

8. ATOMOVÁ ABSORPČNÍ A EMISNÍ SPEKTROMETRIE

TEORIE:

Atomová absorpční a emisní spektrometrie patří mezi metody optické - využívá se zde absorpce či emise záření s energií, odpovídající vlnovou délkou ultrafialové a viditelné části spektra. Obě tyto metody hrají velmi významnou úlohu v analytické chemii při stanovení celkových obsahů prvků (především kovových) v nejrůznějších typech vzorků, včetně vzorků biologických materiálů.

Základem obou těchto metod je převedení vzorku, respektive analytu ve vzorku, do formy volných atomů v plynném stavu. V atomové absorpční spektrometrii (AAS) se využívá skutečnosti, že elektrony valenční vrstvy atomu v základním stavu mohou přijímat energii ve formě záření o vhodné vlnové délce a dochází k excitaci elektronu. Energie tohoto záření je shodná s excitační energií přechodu valenčního elektronu do některé z vyšších, neobsazených energetických hladin. Dochází k absorpci záření volnými atomy v plynném stavu a míru absorpce záření je možno měřit. Atomy absorbují záření ve velmi úzkém spektrálním intervalu. V tomto intervalu 0,0005 – 0,005 nm musí zdroj záření emitovat vysokou zářivou energii. Proto se používá záření těhož prvku, který stanovujeme. Mezi původním tokem záření Φ_0 a tokem záření Φ , který je výsledkem snížení toku Φ_0 absorpcí atomů v plynném stavu, platí Lambertův-Beerův zákon:

$$\Phi = \Phi_0 10^{-\kappa \cdot l \cdot N}$$

kde: κ je atomový absorpční koeficient,

l je délka absorpční vrstvy,

N je počet atomů v jednotce objemu.

Po jeho úpravě zavedením bezrozměrné veličiny absorbance A se získá vztah:

$$A = \log \frac{\Phi_0}{\Phi} = \kappa \cdot l \cdot N$$

Pro praktická měření není důležité znát absolutní počet atomů v absorpčním objemu, nýbrž obsah analytu ve vzorku. Naměřená hodnota absorbance se proto vztahuje na koncentraci analytu ve vzorku. V atomovém absorpčním spektrometru záření ze zdroje prochází absorpčním prostředím (atomizátorem), optickou soustavou a dopadá na detektor a zařízení, kde se měří a vyhodnocuje signál. Pro atomizaci analytu využíváme atomizátory - nejběžnější je plamen (například acetylen – vzduch) nebo elektrotermický atomizátor (ohřev ohmickým odporem při průchodu proudem například grafitovou tubicí). Zdrojem záření pro měření absorpce atomů jsou zpravidla výbojky s dutou katodou, vyrobenou z prvku, který stanovujeme. Pro detekci záření se zpravidla využívá fotonásobič.

V atomové (optické) emisní spektrometrii (AES, OES) využíváme toho, že u volných atomů můžeme vhodným způsobem excitovat valenční elektrony do některé z vyšších energetických hladin. Při deexcitaci (návratu elektronu na nižší či původní energetickou hladinu) se přebytečná energie vyzáří a dochází k emisi záření. Energie (vlnová délka) záření odpovídá energetickému rozdílu hladin a je charakteristická pro daný přechod - souvisí s elektronovým obalem atomu a tedy i s prvkem, který dané záření emituje. Spektrální analýzu emitovaného záření lze využít pro kvalitativní rozbor vzorku a důkaz přítomnosti určitých prvků. Intenzita záření o vybrané vlnové délce (analytická vlnová délka) závisí na koncentraci emitujících částic v excitačním zdroji a ta je závislá na koncentraci (či absolutním obsahu) analytu ve vzorku. Pro atomizaci a excitaci analytu lze využít plamene jako v AAS (plamenová fotometrie, například pro stanovení alkalických kovů), větší počet prvků je však excitován v různých plazmových zdrojích (elektrický oblouk, indukčně vázané plazma, mikrovlákné plazma aj.). Pro izolaci záření o potřebné vlnové délce se používají zpravidla monochromátory na principu difrakční mřížky a intenzita záření je měřena fotoelektrickým detektorem.

Atomový plamenový emisní spektrometr se skládá z budicího zdroje, monochromátoru, fotoelektrického detektoru a zařízení pro vyhodnocování signálu. V současné době se vedle jednocelových plamenových spektrometrů s výhodou používají atomové absorpční spektrometry, přičemž je přívod k primárnímu zdroji záření zakryt clonou a emitované záření je přerušováno (modulováno) výkonným přerušovačem za účelem získání vystupujícího signálu rozlišitelného od signálu pozadí. Téměř každý komerční atomový absorpční spektrometr lze snadno použít jako atomový emisní spektrometr.

Vzorek vnášíme do atomizačního (AAS) či excitačního (AES) prostředí zpravidla ve formě roztoku, a to zmlžováním proudem plynu. Vznikne aerosol, který vnášíme do plamene - zde dojde k odpaření rozpouštědla (vody), atomizaci a případné excitaci atomů. Pevné vzorky či vzorky ve vodě nerozpustné je tedy nejprve nutno převést do roztoku. Využíváme k tomu rozpouštění například v kyselinách, směsích kyselin, tavení s vhodným činidlem a další postupy. V případě biologických materiálů hovoříme o tzv. mineralizaci, kdy použitým postupem odstraníme (alespoň částečně) organické složky vzorku (bílkoviny, sacharidy, tuky aj.). V některých případech není nutno rozložit vzorek zcela - stačí, pokud se námi stanovovaný analyt rozpustí (vyextrahuje se) v použitém činidle.

Kvantitativní analýza využívá závislosti mezi naměřeným signálem (absorbancí, intenzitou emitovaného záření) a koncentrací analytu v roztoku vzorku. Nejde o metody absolutní a proto je nutná kalibrace pomocí sady standardních kalibračních roztoků o vzrůstající koncentraci analytu. Kalibrační závislosti bývají zpravidla lineární v určité oblasti koncentrací, a proto je vhodné koncentraci analytu ve vzorku upravit tak, aby intenzita změřeného signálu ležela v lineární části. Obě metody dosahují nízkých mezí detekce, jsou určeny převážně pro stanovení nízkých až stopových koncentrací analytů, například těžkých kovů či alkalických kovů. Ve stopové analýze se však setkáváme s problémy, které jsou při stanovení vyšších koncentrací (odměrná analýza, gravimetrie aj.) zanedbatelné. Jde především o hodnotu slepého pokusu - tedy koncentraci analytu v roztoku, který obsahuje všechna námi použitá činidla pro stanovení a byl podroben všem operacím, ale neobsahuje analyzovaný vzorek. V případě stanovení nízkých obsahů analytu je takovýto slepý pokus nutný, protože z použitých chemikálií, nádobí, vody i ze vzduchu může docházet ke kontaminacím při zpracování vzorku před měřením. Hodnotu slepého pokusu je potom nutno odečíst od stanoveného obsahu, tím by se zkrleslil výsledek stanovení a analýza by byla nesprávná.

Tabletu vitamínového přípravku je třeba nejprve rozpustit ve vhodném činidle a roztok zbavit nerozpustných příměsí, které by rušily při stanovení. Roztok naředit tak, aby se koncentrace analytu nacházela v rozsahu koncentrací kalibrační závislosti a proměřit absorbancí, resp. intenzitou emise, na atomovém absorpčním spektrometru. Pro oba analyty (Zn i K) se připraví sady kalibračních roztoků, které se využijí k sestrojení kalibračních závislostí. Cílem úlohy je stanovení obsahu Zn a K v jedné vitamínové tabletě - lze postupovat tak, že jedna tableta se celá rozloží a stanoví se obsah analytů v roztoku, nebo se tableta zváží, rozdrtí, v alikvotním podílu se po rozložení stanoví obsah analytů

a přepočítá na celou tabletu. Vedle kvantitativního stanovení obsahu draslíku se využije emisní spektrometrie také pro kvalitativní důkaz některých dalších prvků.

Hlavní rezonanční čáry alkalických kovů leží převážně ve viditelné oblasti spektra. Spektrálně se projevují intenzivními dublety. Při stanovení draslíku je nejcitlivější čára při 766,5 nm, výhodnou se jeví také druhá čára dubletu při 769,9 nm. Vzhledem k nízké excitační energii stačí k excitaci atomů i nízkoteplotní plameny. Při stanovení alkalických kovů pomocí AAS a AES se s moderními přístroji dosahuje výsledků podobné kvality. Předností AAS jsou menší spektrální rušivé vlivy. Díky nízkým hodnotám ionizačních energií dochází u alkalických kovů snadno k ionizaci, zejména při vyšší teplotě plamene. Pro jejich stanovení se někdy doporučuje chladnější plamen zemní plyn-vzduch nebo propan-vzduch. Nízká teplota plamene však vede ke zvýšení vlivu osnova vzorku. Stechiometrický plamen acetylen-vzduch je teplejší, získané signály jsou stabilní a reprodukovatelné. V plameni acetylen-N₂O ionizují všechny alkalické kovy a jejich stanovení vyžaduje přidavek ionizačního pufru k potlačení ionizace (jeden z alkalických kovů v nadbytku). K potlačení ionizace draslíku je i v plameni acetylen-vzduch třeba přidavku vysoké koncentrace Na (jako NaCl), která ale vede k nestabilitě signálu pravděpodobně ucpáváním hořáku. Použití koncentrace 1 g l⁻¹ Na je řešení kompromisní. Účinný je přidavek 1 g l⁻¹ Cs. Kalibrační křivky při stanovení v plameni acetylen-vzduch jsou lineární v rozsahu do 2 mg.l⁻¹ K.

Stanovení zinku patří k nejcitlivějším stanovením v AAS. Charakteristická koncentrace je až 0,012 mg l⁻¹ Zn. Zinek je v plameni zcela disociován a na jeho stanovení nepůsobí žádné výraznější rušivé vlivy. Stanovení se provádí AAS v plameni acetylen-vzduch pomocí kalibrační křivky sestavené pro srovnávací roztoky do 2 mg.l⁻¹ Zn.

8.1. Příprava vzorku vitamínového přípravku a blanku

Celou tabletu zalít ve 100 ml kádince 10 ml 10% roztoku kyseliny dusičné. Kádinku s vitamínovým přípravkem mírně zahřívát, až se tableta rozpadne. Poté obsah kádinky nechat vychladnout, zředit na cca 60 ml destilovanou vodou a přefiltrovat přes papírový filtr do odměrné baňky o objemu 100 ml. Do odměrné baňky je třeba dostat kvantitativně veškerý roztok z kádinky, tzn. kádinku je nutno několikrát vypláchnout malým množstvím vody a přefiltrovat. Filtr následně promýt malým množstvím destilované vody ze stříčky. Odměrnou baňku poté doplnit vodou po značku a umístit na 5 minut do ultrazvukové lázně.

Stejným způsobem je třeba provést i přípravu slepého stanovení (blanku), včetně zahřívání a filtrace, vitamínovou tabletu nahradit 10 ml destilované vody.

Takto získané roztoky vitamínového přípravku se vhodně naředí 1% roztokem HNO₃ tak, aby koncentrace analytů (Zn i K) ležely asi uprostřed kalibrační závislosti, tj. pro stanovení draslíku K se napítuje 5 ml roztoku vitamínového přípravku do 50 ml odměrné baňky a doplní 1% HNO₃ po rysku, pro stanovení zinku Zn se napítuje 1 ml roztoku vitamínového přípravku do 100 ml odměrné baňky a doplní po rysku 1% HNO₃. Důležité je vše řádně promíchat.

8.2. Stanovení draslíku metodou AES

Podmínky pro stanovení draslíku na plamenovém AA spektrometru: $\lambda_K = 766,5$ nm, propouštěný spektrální interval 0,2 nm, průtok acetylenu 65 l. hod⁻¹, 100 mm hořák, výška hořáku 7 mm, průtok vzorku 5 ml min⁻¹, integrační čas 3 s. Všechny tyto parametry včetně vyhodnocení kalibrační závislosti a vzorků jsou nastaveny v příslušné metodě pro jednotlivá stanovení.

8.2.1. Příprava kalibračních roztoků pro stanovení draslíku

Ze zásobního standardního roztoku KNO₃ o koncentraci draslíku 1 g.l⁻¹ se nejprve připraví vhodným zředěním 100 ml roztoku o koncentraci draslíku 10 mg.l⁻¹, tj. 1 ml draslíku K o koncentraci 1 g.l⁻¹ je třeba převést do 100 ml odměrné baňky a doplnit destilovanou vodou po rysku.

Dalším ředěním zásobního standardního roztoku draslíku o koncentraci 10 mg.l⁻¹ 1% roztokem kyseliny dusičné je potřeba připravit sadu standardních kalibračních roztoků o koncentraci draslíku K 0–2 mg.l⁻¹ po 0,5 mg.l⁻¹ (do 25 ml odměrných baněk).

8.2.2. Měření kalibračních závislostí

Po nastavení přístroje (hořák nastavit na 90 °) proměřit dle návodu intenzitu emise na analytické čáře draslíku a pomocí obslužného programu sestavit kalibrační závislost (lineární, procházející počátkem). Změřit koncentraci K ve slepém pokusu (destilovaná voda) a v připraveném roztoku vzorku. Koncentraci vyhodnocenou dle kalibrační závislosti přepočítat na množství draslíku K v tabletě (po případné korekci na hodnotu slepého pokusu) a porovnat s deklarovanou hodnotou.

8.2.3. Kvalitativní spektrální analýza

Podle návodu k přístroji nasnímat emisní spektrum při zmlžování neředěného roztoku vzorku v rozsahu vlnových délek 550 - 800 nm. Odečíst vlnovou délku pozorovaných emisních čar a identifikovat jednotlivé čáry ve spektru (tj. který prvek záření o dané vlnové délce emituje). Spektrum zkopírovat a přiložit k protokolu.

8.3. Stanovení zinku metodou AAS

Podmínky pro stanovení zinku na plamenovém AA spektrometru: $\lambda = 213,9$ nm, propouštěný spektrální interval 0,5 nm, lampa s dutou katodou, proud 4,0 mA, průtok acetylenu 50 l hod⁻¹, 100 mm hořák, výška hořáku 6 mm, průtok vzorku 5 ml min⁻¹, integrační čas 3 s. Všechny tyto parametry včetně vyhodnocení kalibrační závislosti a vzorků jsou nastaveny v příslušné metodě na přístroji.

8.3.1. Příprava kalibračních roztoků pro stanovení zinku

Ze zásobního standardního roztoku ZnSO₄ · 7H₂O o koncentraci zinku Zn 1 g.l⁻¹ se nejprve připraví 100 ml roztoku o koncentraci zinku Zn 10 mg.l⁻¹ vhodným zředěním, tj. 1 ml Zn o koncentraci 1 g.l⁻¹ je třeba převést do 100 ml odměrné baňky a doplnit destilovanou vodou po rysku

Dalším ředěním pracovního standardního roztoku zinku Zn o koncentraci 10 mg.l⁻¹ 1% roztokem kyseliny dusičné je potřeba připravit sadu standardních kalibračních roztoků o koncentraci zinku Zn 0–1 mg.l⁻¹ po 0,2 mg.l⁻¹ (do 25 ml odměrných baněk).

8.3.2. Měření kalibračních závislostí

Po nastavení přístroje proměřit dle návodu absorbanci na čáře zinku a pomocí obslužného programu sestavit kalibrační závislost (lineární, procházející počátkem). Změřit koncentraci Zn ve slepém pokusu a v připraveném roztoku vzorku. Koncentraci vyhodnocenou dle kalibrační závislosti přepočítat na množství Zn v tabletě (po případné korekci na hodnotu slepého pokusu) a porovnat s deklarovanou hodnotou.

8.4. Vyhodnocení AES A AAS

Při vyhodnocení stanovení K a Zn ve vitamínovém přípravku v protokolu do závěru uvést:

1. Nasnímané emisní spektrum při zmlžování neředěného roztoku vzorku v rozsahu vlnových délek 550 - 800 nm a identifikovat jednotlivé čáry ve spektru
2. Hodnoty nalezených koncentrací (mg/l) a obsahu (mg) K a Zn přepočítané na celou tabletu vitamínového přípravku s přihlédnutím k ředění vzorku (v odměrné baňce je pouze alikvotní část zadaného vzorku) zaokrouhlené na platný počet míst, vyplněné tabulky a sestrojené kalibrační závislosti.
3. Srovnání nalezených množství K⁺ a Zn²⁺ a deklarovaných množství těchto látek ve vitamínovém přípravku.
4. Zdůvodnění možného rozdílu od deklarovaných hodnot.