, že citlivost atomizátoru (definici viz níže) klesá se stoupajícím celkovým průtokem plynů. Reakční směs přichází z reakční cívky do separátoru fází, kde plynná fáze sestávající se z hydridu, vodíku vzniklého rozkladem tetrahydroboratu a z nosného plynu je oddělena od zreagované kapaliny, která je vedena do odpadu.

Uspořádání FI generátoru je analogické jako pro kontinuální generování s jediným rozdílem: konstantní tok vzorku je nahrazen tokem nosiče, což je obvykle zředěná kyselina chlorovodíková. Do proudu nosiče je speciálním dávkovacím ventilem injektován malý objem vzorku a následně dochází k jeho disperzi v proudu nosiče.



Obr. 9.1: Schéma kontinuálního uspořádání

Principálním rysem průtokového uspořádání generování hydridů je kontinuální uspořádání vlastní reakce vzorku s tetrahydroboratem, ale i separace plynné fáze od reakční směsi. Koncentrace kyseliny, tetrahydroboratu a jednotlivých meziproduktů hydrolýzy tetrahydroboratu se mění po délce reakční cívky, ale s časem se rozložení těchto koncentrací nemění. Toto je příznivá situace pro kontrolu či ovlivňování chemických reakcí vedoucích ke konverzi analytu na hydrid.

U většiny průtokových generátorů jsou průtoky redukčního činidla a vzorku (nosiče) mezi 1 a 10 ml min⁻¹. Po dosažení rovnovážného stavu je u kontinuálních generátorů tok hydridu (a tudíž i pozorovaný signál) konstantní, což samozřejmě neplatí pro FI generátory. Zde je tvar signálu dán disperzí vzorku v kapalné fázi před separátorem fází a disperzí hydridu v plynné fázi mezi separátorem fází a atomizátorem. Pozorovaný signál má tvar nesymetrického píku se strmou náběžnou hranou a s obvykle méně strmou sestupnou hranou. Jeho výška, vždy menší než u kontinuálního generování, je dána rozsahem disperze v kapalné i plynné fázi. Zvýšení signálu při FI generování (a tím i zvýšení citlivosti) lze dosáhnout zvýšením objemu injektovaného vzorku. Pro dostatečně velký objem lze dosáhnout ustáleného signálu a FI generování přechází na kontinuální generování. Je zřejmé, že kontinuální generování je mezním případem FI generování, proto nemá smysl považovat tyto metody za striktně odlišné.

Citlivost měření při kontinuálním generování stoupá se stoupajícím tokem hydridu a s klesajícím celkovým průtokem plynů z generátoru do atomizátoru. Tok hydridu může být zdánlivě snadno zvýšen zvýšením průtoku vzorku do generátoru, avšak i průtok tetrahydroboratu musí být úměrně zvýšen, aby se nesnížila účinnost uvolnění hydridu. Zvýšení průtoku tetrahydroboratu vede pak ke zvýšení průtoku vodíku vzniklého jeho rozkladem, což přispívá k celkovému průtoku plynů z generátoru do atomizátoru. Zvyšování průtoků reagencií je kromě toho limitováno velikostí volného objemu separátoru fází, protože zvyšování průtoku zvyšuje požadavek na velikost volného objemu, aby nedocházelo k nadměrnému strhávání reakční směsi ze separátoru. Separátory fází mohou být podle principu jejich fungování rozděleny do několika skupin. Pro speciační analýzu s AAS a AFS detektory mají praktický význam separátory (i) hydrostatické a (ii) s nuceným odtahem.

Hydrostatické separátory jsou v principu sifony, často ve tvaru U-trubice (obr. 9.2), kde sloupec kapaliny vyrovnává malé tlakové fluktuace v aparatuře. Plynná fáze odchází do atomizátoru z levého ramene, kdežto zreagovaná kapalina přepadává pravým ramenem do odpadu. Existuje řada modelů hydrostatických separátorů lišících se designem, ale princip jejich funkce je stejný jako u modelu na obr. 9.2. Hydrostatické separátory jsou velmi oblíbené kvůli své jednoduchosti. Jejich nevýhodou je zejména to, že mohou vykompenzovat jen velmi malý přetlak v aparatuře. Proto se nehodí pro kolekci vymrazováním (viz níže). Kvůli velkému vnitřnímu objemu a jím způsobené disperzi nejsou příliš vhodné ani pro FI generování.



Obr. 9.2: Hydrostatický separátor

Separátory s nuceným odtahem jsou uzavřené nádobky, z kterých je odpad odčerpáván peristaltickou pumpou. Jeden z komerčních modelů separátoru s nuceným odtahem je na obr. 9.3. Vnitřní objem separátorů s nuceným odtahem je obvykle velmi malý, což je dělá velmi vhodnými pro FI generování. Tyto separátory mohou pracovat s poměrně velkým přetlakem a proto jsou jedinou volbou při kolekci vymrazováním (viz níže). To proto, že zařazení kryogenní pasti obvykle způsobuje přetlak v aparatuře, který hydrostatické separátory nemohou vykompenzovat. Odolnost separátorů s nuceným odtahem vůči přetlaku umožňuje také vložit na výstup plynné fáze ze separátoru membránu propouštějící plyny, ale ne kapalinu, což zabrání transportu spreje (viz výše). Nevýhodou separátorů s nuceným odtahem je, že vyžadují další pumpu nebo alespoň její další kanál pro odtah kapalné fáze. Kromě toho odtah ze separátoru musí být (především kvůli pěnění) o něco vyšší než přívod kapalin do separátoru, což vede ke ztrátám hydridu. Těmto ztrátám lze zabránit jen diskon-tinuálním módem operace separátoru.



Obr. 9.3: Separátor s nuceným odtahem

9.1.6 Diskontinuální mód operace separátoru fází

Ztrátám hydridu v separátorech s nuceným odtahem lze zabránit diskontinuálním uspořádáním separace plynné fáze od reakční směsi: reakční směs není pumpou kontinuálně odváděna za separátoru do odpadu, ale hromadí se po celou dobu generování vzorku v separátoru. Zreagovaná směs kapalin je ze separátoru odtažena pumpou až po skončení generování hydridu ze vzorku. K tomu je samozřejmě třeba použít separátor s dostatečně velkým vnitřním objemem. Toto uspořádání je výhodné především pro kolekci vymrazováním.

9.1.7 Kolekce vymrazováním

Ke kolekci vymrazováním slouží kryogenní past, obvykle U-trubice, většinou s chromatografickou náplní, ponořená v kapalném dusíku. Vodík a nosný plyn (helium) prochází, zatímco hydridy jsou zadrženy. Následně, po ohřevu kryogenní pasti, je zachycený hydrid uvolněn a proudem nosného plynu transportován do atomizátoru. Hlavní předností kolekce vymrazováním je, že lze zachytit hydrid z velkého objemu vzorku a tím dosáhnout vysoké citlivosti. Objem zpracovaného vzorku je limitován pouze schopností aparatury zvládnout příslušné množství vodní páry a spreje, transportovaných spolu s hydridem ze separátoru fází. Uvolnění vymrazeného hydridu je komplexní chromatografický proces, takže pro dosažení uspokojivé přesnosti musí být pracovní postup optimalizován.

9.2 Atomizace hydridů

V atomizátoru je hydrid převeden na volné atomy. Důležité je, že zastoupení jednotlivých forem (sloučenin) analytu v hydridových atomizátorech je daleko od termodynamické rovnováhy: volné atomy jsou za pracovních teplot hydridových atomizátorů "termodynamicky zakázány". Z toho plyne, že atomizace hydridů není termický proces - hydridy jsou atomizovány interakcí s vysoce energetickými vodíkovými radikály (H radikály). Kvalita hydridových atomizátorů je proto dána jejich schopností produkovat dostatečné množství "vhodně" rozložených H radikálů. Nejdůležitějšími parametry každého atomizátoru jsou citlivost atomizátoru, *S*, a příspěvek atomizátoru k šumu měření. Význam veličiny *S* je zřejmý z následující rovnice:

R(t) = S supply (t)

kde R(t) je časová velikost signálu AAS nebo AFS a supply (t) je tzv. vstupní funkce definovaná jako hmota analytu přiváděna za časovou jednotku do atomizátoru (rozměr hmotnost čas⁻¹). Hodnota veličiny S je dána užitým atomizátorem, ale také parametry specifickými pro užitý AAS nebo AFS spektrometr.

Vliv jednotlivých parametrů atomizátoru a spektrometru na *S* může být ilustrován na příkladu tubulárních atomizátorů pro AAS: hodnota *S* závisí vedle numerických konstant na atomovém absorpčním koeficientu, atomizační teplotě, účinnosti atomizace, průtoku plynů, rozměrech atomizátoru a na rozsahu odumírání volných atomů v atomizátoru [6]. Velikost atomového absorpčního koeficientu závisí, vedle parametrů AAS spektrometru jako jsou šířka štěrbiny a emisní profil spektrální lampy, na teplotě a na složení plynů v atomizátoru. Podobně lze analyzovat vliv parametrů atomizátoru a spektrometru na *S* v případě jiných než tubulárních atomizátorů, nebo i pro AFS.

Veličina *S* by proto správně měla být nazývána "citlivost spektrometru/atomizátoru", ale kvůli stručnosti zůstaneme u "citlivosti atomizátoru". Její rozměr v AAS je hmotnost čas⁻¹; může být vyjadřována jako charakteristická hmotnost pro integrovanou absorbanci, m_0 . Analogický způsob vyjádření citlivosti pro AFS neexistuje, protože intenzita signálu AFS, na rozdíl od AAS, vždy závisí na konkrétním nastavení spektrometru.

Relevantním parametrem pro praxi ovšem není citlivost, ale detekční limit. Ten může být ovlivněn, kromě citlivostí, kontaminacemi, ke kterým může dojít pří přípravě vzorku, ale i při generování hydridu. Odhlédneme-li od kontaminací, které obvykle nejsou dány metodou generování, ani atomizace, detekční limit závisí na poměru signál/šum, to znamená na poměru citlivosti k šumu měření. Rozsah šumu měření je v principu dán použitým spektrometrem. Šum měření pozorovaný v nepřítomnosti atomizátoru může být označen "šum spektrometru". Ale atomizátor nastavený na provozní parametry přispívá k šumu měření. Tento příspěvek bude pro jednoduchost označován jako "šum atomizátoru". V optimálním případě je šum atomizátoru zanedbatelný vzhledem k šumu spektrometru. Obecně ale platí, že rozsah šumu měření je ovlivněn parametry spektrometru i atomizátoru.

V dalších odstavcích budou probrány jednotlivé atomizátory hydridů pro AAS a AFS užitečné pro speciační analýzu. Nejprve bude vysvětlena funkce konvenčních křemenných atomizátorů, pak bude popsán multiatomizátor a nakonec se budeme věnovat miniaturním plamenovým atomizátorům. Pro popis ostatních atomizátorů, které jsou momentálně pro speciační analýzu méně důležité, jakožto i pro detailnější popis atomizátorů probíraných níže, viz nedávno publikovaný přehled [24].

9.2.1 Konvenční křemenné atomizátory pro AAS

Existují různé typy křemenných atomizátorů (QTA). Jsou to trubice, jejichž vodorovné rameno (optická trubice) je umístěné v optické ose spektrometru. Obvykle mají T-uspořádání, kde přívodní rameno, sloužící pro přívod hydridu unášeného proudem nosného plynu z generátoru, je připojeno v pravém úhlu do středu optické trubice. Tyto QTA budeme nadále nazývat "konvenční QTA", abychom je rozlišili od multiatomizátoru, který bude probírán níže. Podle způsobu přivádění kyslíku, který je nutný pro optimální funkci konvenčních QTA (viz níže), konvenční QTA se dělí na atomizátory typu plamínek v trubici (FIT) a na konvenční zevně vyhřívané QTA (konvenční EHQTA).

FIT lze realizovat různými způsoby. Jeden z nich využívá kapiláru centrálně umístěnou v přívodním rameni T-trubice sloužící pro přívod malého proudu kyslíku. Na jejím konci pak hoří v přebytku vodíku prakticky neviditelný vodíkovo-kyslíkový difúzní mikroplamínek. Konec kapiláry je 2 až 10 mm před spojem přívodního ramene s optickou trubicí. FIT nevyžadují externí ohřev, ale kvůli udržení mikroplamínku musí atmosféra atomizátoru obsahovat značnou frakci vodíku. V mikroplamínku jsou reakcemi mezi vodíkem a kyslíkem tvořeny H radikály. Mimo horkou zónu vlastního mikroplamínku H radikály odumírají rekombinačními reakcemi. H radikály proto tvoří nehomogenní oblak v němž se jejich hustota se snižuje se vzdáleností od horké zóny. Velikost oblaku je proto vedle průtoku kyslíku ovlivněna rychlostí rekombinačních reakcí. Dominantní rekombinační cestou je reakce s molekulárním kyslíkem. Koncentrace H radikálů v oblaku je o několik řádů vyšší než v termodynamické rovnováze, protože rekombinační reakce nejsou dost rychlé. Jsou ale dost rychlé na to, aby zabránily signifikantnímu šíření H radikálů fixovaný na konec kapiláry.

Optická trubice konvenčních EHQTA je zevně vyhřívaná buď plamenem acetylen-vzduch či, lépe, pomocí odporově zahřívané pícky na teplotu nad 700 °C, maximálně na 1 100 °C. Jako nosný plyn je obvykle používán argon. Pro atomizaci hydridu je nutná alespoň malá frakce vodíku v atmosféře atomizátoru. Jinak nejsou volné atomy analytu pozorovány. Při použití některé z metod generování přímého přenosu (viz výše) je vodík vždy přítomen jako produkt rozkladu tetrahydroboratu. Avšak při použití kolekce vymrazováním nemusí být koncentrace vodíku v atomizátoru pro účinnou atomizaci dostatečná. Konvenční EHQTA zpravidla nevyužívají speciální přívod kyslíku, ale jistý obsah kyslíku v plynech vstupujících do atomizátoru je pro dosažení optimální citlivosti atomizátoru nezbytný. Při dostatečném přívodu kyslíku je atomizace úplná. Zkušenost ukazuje, že minimální přívod kyslíku, nutný pro úplnou atomizaci (kyslíkový nárok), závisí u daného atomizátoru především na teplotě (čím vyšší teplota, tím nižší kyslíkový nárok) a také na průtoku nosného plynu. Kyslíkový nárok je obvykle uspokojen stopami kyslíku, který je vždy přítomen ve vzorku, reagenciích a hlavně jako kontaminant v nosném plynu. Při nízkých teplotách nemusí tyto zdroje kyslíkový nárok pokrýt a bez přidávání kyslíku či vzduchu není dosaženo

optimální citlivosti. Optimální atomizační teplota je pro daný atomizátor a daný průtok nosného plynu dána přívodem kyslíku z výše uvedených zdrojů. Z toho vyplývá, že zvýšení přívodu kyslíku, ať už záměrné nebo způsobené např. přidáním dodatečného spoje hadic (spoje jsou často zdrojem difúze kyslíku z okolní atmosféry do aparatury) či užitím tenkostěnné hadice, může vést ke snížení optimální teploty atomizace. Naopak, snížení přívodu kyslíku, způsobené např. lepším utěsněním aparatury, může vést k tomu, že dříve dostatečnou teplotu atomizace je třeba zvýšit.

Na začátku horké zóny atomizátoru je reakcemi mezi vodíkem a kyslíkem tvořen oblak H radikálů analogicky jako v případě FIT atomizátoru. Oblak H radikálů se může nacházet v přívodním rameni T-trubice atomizátoru, ve spoji přívodního ramene s optickou trubicí, ale může být i celý v optické trubici. Poloha oblaku závisí na teplotním profilu uvnitř atomizátoru, na průtoku nosného plynu a na konkrétním designu atomizátoru (především na světlostech přívodního ramene a optické trubice). Množství tvořených H radikálů závisí pouze na přívodu kyslíku, avšak pro účinnost atomizace (viz níže) není rozhodující jejich množství, ale plošná hustota. Z toho plyne, že kyslíkový nárok může být dramaticky ovlivněn vnitřním průměrem té části atomizátoru, kde se oblak H radikálů nachází. Přímé důkazy o velikosti a tvaru tohoto oblaku neexistují. Z nepřímých pozorování vyplývá, že oblak vyplňuje pouze malou část vnitřního prostoru atomizátoru - obdobně jako ve FIT atomizátorech.

V obou typech konvenčních QTA je hydrid za optimálních podmínek v tomto oblaku plně atomizován reakcemi s energetickými H radikály. Volně atomy analytu jsou v oblaku stabilní. Stejný mechanizmus atomizace v konvenčních EHQTA a v FIT ukazuje, že oba tyto typy konvenčních QTA jsou v principu identické. Hlavními rozdíly mezi konvenčními EHQTA a FIT atomizátory jsou:

- (i) Způsob tvorby oblaku H radikálů: ve FIT atomizátorech v mikroplamínku hořícím na konci kapiláry; v konvenčních EHQTA zevním ohřevem plynů obsahujících vodík a kyslík.
- (ii) Mobilita oblaku v konvenčních EHQTA oproti jeho fixované pozici na konci kapiláry v případě FIT atomizátorů.

Volné atomy analytu vznikající v oblaku H radikálů jsou v obou typech konvenčních QTA unášeny optickou trubicí. Ze zorného pole spektrometru mizí dvěma cestami. První cesta je mechanická - odnos proudem plynu. Druhá je chemická - homogenní i heterogenní reakce. Protože volné atomy jsou za teplot pod 1 100 °C "termodynamicky zakázány" (viz výše), okamžitě po opuštění oblaku H radikálů reagují a tím se ztrácejí ze zorného pole spektrometru. Z toho vyplývá, že kinetika chemických reakcí volných atomů analytu je rozhodující pro rozložení volných atomů produkovaných konvenčními QTA v optické ose spektrometru a potažmo pro absorbanci registrovanou spektrometrem.

Specie vzniklé chemickými reakcemi volných atomů analytu mohou být reatomizovány, ale jen interakcí s H radikály, které mohou být tvořeny v dodatečných plamíncích, nebo v místech přívodu kyslíku do horké části atomizátoru. Reatomizace je nemožná v centrální části konvenčních QTA. K reatomizaci může v konvenčních EHQTA dojít pouze následkem difúze vzdušného kyslíku do části optické trubice, která je dostatečně horká ke spuštění reakcí mezi kyslíkem a vodíkem. Tak mohou za příhodných podmínek vzniknout poblíž konců optické trubice dodatečná oblaka H radikálů reatomizující specie vzniklé chemickými reakcemi volných atomů. Vzniku těchto oblaků brání křemenná okénka na koncích optické trubice, ale také delší úseky "studené" optické trubice protažené mimo vyhřívací plamen nebo pícku.

V několika dalších odstavcích bude diskutován vliv experimentálních parametrů na citlivost atomizátoru u konvenčních EHQTA.

<u>Přívod kyslíku.</u> Jak je diskutováno výše, jistý, byť velmi malý, přívod kyslíku (kyslíkový nárok) daný především teplotou a vnitřním průměrem atomizátoru, obvykle krytý "přirozeným" obsahem kyslíku v aparatuře, je pro atomizaci nezbytný. Nižší přívod vede k nižší citlivosti a bohužel i ke zhoršení správnosti i přesnosti a ke zhoršení linearity kalibračních grafů. Příliš vysoký přívod může vést k neselektivní absorpci.

<u>Průtok nosného plynu.</u> Citlivost obecně stoupá s poklesem průtoku, avšak z různých důvodů (obvykle kvůli riziku transportních ztrát) nelze pracovat s průtoky pod 50-100 ml min⁻¹.

<u>Teplota.</u> Minimální teplota pro atomizaci je kolem 550 °C. Při nižších teplotách k atomizaci nedochází, bez ohledu na přívod kyslíku či další parametry. Při překročení této prahové teploty se projevuje synergický efekt teploty a přívodu kyslíku (viz výše): čím nižší teplota, tím vyšší kyslíkový nárok a naopak. Zvyšování teploty nad optimum (pro daný přívod kyslíku) vede k mírnému snížení citlivosti, avšak jinak lze očekávat spíše pozitivní vliv.

<u>Rozměry atomizátoru</u>. Citlivost obecně roste se snižováním průměru optické trubice a s jejím prodlužováním. Přílišné snižování průměru však vede k absorpci záření emitovaného lampou a tudíž ke zvýšení šumu atomizátoru.

<u>Kvalita vnitřního povrchu atomizátoru.</u> Často je pozorováno postupné reverzibilní nebo ireverzibilní zhoršování citlivosti či přesnosti. Reverzibilní zhoršování lze přičíst transportu drobných kapiček reakční směsi z generátoru hydridů do atomizátoru. Takto vzniklé usazeniny mění vlastnosti povrchu - nejspíše zvyšují jeho reaktivitu vzhledem k volným atomům a možná i k H radikálům. Usazeniny, pokud nepronikly difúzí příliš hluboko pod povrch, lze odstranit několikaminutovým loužením atomizátoru v koncentrované HF. Ireverzibilní zhoršování je pravděpodobně způsobeno devitrifikací (odskelněním) povrchu. Podle některých zdrojů lze devitrifikaci napravit několikahodinovým ohřevem na 1 100 °C, který by měl způsobit opětovné zeskelnění povrchu. Konvenční EHQTA jsou podstatně populárnější než FIT atomizátory, evidentně protože všechny komerční QTA jsou tohoto typu. V poslední době jsou FIT atomizátory výhradně používány ve spojení s AAS detekcí pro atomizaci hydridů pro uvolněných z kryogenní pasti a jsou tedy důležité pro jeden z přístupů ke speciační analýze založené na generování hydridů (viz níže). Konvenční EHQTA jsou pro tyto účely nevhodné, kvůli nároku na přívod kyslíku i vodíku pro optimální atomizaci.

Pokud je přívod kyslíku dostatečný, hydrid je kompletně atomizován v oblaku H-radikálů tvořeném v konvenčních QTA. Tyto atomizátory umožňují dlouhou dobu života volných atomů analytu v optické cestě AAS spektrometru a proto vykazují velkou citlivost. Navíc šum těchto atomizátorů je obvykle velmi nízký (pokud nedojde ke vznícení plamenů na konci optické trubice atomizátoru) - může být dokonce zanedbatelný ve srovnání s šumem spektrometru. Tato kombinace pak vede k velmi nízkým detekčním limitům. Avšak konvenční QTA trpí závažnými inherentními nedostatky, jmenovitě: velice nízkou odolností vůči interferencím způsobenými jinými těkavými sloučeninami, nedostatečnou linearitou analytických kalibrací a špatnou reprodukovatelností citlivosti. To vše je způsobeno tím, že v podstatné části optické trubice nejsou H radikály, takže reaktivním volným atomům analytu po opuštění oblaku H radikálů nic nebrání v chemických reakcích.

9.2.2 Multiatomizátor pro AAS

Z toho co bylo uvedeno výše vyplývá, že všechny nedostatky konvenčních QTA by byly odstraněny, kdyby H radikály vyplňovaly podstatnou část optické trubice, takže analyt by tam byl udržován ve stavu volných atomů. Na tomto principu je založen nový tzv. multiatomizátor (obr. 9.4). Multiatomizátor je dvouplášťový zvnějšku vyhřívaný atomizátor. Horizontální rameno multiatomizátoru se skládá ze dvou koncentrických trubic a je zvenčí vyhříváno na teplotu 700 °C až 1 100 °C. Vnitřní koncentrická trubice odpovídá optické trubici konvenčního QTA atomizátoru, na rozdíl od něj je však děrovaná. Do prostoru mezikruží mezi koncentrickými trubicemi, je přiváděn kyslík nebo vzduch, odkud otvory v optické trubici vstupuje do jejího vnitřního objemu. K přívodu hydridu z generátoru slouží stejně jako u konvenční QTA kolmé přívodní rameno ve střední části horizontálních trubic. Na vstupu kyslíku do optické trubice, tzn. v blízkosti každého otvoru, dochází reakcí kyslíku s přítomným vodíkem k tvorbě oblaku H radikálů. Specie vzniklé chemickými reakcemi volných atomů jsou v těchto oblacích opakovaně atomizovány. Tím se výrazně (o jeden až dva řády) zlepší odolnost vůči atomizačním interferencím i linearita analytických kalibrací. Přitom citlivost multiatomizátoru je stejná jako u konvenčního QTA a totéž platí pro šum atomizátoru. To dělá z multiatomizátoru optimální atomizátor pro speciační analýzu s AAS detektorem.



Obr. 9.4: Multiatomizátor

9.2.3 Miniaturní plamenové atomizátory pro AFS

Difúzní plamen, hořící na štěrbinovém hořáku používaném v plamenové AAS, byl užíván hlavně v minulosti. Následkem velkého zředění analytu složkami plamene poskytuje nízkou citlivost a navíc má proti jiným hydridovým atomizátorům vysokou nespecifickou absorpci. Její šum pak dále zhoršuje detekční limit. Nepříznivé vlastnosti difúzního plamene hořícího na štěrbinovém hořáku jsou způsobeny tím, že je tento hořák určen pro úplně jiný účel: pro atomizaci analytu dávkovaného v kapalném vzorku zmlžovaném do plamene. Elementární optimalizace difúzního plamene pro atomizaci hydridů vede k pronikavému zlepšení citlivosti a zásadnímu potlačení absorpce plamene při zachování hlavní výhody atomizace v difúzním plameni, t.j. vysoké odolnosti vůči atomizačním interferencím. Toto uspořádání, nazývané miniaturní difúzní plamen (MDF) je standardním atomizátorem pro AFS. Pro AAS je MDF používaný jen výjimečně. Schéma typického MDF je na obr. 9.5. Atomizátor je velmi jednoduchý - vertikální křemenná trubice o vnitřním průměru obvykle mezi 3 a 8 mm (7 mm u atomizátoru na obr. 9.5) sloužící jako hořák směsi argon/vodík přiváděné do atomizátoru společně s hydridem. Komerční konstrukce MDF atomizátorů často místo vodíku z tlakové nádoby využívají pouze vodík vznikající v generátoru hydridů rozkladem tetrahydroboratu. Difúzní plamen je pak zapalován pomocí odporového drátu omotaného kolem horní části vertikální křemenné trubice.



Obr. 9.5: MDF atomizátor

Rozdělení teplot v MDF je vysoce nehomogenní - od minimální teploty 150 °C uvnitř difúzního plamene blízko vrcholu křemenné trubice do maximální teploty 1 300 °C ve vnějších partiích plamene, kde dochází k reakcím mezi vzdušným kyslíkem a vodíkem. Těmito reakcemi vznikají i H radikály, které pak difundují do chladnějších zón plamene. Mimo horkou zónu vlastního plamene H radikály mohou odumírat stejnými rekombinačními reakcemi jako ve výše diskutovaném případě FIT atomizátoru, tedy hlavně reakcí s molekulárním kyslíkem. Přístupu molekulárního kyslíku z vnější atmosféry do objemu plamene brání v MDF horké vnější partie plamene, kde je molekulární kyslík spotřebován reakcí s vodíkem. Proto celý objem difúzního plamene obsahuje vysokou koncentraci H radikálů. Mimo plamen jsou H radikály okamžitě spotřebovány reakcí s atmosférickým kyslíkem.

Rozložení volných atomů analytu v MDF je dáno atomizací hydridu, fyzikálními procesy a chemickými reakcemi. Fyzikální procesy jsou: konvekce, turbulence, teplotní expanze a difúze volných atomů. Volné atomy mohou reagovat s komponentami plamene a s atmo-sférickými plyny difundujícími do plamene.

Ani maximální teplota MDF nestačí k termické atomizaci hydridů. K té dochází analogicky jako u výše diskutovaných atomizátorů: reakcemi analytu s H radikály. Vzhledem k vysoké populaci H radikálů v celém objemu plamene MDF atomizátoru je hydrid plně atomizován ihned po průchodu křemennou trubicí. "Chemické" odumírání volných atomů probíhá stejným mechanizmem jako odumírání H radikálů: reakcí s molekulárním kyslíkem. Z toho vyplývá, že vnější partie plamene, kde je spotřebováván molekulární kyslík, také zabraňují ztrátám volných atomů v objemu plamene reakcí s molekulárním kyslíkem. Následkem toho je analyt přítomen v celém objemu plamene výhradně ve formě volných atomů. Jejich rozložení je dáno pouze fyzikálními procesy. Citlivost MDF je ovlivněna hlavně průtokem směsi argon/vodík a obsahem vodíku v této směsi. Typické průtoky jsou 100 až 300 ml min⁻¹ vodíku a 300 až 700 ml min⁻¹ argonu. Zvyšování průtoku směsi vykazuje dva proti sobě jdoucí vlivy: příznivým vlivem je lepší stínění pronikání vzdušného kyslíku a tudíž lepší ochrana volných atomů před ztrátami chemickými reakcemi; nepříznivým vlivem je vyšší zředění volných atomů, které nevyhnutelně snižuje citlivost. Optimální průtok směsi je proto vždy kompromisem mezi stíněním a zředěním.

MDF vykazuje velice účinnou atomizaci analytu, jeho odolnost vůči atomizačním interferencím je vynikající i ve srovnání s multiatomizátorem, poskytuje vynikající dlouhodobou stabilitu citlivosti a jeho provoz i pořízení je velmi laciné. Jeho jedinou nevýhodou je krátká optická cesta a z toho plynoucí nízká citlivost pro AAS.

Pro AFS není krátká optická cesta relevantní; zde však hraje důležitou úlohu šum tohoto atomizátoru. To je rozdíl oproti AAS, kde je šum plamene MDF ve srovnání s šumem spektrometru zanedbatelný. V případě AFS může šum plamene MDF kriticky ovlivňovat detekční limit. Tento šum může být do jisté míry snížen částečným stíněním plamene. Takové stínění musí ale být pečlivě optimalizováno, protože difúzní plamen vyžaduje dostatečný přívod kyslíku z okolní atmosféry. Alternativní a výhodnější způsob potlačení šumu plamene je použití "flame-in-gas shield" (FIGS) atomizátoru.



Obr. 9.6: FIGS atomizátor

FIGS atomizátor využívá vodíkovo-kyslíkový difúzní mikroplamínek, stejný jako v případě FIT atomizátoru. Na rozdíl od FIT atomizátoru tento plamínek nehoří v křemenné trubici, ale ve cloně tvořené proudem argonu. Schéma typického FIGS atomizátoru je na obr. 9.6. Jádro atomizátoru je totožně s MDF atomizátorem. Stejný je i přívod, složení a průtok směsi argon/vodík přiváděné do atomizátoru společně s hydridem. Na rozdíl od MDF FIGS atomizátor využívá centrované kapiláry, obvykle o světlosti 0,5 mm, pro přívod malého proudu kyslíku. Na jejím konci pak hoří v přebytku vodíku mikroplamínek. Konec kapiláry je zarovnán s vrcholem křemenné trubice. Pozorovaný objem nad vrcholem trubice musí být chráněn před vnější atmosférou clonou tvořenou laminárním proudem argonu. Tento proud, obvykle kolem 2 l min⁻¹, je vytvářen v jednoduché stínící jednotce (obr. 9.6).

Průtok kyslíku do kapiláry poskytující analyticky užitečné signály je mezi 1,8 a 10 ml min⁻¹. Vznik malého oblaku H radikálů fixovaného na konec kapiláry i atomizace hvdridů v tomto oblaku probíhají úplně stejně jako v případě FIT atomizátoru. Kompletní atomizace hydridu je dosaženo nejpozději před průchodem analytu zónou nad 2 mm nad vrcholem křemenné trubice. Rozložení volných atomů analytu ve FIGS atomizátoru je v principu řízeno stejnými procesy jako v MDF atomizátoru: atomizací hydridu, fyzikálními procesy a chemickými reakcemi volných atomů analytu. V případě FIGS probíhá odumírání volných atomů převážně reakcí s molekulárním kyslíkem z okolní atmosféry, který proniká stínícím laminárním proudem argonu vinou lokálních turbulencí v laminárním proudu argonu. Výslednicí těchto dějů vertikální kužel volných atomů, zužující se s výškou nad vrcholem křemenné trubice. To se projevuje ve snižováni AFS citlivosti s pozorovací výškou. Podobně jako v případě MDF atomizátoru, citlivost je ovlivněna i zastoupením vodíku ve směsi plynů. Citlivost pochopitelně závisí také na průtoku kyslíku do kapiláry: příliš nízký průtok nemusí stačit ke kompletní atomizaci a příliš vysoký průtok vede k teplotní expanzi. Avšak hlavním parametrem ovládajícím citlivost je průtok směsi argon/vodík. Na rozdíl od MDF atomizátoru není izolace volných atomů analytu od kyslíku okolní atmosféry realizována horkými vnějšími partiemi plamene, ale nezávisle ovladatelným průtokem stínícího argonu, který nemá vliv na zředění volných atomů analytu. To umožňuje dosáhnout s FIGS podstatně vyšší citlivosti atomizátoru než s MDF.

Fungování FIGS i MDF atomizátorů závisí tedy na třech základních funkcích, kterými jsou:

(i) produkce H radikálů,

(ii) izolace volných atomů od kyslíku okolní atmosféry,

(iii) zředění volných atomů v pozorovaném objemu atomizátoru.

V MDF jsou všechny tyto tři funkce ovládány jediným parametrem: průtokem směsi argon/vodík. Naproti tomu v případě FIGS jsou všechny tyto tři funkce ovládány nezávisle: produkce H radikálů průtokem kyslíku do kapiláry, izolace volných atomů tokem stínícího argonu a zředění volných atomů průtokem směsi argon/vodík.

Zařazení stínící jednotky a kapiláry přivádějící kyslík způsobuje, že aparatura i experimenty s FIGS jsou složitější nežli v případě MDF. Naproti tomu FIGS umožňuje dosáhnout vyšší citlivost atomizátoru než s MDF. Zásadní předností FIGS pro AFS je podstatně nižší šum atomizátoru, což umožňuje ve srovnání s MDF řádové zlepšení detekčních limitů. Kromě toho FIGS je podstatně flexibilnější; mimo jiné, na rozdíl od MDF, umožňuje miniaturizaci.

9.3 Jednotlivé přístupy ke speciační analýze založené na generování hydridů

Obecně platí, že generování hydridů lze pro speciační analýzu využít třemi přístupy:

- selektivní generování hydridů.
- generování substituovaných hydridů,
- postkolonové generování hydridů.

Rozsah tohoto textu nedovoluje extensivní pokrytí literatury (viz novější přehledná sdělení [2-5,16,25,29] pro podrobnější informace). Proto byla zvolena speciační analýza arsenu jako příklad, na kterém jsou demonstrovány výhody a omezení jednotlivých přístupů. Arsen je toxický prvek vyskytující se v širokém spektru specií a proto je určení jeho speciace velmi důležité, především v biochemických a toxikologických vzorcích a ve vzorcích životního prostředí. Ve sloučeninách se arsen vyskytuje v oxidačních stavech -III, +III a +V. Kromě anorganických sloučenin arsenu, sulfidů, oxidů, arsenitanů, arseničnanů apod. existuje i velká skupina organických sloučenin jako jsou arsenocukry, organické kyseliny, jejich estery a soli, atd. Ty sloučeniny arsenu, které reagují s tetrahydroboratem za vzniku těkavých hydridů jsou uvedeny v tab. 9.2 spolu s příslušným arsinem.

Sloučenina	Vzorec	Zkratka	Arsin ^a
trihydrogenarsenitá kyselina	H ₃ AsO ₃	iAs(III)	H ₃ As
methylarsenitá kyselina	$(CH_3)H_2AsO_2$	MAs(III)	(CH ₃)H ₂ As
dimethylarsenitá kyselina	(CH ₃) ₂ HAsO	DMAs(III)	(CH ₃) ₂ HAs
trihydrogenarseničná kyselina	H_3AsO_4	iAs(V)	H ₃ As
methylarseničná kyselina	(CH ₃)H ₂ AsO ₃	MAs(V)	(CH ₃)H ₂ As
dimethylarseničná kyselina	(CH ₃) ₂ HAsO ₂	DMAs(V)	(CH ₃) ₂ HAs
oxid trimethylarseničný	(CH ₃) ₃ AsO	TMAsO	(CH ₃) ₃ As

Tab. 9.2: Hydridotvorné specie arsenu

^a produkt reakce s tetrahydroboratem

Postkolonové generování hydridů je charakterizováno tímto schématem:

separace → generování hydridu → atomizace/detekce

Tento přístup ke speciační analýze je koncepčně totožný s "hyphenated" speciační analýzou založenou na on-line spojení separační a detekční jednotky a tudíž charakterizovanou schématem: separace → atomizace/detekce. Jediným důvodem pro zařazení generování hydridů do schématu "hyphenated" speciační analýzy je přesně ten důvod, kvůli kterému se generování hydridů používá obecně: zvýšení citlivosti a významné potlačení interferencí při atomizaci/detekci. To umožňuje nahradit ICPMS detektory podstatně jednoduššími a méně nákladnými AAS a AFS detektory. Formálně lze postkolonové generování hydridů považovat za druh FI generování s tím, že injekční ventil je zastoupen separační jednotkou. Jediný rozdíl proti FI generování je, že tvar pozorovaného signálu je řízen disperzí analytu v separační koloně.

Evidentní nevýhodou postkolonového generování hydridů je, že je použitelné pouze pro speciaci forem analytu, které lze převést na těkavý hydrid. Tuto nevýhodu lze sice v principu eliminovat zařazením on-line mineralizace (schéma: separace → mineralizace → generování hydridu → atomizace/detekce), ale to vede k příliš komplikovaným aparaturám. Pro separaci může být užita jakákoliv metoda. Doposud ale jednoznačně převažuje HPLC. Jednotlivé specie jsou identifikovány podle retenčních časů.

Selektivní generování hydridů je charakterizováno tímto schématem:

generování hydridu + atomizace/detekce

Speciační analýza je u tohoto přístupu založena na odlišné účinnosti konverze jednotlivých forem analytu (specií) na hydrid. Tohoto přístupu se nejčastěji používá ke speciační analýze anorganických forem antimonu, arsenu, selenu a telluru ve vodných roztocích: iSb(III) a iSb(V), iAs(III) a iAs(V), iSe(IV) a iSe(VI), iTe(IV) a iTe(VI).

Speciační analýza založená na selektivním generování hydridů bude ilustrována na příkladu speciační analýzy iAs(III) a iAs(V), ale obdobné schéma platí i pro speciační analýzu anorganických forem ostatních elementů i pro speciační analýzu MAs(III) a MAs(V), DMAs(III) a DMAs(V), případně pro speciační analýzu směsí anorganických solí olova, Me_2Pb^{2+} , Et_2Pb^{2+} , Me_3Pb^+ a Et_3Pb^+ .

Ideální by bylo generovat arsin selektivně pouze z As(III) v jednom alikvótu vzorku a pouze z As(V) v druhém alikvótu. Ve skutečnosti ale neexistuje způsob jak generovat arsin selektivně pouze z pentavalentní formy vedle formy trivalentní. Typická procedura proto využívá generování hydridu jen z trivalentní formy (to lze zajistit vhodnou volbou podmínek generování) v jednom alikvótu (alikvót A) a na generování hydridu z obou forem (to lze zajistit buď předredukcí pentavalentní formy, nebo vhodnou volbou podmínek generování) v alikvótu druhém (alikvót B). Zastoupení pentavalentní formy je dáno diferencí obou alikvótů. V optimálním případě jsou citlivosti obou forem v alikvótu B i citlivost trivalentní formy v alikvótu A stejné. Pak lze použít "single species standardization" přístup. To znamená, že stačí změřit signál standardu jen jedné formy v jednom alikvótu: pentavalentní formy v alikvótu B, nebo trivalentní formy v alikvótu A či B. To velmi usnadňuje situaci, protože není třeba pracovat se standardy (často) nestabilních forem.

Speciační analýza založená na selektivním generování hydridů je však proveditelná, i když citlivosti se obou forem v obou alikvótech liší a dokonce i když je arsin z pentavalentní formy částečně generován i v alikvótu A. Principiálně je to možné, pokud je splněna následující nerovnost:

 $S_{\text{IIIA}} S_{\text{VB}} - S_{\text{IIIB}} S_{\text{VA}} \neq 0$

kde S_{IIIA} citlivost trivalentní formy v alikvótu A atd. Je ale nutné stanovit citlivosti obou forem v obou alikvótech. Např. S_{VB} je stanovena z měření standardu (zaručeně čisté) pentavalentní formy v alikvótu B atd. Je zřejmé, že takový postup je pracný a zatížený značnou chybou. Proto je vysoce žádoucí najít takové podmínky generování hydridu v alikvótu A i alikvótu B, které umožňují "single species standardization".

Speciační analýza založená na selektivním generování hydridů nevyžaduje na rozdíl od ostatních dvou přístupů zařazení žádné separační jednotky a proto ani žádné úpravy aparatur využívaných pro "klasické" generování hydridů. Pro detekci lze zvolit AAS, AFS nebo jakoukoliv jinou atomově spektrometrickou metodu.

Generování substituovaných hydridů je charakterizováno tímto schématem:

generování směsi alkyl substituovaných hydridů → separace → atomizace/detekce

V podstatě se tedy jedná o variaci derivatizační techniky dobře známé z aplikací plynové chromatografie.

Speciační analýza založená na generování substituovaných hydridů je použitelná v případech, kdy jednotlivé formy analytu mohou být převedeny na různé (těkavé) alkyl substituované hydridy. Typickou aplikací je speciační analýza iontových alkyl sloučenin typu $R_n A^{+(m-n)}$, kde *m* je valence analytu A, *n* má hodnotu mezi 1 a *m* – 1 a R je alkylsubstituent. Výsledkem generování je směs alkylsubstituovaných hydridů sumárního vzorce $R_n A H_{(m-n)}$, s příslušným binárním hydridem $A H_m$. Směs hydridů je chromatograficky separována a nalezené zastoupení jednotlivých hydridů pak udává zastoupení analyzovaných forem analytu. Tento přístup je užitečný pro speciační analýzu methyl substituovaných As, Sb a Ge forem, methyl a butyl substituovaných Sn forem a methyl, ethyl a butyl substituovaných Pb forem.

Vygenerovaná směs hydridů je koncentrována kolekcí vymrazováním v kryogenní pasti, která obvykle také slouží jako chromatografická kolona. Následně, po ohřevu, jsou zachycené hydridy uvolněny a separovány přímo v koloně, která sloužila k jejich kolekci. Pro detekci je prakticky výhradně používána AAS, ačkoliv principiálně použitelná je jakákoliv atomově spektrometrická metoda.

Generování substituovaných hydridů má proti postkolonovému generování hydridů, které obecně může sloužit i pro speciační analýzu iontových alkylsloučenin typu $R_n A^{+(m-n)}$, vý-znamné přednosti:

 (i) Vyžaduje jen minimální úpravu vzorku, což minimalizuje riziko porušení originální speciace v průběhu analýzy. (ii) Je použitelné i ve velmi komplikovaných matricích (např. v buněčných lyzátech), které nelze separovat pomocí HPLC.

Jako příklad aplikace generování substituovaných arsinů spojené se selektivním generováním může sloužit speciační analýza produktů metabolizmu As u savců: iAs(V), iAs(III), MAs(III), DMAs(III), MAs(V), DMAs(V) a TMAsO [30]. Vlastně se jedná o dvourozměrnou analýzu. Jeden rozměr je pokryt selektivním generováním trivalentních a pentavalentních forem. Druhý rozměr je zajištěn separací jednotlivých substituovaných hydridů v chromatografické koloně. Byly nalezeny podmínky generování, za kterých jsou arsiny generovány buď výhradně z trivalentních forem (alikvót A) nebo z obou forem (alikvót B). Podmínky generování z obou alikvótů se lišily jen přítomností L-cysteinu (který působí jako předredukční činidlo a/nebo jako reakční modifikátor při generování z alikvótu B; TRIS pufr byl použit jako reakční médium v obou alikvótech, protože L-cystein je efektivní jen ve velmi úzkém rozsahu kyselostí. Vygenerovaná směs binárního arsinu, monomethylarsinu, dimethylarsinu a trimethylarsinu je koncentrována kolekcí vymrazováním v kryogenní pasti ve formě U-trubice naplněné chromosorbem. Pro generování hydridů, jejich kolekci a následnou separaci v U-trubici byla vyvinutá automatizovaná aparatura, která podstatně usnadňuje obsluhu celého zařízení. Optimalizace podmínek separace (především rozměrů U-trubice, rychlosti ohřevu a průtoku nosného plynu) vedla ke kompletní separaci signálů odpovídacích jednotlivým hydridům během 60 s. Pro detekci sloužila AAS; pro atomizaci hydridů multiatomizátor. Popsaný systém poskytuje stejnou citlivost plochy signálů pro všechny specie. To umožňuje rozšířit koncepci "single species standardization" na všech sedm zkoumaných forem arsenu. To je velmi důležité, protože komerčně nedostupné MAs(III) a DMAs(III) ve vodných prosředích jsou velmi náchylné k rychlé oxidaci. S tímto relativně jednoduchým a laciným přístrojovým vybavením bylo dosaženo velmi nízkých detekčních limitů, kolem 4 ng l^{-1} .

Literatura

- [1] D.M. Templeton, F. Ariese, R. Cornelis, L.G. Danielsson, H. Muntau, H.P. Van Leeuwen, R. Lobinski, Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects, and methodological approaches (IUPAC Recommendations 2000), Pure Appl. Chem. 72 (2000) 1453-1470.
- [2] R. Cornelis, J. Caruso, H. Crews, K. Heumann (Eds.), Handbook of Elemental Speciation, II: Species in the Environment, Food, Medicine and Occupational Health, Wiley, NY, 2005.
- [3] R. Cornelis, J. Caruso, H. Crews, K. Heumann (Eds.), Handbook of Elemental Speciation, Techniques and Methodology, Wiley, NY, 2003.
- [4] J. Szpunar, R. Lobinski, Hyphenated Techniques in Speciation Analysis, RSC, Cambridge, 2003.
- [5] L. Ebdon, L. Pitts, R. Cornelis, H. Crews, O. F. X. Donard, Ph. Quevauviller (Eds.), Trace element Speciation for Environment, Food and Health, The Royal Society of Chemistry, UK, Cambridge CB4 0WF, 2001.
- [6] J. Dědina, D.L. Tsalev, Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry, Wiley & Sons, Inc., Chichester, 1995.
- T. Nakahara, Hydride generation techniques in atomic spectroscopy, Advanc. Atom. Spectrom. 2 (1995) 139-178.

- [8] L.K. Olson, N.P. Vela, J.A. Caruso, Hydride generation, electrothermal vaporization and liquid chromatography as sample introduction techniques for inductively coupled plasma, Spectrochim. Acta Part B 50 (1995) 355-368.
- [9] R.Ritsema, F.M.Martin, P.Quevauviller, Hydride generation for speciation analyses using GC/AAS, in: P. Quevauviller, E. A. Maier, and B. Griepnik (Eds.), Quality Assurance for Environmental Analysis, Elsevier Science B.V., Amsterdam, 1995, pp. 489 - 503.
- [10] Z.L. Fang, G.-H. Tao, S.K. Xu, X.Z. Liu, W. Jing, X.S. Chai, New developments in flow injection vapor generation atomic absorption spectrometry, Microchem. J. 53 (1996) 42-53.
- [11] H. Matusiewicz, R.E. Sturgeon, Atomic spectrometric detection of hydride forming elements following in situ trapping within a graphite fu rnace, Spectrochim. Acta Part B 51 (1996) 377-397.
- [12] A.G. Howard, (Boro)hydride techniques in trace element speciation, J. Anal. At. Spectrom. 12 (1997) 267-272.
- [13] B. Welz, M. Sperling, Atomic Absorption Spectrometry, Wiley-VCH, Weinheim, 1999.
- [14] D.L. Tsalev, Hyphenated vapor generation atomic absorption spectrometric techniques, J. Anal. At. Spectrom. 14 (1999) 147-162.
- [15] J. Dědina, Flow Methods in Gas-liquid Separations, in: A. Sanz-Medel (Ed.), Flow Analysis Atomic Spectrometric Detection, Elsevier, Amsterdam, 1999, pp. 237 - 273.
- [16] Y. Cai, Speciation and analysis of mercury, arsenic, and selenium by atomic fluorescence spectrometry, TrAC, Trends Anal. Chem. 19 (2000) 62-66.
- [17] D.L. Tsalev, Vapour generation or electrothermal atomic absorption spectrometry? Both!, Spectrochim. Acta Part B 55 (2000) 917-933.
- [18] H. Matusiewicz, Chemical vapor generation with slurry sampling: A review of atomic absorption applications, Appl. Spectrosc. Rev. 38 (2003) 263-294.
- [19] J.F.Tyson, E.Yourd, Flame atomic absorption spectroscopy, including hydride generation and cold vapor techniques, in: M. Cullen (Ed.), Atomic Spectroscopy in Elemental Analysis, Blackwell Publishing, 2004, pp. 239 - 281.
- [20] P. Pohl, Hydride generation recent advances in atomic emission spectrometry, TrAC, Trends Anal. Chem. 23 (2004) 87-101.
- [21] T. Nakahara, Development of gas-phase sample-introduction techniques for analytical atomic spectrometry, Anal. Sci. 21 (2005) 477-484.
- [22] A.R. Kumar, P. Riyazuddin, Mechanism of volatile hydride formation and their atomization in hydride generation atomic absorption spectrometry, Anal. Sci. 21 (2005) 1401-1410.
- [23] I.D. Brindle, Vapour-generation analytical chemistry: from Marsh to multimode sample-introduction system, Anal. Bioanal. Chem. 388 (2007) 735-741.
- [24] J. Dědina, Atomization of volatile compounds for atomic absorption and atomic fluorescence spectrometry: On the way towards the ideal atomizer, Spectrochim. Acta Part B 62 (2007) 846-872.
- [25] A.R. Kumar, P. Riyazuddin, Non-chromatographic hydride generation atomic spectrometric techniques for the speciation analysis of arsenic, antimony, selenium, and tellurium in water samples - a review, International Journal of Environmental Analytical Chemistry 87 (2007) 469-500.
- [26] T. Matoušek, The efficiency of chemical vapour generation of transition and noble metals, Anal. Bioanal. Chem. 388 (2007) 763-767.
- [27] P. Pohl, B. Prusisz, Chemical vapor generation of noble metals for analytical spectrometry, Anal. Bioanal. Chem. 388 (2007) 753-762.
- [28] R. Sturgeon, Vapor generation for atomic spectroscopy, Anal. Bioanal. Chem. 388 (2007) 733-734.
- [29] E.Krupp, F.Seby, R.R.Martin-Doimeadios, A.Holliday, M.Moldovan, G.Koellensperger, S.Hann, O.F.X.Donard, Trace Metal Speciation with ICP-MS Detection, in: S. Nelms (Ed.), ICP Mass Spectrometry Handbook, Oxford, UK, 2005, pp. 259 - 335.
- [30] T. Matoušek, A. Hernandez-Zavala, M. Svoboda, L. Langrová, B. Adair, Z. Drobná, D.J. Thomas, M. Stýblo, J. Dědina, Oxidation State Specific Generation of Arsines from Methylated Arsenicals Based on L- Cysteine Treatment in Buffered Media for Speciation Analysis by Hydride Generation Automated Cryotrapping Gas Chromatography-Atomic Absorption Spectrometry with the Multiatomizer, Spectrochim. Acta Part B, v tisku.

10. STANOVENÍ CHEMICKÝCH FOREM RTUTI PLYNOVOU A KAPALINOVOU CHROMATOGRAFIÍ S DETEKCÍ ATOMOVOU FLUORESCENČNÍ SPEKTROMETRIÍ

Josef Komárek¹, Pavlína Pelcová² a Rostislav Červenka¹ ¹Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, Kotlářská 2, 611 37 Brno ²Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Ústav chemie a biochemie, Zemědělská 1, 613 00 Brno

10.1 Výskyt rtuti

Sloučeniny rtuti patří mezi nejvíce toxické škodliviny vyskytující se v životním prostředí. Jejich přítomnost má neblahé účinky na všechny živé organismy. Různé formy tohoto prvku (anorganické i organické) se do prostředí dostávají z přírodních i antropogenních zdrojů. Zastoupení rtuti v přírodě je velmi nízké [1]. Hlavními zdroji rtuti jsou zvětrávání minerálů a sopečná aktivita. Kromě těchto přírodních pochodů hraje stále větší roli průmyslové znečištění. Určitý význam má i rtuť obsažená ve fosilních palivech. I když je její obsah v uhlí a ropě docela nízký, významný obsah kovu je pak při spalování uvolněn do atmosféry. Těkavá rtuť, která je produktem inhalací, zvětrávání a sopečné činnosti, je z atmosféry vymývána srážkami a hromadí se ve vodách a půdách. Sem se také dostává z průmyslových vod. Velká část rtuti reaguje za vzniku nerozpustných sloučenin, např. HgS a HgSe (obr. 10.1).



Obr. 10.1: Zjednodušené schéma transportu rtuti v životním prostředí

Sloučeniny rtuti jsou ve všech složkách životního prostředí transformovány biotickou a abiotickou oxidací a redukcí, biologickými přeměnami mezi anorganickými a organickými formami rtuti a fotolýzou organokovových sloučenin rtuti. Důležitým transformačním procesem rtuti ve vodních ekosystémech je neenzymatická methylace rtuťnatých iontů methylkobalaminovými sloučeninami v přítomnosti mikroorganismů vyskytujících se v sedimentech. Ze sedimentů se methylrtuť dostává do vody, vodních rostlin a potravním řetězcem do vyšších organismů [2].

10.2 Chemické formy rtuti

Ve vodním ekosystému se vyskytují tři významné formy rtuti: elementární rtuť Hg^0 , rtuťné $(Hg_2^{2^+})$ a rtuťnaté (Hg^{2^+}) anorganické formy rtuti a alkylové nebo arylové sloučeniny rtuti: methylrtuť (MeHg⁺), ethylrtuť (EtHg⁺), fenylrtuť (PhHg⁺), dimethylrtuť (Me₂Hg), difenylrtuť (Ph₂Hg). Z organokovových sloučenin rtuti se v životním prostředí nejčastěji objevují halogenidy methylrtuti, které jsou přibližně 10krát toxičtější než její anorganické formy. Jsou neurotoxické a mají silnou tendenci se bioakumulovat v potravních řetězcích, zvláště ve vodních ekosystémech [3, 4]. Kontaminace vodních ekosystémů rtuti nejvýznamněji ovlivňuje organismy na nejvyšších trofických úrovních potravní pyramidy. Vysoké koncentrace rtuti v rybách, které mají celosvětově velký nutriční význam, mohou významně ovlivňovat jak zdraví člověka, tak i rybožravých ptáků.

Toxicita sloučenin rtuti souvisí s jejich mobilitou. To znamená, že čím vyšší je mobilita chemické formy, tím je toxičtější. Tyto vlastnosti jsou určeny strukturou molekuly, její stabilitou, jejím chováním v biosystémech a mírou vylučování organismem. Anorganické a organické sloučeniny rtuti se mohou rozdělovat podle toxicity do dvou skupin [5].

První skupinu tvoří organické a ve vodě rozpustné anorganické sloučeniny, které jsou charakteristické vysokou mobilitou. Koncentrace těchto látek v podstatě rozhoduje o míře toxicity rtuti ve vzorcích. Alkylové sloučeniny rtuti jsou mnohem mobilnější a tedy i toxičtější než anorganické specie. Organokovové sloučeniny rtuti pronikají snadno bariérami krev-mozek a placentou a ukládají se v ledvinách a vlasech. Methylrtuť je rozpustná v tucích, po vstřebání v trávicím traktu vstupuje do krve, z níž se dostává do mozku. V membránových proteinech a enzymech se váže na SH-skupiny a způsobuje tak nevratné poškození centrálního nervového systému. U dospělých lidí se poškození vztahuje na oblasti mozku, ve kterých jsou soustředěny smyslové a koordinační funkce. Vysoká koncentrace methylrtuti způsobuje u těhotných žen poškození plodu. Hromadné otravy lidí organokovovými sloučeninami rtuti byly zaznamenány v Minamatě v Japonsku (1952) a v Iráku (1971). V rozpustných anorganických sloučeninách se rtuť vyskytuje v oxidačním stavu +II, např. v chloridu rtuťnatém (HgCl₂). Toxicita těchto sloučenin rtuti není tak dramatická jako u methylrtuti. Rtuťnaté sloučeniny poškozují ledviny a střevní trakt. Díky vysoké afinitě k SH-skupinám jsou ochotně absorbovány erythrocyty a bílkovinami plazmy. Semimobilní a nemobilní formy rtuti tvoří druhou skupinu, která je charakteristická minimální toxicitou. Zatímco semimobilní formy tvoří elementární rtuť (Hg) a amalgámy, k nemobilním patří např. sulfid rtuťnatý (HgS) a chlorid rtuťný (Hg₂Cl₂). Kapalná rtuť je špatně absorbována zažívacími orgány, ale její páry jsou snadno absorbovány plícemi. Páry rtuti jsou rozpustné v tucích, při vdechnutí způsobují bolest hlavy, zánět močového měchýře, ztrátu paměti i smrt. Nemobilní specie jsou charakteristické svou chemickou stabilitou (v půdě vydrží i přes tisíce let) a jsou nejméně toxické [5].

10.3 Stanovení celkového obsahu rtuti

Pro stanovení celkového obsahu rtuti se používá atomová absorpční spektrometrie využívající měření absorpce záření na rezonanční čáře rtuti 253,7 nm. Analýza vzorků s nízkým obsahem rtuti se provádí především metodou studených par a metodou zahrnující pyrolýzu. Metoda studených par (CV) je redukčně-vyvíjecí metoda pro vydestilování rtuti z roztoků. Monoatomická pára rtuti získaná redukcí v roztoku je vedena proudem plynu do absorpční průtokové trubice - kyvety, umístěné do cesty paprsku zdroje záření.

Pro stanovení rtuti využívající termooxidační rozklad vzorku s následným zachycením rtuti v amalgamátoru byly vyvinuty speciální analyzátory, např. AMA 254 české výroby (Altec), DMA-80 (Milestone), Mercury SP-3D a MA-2 (NIC). Princip stanovení u těchto přístrojů je podobný (obr. 10.2). Nejdříve se kapalný nebo pevný vzorek nadávkuje na lodičku z Pt nebo Ni a ta je vložena do přístroje. Vzorek je termicky upraven podle nastaveného programu. Dochází k vysušení, spálení vzorku v proudu kyslíku a k dokončení rozkladu spalných produktů v katalytické peci při teplotě 750 °C. Páry rtuti jsou zachyceny na zlatém amalgamátoru a odtud vedeny do bloku měřících kyvet. Sériové uspořádání kyvet dovoluje měřit na dvou koncentračních hladinách. Stanovení nižších koncentrací rtuti je možné po zkoncentrování vzorku opakovaným dávkováním a odpařením vzorku přímo v dávkovacím zařízení systému.

Další možností jak stanovit rtuť je použití atomové fluorescenční spektrometrie (AFS). Využívá se rovněž rezonanční čára 253,7 nm. Zdrojem záření je bezelektrodová výbojka (EDL) nebo nízkotlaká rtuťová výbojka. Plynná rtuť získaná metodou studených par (CV) nebo pyrolýzou sloučenin rtuti je vedena pomocí argonu do průtokové cely. Stejně jako u AAS byly pro AFS vyvinuty speciální přístroje. K nejpoužívanějším patří AFS přístroje od firmy P.S. Analytical Ltd. z Velké Británie a Analytik Jena AG z Německa. Často jsou vybaveny amalgamační prekoncentrační jednotkou, která zlepšuje mez detekce.



Obr. 10.2: Schéma analyzátoru rtuti využívajícího termooxidační rozklad vzorku (AMA 254))

10.4 Speciační analýza rtuti

Speciační analýza je definována jako stanovení koncentrací jednotlivých fyzikálně chemických forem prvku (specií), jejichž součet tvoří celkovou koncentraci prvku ve vzorku. Vývoj nových selektivních a citlivých analytických metod umožnil identifikaci a kvantifikaci specií rtuti. Lze ji provádět sekvenčními extrakcemi jednotlivých forem s následným stanovením AAS nebo AFS. Pro rozlišení specií lze využít i selektivních redukčních postupů pomocí NaBH₄ a SnCl₂. Rostoucí potřeba určit koncentraci jednotlivých forem prvků vedla ke vzniku kombinovaných (tandemových) technik, které spojují separační metody s prvkově selektivní detekcí. Mezi nejčastěji používané kombinované techniky patří plynová a kapalinová chromatografie ve spojení s UV/VIS, atomovou absorpční, emisní a hmotnostní spektrometrickou detekcí. Za vysoce citlivou a selektivní pro stanovení specií rtuti je také považována plynová nebo kapalinová chromatografie ve spojení s atomovou fluorescenční detekcí. Pomocí separačních metod se rozdělí směs sloučenin rtuti a jednotlivé formy jsou po převedení do plynného stavu Hg⁰ stanoveny pomocí AFS. Před vlastním dělením je třeba sloučeniny rtuti ze vzorku izolovat a často i zkoncentrovat. Analytická metoda využívající kombinovaných technik se skládá z extrakčního postupu vedoucího k izolaci chemických forem ze vzorku, separační metody a detekčních podmínek.

10.5 Izolace chemických forem rtuti

Izolace chemických forem rtuti patří mezi nejvýznamnější část analýzy, často také nejkomplikovanější, např. u biologických materiálů. Jejím cílem je jak oddělení analytu od matrice, tak zkoncentrování na detekovatelnou hladinu. Při speciační analýze musí být prováděna tak, aby nedošlo ke ztrátám nebo kontaminaci během oddělení, ale také nesmí dojít ke změně formy daného prvku.

Při izolaci sloučenin rtuti nesmí tedy docházet k úniku a přeměně jednotlivých forem. To je také nutné zajistit již při odběru a uchovávání vzorku. Např. stabilitu biologických vzorků a sedimentů lze prodloužit lyofilizací vzorků.

Izolaci sloučenin rtuti od matrice lze provést destilací, kyselou extrakcí, alkalickou extrakcí a sekvenční extrakcí. Methylrtuť lze izolovat ze sedimentů destilací v proudu dusíku při 145 °C z prostředí H₂SO₄ s přídavkem KI po ethylaci s tetraethylboritanem sodným. Pro nechromatografickou separaci methylrtuti bez ethylačního činidla byla navržena destilace s vodní parou v proudu dusíku při teplotě 150 °C z prostředí zředěné H₂SO₄ nebo HCl s přídavkem NaCl [6, 7].

Volba extrakčního postupu je ovlivněna povahou analytu, jeho chemickou formou, matricí z níž se analyt izoluje a dostupnou analytickou technikou. Výtěžky extrakce musí být co nejvyšší a reprodukovatelné. Provádí se kyselou nebo alkalickou hydrolýzou. Izolaci lze provést buď klasickou cestou nebo s pomocí ultrazvuku či mikrovlnné energie.

První metodu pro extrakci chemických forem rtuti z ryb vyvinul Westöö [8]. Metoda je založena na jejich uvolnění koncentrovanou HCl, extrakci chloridu methylrtuti do benzenu a převedení zpět do vodné fáze pomocí NH₄OH s Na₂SO₄. Většina extrakčních postupů využívajících uvolnění chemických forem rtuti kyselinou je založena na této metodě. Benzen je nahrazován méně toxickým toluenem nebo CH₂Cl₂ a sloučeniny rtuti jsou převáděny do vodné fáze pomocí cysteinu nebo thiosíranu sodného. Tento postup je nutný při použití neselektivní detekce. Při selektivní detekci je možné použít jednokrokovou kyselou extrakci.

Pro kyselou hydrolýzu se používá 6 mol 1^{-1} HCl v prostředí NaCl, 2 mol 1^{-1} HNO₃, okyselený roztok ethanolu, kyselina octová, kyselina thiooctová aj. Při použití mikrovlnné extrakce jsou pozorovány extrakční výtěžky přibližně o 10 % vyšší než při ultrazvukové extrakci. Nejvyšší extrakční výtěžky byly získány při použití směsných extrakčních činidel na bázi kyseliny chlorovodíkové (6 mol 1^{-1} HCl). Přítomnost HCl v extrakčním činidle výrazně zlepšuje extrakční výtěžky chemických forem rtuti. Zředěná HCl umožňuje rychlé a dokonalé rozbití vazeb chemických forem rtuti s proteiny a zároveň při nízkých extrakční cinidlo jeví směs 6 mol 1^{-1} HCl s 0,1 mol 1^{-1} NaCl. Pro mikrovlnnou extrakci biologického materiálu vychází optimální extrakční čas 10 min, pro extrakci v ultrazvukové lázni 45 min. Pro extrakci sedimentů lze extrakční čas zkrátit pro mikrovlnnou extrakci na 7 min a extrakci ultrazvukem na 30 min. Zkrácení extrakčního času u sedimentů je způsobeno slabšími vazbami chemických forem rtuti v sedimentech. Extrakt po mikrovlnné extrakci je stabilní při uchovávání v tmavě hnědých skleněných lahvích v ledničce nejméně 30 dnů [9].

Pro alkalickou hydrolýzu se nejčastěji používá 25 % KOH v methanolu nebo 5 % tetramethylamonium hydroxid ve vodě. Při izolaci ze sedimentů se alkalická hydrolýza používá méně často vzhledem k vysokému obsahu organických látek, sulfidů a železitých iontů extrahovaných spolu se sloučeninami rtuti [6].

Sekvenční extrakce jsou založeny na postupném získávání jednotlivých specií ze vzorku. Typ činidel a postup extrakce se volí podle odlišných vlastností jednotlivých sloučenin rtuti. Příkladem může být sekvenční extrakce sedimentu. K uvolnění labilních forem rtuti se sediment extrahuje 4 mol l^{-1} HNO₃ po dobu 1 hod při teplotě 0 °C, k uvolnění rtuti komplexované huminovými kyselinami 1 mol l^{-1} KOH 24 hod při teplotě 24 °C a sloučenin rtuti vázané na síru roztokem Na₂S v 1 mol l^{-1} KOH. Analýza je zakončena stanovením obsahu rtuti v jednotlivých extraktech [10].

10.6 Spojení GC-AFS

Při použití plynové chromatografie musí být všechny formy převedeny na těkavé, ale termicky stabilní sloučeniny. Tento proces se nazývá derivatizace a nesmí u něho docházet k porušení původních vazeb ve sloučeninách. Derivatizaci chemických forem rtuti před GC analýzou lze provést alkylací Grignardovými činidly (např. butylmagnesium chloridem) v nevodném prostředí nebo alkylací s tetraalkylboritany ve vodném prostředí. Mezi nejpoužívanější derivatizační činidla patří tetraalkylboritany jako tetraethylboritan [11-13], tetrapropylboritan [12,14], tetrafenylboritan sodný [15-17] ve vodném prostředí při pH 5. Z těchto činidel se nejvíce používá tetraethylboritan sodný (NaBEt₄). Vznikají ethylové deriváty specií rtuti, které jsou vysoce těkavé. Tato derivatizace je rychlým a jednoduchým postupem při stanovení methylrtuti. Umožňuje stanovit anorganickou rtuť a methylrtuť zároveň, ale má i své nevýhody. Neumožňuje rozlišit ethylrtuť a anorganickou rtuť Hg(II). V tomto případě se upřednostňuje použití jiných derivatizačních činidel, např. tetrafenylboritanu sodného (NaBPh₄) nebo tetrapropylboritanu sodného (NaBPr₄). Po derivatizaci je vzorek extrahován do vhodného organického rozpouštědla (hexanu, heptanu aj.) a extrakt dávkován na kolonu. Jinou možností jak izolovat a zkoncentrovat analyt je mikroextrakce tuhou fázi (SPME). Tato technika nevyžaduje použití organických rozpouštědel a umožňuje dávkovat vzorek přímo do plynového chromatografu termickou desorpcí z vloženého vlákna. Mezi nejpoužívanější patří vlákna pokrytá 100 µm vrstvou polydimethylsiloxanu [11-17]. Lze použít i vlákna obsahující sulfhydrylové skupiny. Po separaci jednotlivých specií na koloně dochází k jejich pyrolytickému rozkladu (800-900 °C) na elementární rtuť, která je následně detekována AFS.

Příkladem může být stanovení methylrtuti, ethylrtuti, fenylrtuti a anorganické formy rtuti (Hg²⁺) pomocí plynového chromatografu Agilent Technologies 6890 N Network GC System vybaveného kapilární kolonou HP-5 o rozměrech 30 m x 320 μ m x 0,25 μ m s teplotním programem pece: 50 °C až 150 °C s nárůstem 15 °C min⁻¹, na konečnou teplotu

270 °C s nárůstem 30 °C min⁻¹ a dobou trvání 5 minut. Jako nosný plyn byl použit argon o průtoku 0,9 ml min⁻¹. Derivatizace byla prováděna pomocí 2% (m/v) tetrapropylboritanu sodného při pH 5. Propylovaný analyt byl zachycen v headspace na SPME vlákno pokryté polydimethylsiloxanem (PDMS) o tloušťce 100 μm (Supelco, Bellefonte, PA) při pokojové teplotě během 10 min za stálého míchání teflonovým míchadlem nebo extrahován do isooktanu. Následně byla provedena termická desorpce vlákna resp. nástřik 5 μl isooktanu do GC injektoru. Desorpce vlákna probíhala v GC injektoru při teplotě 220 °C po dobu jedné minuty. Vlákno bylo před každou extrakční procedurou 20 minut kondicionováno při teplotě 250 °C. K detekci byl využit atomový fluorescenční spektrometr PSA 10.750 s předcházející pyrolýzou sloučenin rtuti (obr. 10.3, 10.4). Data byla vyhodnocena programem Agilent ChemStation (obr. 10.5). Pro izolaci sloučenin rtuti ze vzorku byla použita mikrovlnná extrakce s 25 % (m/v) KOH v methanolu. Před speciační analýzu rybích tkání je vhodné zařadit trojnásobnou extrakci rybí tkáně acetonem.



Obr. 10.3: Schéma GC-AFS systému (Millenium Merlin System, P.S. Analytical Ltd.)



Obr. 10.4: Schéma atomového fluorescenčního spektrometru (P.S. Analytical Ltd.)



Obr. 10.5: Chromatogram pro GC-AFS systém

10.7 Spojení HPLC-AFS

Separace sloučenin rtuti kapalinovou chromatografií se nejčastěji provádí chromatografií s reverzním systémem fází využívající chelatačních, příp. ion-párových interakcí mezi modifikátorem mobilní fáze a analyty na jedné straně a hydrofobních interakcí mezi modifikátorem mobilní fáze a stacionární fází na straně druhé. Modifikátory jsou chelatační činidla, která vytvářejí stabilní komplexy se sloučeninami rtuti a pomáhají tak překonat významné rozdíly v chemických a fyzikálních vlastnostech jednotlivých chemických forem rtuti a tím umožňují stanovit diametrálně odlišné sloučeniny v jednom separačním kroku. Jako modifikátory se používají chelatační činidla 2-sulfanylethanol [9, 18], L-cystein [19], 1,5-difenyl-3-thiokarbazon (dithizon) [20], sodná sůl diethyldithiokarbamátu (DDTC) nebo amonná sůl pyrrolidin-1-yl-dithiokarbamátu (APDC) [21]. Pro separaci specií rtuti na C18 RP koloně se používají také iontově párová činidla (směs NaCl a kvarterní amoniové soli). Pokud není citlivost metody dostatečná musí se použít prekoncentrační krok. Nejčastěji se používá prekoncentrace rtuti extrakcí tuhou fází (SPE). Pro SPE se používají mikrokolonky s hydrofóbním sorbentem (C18) modifikovaným chelatačními činidly (2-sulfanylethanol, dithizon, DDTC aj.) [18-20]. Eluce se provádí organickými rozpouštědly (methanol) nebo elučními činidly, která obsahují silnější chelatační činidla. Při detekci separovaných specií rtuti pomocí CV-AFS detektoru je nejdříve zapotřebí převést všechny chemické formy rtuti na Hg^{2+} a ty následně redukovat na elementární rtuť.

Jako příklad může být uvedeno stanovení methylrtuti, ethylrtuti a fenylrtuti vedle anorganických forem rtuti (Hg²⁺) pomocí kapalinového chromatografu LC-200 (Perkin Elmer, Norwalk, USA) s atomovým fluorescenčním detektorem PSA Millenium Merlin (P.S Analytical Ltd.) využívajícím metody studených par. Pro separaci chemických forem rtuti byla používána reverzní chromatografická stacionární fáze Hypersil BDS C18 a izokratická eluce mobilní fází obsahující 7% methanolu a 0,05% 2-sulfanylethanolu v acetátovém pufru (pH 5) při průtokové rychlosti 0,15 ml min⁻¹. Extrakce chemických forem rtuti byla prováděna extrakčním činidlem obsahujícím 6 mol l⁻¹ HCl a 0,1 mol l⁻¹ NaCl v mikrovlnném extraktoru (10 ml extrakčního činidla, 10 min, 55 °C, 400 W). Dávkováno bylo 100 µl vzorku. Meze detekce (při navážce 1000 mg a desetinásobném ředění) byly 0,20 µg kg⁻¹ pro MeHgCl, 0,07 µg kg⁻¹ pro Hg²⁺, 0,06 µg kg⁻¹ pro PhHgCl, 0,12 µg kg⁻¹ pro EtHgCl. Eluent z chromatografické kolony po smísení s okyseleným roztokem bromidu/bromičnanu přecházel přes UV reaktor, který zajišťoval převedení všech forem rtuti fotooxidací na Hg²⁺. Přebytečný brom byl následně odstraňován vodným roztokem hydroxylaminhydrochloridu. Rtuťnaté sloučeniny byly dále redukovány reakcí s SnCl₂ na elementární rtuť. Z roztoku byla pára rtuti uvolněna proudem argonu, oddělena v g-l separátoru fází, vysušena v membránové jednotce PermaPure[®] a detekována AFS v křemenné cele při 253,7 nm (obr. 10.6). Výsledná data byla zpracována chromatografickým softwarem Clarity (verze 2.1, Data Apex, Praha, ČR).



Obr. 10.6: Schéma HPLC-CV-AFS systému

Tato metoda nevyžaduje složitou přípravu vzorku. Vzhledem k silně nepolárnímu charakteru mají EtHgCl a PhHgCl v daném chromatografickém systému velmi dlouhé retenční časy. Stanovení EtHgCl a PhHgCl v rozumném retenčním čase je umožněno skokovým vzrůstem koncentrace methanolu v mobilní fázi na 100 % od 15 minuty separace. Mrtvý retenční čas byl 5 min. Výsledný chromatogram je znázorněn na obr. 10.7.



Obr. 10.7: Chromatogram standardů při stanovení HPLC-CV-AFS

Metoda je použitelná pro stanovení chemických forem rtuti v jednotlivých orgánech u ptáků a sladkovodních ryb, v sedimentech a vodních rostlinách. Pro stanovení specií rtuti ve vodách, které obsahují velmi nízké obsahy rtuti vyžaduje zařazení prekoncentračního kroku. Měřením získaná potravní pyramida vykazovala bioakumulaci rtuti s rostoucí trofickou úrovní ve vodním ekosystému.

Literatura

- 1. Emteborg H.: Speciation of mercury in environmental and biological matrices at ultratrace levels based on capillary gas chromatography and atomic spectrometry. Umea University, Sweden (1995).
- Houserová P., Janák K., Kubáň P., Pavlíčková J., Kubáň V.: Chemické formy rtuti ve vodních ekosystémech-vlastnosti, úrovně, koloběh a stanovení. Chem. Listy 100, 862-876 (2006).
- 3. Ikingura J. R., Akagi H.: Methylmercury production and distribution in aquatic systems. Sci. Total Environ. 234, 109-118 (1999).
- 4. Fournier F., Karasov W. H., Kenow K. P., Meyer M. W., Hines R. K.: The oral bioavailability and toxicokinetics of methylmercury in common loon (Gavia immer) chicks. Comp. Biochem. Phys. A 133, 703-714 (2002).
- Han Y., Kingston H. M., Boylan H. M., Rahman G. M. M., Shah S., Richter R. C., Link D. D., Bhandari S.: Speciation of mercury in soil and sediment by selective solvent and acid extraction. Anal. Biochem. Chem. 375, 428-436 (2003).
- 6. Leermakers M., Baeyens W., Quevauviller P., Horvat M.: Mercury in environmental samples: Speciation, artifacts and validation. Trac Trends Anal. Chem. 24, 383 392 (2005).
- 7. Canário J., Antunes P., Lavrado J., Vale C.: Simple metod for monomethylmercury determination in estuarine sediments. Trac Trends Anal. Chem. 23, 799-806 (2004).
- 8. Westöö G.: Determination of methylmercury compounds in foodstuffs. I. Methylmercury compounds in fish identification and determination. Acta Chem. Scand. 20, 2131 (1966).
- Houserová P., Matějíček D., Kubáň V., Pavlíčková J., Komárek J.: Stanovení chemických forem rtuti kapalinovou chromatografií s detekcí atomovou fluorescenční spektrometrií technikou generace studených par. Chem. Listy 101, 495-503 (2007).
- Trombini C., Fabbri D., Lombardo M., Vassura I., Zavoli E., Horvat M.: Mercury and methylmercury contamination in surficial sediments and clams of a coastal lagoon (Pialassa Baiona, Ravenna, Italy). Cont. Shelf Res. 23, 1821-1831 (2003).

- 11. Centineo G., González E. B., Sanz-Medel A.: Multielemental speciation analysis of organometallic compounds of mercury, lead and tin in natural water samples by headspace-solid phase microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometry. J. Chromatogr. A 1034, 191-197 (2004).
- Bravo-Sanchéz L. R., Encinar J. R, Martínez J. I. F., Sanz-Medel A.: Mercury speciation analysis in sea water by solid phase microextraction-gas chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry using ethyl and propyl derivatization. Matrix effects evaluation. Spectrochim. Acta B 59, 59-66 (2004).
- 13. Mester Z., Sturgeon R., Pawliszyn J.: Solid phase microextraction as a tool for trace element speciation. Spectrochim. Acta B 56, 233-260 (2001).
- 14. Yang L., Colombini V., Maxwell P., Mester Z., Sturgeon R. E.: Application of isotope dilution to the determination of methylmercury in fish tissue by solid-phase microextraction gas chromatographymass spectrometry. J. Chromatogr. A 1011, 135-142 (2003).
- 15. Rodil R., Carro A. M., Lorenzo R. A., Abuín M., Cela R.: Methylmercury determination in biological samples by derivatization, solid-phase microextraction and gas chromatography with microwave-induced plasma atomic emission spectrometry. J. Chromatogr. A 963, 313-323 (2002).
- Ipolyi I., Massanisso P., Sposato S., Fodor P., Morabito R.: Concentration levels of total and methylmercury in mussel samples collected along the coasts of Sardinia Island (Italy). Anal. Chim. Acta 505, 145-151 (2004).
- 17. Cai Y., Monsalud S., Jaffé R., Jones R. D.: Gas chromatographic determination of organomercury following aqueous derivatization with sodium tetraethylborate and sodium tetraphenylborate. Comparative study of gas chromatography coupled with atomic fluorescence spectrometry, atomic emission spectrometry and mass spectrometry. J. Chromatogr. A 876, 147-155 (2000).
- Ramalhosa E., Río Segade S., Pereira E., Vale C., Duarte A.: Simple methology for methylmercury and inorganic mercury determinations by high-performance liquid chromatography-cold vapour atomic fluorescence spectrometry. Anal. Chim. Acta 448, 135-143 (2001).
- 19. Blanco R. M., Villanueva M. T., Sánchez-Uría J. E., Sanz-Medel A. S.: Field sampling, preconcentration and determination of mercury species in river waters. Anal. Chim. Acta 419, 137-144 (2000).
- Sánchez D. M., Martín R., Morante R., Marín J., Munuera M. L.: Preconcentration speciation method for mercury compounds in water samples using solid phase extraction followed by reversed phase high performance liquid chromatography. Talanta 52, 671-679 (2000).
- Dong L. M., Yan X. P., Li Y., Jiang Y., Wang S. W., Jiang D. Q.: On-line coupling of flow injection displacement sorption preconcentration to high-performance liquid chromatography for speciation analysis of mercury in seafood. J. Chromatogr. A 1036, 119-125 (2004).

Práce vznikla za podpory výzkumného záměru MŠMT ČR MSM 0021622412.

11. TRENDS IN SAMPLE PREPARATION: INNOVATIVE STRATEGIES FROM INORGANIC SPECIES TO METALLOPROTEINS

Professor Marco A. Z. Arruda Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brazil <u>zezzi@iqm.unicamp.br</u>

11.1 Introduction

Sample preparation can be understood as any manipulation that modifies the sample matrix. Although it is as old as any process that reveals one or more sample characteristics [1], discussions about the role of sample preparation are always fruitful, once that they can push the development in different/complementary areas, allowing interrelations between them and a more complete comprehension about the studied system. In this way, innovative strategies applied to one of the oldest area (sample preparation) are challenges in terms of creativity. However, these challenges put on evidence the dynamic of the science and also the most creative solutions. In this sense, this text, which was adapted through reference [1], comments about the trends in sample preparation, particularizing some strategies such as Cloud point extraction (CPE), Ultrasound extraction (USE), Microwave-assisted water extraction (MAWE), Molecularly imprinted polymers (MIP) and bidimensional gel electrophoresis (2D-PAGE) for metalloprotein characterization/determination.

11.2 Cloud Point Extraction - CPE

Molecules presenting both hydrophilic and hydrophobic structures (obtained from surfactants) may associate in aqueous media to form dynamic aggregates commonly called micelles [2]. When the surfactant exceeds a minimum concentration (named Critical Micelle Concentration, c.m.c.), the monomers are then associated spontaneously. These structures can be considered as microscopically organized chemical assemblies, of colloidal dimensions, and the nature of the micelles is dependent of the solvent used, surfactant monomer, and of other possible surrounding ions.

The micellar system formed can be separated, at certain temperatures, into two apparently immiscible phases, one rich in surfactant, and another poor in surfactant. This phenomenon is named cloud point, and it is more common when non-ionic surfactants are employed, although ionic surfactants have also been used for this purpose.

The cloud point phenomenon can be used for extraction and/or preconcentration of inorganic or organic species as well as in the purification of a wide range of analytes. During cloud point phase separation process, the micelles, which attract non-polar analytes, aggregate into a surfactant-rich phase, with reduced volume, as long as other species maintain themselves in an aqueous phase.

Besides the advantages such as environmentally friendly, low costs, and others, the cloud point extraction (CPE) can also be used in industrial scale operations, as protein purification [3,4]. In fact, since the original work proposed by Hartley [5], which focused the functional model of the micelles geometry, an incredible growth of micelles studies and applications can be noted in the literature. For example, taking into account the last 5 years, about 15 thousand articles related to micelles are found in the literature.

11.3 Ultrasound Extraction - USE

The ultrasound energy has been used as an efficient way to improve the performance of several applications related to analytical chemistry, e.g., homogenization procedures [6] and extractions of inorganic and/or organic compounds [7,8].

The process involved in the sonochemical reactions can be characterized by formation, growth and implosive collapse of gas vacuoles in a solution. The cavity growth is dependent on the intensity of sound [9]. The collapse may proceed as an adiabatic compression, generating high temperatures and pressures [10], while an unusual environment for chemical reactions is established due to the implosion of cavities [9,11]. According to these conditions, the formation of free radicals and other compounds are easily detected when pure water is sonicated, for example, with the presence of H atoms and OH radicals as well as their recombination to form hydrogen peroxide [9,11,12]. In this way, the ultrasonic effects have been exploited for sample treatment, being excellent to perform solid-liquid extractions [13,14].

As chemical effects of ultrasound have been attributed to cavitation, the efficiency of the analyte extraction depends on the variables, which influence the cavitation process. These variables can be temperature, viscosity, presence of solid particle, height of water column, frequency, and position of the vessels used for extraction, among others. In this way, Nascentes et al. [15] optimized some conditions in order to maximize the cavitation intensity using two different ultrasonic baths as example. After the optimization, the better results obtained related to maximum cavitation intensity for both baths studied were: 1 L of water at room temperature, 0.2% (v/v) of detergent, central position on the bottom of the tank. Only one tube inside the bath per time should be used during the ultrasound application. The cavitation intensity was linear with the sonication time up to 10 min.

An interesting work was published by Linares et al. [16], in which the potentialities of the ultrasonic energy using flow-injection systems were presented. The influence of ultrasound on the physical dispersion of the injected sample was considered. As example, the authors pointed out catalytic and non-catalytic reactions as well as those based on liquid/liquid

extraction and precipitation. Aspects focusing the sensitivity increase were evaluated and some practical considerations and potential applications of flow systems and ultrasound energy were discussed. In another publication, Luque de Castro and Silva [13] pointed out the use of ultrasound as auxiliary energy source for solid sample treatment. In this sense, the authors emphasized different applications of ultrasound, mainly those related to sample treatment of agricultural, biological and environmental samples. Some other applications of this technique were also commented, such as liquid/liquid extraction, enzyme-catalyzed reactions, electrochemical processes and atomic spectroscopic techniques.

The use of ultrasound nowadays is a reality, mainly if one considers geological and/or environmental samples. In this way, Meegoda and Veerawat use the ultrasound energy to decontaminate organics in dredged sediments [17]. The authors carried out the experiments in a laboratory-scale, using both coarse (process 1) and fine (process 2) fractions of sediments. The p-terphenyl was selected as organic contaminant. In the process 1, some variables such as ultrasound power, solvent to sediment ratio, vacuum pressure, and sonication time were investigated, while the process 2 was evaluated without and with surfactants. In this last process, four variables were studied: power, solvent to sediment ratio, surfactant concentration, and sonication time. The best results were achieved for process 1 where had 99% contaminant removal efficiency at 60% power (900 W), 15:1 solvent to sediment ratio, 15 psi vacuum pressure, and 9 min of sonication time. The study emphasized that the proposed procedure using ultrasound energy is effective for treating dredged sediments.

The ultrasound energy was also applied for extracting organic species. In this way, Mecozzi et al. [18] described an ultrasound-assisted procedure for the extraction of bioavailable fraction of humic substance in marine sediments. The proposed method was based on consecutive sample extractions with 0.5 mol/L NaOH using ultrasound. Only 30 min was necessary in contrast to another method (24 h shaking with 8 mol/L HCl), which was also proposed by the same authors.

Danovaro et al. [19] proposed another interesting application for ultrasound extraction. The ultrasound was applied in that work as energy source to extract viruses from marine sediments. They were enumerated by epifluorescence microscopy using SYBR Green I as stain. The efficiency of ultrasonic extraction benthic viruses by pyrophosphate was ca. 60% of the extractable virus particles when only 3 min of sonication time was used. Samples treated with nucleases had increased virus counts, suggesting a masking effect of extra cellular DNA. Different techniques (epifluorescence and transmission electron microscopy) were also compared. However, no differences in the virus count were achieved.

The use of ultrasound can be made in combination to another method. It was demonstrated by Pino et al. [8], which used an ultrasound micellar extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from marine sediments. The polyoxyethylene 10 lauryl ether was used

as surfactant. Factorial design was employed to optimize the extraction parameters: extraction time, surfactant concentration and surfactant volume:amount of sediment relationship. The HPLC with UV detection was used as analytical technique. Recoveries from 86.7 to 106.6% were obtained from fortified sediments, with RSD of 2.02 - 6.8% for PAHs with a ring number higher than three.

11.4 Microwave-assisted water extraction – MAWE

Since their first appearance in the 1950s, specifically in kitchens, microwave ovens have been taken seriously in the chemistry laboratory. Nowadays, those chemists doing à la carte chemical reactions have increased exponentially. It can be understood that due to the facilities, much less time consumed, and different feedback systems were implemented in such machines. In this way, they can accurately control microwave power and time. Additionally, the reactions are continuously and accurately monitored (through temperature and pressure), and even built-in robotic systems are also available.

If these systems have been mainly used for total sample decomposition [20], recently they are also being considered for those gentle processes such as drying, leaching, cleaning-up, as well as adsorption/desorption and extraction [21].

Extraction performed through solvents or Soxhlet systems continues to be widely accepted, however when microwave energy is applied they can be carried out in a few minutes and with much lower solvent consumption [22]. Although the majority of applications related to microwave-assisted extraction (MAE) is related to organic compounds such as polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs), organochlorine pesticides (OCPs), polychlorine pesticides (PCBs), and alkanes [23], applications to biomolecules extractions are also considered for some years, however in lesser extension.

However, besides those common solvent applied to MAE, some recent application of microwave-assisted extraction can be found in the literature, but emphasizing another solvent: water. Such strategy is called microwave-assisted water extraction (MAWE) [24] and presents some advantages: 1) once that water is an abundant solvent, low costs extraction procedures can be obtained, 2) it can be easily purified, 3) extractions using water can really be considered an environmentally friendly process, 4) the matrix is not greatly modified after extraction, 5) at high temperature and pressure its dielectric constant is closer to ethanol or methanol, allowing the extraction of non-polar solvent, among others.

11.5 Molecularly imprinted polymers - MIP

Since 1949, Dickey already showed that specific adsorbents able to selectively rebind the compound used as template could be prepared [25]. In the referred case different dyes were adsorbed in silica. The insight made by Dickey was taken into account due to its importan-
ce, and in the early 70s Wullf et al. pointed out efficient molecular recognition systems by introducing functional groups in association to the imprinted binding sites [26-28].

Molecular imprinting is a technique used for preparing polymers with synthetic recognition sites having a predetermined selectivity for analyte(s). The imprint is obtained by arranging polymerizable functional monomers around a template as target molecule (the analyte). Complexes are then formed through covalent, non-covalent interactions, and sacrificial spacer approach between the analyte and the monomer precursors. The complexes are assembled in the liquid phase and fixed by cross-linking polymerization. Removal of the template (through extraction or hydrolysis) from the resulting polymer matrix creates vacant recognition sites that exhibit affinity for the analyte. If the considered analyte is a biomolecule (e.g. albumin) then these sites will recognize with high selectivity this specific protein.

Complementary information can be found in different reviews [28-36], which cover food, drug, and biological compounds analysis. among others.

MIP can be implemented in sample preparation once they are used as sorbent for solid phase extraction purposes [34] mainly for bio- and pharmaceutical analysis. Generally, the MIP is packed in an adsorption column, and the sample is impelled through flow system or gravity force, making the separation. The efficiency of the process is mainly due to the amount of binding sites as well as to the sample conditions in the moment of the separation.

Samples have to be conditioned in a similar medium to that where the polymer was synthesized in order to facilitate the interection between the analyte and the cavity of the polymer.

Samples used in MIP applications do not have to be subjected to a previous specific treatment. However, it is necessary to eliminate larger particles from samples. Exemplifying, sample preparation for MIP applications can involve previous protein precipitation for decreasing the complexity of the matrix (blood plasma) [37] or only a previous pH conditioning with specific buffer for urine samples, which are directly impelled through the column [38].

11.6 MIP Synthesis

Due to the importance of MIP synthesis and its use for recognizing biomolecules, a brief discussion about different strategies to attain these tasks will be made. A didactic general view of the MIP synthesis is shown in the review of Cormack and Elorza [29]. In that review the authors also comment about the polymer and morphological characterizations.

11.6.1 Covalent Approach

The covalent imprinted was introduced by Wulff and co-workers and it has as main characteristic the reversible covalent bonding between the template and the functional monomer. This bonding is the initial stage of the polymer synthesis, followed by a procedure for separation of the obtained compound. Later, the cross-linking (e.g. divinylbenzene) promotes the polymerization according to the spatial disposition of the template. Finally, it is necessary to promote hydrolysis of the bond between the template and the formed polymer, liberating the template for future bonds with the target [30]. Covalent imprinted, besides stable, is also selective mainly due to the exact fit between the template and the functional monomers. However, some limitations turn its use unfeasible such as: limited number of functional groups that react with the template, slow kinetic reaction rate involved between the template and functional monomers, and incompatibility with water [39].

11.6.2 Non-Covalent Approach

Pioneered by Mosbach and Ramström [40], it is considered the most commonly used approach for preparing MIPs due to its inherent simplicity [41]. The main characteristic of the non-covalent imprinted, is the fragile interaction between the template and the functional monomers (e.g. ion-ion, ion-dipole, dipole-dipole, hydrogen bonds and hydrophobic interactions). This fact has as consequence the possibility of template-monomers interactions using compounds as simple as methacrylic acid, methacrylamide, vinylpyridine, hydroxyethyl metacrylate and other commercial monomers [39]. Initially, the functional monomers are put together with the template, forming fragile interactions. Later, cross-linker (e.g. ethylene glycol dimethacrylate) promotes the polymerization reaction. Finally, the template is removed and the cavity formed in the polymer is selective for the target. High-affinity binding site can be generated using the non-covalent imprinted strategy; however, the main limitation is that the template must form a sufficient number of non-covalent interactions [30].

11.6.3 Sacrificial Spacer Methodologies

Due to those problems associated with covalent and non-covalent imprinted, Whitcombe et al. [42] proposed an alternative, which has advantageous characteristics of both covalent and non-covalent imprinted strategies. In this case, the authors used the functional monomer that bind with the template through covalent interaction but that it is easily and efficiently liberated by a cleaved hydrolytically with loss of CO2 to give a non-covalent recognition site. Therefore, in the referred technique, a covalent interaction between template and functional monomer happens in the first stage. Later, the template is cleaved, leaving part of its structure in the polymeric chain. Thus, the small fragments (linked to the polymeric chain) promote a non-covalent link to the target.

11.7 Bidimensional gel electrophoresis (2D-PAGE) for attaining metalloproteins analyses

For deciphering metalloproteomics, selectivity, structural and sensitivity components are necessary. One of the most important technique in the proteomics field (a more recently in the metalloproteomics field) is the electrophoresis, once that it allows thousands proteins separation with excellent selectivity and in a single run. Electrophoresis involves separation of charged species on the basis of their movement under the influence of an applied electric field. In proteins, the charged species can be produced by dissociation reactions of amino and carboxylic groups or by uniform coating of proteins with an anionic surfactant. In gel electrophoresis, the most important properties of proteins are both size (i.e., radius) and net charge. According to these properties, the proteins will have different migration velocities under electrophoresis conditions, which promote their separations in the referred technique. Others factors which also influence proteins separation through electrophoresis, are electric field applied and the viscosity of the medium [43].

Gel electrophoresis can be developed into one (1D) or two dimensions (2D). When taken into account two-dimensional electrophoresis technique, the separation is carried out through two steps using those distinct properties of proteins. In the first-dimension step, IEF is employed to separate proteins according to their pI. In the second-dimension step, the IEF gel is equilibrated with SDS, and it is inserted on the top of SDS-PAGE gel. Thus, the current is newly applied and proteins are separated according their MM. This two-dimensional separation allows a higher resolution than one-dimensional technique [43,44]. It is clear that sample preparation step is extremely important in such technique, once that it contributes not only for a better protein separation, but also for establishing its exact identity (structural characterization). Some aspects of sample preparation for 2D PAGE are then commented.

11.8 Sample Preparation

The proteins must be solubilized for almost all analytical techniques. For this task, there are three fundamental steps: (1) extraction of proteins from biological sample, (2) reduction of those substances which could interfere and (3) maintenance of proteins in solution until separation process to be finished [45,46]. Different conditions and treatments are required to solubilize different proteins, which are dependent of those electrophoretic techniques employed. The ideal protein solubilization procedure for electrophoresis results in a completely disruption of non-covalently bound protein complex and aggregates into a solution of individual polypeptides to prevent artificial spots.

11.9 Cell Disruption Method

The choice of extraction or cell disruption method is dependent on sample conditions (liquid or solid). Each cell disruption method should be performed at cold temperatures and as quick as possible, being used individually or combined with others. Some examples are listed [45]:

- Osmotic lysis → method which lysate is to be fractionated in subcellular components.
- Freeze-thaw lysis \rightarrow cells can be lysed with one or more quick freezing cycles with subsequent thawing.
- Detergent lysis → cellular membranes are solubilized, lysing cells and releasing their components.
- Enzymatic lysis \rightarrow specific enzymes can be used to remove cell walls.
- Sonication \rightarrow ultrasonic waves lyses cells through shear forces.
- French pressure cell \rightarrow cells are lysed by shear forces resulting from forcing suspension through a small orifice under high pressure.
- Grinding → cells can be opened by hand grinding with a mortar and pestle with assist (or not) of liquid nitrogen.
- Mechanical homogenization \rightarrow different devices can be used to promote mechanically homogenization of tissues such as hand-held and blenders.

11.10 Removal of Interfering Compounds

After or during cells disruption, interfering compounds have to be inactivated or removed. Interfering compounds are substances present in the sample that interact with proteins or can cause problems in the electrophoretic separation. The mainly interfering compounds in proteins analysis are salts, nucleic acids, lipids and polysaccharides. In plant materials lignins, polyphenols, pigments and alkaloids could be also included. In some cases, proteins presenting high concentrations are also considered as interfering compound. For example, albumin can be cited, which makes difficult the detection of proteins present at low level.

11.11 Proteins Solubilization

After cell disruption and removal of interfering substances, proteins must be both denatured and reduced to promote the disruption of intra- and intermolecular interactions, as well as their solubilization without charge properties modification, mainly when 2-DE separation is considered. Generally, the sample solubilization is carried out with buffer containing chaotropes, detergents, reducing agents and protease inhibitors (if necessary). The most popular sample solubilization buffer is that based on O' Farrell's lysis buffer [47]. Although it gives good results in many cases, not all protein complexes are completely disrupted with this buffer. Generally, modifications in lysis buffer as well as removal of interfering compounds are simultaneously made to improve sample preparation.

Descriptions about how these compounds interfere in proteins separation and which procedure required for removing or inactivating these substances are available in some reviews [45,46,48].

11.12 Conclusions

Accurate conclusions about a studied system are greatly dependent on the quality of the produced data, which are also greatly dependent on sample preparation. As almost the totality of analytical schemes is sample preparation-dependent, either new strategies or modifications on those ones already applied for such task are extremely salutary for an accurate interpretation data as demonstrated through this text.

References

- M. A. Z. Arruda (Ed.) Trends in Sample Preparation, Nova Science Publishers, Inc., New York, 2007, p. 304.
- [2] G. L. McIntire, Micelles in analytical-chemistry, Crit. Rev. Anal. Chem. 21(1990)257.
- [3] K. Selber, F. Tjerneld, A. Collén, T. Hyytiä, T. Nakari-Setälä, M. Bailey, R. Fergerström, J. Kan, J. van der Lann, M. Penttilä, M-R. Kula, Large-scale separation and production of engineered proteins, designed for facilitated recovery in detergent-based aqueous two-phase extraction systems, Process Biochem. 39 (2004) 889.
- [4] T. Minuth, H. Gieren, U. Pape, H. C. Raths, J. Thömmes, M. R. Kula, Pilot scale processing of detergent-based aqueous two-phase systems, Biotechnol. Bioeng. 55 (1997) 339.
- [5] G. S. Hartley, The application of the Debye-Hückel theory to colloidal electrolytes, Trans. Faraday Soc. **31** (1935) 31.
- [6] A. Henglein, Sonochemistry Historical developments and modern aspects, Ultrasonics 25 (1987) 6.
- [7] J. L. Gomez-Ariza, E. Morales, R. Beltran, I. Giraldez, M. Ruiz-Benitez, Ultrasonic treatment of molluscan tissue for organotin speciation, Analyst **120** (1995) 1171.
- [8] V. Pino, J. H. Ayala, A. M. Afonso, V. Gonzalez, Ultrasonic micellar extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from marine sediments, Talanta 54 (2001) 15.
- [9] K. S. Suslick, The chemical effects of ultrasound, Scient. Amer. Feb (1989) 80.
- [10] Y. Mizukoshi, H. Nakamura, H. Bandow, Y. Maeda, Y. Nagata, Sonolysis of organic liquid: effect of vapour pressure and evaporation rate, Ultrason. Sonochem. **6** (1999) 203.
- [11] L. R. F. Carvalho, S. R. Souza, B. S. Martinis, M. Korn, Monitoring of the ultrasonic irradiation effect on the extraction of airbone particulate matter by ion chromatography, Anal. Chim. Acta 317 (1995) 171.
- [12] C. A. Wakeford, R. Blackburn, P. D. Lickiss, Effect of ionic strength on the acoustic generation of nitrite, nitrate and hydrogen peroxide, Ultrason. Sonochem. 6 (1999) 141.
- [13] M. D. Luque de Castro, M. P. Silva, Strategies for solid sample treatment, Trends Anal. Chem. 16 (1997) 16.

- [14] J. Mierzwa, S. B. Adeloju, H. S. Dhindsa, Ultrasound accelerated solid-liquid extraction for the determination of selenium in biological samples by electrothermal atomization atomic absorption spectrometry, Anal. Sci. 13 (1997) 89.
- [15] C. C. Nascentes, M. Korn, C. S. Sousa, M. A. Z. Arruda, Use of ultrasonic baths for analytical applications: A new approach for optimisation conditions, J. Braz. Chem. Soc. 12 (2001) 57.
- [16] P. Linares, F. Lázaro, M. D. Luque de Castro, M. Valcárcel, Effects of ultrasonic irradiation in flowinjection systems, Anal. Chim. Acta 200 (1987) 51.
- [17] J. N. Meegoda, K. Veerawat, Ultrasound to decontaminate organics in dredged sediments, Soil Sediment Contam. 11 (2002) 91.
- [18] M. Mecozzi, M. Amici, E. Pietrantonio, G. Romanelli, An ultrasound assisted extraction of the available humic substance from marine sediments, Ultrason. Sonochem. 9 (2002) 11.
- [19] R. Danovaro, A. Dell'anno, A. Trucco, M. Serresi, S. Vanucci, Determination of virus abundance in marine sediments, App. Environm. Microbiol. 67 (2001) 1384.
- [20] H. M. Kingston, L. B. Jassie, Introduction to Microwave Sample Preparation, 1st ed., ACS Professional Reference Book, Washington, DC, 1988, p. 263.
- [21] Q. H. Jin, F. Liang, H. Zhang, L. Zhao, Y. Huan, D. Song, Application of microwave techniques in analytical chemistry, TrAC, Trends Anal. Chem. 18 (1999) 479.
- [22] H. M. Kingston, S. J. Haswell, Microwave-Enhanced Chemistry: Fundamentals, Sample Preparation and Applications, 1st ed., ACS Professional Reference Book, Washington, DC, 1997, p. 772.
- [23] J. A. Nóbrega, L. C. Trevizan, G. C. L. Araújo, A. R. A. Nogueira, Focused-microwave-assisted strategies for sample preparation, Spectrochim. Acta, Part B 57 (2002) 1855.
- [24] S. M. Muñoz, J. L. Luque-García, M. D. Luque de Castro, Pure and modified water assisted by auxiliary energy: An environmental friendly extractant for sample preparation, Anal. Chim. Acta 557 (2006) 278
- [25] F. H. Dickey, The preparation of specific adsorbents, Proc. Natl. Acad. Sci. 35 (1949) 227.
- [26] G. Wulff, A. Sarhan, K. Zabrocki, Enzyme-analog built polymers and their use for resolution of racemates, Tetrahedron Lett. (1973) 4329.
- [27] G. Wulff, W. Vesper, R. Grobe-Einsler, A. Sarhan, Enzyme-analogue built polymers, . 4. synthesis of polymers containing chiral cavities and their use for resolution of racemates, Makromol. Chem. 178 (1977) 2799.
- [28] G. Wulff, H. –G. Poll, Enzyme-analog built polymers. 23. influence of the structure of the bindingsites on the selectivity for racemic-resolution, Makromol. Chem. 188 (1987) 741.
- [29] P. A. G. Cormack, A. Z. Elorza, Molecularly imprinted polymers: synthesis and characterization, J. Chromatogr., B 804 (2004) 173.
- [30] V. B. Kandimalla, H. Ju, Molecular imprinting: a dynamic technique for diverse applications in analytical chemistry, Anal. Bioanal. Chem. 380 (2004) 587.
- [31] B. Sellergren, Noncovalent molecular imprinting: Antibody-like molecular recognition in polymeric network materials, TrAC, Trends Anal. Chem. **16** (1997) 310.
- [32] L. I. Andersson, Molecular imprinting: developments and applications in the analytical chemistry field, J. Chromatogr., **B 745** (2000) 3.
- [33] O. Ramström, K. Skudar, J. Haines, P. Patel, O. Brüggermann, Food analyses using molecularly imprinted polymers, J. Agricult. Food Chem. 49 (2001) 2105.
- [34] P. K. Owens, L. Karlsson, E. S. M. Lutz, L. I. Andersson, Molecular imprinting for bio-and pharmaceutical analysis, TrAC, Trends Anal. Chem. 18 (1999) 146.
- [35] X. Xu, L. Zhu, L. Chen., Separation and screening of compounds of biological origin using molecularly imprinted polymers, J. Chromatogr. **B 804** (2004) 61.
- [36] K. Haupt, Molecularly imprinted polymers in analytical chemistry, Analyst 126 (2001) 747.

- [37] P. D. Martin, G. R. Jones, F. Stringer, I. D. Wilson, Comparison of extraction of a beta-blocker from plasma onto a molecularly imprinted polymer with liquid-liquid extraction and solid phase extraction methods, J. Pharm. Biom. Anal. 35 (2004) 1231.
- [38] K. Moller, U. Nilsson, C. Crescenzi, Investigation of matrix effects of urine on a molecularly imprinted solid-phase extraction, J. Chromatogr., **B 811** (2004) 171.
- [39] M. J. Whitcombe, E. N. Vulfson, Imprinted polymers, Adv. Mater 13 (2001) 467.
- [40] K. Mosbach, O. Ramström, The emerging technique of molecular imprinting and its future impact on biotechnology, Bio/Technology 14 (1996) 163.
- [41] L. Schweitz, L. I. Andersson, S. Nilsson, Capillary electrochromatography with molecular imprintbased selectivity for enantiomer separation of local anaesthetics, J. Chromatogr., A 792 (1997) 401.
- [42] M. J. Whitcombe, E. M. Rodriguez, P. Villar, E. N. Vulfson, A new method for the introduction of recognition site functionality into polymers prepared by molecular imprinting - synthesis and characterization of polymeric receptors for cholesterol, J. Am. Chem. Soc. 117 (1995) 7105.
- [43] B. D. Hames, Gel Electrophoresis of Proteins A Practical Approach, 3rd ed., Oxford University Press, Oxford, 1998, p. 351.
- [44] M. Melvin, Electrophoresis Analytical Chemistry by Open Learning, 1st ed., Ed. D. Kealy, John Wiley & Sons, London, 1987, p. 127.
- [45] A. Görg, W. Weiss, M. J. Dunn, Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics, Proteomics 4 (2004) 3665.
- [46] T. Rabilloud, Solubilization of proteins for electrophoretic analyses, Electrophoresis 17 (1996) 813.
- [47] P. H. O'Farrel, High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins, J. Biol. Chem. 250 (1975) 4007.
- [48] M. M. Shaw, B. M. Riederer, Sample preparation for two-dimensional gel electrophoresis, Proteomics 3 (2003) 1408.