

ÚLOHA č.4

ATOMOVÁ ABSORPČNÍ SPEKTROMETRIE

Stanovení mědi ve víně metodou AAS

ÚKOLY:

- 4.1. Seznámení s metodou
- 4.2. Stanovení mědi ve víně
 - 4.2.1. Metoda kalibrační křivky
 - 4.2.2. Metoda standardních přídavek
- 4.3. Vyhodnocení analýzy

Přístrojové vybavení:

Spektrofotometr novAA 330 pro atomovou absorpční a emisní spektrometrii

Chemikálie:

Zásobní roztok $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (1mg/ml), 1% roztok HNO_3 , tlaková láhev s acetylenem, vzorek vína.

Chemické sklo:

Odměrná baňka 100 ml (2x), 25 ml (11x), kádinka 100 ml (2x), 50 ml (1x), pipetovací balónek, pipeta nedělená 5 ml (1x), pipeta dělená 5 ml (1x), 2 ml (1x), umělohmotná pipetka, skleněná tyčinka, nálevka, stříčka

4.1. SEZNÁMENÍ S METODOU

4.1.1. OBECNÝ PRINCIP METODY

TEORIE:

Atomová absorpční a emisní spektrometrie patří mezi metody optické - využíváme zde absorpci či emisi 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 nejprve převedení vzorku, respektive analytu ve vzorku, do formy volných atomů v plynném stavu. Atom určitého prvku má elektronovou konfiguraci, která je pro něj charakteristická. V atomové absorpční spektrometrii (AAS) využíváme 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 téhož 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**

$$\Phi = \Phi_0 10^{-\epsilon \cdot c \cdot l}$$

ve kterém jednotlivé symboly značí:

- κ – atomový absorpční koeficient
- l – délka absorpční vrstvy
- N – počet atomů v jednotce objemu.

Po jeho úpravě zavedením bezrozměrné veličiny absorbance, A získáme vztah:

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \kappa \cdot l \cdot N$$

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 proudu například grafitovou trubicí). 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 analýza 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, mikrovlnné 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 budícího zdroje, monochromátoru, fotoelektrického detektoru a zařízení pro vyhodnocování signálu. V současné době se vedle jednoúčelových 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) 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, směsí 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) a koncentrací analytu v roztoku vzorku. Nejde o metodu 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. Metoda AAS dosahuje nízkých mezí detekce, je určena 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.) opominutelné. 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 či pracovníka může docházet ke kontaminacím při zpracování vzorku před měřením. Hodnotu slepého pokusu je potom nutno odečíst od stanoveného obsahu, protože by se tím zkreslil výsledek stanovení a analýza by byla nesprávná.

Atomová absorpční spektrometrie (AAS) tedy využívá jako analytickou vlastnost absorpci elektromagnetického záření volnými atomy sledovaného elementu. Podstatou metody je absorpce vhodného elektromagnetického záření volnými atomy v plynném stavu. Absorbovat se bude záření, které splňuje podmínku:

$$E_1 - E_0 = \frac{h \cdot \nu}{\lambda}, E_2 - E_0 = \frac{h \cdot \nu}{\lambda}, \dots \text{ atd.}$$

kde: E_0 – energie základní hladiny,
 E_1, E_2, \dots atd. – energie excitovaných hladin

Úbytek primárního záření je mírou koncentrace volných atomů prvku, který záření absorboval. Rozdíly energií mezi jednotlivými elektronovými stavy atomu jsou funkcí atomového čísla sledovaného prvku. Přejít z nižší energetické hladiny m na vyšší hladinu n není spontánní, ale je vynucen přítomností záření o vhodném kmitočtu ν_{mn} [s^{-1}] a energií fotonu $h \cdot \nu_{mn}$. Absorpce fotonu vzniká excitovaný atom. Excitovaný atom může samovolně přejít na nižší energetický stav, rozdíl energií ΔE_{nm} se může vyzářit v podobě fotonu o stejném kmitočtu ν_{mn} a energii $h \cdot \nu_{mn}$:

$$\Delta E_{nm} = h \cdot \nu_{mn}$$

kde: E_{nm} – energie v elektronvoltech [eV], případně v Joulech [J],
 λ – vlnová délka v nanometrech [nm],

Rozdíl energií, odpovídající přechodu mezi energetickými stavy m a n při pohlcení nebo vyzáření fotonu se liší jen znaménkem. Tuto vlastnost hmoty emitovat a absorbovat elektromagnetické záření téže vlnové délky vyjadřuje Kirchhoffův zákon, který je též základem pro analytické využití atomové absorpce. Pro tvorbu volných atomů se nejčastěji v AAS používá plamen, který podle druhu paliva a oxidovadla dosahuje teploty 2000 - 3150 K. Při těchto teplotách se převážná část volných atomů většiny prvků nachází v základním energetickém stavu E_0 a pohlcením fotonu se dostává na některou z vyšších energetických hladin. Elektronové přechody ze základního stavu, stejně jako emisní procesy na tomto energetickém stavu končící, se nazývají rezonanční. V AAS mají největší pravděpodobnost přechody mezi základním a nejbližším excitovaným stavem o energii E_1 . Těmto přechodům odpovídají tzv. základní rezonanční čáry, které jsou pro atomy jednotlivých prvků nejcitlivější a zcela specifické, neboť jsou funkcí vzájemného působení elektricky kladně nabitého jádra a pro daný prvek charakteristické konfigurace elektronového obalu. Pro poměrné zastoupení počtu atomů ve vyšším a nižším energetickém stavu podle **Boltzmannova rozdělovacího zákona** platí:

$$\frac{N_1}{N_0} = \frac{g_1}{g_0} \exp\left(-\frac{E_1 - E_0}{k \cdot T}\right)$$

kde: N_0 (resp. N_1) – koncentrace atomů v základním (resp. excitovaném stavu) vyjádřená jejich počtem v objemové jednotce [m^{-3}],
 g_0 a g_1 - statistické váhy těchto stavů,
 k - Boltzmannova konstanta [$J K^{-1}$],
 T - absolutní teplota [K]

Podíl excitovaných atomů N_1 , za předpokladu že $g_1 = g_0$, je v plamenech při rozdílech energetických hladin $E_1 - E_0$, odpovídajících emisi záření ve viditelné a ultrafialové oblasti spektra, velmi malý. Pro $\nu = 1015 \text{ Hz}$, $\lambda = 300 \text{ nm}$ a $T = 3000 \text{ K}$ je $N_1 / N_0 = 1,5 \cdot 10^{-7}$. Naprostá většina volných atomů se nachází v základním stavu a je proto schopna absorbovat záření svých rezonančních vlnových délek (nebo kmitočtů).

Atomová absorpční spektra využíváme v rozpětí vlnových délek 190-900 nm. Prochází-li monochromatické záření vhodným absorpčním prostředím o tloušťce b a počtu volných atomů v základním stavu N_0 , dochází k zeslabení toku záření z původní hodnoty Φ_0 na hodnotu Φ [$J s^{-1}$]. Za konstantní teploty a počtu elektronů je počet atomů na základní energetické hladině úměrný koncentraci c , sledovaného prvku (analytu) v roztoku, který do plamene zmlžujeme. Matematickým vyjádřením uvedených skutečností je spojený **zákon Bougherův-Lambertův** a **Beerův** ve tvaru:

$$A = \log \frac{\Phi_0}{\Phi} = \epsilon \cdot c \cdot b$$

kde: A – absorbance,
 Φ_0, Φ – původní a prošlý zářivý tok,

b - tloušťka absorbující vrstvy [cm],

c_a - koncentraci analytu [mol.l^{-1}]

ϵ_λ – molární absorpční koeficient (konstanta úměrnosti, která je při dané vlnové délce charakteristická pro absorbující prvek, jeho hodnota a rozměr závisí na vyjádření koncentrace [$\text{l.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$]).

!POZOR!

Pokud uvedeme koncentraci analytu jako hmotnostní (např. mg.l^{-1}) a tloušťku vrstvy v cm, potom se absorpční koeficient značí symbolem a_λ a jeho rozměr je [l.g.cm^{-1}].

V případě, že zůstaneme u koncentrace vyjádřené počtem volných atomů N_0 v objemové jednotce, potom se jedná o tzv. **atomový absorpční koeficient**, označovaný symbolem X_λ , který má rozměr plochy [m^2], jejíž velikost odpovídá účinnému průřezu atomu pro absorpci fotonu.

Kromě absorbance je důležitou veličinou **transmittance** (propustnost) τ - poměr toku záření prošlého absorpčním prostředím ku zářivému toku do prostředí vstupujícího:

$$\tau = \frac{I}{I_0}$$

Transmittanci využíváme při nastavení maxima vlnové délky rezonanční čáry ve spektrálním intervalu vymezeném monochromátorem. Mezi absorbancí a transmittancí platí jednoduchý převodní vztah:

$$A = -\lg \tau$$

Metoda AAS je jako většina analytických metod metodou srovnávací, u níž měřenou veličinou je absorbance. Hodnota absorbance jako míra koncentrace sledovaného prvku nezávisí na velikosti zářivé energie primárního zdroje, ale hustotou zářivé energie je ovlivněna velikost nejmenší měřitelné absorbance (odstup signálu od šumu) a tím i mez detekce. Vyhodnocování výsledků provádíme metodou kalibrační křivky, sestavené proměřením absorbancí srovnávacích roztoků o známé koncentraci, nebo metodou standardních přidávků. Ve vzorcích přicházejících k analýze se obvykle sledovaný prvek vyskytuje spolu s dalšími elementy či sloučeninami, které mohou významně ovlivnit hodnotu absorbance. Toto ovlivnění míry signálu složkami matrice vzorku označujeme jako **interferenci**, tj. rušivý vliv. Interference rozlišujeme spektrální a nespektrální. Spektrální interference jsou způsobeny nedokonalou izolací absorpčního signálu analytu a interferentu. Překryv absorpčních linií čárových atomových spekter je v AAS dosti vzácný. Záření primárního zdroje však může být při průchodu absorpčním prostředím zeslabeno nejen volnými atomy analytu, ale i tzv. nespecifickou absorpcí, která je způsobena rozptylem záření na nevypařených částicích aerosolu a molekulovou absorpcí. Zatímco rozptyl se nejvíce projevuje v oblasti krátkých vlnových délek (do 250 nm), má absorpce molekulami širokopásmový charakter a projevuje se v celé využitelné oblasti spektra. Nespecifická absorpce se přičítá k signálu analytu a vyvolává vždy pozitivní chybu. Korekce neselektivní absorpce se nejčastěji provádí pomocí zdroje kontinuálního záření, kterým bývá v ultrafialové oblasti (do 350 nm) deuteriová výbojka a ve viditelné oblasti halogenová žárovka s wolframovým vláknem. Nespektrální interference zahrnují ostatní jevy, např. rušivý vliv transportu vzorku do plamene (změny v rychlosti sání a účinnosti zmlžování, ovlivněné různým povrchovým napětím, hustotou a viskozitou vzorků), rušivý vliv vypařování kondenzované fáze vznikem sloučenin s odlišnou těkavostí (depresivní vliv fosfátů při stanovení vápníku či pozitivní vliv fluoridů při stanovení hliníku) a interference v plynné fázi, dané posunem disociační a ionizační rovnováhy a změnami prostorového rozložení volných atomů v plameni. Nespektrální rušivé vlivy nejsou aditivní, mohou tedy vyvolat jak kladné tak záporné chyby a náhodně může dojít i k jejich vzájemné eliminaci. Složení srovnávacích roztoků by proto mělo co nejlépe odpovídat matrici vzorku, ve kterém sledujeme určitý prvek. Provádíme-li potom za stejných podmínek (zmlžování, vlnová délka, složení plamene, délka šterbiny hořáku aj.) měření absorbance analytu ve vzorku, zjednoduší se matematické vyjádření **zákona Bougherova-Lambertova a Beerova** na přímou úměrnost mezi absorbancí a koncentrací analytu ve vzorku:

$$A = k \rho$$

kde: ρ – hmotnostní koncentrace sledovaného analytu.

Lineární závislost však platí jen v oboru nízkých koncentrací, při vyšších hodnotách ρ se zakřivuje k ose koncentrací, protože zákon Bougherův-Lambertův a Beerův byl odvozen pro nízké koncentrace. Nejběžnějším vyjádřením koncentrace prvku v AAS je označení ppm, což pro hmotnostní koncentraci analytu v roztoku znamená $\mu\text{g.ml}^{-1}$ (mg.l^{-1}). Totéž označení může vyjadřovat i koncentraci analytu v pevném vzorku, např. $\mu\text{g.g}^{-1}$ nebo mg.kg^{-1} .

Směrnice závislosti $k = dA/dp$ určuje citlivost metody. V AAS se často uvádí tzv. charakteristická koncentrace prvku, což je převrácená hodnota citlivosti pro koncentraci, která absorbuje 1% původního záření ($T = 0,99$) a odpovídá hodnotě absorbance $A = 0,0044$. Charakteristická koncentrace se vyjadřuje v hmotnostní koncentraci kovu v roztoku bez doprovodných příměsí a pro jednotlivé prvky se liší až o několik řádů. Moderní přístroje s atomizací v plameni dosahují např. pro Ca a Mg charakteristickou koncentraci 0,003 ppm a pro Cr hodnotu ppm.

Metoda AAS s plamenovou atomizací umožňuje měřit koncentraci asi 60 elementů (kovů a přechodových prvků) a používá se při analýzách vzorků různého původu. Významný je podíl této metody při sledování nízkých obsahů toxických prvků ve vzorcích životního prostředí, kde se velmi dobře uplatňuje pro svou vysokou citlivost a selektivitu.

4.1.2. INSTRUMENTACE – ATOMOVÝ ABSORPČNÍ SPEKTROMETR A JEHO FUNKCE

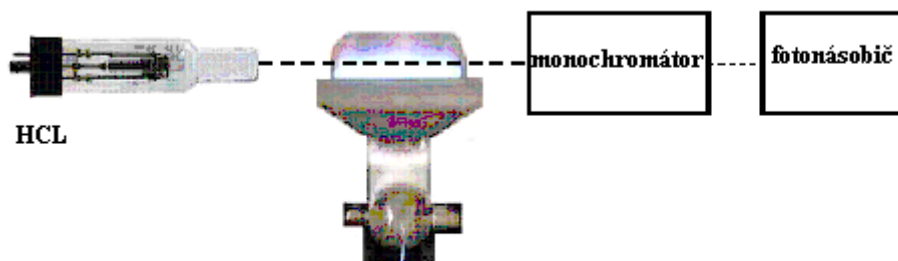
Základní konstrukční prvky každého atomového absorpčního spektrofotometru tak, jak jsou za sebou zařazeny v optické ose, jsou:

- zdroj monochromatického rezonančního záření sledovaného prvku,
- absorpční prostředí s volnými atomy,
- monochromátor k izolaci rezonanční čáry primárního záření,
- detektor tohoto záření, kterým se mění proud fotonů (zářivý tok) na proud elektronů (elektrický proud),
- počítačové zpracování signálu.

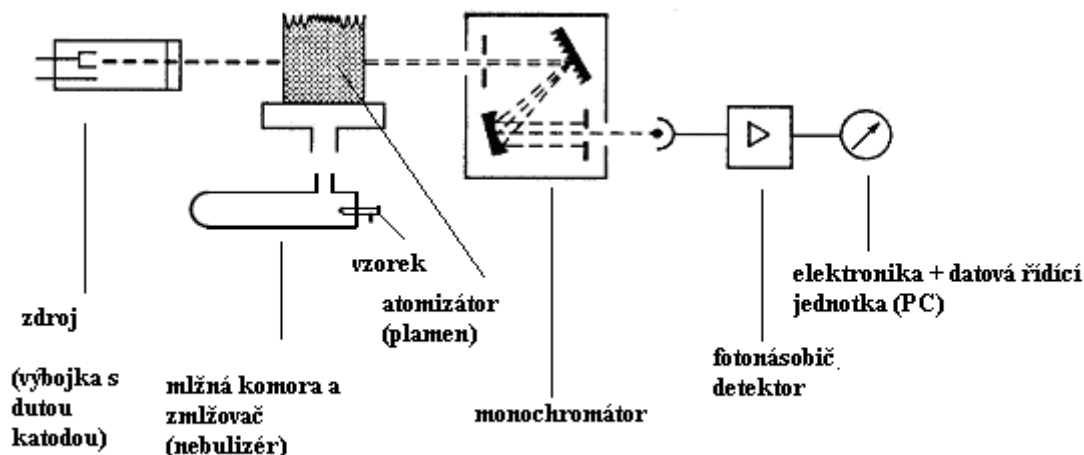
Obr. 1: Pohled na atomový absorpční spektrofotometr novAA 300 Analytik Jena s vestavěnou dotykovou obrazovkou (v laboratoři analytické chemie je umístěn přístroj řízený externím počítačem, bez této lokální dotykové obrazovky)



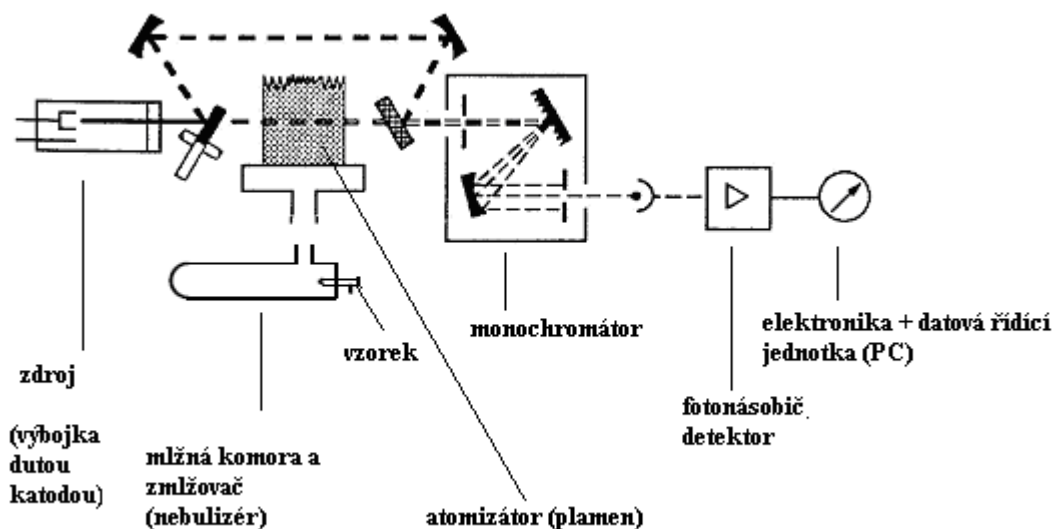
Obr. 2: Schéma AAS s plamenovou atomizací vzorku



a) schéma jednopaprskového AAS



b) schéma dvouprskového AAS

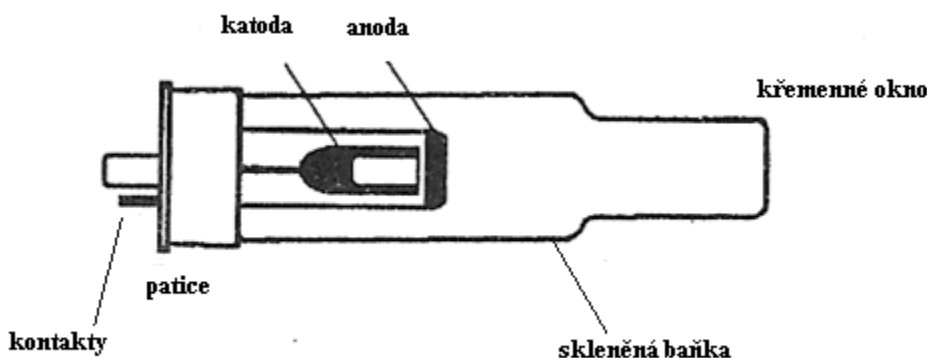


Zdroj

Zdrojem primárního záření je nízkotlaková, neonem plněná výbojka s dutou katodou. Výbojka pracuje v doutnavém režimu při minimálním proudu několika miliampér a tlaku řádově 10^{-1} kPa. Emituje čárové spektrum toho prvku, ze kterého je zhotovena dutá katoda, nebo který je v materiálu duté katody obsažen. Tím je dána vysoká selektivita této metody, již je možné stanovit koncentrace jednotlivých prvků ve vzorku obvykle bez nutnosti dělení.

Podmínky buzení při nízkém tlaku i teplotě zaručují, že rezonanční záření je vysoce monochromatické, má pološířku profilu (tj. šířku měřenou v polovině výšky profilu čáry) jen asi 10^{-3} nm. Záření vysílané výbojkou je modulováno frekvencí, na kterou je naladěný střídavý zesilovač. Modulace se provádí elektricky nebo mechanicky přerušovačem. Modulací se umožní měřit jen záření výbojky, nikoli záření emitované z atomizačního prostředí, např. z plamene. K vysokonapětovému napájení výbojky slouží stabilizovaný proudový zdroj o napětí asi 400 V. V současné době se vyrábějí výbojky s dutou katodou pro více než 60 prvků. Pro elementy, které mají podobné fyzikální vlastnosti a přibližně stejně se i katodicky rozprašují, je možné vyrábět výbojky s víceprvkovou katodou, která je v tomto případě zhotovena sintrací směsi 2 až 6 druhů práškových kovů.

Obr.3: Schéma lampy s dutou katodou



Atomizátor

Absorpční prostředí, kde vznikají volné atomy analytu, musí mít teplotu alespoň 2000 - 3000°C. Nejjednodušeji realizovatelným prostředím k atomizaci je laminární předmíchaný plamen, který se získává laminárním hořením předmíchané směsi acetylenu se vzduchem popř. oxidem dusným ve speciálním hořáku. Jeho ústí má tvar úzké štěrby, pro plamen acetylen-vzduch dlouhé 10 cm a pro plamen acetylen-oxid dusný s vyšší rychlostí hoření pouze 5 cm. Délkou štěrby je dána i maximálně dosažitelná tloušťka vrstvy absorpčního prostředí, kterým prochází záření z výbojky. Analyzovaný vzorek s určeným prvkem se přivádí do plamene ve formě aerosolu, tj. nepatrných kapiček analyzovaného roztoku. Zmlžování roztoku se provádí pneumatickým zmlžovačem pomocí tlaku oxidujícího plynu, kterým je vzduch popř. oxid dusný. Potřebné plyny se odebírají z tlakových lahví, vzduch většinou z kompresoru. Každý AA-spektrofotometr musí být vybaven regulací a měřením průtoku paliva i oxidovadla. Poměrem obou plynů ve směsi se získává buď oxidační nebo redukční typ plamene. Redukční plamen je vhodný k atomizaci prvků, které tvoří termostabilní oxidy (např. Cr, Al). Složení a teplota plamene se mění s jeho výškou. Pro každý prvek existuje proto optimální zóna v plameni daná výškou nad ústím hořáku, kde koncentrace volných atomů je největší. Tuto výšku je třeba zjistit pokusně. Poloha hořáku musí být proto nastavitelná, a to jak ve vertikálním, tak i horizontálním směru.

Monochromátor

Za plamenem následuje mřížkový monochromátor, který slouží k izolaci vhodné rezonanční čáry. Natáčením mřížky se nastavuje vlnová délka rezonanční čáry na maximum propustnosti. Běžný monochromátor mívá pomocí vstupní a výstupní štěrby regulovatelnou šířku spektrálního intervalu od 0,1 nm do 2,0 nm. Jak již bylo uvedeno, šířka profilu rezonanční čáry je řádově 0,001 nm. Šířka spektrálního intervalu se volí tak, aby spolu s rezonančním zářením nedopadalo na detektor neabsorbující čili balastní záření čar blízkých vlnových délek. To by způsobilo zakřivení koncentrační závislosti absorbance (neplatnost Bougherova-Lambertova-Beerova zákona). Je-li rezonanční čára ve spektru výbojky osamocena, lze pracovat s širším intervalem (např. 0,5 až 1,0 nm).

Detektor

K detekci toků záření Φ_0 a Φ se zařazuje těsně za výstupní štěrbinu monochromátoru fotonásobič s fotokatodou, jejíž citlivost je dostačující pro sledovanou oblast spektra, tj. od 190 do 900 nm. Získaný fotoproud se zesiluje jednak vkládáním napětí na dynody násobiče elektronů, jednak dalším zesilovačem. V AAS, se používají fázově citlivé zesilovače (lock-in) laděné na frekvenci modulačního záření výbojky. Pro přímé odečítání hodnot absorbancí na lineární stupnici je indikační systém vybaven logaritmickým převodníkem. Moderní AA-spektrofotometry jsou vybaveny analogově-digitálním převodníkem a v digitální formě se provádí ovládání nastavitelných parametrů, automatické odečítání nespecifické absorpce, nebo-li pozadí, vyhodnocování výsledků, statistika, tisk výsledků apod.

4.2. STANOVENÍ MĚDI VE VÍNĚ

PRINCIP:

Protože sledujeme absorpci elektromagnetického záření volnými atomy v plynném stavu, musíme před vlastním měřením absorbance převést atomy stanovovaných prvků do atomárního stavu a následně volné atomy, které již nejsou součástí molekul do plynného stavu. Teprve v tomto stavu můžeme sledovat absorpci záření. Na převedení atomu do volného atomárního plynného stavu je nutné dodat energii ve formě tepla. Vzorek musí být vždy připraven ve formě roztoku.

Proces, který je souborem složitých procesů, které vedou ke vzniku volných atomů v plynném stavu se nazývá atomizace. Potřebná teplota na atomizaci kovových atomů je v rozmezí 2000 - 3000°C . Teplota pro atomizaci, ale nesmí být vyšší než je teplota nutná k excitaci elektronů. Jako zdroje záření o vhodné vlnové délce, jehož absorpci volnými atomy stanovovaného prvku sledujeme, se používají výbojky s dutou katodou. Katodu tvoří váleček z kovu, který stanovujeme (např. pro stanovení Cu je katoda vyrobena jako měděný váleček). Anodu tvoří buď wolframový nebo molybdenový drát. Lampa je naplněna argonem nebo neonem o tlaku 1 kPa. Mezi anodu a katodu je vloženo napětí 400 V, kdy vzniká doutnavý výboj. Při něm ionizované atomy argonu nebo neonu bombardují kov, uvolněné atomy kovu se srážkami excitují a při deexcitaci vysílají potřebné záření.

Pro AAS se používají dva druhy atomizátorů – plamenový atomizátor (FA AAS) a elektrotermický atomizátor (ETA AAS). Plamenový atomizátor pracuje na principu zmlžování nasávaného vzorku teflonovou trubičkou pomocí ultrazvuku nebo pneumatického zmlžování. Vzniklý aerosol vzorku je unášen plynem do plamene. V plameni probíhá atomizace – odpaření rozpouštědla vzorku, odpaření molekul vzorku, disociace vazeb mezi atomy v molekulách a následně převedení uvolněných atomů do plynného stavu. Plamen tvoří vždy palivo a okysličovadlo. Podle druhu paliva a okysličovadla je pak dosaženo určité teploty.

Vznik atomů v plameni je složitý proces. Výtěžek atomizace závisí především na teplotě plamene a parciálním tlaku spalných produktů plamene. Rozhodující je výběr plynové směsi, stechiometrie paliva a oxidovadla. Mnohdy je výhodou vhodné redukční prostředí v plameni, přítomnost organických sloučenin a rozpouštědel. Plamen musí být opticky propustný, nemá absorbovat záření, má vést k maximálnímu výtěžku atomizace prvku. Absorpce atomů je sledována v definované výšce plamene. Pevné nebo kapalné částice v plameni mohou vyvolat rozptyl záření, nedisociované molekuly pak nespecifickou absorpci záření. U laminárních plamenů dochází k míchání plynů před dosažením hořáku.

Tab.: Plameny plynných směsí používaných v AAS

plynná směs	rychlost hoření cm/s	průměrná teplota °C	rozsah teplot °C
propan - vzduch	80	1930	
acetylen - vzduch	160	2300	2125 - 2400
acetylen - N ₂ O	180	2700	2660 - 2800

Směs propan-vzduch je používána jen při stanovení alkalických kovů a Pb. Obvyklá je směs acetylen-vzduch. Maximální absorpční signál v plameni acetylen-vzduch pro stanovení Cd, Pb nezávisí na složení plamene, pro Cu, Zn, Ni, Co, In a Ga je získán v palivově chudém - oxidačním plameni. Silně oxidační plamen se používá pro stanovení Au, Ir, Pt, Pd, Rh, silně redukční pro kovy alkalických zemin a svítivý palivově bohatý plamen pro stanovení Mo, Cr a Sn. Stechiometrický plamen se používá pro stanovení Fe a Mn. Při používání svítivého plamene (velký nadbytek acetyleny) se projevuje zvýšený šum přístroje.

Ve směsi acetylen-N₂O dochází k atomizaci prvků v červené zóně plamene (vysoká 5 - 50 mm u slabě redukčního plamene). Ve spektru plamene se objevují pásy CN, CH, NH, které zvyšují šum přístroje a znemožňují stanovení prvku při použití slabých zdrojů záření. V tomto plameni se však odstraní většina chemických rušivých vlivů a dochází k rozrušení stabilních oxidických vazeb v binárních a ternárních oxidických fázích. Atomy velkého počtu prvků již v plameni ionizují.

4.2.1 METODA KALIBRAČNÍ KŘIVKY

POSTUP:

Ze zásobního roztoku o koncentraci 1mg Cu/ml připravíme do 100ml odměrné baňky roztok o koncentraci 10 µg/ml. Z tohoto roztoku zředěním připravíme roztok o koncentraci 0,1µg/ml. Z takto zředěného roztoku připravíme kalibrační roztoky o koncentracích: 0,005; 0,01; 0,015; 0,02 a 0,03 µg/ml do 25 ml odměrných baněk. Baňky doplníme 1% HNO₃.

Nastavíme parametry analýzy a provedeme optimalizaci na maximální signál na střední kalibrační roztok.

Parametry analýzy: $\lambda = 324,8$ nm, šířka štěrby (propouštěný spektrální interval) 0,5 nm, průtok acetylenu 50 l. hod⁻¹, proud výbojky s dutou katodou 8 mA, plamen acetylene + vzduch (stechiometricky) 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.

Stejným způsobem provádíme i přípravu slepého stanovení (blank).

Analyzovaný vzorek vína vhodně naředíme redestilovanou vodou tak, aby koncentrace analytu (Cu) ležela asi uprostřed kalibrační závislosti (asi 10x), tzn. do 25 ml odměrné baňky pipetujeme 5 ml a doplníme po rysku 1% HNO₃.

Roztoky proměříme na přístroji po navolení požadované metody.

4.2.2 METODA STANDARDNÍCH PŘÍDAVKŮ

POSTUP:

Do 25 ml odměrných baněk pipetujeme 0,0; 1,25; 2,5; 3,75; 5,0 a 7,5 ml roztoku o koncentraci 10 µg/ml Cu. Do každé z baněk přidáme 5 ml nezředěného vzorku vína a doplníme 1% HNO₃.

Jako blank použijeme čistý roztok 1% HNO₃.

Po zvolení požadované metody roztoky proměříme na přístroji.

4.3. VYHODNOCENÍ ANALÝZY

1. K protokolu přiložíme vytištěné výsledky analýzy včetně kalibrační křivky.
2. Provedeme test na shodu výsledků získaných metodou přídavek a kalibrační křivky.
3. Zdůvodnění možného chybného stanovení.