

ATOMOVÁ ABSORPČNÍ SPEKTROMETRIE

Antonín Kaňa, Oto Mestek

Obecné základy

Atomová absorpční spektrometrie (AAS) využívá jako analytickou vlastnost absorpci záření volnými atomy sledovaného elementu. Úbytek primárního záření je mírou koncentrace volných atomů prvku, který záření absorboval. Rozdíly energií mezi jednotlivými elektronovými stavy atomu jsou charakteristické pro každý prvek.

Přechod atomu z nižší energetické hladiny m na vyšší hladinu n není spontánní, ale je vynucen přítomností záření o vhodném kmitočtu ν_{mn} . Energie fotonu $h\nu_{mn}$ musí odpovídat energetickému rozdílu mezi hladinami m a n :

$$\Delta E_{mn} = h\nu_{mn} = \frac{hc}{\lambda} \quad (1)$$

kde E značí energii, h je Planckova konstanta, c je rychlost světla a λ je vlnová délka záření. Absorpcí fotonu vzniká excitovaný atom, který může samovolně (spontánně) přejít na nižší energetický stav m , přičemž rozdíl energií ΔE_{mn} může vyzářit v podobě fotonu o stejném kmitočtu $\nu_{mn}=\nu_{nm}$. Rozdíl energií, odpovídající přechodu mezi energetickými stavy m a n při pohlcení nebo vyzáření fotonu je co do absolutní hodnoty stejný a liší se 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 (generaci) 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 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.

Obecný dvouhladinový systém $n-m$ lze potom nahradit systémem 1-0, ve kterém pro poměrné zastoupení počtu atomů ve vyšším a nižším energetickém stavu podle **Boltzmannova rozdělovacího zákona** platí:

$$\frac{N_1}{N_0} = \frac{g_1}{g_0} \cdot \exp\left(-\frac{E_1-E_0}{kT}\right) \quad (2)$$

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

Podíl excitovaných atomů N_1 za předpokladu $g_1=g_0$ je v plamenech při rozdílech energetických hladin E_1-E_0 , odpovídajících emisi záření ve viditelné a ultrafialové oblasti spektra, velmi malý. Pro $\nu=10^{15}$ Hz ($\lambda=300$ nm) a $T=3000$ K je $N_1/N_0=1,5 \cdot 10^{-7}$. Naprostá většina volných atomů se tedy nachází v základním stavu a je proto schopna absorbovat záření svých rezonančních vlnových délek.

Atomová absorpční spektra nalézáme 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 [J s^{-1}]

na hodnotu Φ . Matematickým vyjádřením uvedených skutečností je spojený zákon **Bouguerův–Lambertův a Beerův** ve tvaru:

$$A = \log \frac{\Phi_0}{\Phi} = \kappa_\lambda \cdot b \cdot N_0 \quad (3)$$

kde **absorbance** A , definovaná jako logaritmus poměru původního a prošlého zářivého toku, je úměrná tloušťce absorbující vrstvy b a počtu atomů v základním stavu N_0 . Konstanta úměrnosti κ_λ , jejíž velikost odpovídá účinnému průřezu atomu pro absorpci fotonu, je při dané vlnové délce charakteristická pro absorbující prvek a nazývá se atomový **absorpční koeficient**, který má rozměr plochy [m^2]. Za konstantní teploty, počtu elektronů v plameni a ustálených podmínek při zmlžování analyzovaného roztoku do plamene je počet atomů na základní energetické hladině úměrný koncentraci **sledovaného prvku (analytu)** v roztoku.

Kromě absorbance je důležitou veličinou **propustnost (transmitance)**, která je definovaná jako poměr toku záření prošlého absorpčním prostředím ku zářivému toku do prostředí vstupujícího:

$$\tau = \frac{\Phi}{\Phi_0} \quad (4)$$

Transmitanci využíváme při nastavení maxima vlnové délky rezonanční čáry ve spektrálním intervalu vymezenému monochromátorem. Mezi absorbancí a transmitancí platí jednoduchý převodní vztah

$$A = -\log \tau \quad (5)$$

Metoda AAS je jako řada analytických metod metodou srovnávací, měřenou veličinou je absorbance. Hodnota absorbance jako míra koncentrace sledovaného prvku nezávisí na velikosti zářivého 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 kalibračních roztoků o známé koncentraci nebo metodou standardních přidávků.

V analyzovaných vzorcích se obvykle sledovaný prvek vyskytuje spolu s dalšími prvky 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 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 projevuje nejvíce v oblasti krátkých vlnových délek (do 250 nm), absorpce molekulami má 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 kalibračních roztoků by proto mělo co nejlépe odpovídat **matrici vzorku**, ve kterém sledujeme určitý prvek. Provádí-li se potom za stejných podmínek (zmlžování, vlnová délka, složení plamene, délka štěrbinovýhořáku aj.) měření absorbance analytu ve vzorku, zjednoduší se vztah (3) na přímou úměrnost mezi absorbancí a koncentrací analytu ve vzorku

$$A = k \cdot \rho \quad (6)$$

kde ρ je hmotnostní koncentrace sledovaného analytu. Lineární závislost však platí jen v oboru nízkých koncentrací, při vyšších hodnotách se závislost zakřivuje.

Směrnice kalibrační závislosti $k=dA/d\rho$ určuje citlivost metody. V AAS se často uvádí tzv. **charakteristická koncentrace prvku**, což je taková koncentrace, která absorbuje 1% původního záření ($\tau=0,99$) 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.

Metoda AAS s plamenovou ionizací umožňuje měřit koncentraci asi 60 prvků (kovů a přechodných 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.

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** záření, kterým se mění proud fotonů (zářivý tok) na proud elektronů (elektrický proud).

Zdroj záření

Zdrojem primárního záření je nízkotlaká, neonem plněná **výbojka s dutou katodou** (VDK). Výbojka pracuje v doutnavém režimu při proudu několika miliampér a tlaku řádově 0,1 kPa. **Emituje čárové spektrum prvku**, ze kterého je vyrobena dutá katoda nebo který je v materiálu duté katody obsažen. Tím je dána vysoká selektivita této metody, kterou je možné stanovit koncentrace jednotlivých prvků ve vzorku obvykle bez nutnosti předběžného dělení. Podmínky buzení při nízkém tlaku i teplotě zaručují, že rezonanční záření je vysoce monochromatické a má **pološířku profilu** (tj. šířku měřenou v polovině výšky profilu čáry) jen asi 0,001 nm.



Obr. 1: Výbojka s dutou katodou

Záření vysílané výbojkou je modulováno. Modulace se provádí elektricky nebo mechanicky přerušovačem. Modulací se umožní měřit jen záření výbojky, nikoli záření emitované z atomizačního prostředí, např. z plamene. Na stejnou modulační frekvenci je naladěno i střídavý zesilovač signálu detektoru. K 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 prvky, 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 směsí dvou až šesti druhů práškových kovů.

Atomizátor

Absorpční prostředí, kde vznikají volné atomy analytu, musí mít teplotu alespoň 2000 až 3000 K. 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 štěrbinu, pro plamen acetylen–vzduch dlouhé 10 cm a pro plamen acetylen–oxid dusný s vyšší rychlostí hoření pouze 5 cm. Délkou štěrbinu je dána i maximálně dosažitelná tloušťka vrstvy absorpčního prostředí, kterým prochází záření z výbojky. Analyzovaný vzorek se přivádí do plamene ve formě aerosolu. Zmlžování roztoku se provádí pneumatickým zmlžovačem pomocí tlaku oxidujícího plynu, kterým je vzduch, popř. oxid dusný. Potřebné plyny se odebírají z tlakových lahví, vzduch obvykle z kompresoru. Každý AA-spektrometr 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 výškou. Pro každý prvek tedy existuje optimální zóna v plamenu daná výškou nad ústím hořáku, kde je koncentrace volných atomů nejvyšší. Tuto výšku je třeba zjistit pokusně. Poloha hořáku je tedy nastavitelná ve vertikálním i horizontálním směru.

Monochromátor

Za plamenem následuje **mřížkový monochromátor**, který slouží k izolaci záření vhodné vlnové délky. Natáčením mřížky se nastavuje vlnová délka rezonanční čáry na maximum propustnosti. Běžný monochromátor má pomocí vstupní a výstupní štěrbinu 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. 0,5–1,0 nm).

Detektor

K detekci toků záření Φ_0 a Φ (rovnice (3)) 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 vkládaným napětím 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. AA-spektrometry jsou vybaveny analogově–digitálním převodníkem a v digitální formě se provádí ovládání nastavitelných parametrů, automatické vyhodnocování výsledků, statistika apod.

Práce se spektrometry GBC SensAA

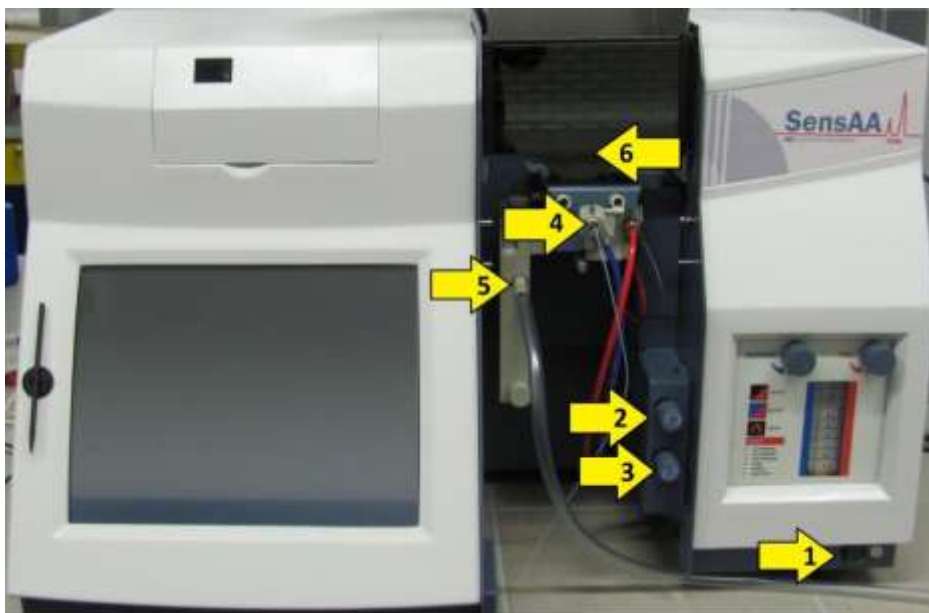
Popis přístrojů

K měření atomové absorpce se v posluchačských laboratořích atomové absorpční spektrometrie používá dvoupaprskový spektrofotometr firmy GBC, model SensAA Dual, vybavený deuteriovou výbojkou pro korekci neselektivní absorpce. Zdrojem záření je výbojka s dutou katodou, jejíž zářivý tok je modulován elektricky přerušováním napájecího proudu přesně stanovenou frekvencí, se kterou je elektronicky synchronizován frekvenčně laděný zesilovač. Přístroj je vybaven mřížkovým monochromátorem konstrukce Fastie–Ebert s mřížkou 1800 vrypů/mm a s fokální vzdáleností 333 mm, šířka vymezeného spektrálního intervalu je v rozsahu 0,2–2 nm. K detekci relativních intenzit zářivých toků je přístroj vybaven univerzálním fotonásobičem s pracovním rozsahem 175–900 nm.

Spektrometr GBC typ SensAA má jednu pozici pro výbojku s dutou katodou (VDK), napájenou modulovaným stejnosměrným proudem o hodnotě 3–20 mA podle stanovovaného prvku a doporučení výrobce. Pro VDK je nutné dodržet dobu žhavení 15–20 minut před začátkem analýzy. Výbojku v pracovní pozici lze justovat ve vertikálním i horizontálním směru tak, aby co největší část primárního záření dopadala na detektor.

!!! POZOR !!! Justačními šrouby deuteriového korektoru pozadí je zakázáno manipulovat!

Umístění ovládacích a kontrolních prvků spektrometru je patrné z obrázku 2 a 3.

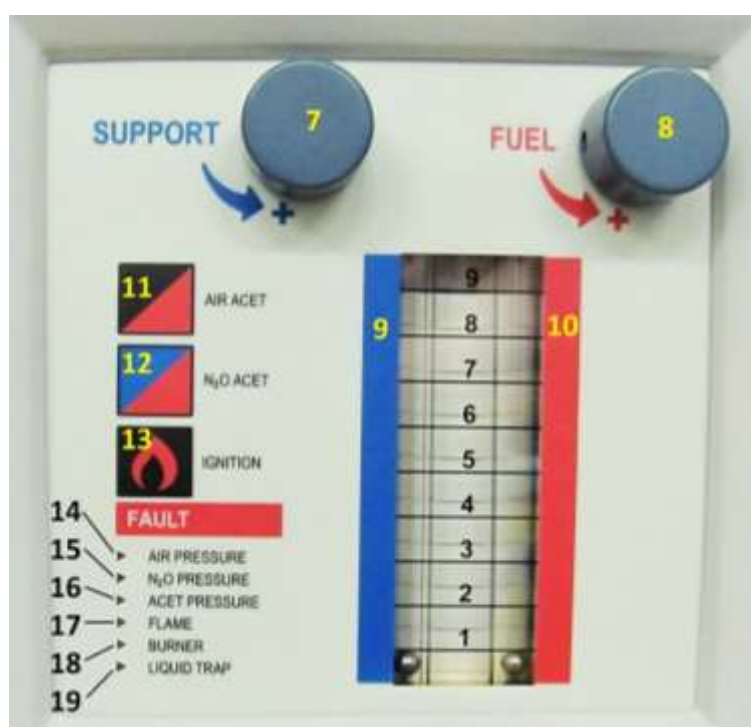


Obr. 2: Spektrometr pro atomovou absorpci GBC model SensAA

1. Síťový vypínač
2. IN-OUT: justace polohy hořáku ve vodorovném směru
3. UP-DOWN: justace polohy hořáku ve svislém směru
4. Nastavitelný zmlžovač s kapilárou pro nasávání vzorku
5. Odkap zkondenzované části nasávaného vzorku
6. Hořák se štěrbinovým ústím

Kromě nastavení průtoků plynů je přístroj plně řízen počítačem prostřednictvím software SavantAA. V plynové části je mikroprocesorem řízeno monitorování vstupního tlaku paliva i oxidovadla, automatické zapalování plamene, volba druhu plamene s automatickým zajištěním bezpečného složení plamene acetylen–oxid dusný a správná volba hořáku. Při jakékoliv závadě v této části je plamen automaticky zhasnut a nelze jej zapálit, dokud není chyba odstraněna. Pro plamen acetylen–oxid dusný je bezpodmínečně nutné použít hořák se štěrbinou dlouhou pouze 50 mm, opatřený nápisem N₂O–ACET. Plamen acetylen–vzduch je možné provozovat v obou typech hořáků. Použití správného hořáku je jistěno spínacím konektorem. S chybným hořákem pro vysokoteplotní plamen acetylen–oxid dusný nelze tuto směs zapálit.

Měření absorbance či koncentrace připravených kalibračních roztoků a vzorků a graf kalibrační křivky lze sledovat na obrazovce i vytisknout na připojené tiskárně.

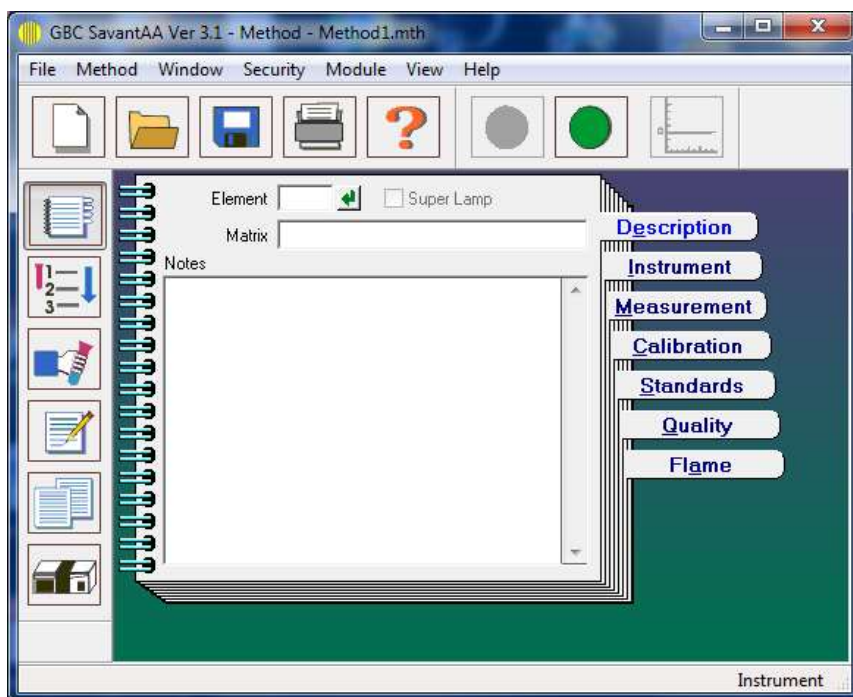


Obr. 3: Kontrolní panel spektrometru GBC SensAA s automatickým řízením plamene

7. SUPPORT: regulace průtoku oxidovadla
8. FUEL: regulace průtoku acetylenu
9. Průtokoměr pro oxidovadlo
10. Průtokoměr pro acetylen
11. AIR ACET: tlačítko pro spuštění a nastavení průtoku plynů pro plamen acetylen–vzduch. *Slouží zároveň pro zhasnutí plamene*
12. N₂O ACET: tlačítko pro spuštění a nastavení průtoku plynů pro plamen acetylen–oxid dusný. *Slouží zároveň pro zhasnutí plamene*
13. IGNITION: tlačítko pro zapálení plamene
14. Signalizace nesprávného tlaku vzduchu
15. Signalizace nesprávného tlaku oxidu dusného
16. Signalizace nesprávného tlaku acetylenu
17. Signalizace zhasnutí plamene
18. Signalizace použití nesprávného typu hořáku nebo chybného zasunutí konektoru
19. Signalizace prázdného sifonu pojistné lahve









Zapojení a uvedení přístroje do chodu

1. Atomový absorpční spektrometr se zapíná síťovým vypínačem zelené barvy (označený 1 v obr. 1).
2. Po zapnutí síťového vypínače se automaticky spustí operační systém Windows 7 a vlastní řídicí software GBC SavantAA. (Po ukončení práce lze síťovým vypínačem vypnout počítač i přístroj současně.) Software GBC SavantAA (Obr. 4) umožňuje řízení přístroje AAS pomocí systémového menu umístěného v horní liště, pomocí tlačítek umístěných ve vodorovném panelu nahoře a tlačítek modulů umístěných ve svislém panelu vlevo.









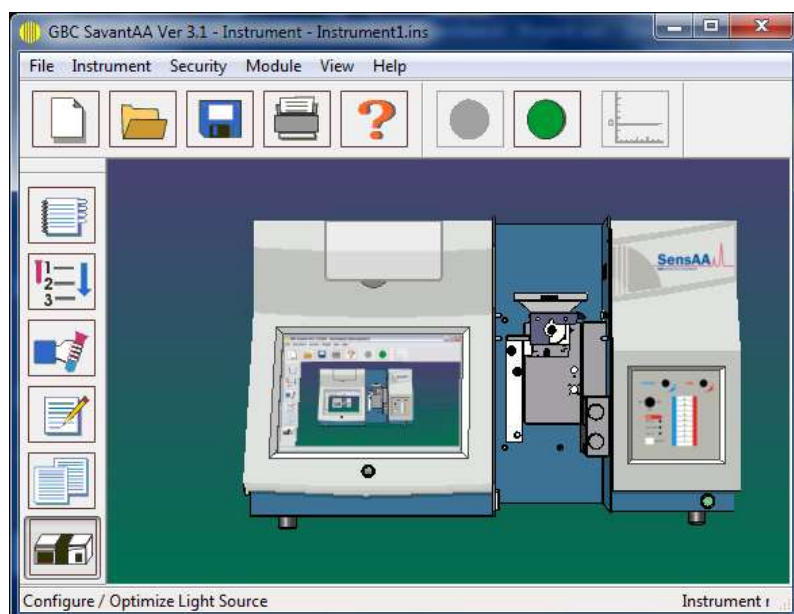
Obr. 4: Řídicí panel ovládacího programu: modul **Method**

Funkce vodorovně umístěných tlačítek

New		vytvoření nového souboru
Open		nahrání souboru z disku
Save		uložení souboru na disk. Při ukládání nově vytvořeného souboru software automaticky volí jméno pro tento soubor. Při práci v laboratořích používáme příkaz <i>File–Save As</i> a metody či výsledky ukládáme ve tvaru <i>PRIJMENI-MERENYPRVEK.MTH</i> nebo <i>PRIJMENI-MERENYPRVEK.RES</i> do adresáře <i>Studentské laboratoře</i> na disku <i>D–Data</i> . <i>Pozor: typ zpracovávaných souborů je určen volbou visle umístěného tlačítka nebo volbou menu Module.</i>
Print		tisk celého obsahu daného modulu
Help		nápověda
Stop		zastavení sekvence měření
Start		spuštění sekvence měření
Zero		nastavení nulové hodnoty absorbance

Funkce svise umístěných tlačítek (volba modulu)

Method		editace podmínek měření (metody), podrobnosti viz dále
Samples		slouží k určení typu (1. sloupec tabulky) a označení (2. sloupec tabulky) měřených vzorků. Počet řádků v tabulce se mění pomocí kláves <i>Insert</i> a <i>Delete</i> nebo pomocí tlačítek ve spodní části panelu. Funkce tlačítek je zřejmá z jejich grafické podoby. Označení vzorku (<i>Label</i>) se zapisuje přímo z klávesnice. Typ vzorku se volí (<i>Measurement</i>) tak, že se na požadovaném řádku klikne pravým tlačítkem myši a z nabídky se zvolí položka <i>Properties</i> . Požadovaný typ vzorku se zvolí v nabídce <i>Measurement Type</i> a volba se potvrdí kliknutím na tlačítku <i>OK</i> . Důležité typy vzorků jsou <i>Sample</i> (vzorek) a <i>Calibration</i> (kalibrace). Poznámka: typ vzorku <i>Calibration</i> způsobí proměření celé kalibrační křivky. Nemusí se tedy zadávat jednotlivé kalibrační roztoky
Analysis		z tohoto modulu je důležitý panel <i>Sequence</i> , ve kterém se volí pořadí měřených vzorků. V řádku <i>First Measurement</i> se zvolí pořadové číslo vzorku odpovídající tabulce vzorků (viz výše), který se bude měřit první. Další vzorky se měří v pořadí, v jakém jsou v tabulce zapsány. Pokud je zaškrtnuta položka <i>Measure to End</i> , proměří se vzorky až k poslednímu zapsanému vzorku; v opačném případě bude posledním měřeným vzorkem vzorek s pořadovým číslem uvedeným v řádku <i>Last Measurement</i> .
Results		tabulka výsledků měření
Report		nastavení parametrů externího výstupu
Instruments		optimalizace přístrojových parametrů Poznámka: modul pro optimalizaci polohy lampy se aktivuje se tak, že se klikne pravým tlačítkem myši na střední horní části schématu přístroje (Obr. 5)



Obr. 5: Řídicí panel ovládacího programu: modul **Instrument**

Zapálení plamene

Nejprve se uvede do chodu kompresor. Za přítomnosti asistenta se otevře hlavní ventil tlakové lahve s acetylenem pootočením o 1,5 otáčky (ne až do krajní polohy) a otevře se i boční ventil. Výstupní tlak acetyleny se nastaví na 60–70 kPa a vyčká se natlakování kompresoru. Stiskem tlačítka (11) se otevře přívod plynů a tlačítkem (13) se zapálí plamen zapalovače, od kterého se zapaluje plamen ve štěrbinovém hořáku. Jakmile plamen hoří, provede se kontrola nastavení průtoku vzduchu rotametrem (9) (cca 5 dílků rotametru), průtoku acetyleny rotametrem (10) (1–2 dílky), případně výstupního tlaku z lahve. Okamžitě po zapálení se začne do plamene zmlžovat destilovaná voda. Odpařováním vody ve zmlžovací komoře dochází k jejímu ochlazení a chrání se tak její vnitřní teflonový povlak. Je-li plamen zapálený, musí se vždy zmlžovat do plamene roztok, buď vzorek, nebo destilovaná voda.

Během hoření plynová automatika přístroje hlídá nebezpečné stavy, které mohou během provozu vzniknout, a signalizuje takovou situaci pomocí řady diod (14–19). Při zjištění jakékoli chyby se okamžitě zhasíná plamen. Zhasnutí plamene po skončení měření se docílí zmáčknutím tlačítka (11). Plamen nenecháváme zbytečně hořet a vypínáme jej okamžitě po každém změření připravené série vzorků.

Měření

Za optimalizovaných podmínek se může měřit podle připravené metody (modul *Method*) a sekvence vzorků (moduly *Samples* a *Analysis*). Měření se aktivuje stiskem tlačítka *Start* nebo pomocí příkazu menu *File–Start Analysis*.

Pozor: při každém spuštění měření se znovu automaticky nastavuje nula přístroje, proto je nutné v tomto okamžiku zmlžovat pouze destilovanou vodu a nikoli roztok obsahující stanovovaný prvek

Vlastní měření absorbance daného vzorku se aktivuje stiskem tlačítka *OK* v okně *Manual sampling*, které se automaticky otevře po spuštění měření. Po stisku tlačítka *Repeat Sample* je možné změřit poslední vzorek znovu. V modulu *Results* lze průběžně sledovat výsledky měření. Předčasné ukončení měření se provede stiskem tlačítka *Stop*, jinak se měření samo ukončí po proměření všech vzorků zadaných v modulu *Samples*.

Návod laboratorní práce

Stanovení chromu a mědi/vápníku a hořčíku atomovou absorpční spektrometrií

1. Připravte kalibrační roztoky Cr a Cu nebo Ca a Mg.
2. Seznamte se s přístrojem a vytvořte metody pro stanovení Cr a Cu nebo Mg a Ca.
3. Optimalizujte podmínky měření.
4. Proměřte kalibrační závislosti a změřte vzorky metodou AAS.
5. Vyhodnoťte hmotnostní koncentrace stanovených prvků ve vzorcích a sepište protokol.

Příprava kalibračních roztoků

- 100 ml základního roztoku **Cr** o hmotnostní koncentraci 1 mg ml⁻¹ Cr se připraví navážením vypočteného množství K₂CrO₄ a jeho rozpuštěním v destilované vodě.
- 500 ml základního roztoku **Cu** o hmotnostní koncentraci 1 mg ml⁻¹ se připraví rozpuštěním přesně naváženého vypočteného množství CuSO₄·5H₂O čistoty p.a. v destilované vodě.

- 500 ml základního roztoku **Ca** o hmotnostní koncentraci 1 mg ml^{-1} Ca se připraví rozpuštěním vypočteného a přesně odváženého množství CaCO_3 , čistoty p.a., v asi 10 ml zředěné HCl p.a. (1:1, V/V).
- 500 ml základního roztoku **Mg** o hmotnostní koncentraci $0,1 \text{ mg ml}^{-1}$ Mg se připraví navážením vypočítaného množství krystalického $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ čistoty p.a. a jeho rozpuštěním v destilované vodě.

Všechny tyto základní roztoky jsou příliš koncentrované, proto se před přípravou kalibračních roztoků desetkrát, resp. dvacetkrát naředí (pipetuje se 25 ml do 250 ml odměrné baňky pro Cr, Cu a Ca; pipetuje se 25 ml do 500 ml odměrné baňky pro Mg). Tyto roztoky mají koncentraci $0,1 \text{ mg ml}^{-1}$ Cr, $0,1 \text{ mg ml}^{-1}$ Cu, $0,1 \text{ mg ml}^{-1}$ Ca, respektive $0,005 \text{ mg ml}^{-1}$ Mg. Z těchto zředěných roztoků se pak připraví vlastní kalibrační roztoky:

- pro stanovení Cr: 0, 2, 4, 6, 8 a $10 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ Cr
- pro stanovení Cu: 0, 2, 4, 6, 8 a $10 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ Cu
- pro stanovení Ca: 0, 2, 4, 6, 8 a $10 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ Ca
- pro stanovení Mg: 0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 a $0,5 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ Mg

Kalibrační roztoky pro Ca a Mg, resp. Cu a Cr se připravují ve směsi. Připravuje se vždy 100 ml každého kalibračního roztoku. Vypočtený objem ředěného základního roztoku příslušného kovu se odměřuje z byrety. **Před doplněním se směs Cu a Cr okyselí přidáním 1 ml koncentrované HNO_3 !!!**

Vytvoření aplikace pro stanovení Cr, Cu, Ca nebo Mg.

Vytvoření nové měřicí aplikace nebo editace stávající aplikace se provede v modulu *Method*. Jednotlivé parametry aplikace se volí v souladu s tabulkou I a dalšími pokyny asistenta. Modul *Method* obsahuje několik záložek:

Description	nezapomeňte zvolit měřený prvek. Ostatní parametry mají charakter popisek a nejsou povinné
Instrument	zapiší se hodnoty žhavicího proudu výbojky (<i>Lamp Current</i>), vlnové délky (<i>Wavelength</i>), šířky štěrbin (<i>Slit Width</i>), výšky štěrbin (<i>Slit Height</i>) a podle potřeby se aktivuje korekce nespecifické absorpce (<i>Background Correction</i>)
Measurement	zvolte způsob měření (<i>Measurement Mode</i>) a zapište délku odečtu jedné repliky (<i>Read Time</i>), časovou konstantu detektoru (<i>Time Constant</i>) a počet replik měření (<i>Replicates</i>)
Calibration	zvolte způsob vyhodnocení kalibrační závislosti (<i>Calibration Mode</i>), koncentrační jednotky (<i>Conc. Units</i>), počet desetinných míst (<i>Conc. Decimal Places</i>), zaškrtněte nulování před kalibrací (<i>Zero Before Calibration</i>) a v případě optimalizace také nulování mezi jednotlivými vzorky (<i>Zero between samples</i>)
Standards	pomocí tlačítek na spodním okraji stránky rozšiřte tabulku na odpovídající počet řádků a zapište koncentrace kalibračních roztoků. <i>Pozor: pomocí posledního tlačítka vpravo můžete po proměření kalibračních roztoků graficky zobrazit průběh kalibrace.</i>
Quality	řízení jakosti; tato stránka není při práci ve studentských laboratořích využívána
Flame	nastavení přístroje GBC SensAA není možné řídit přímo z počítače, parametry se proto nemusí vyplňovat. <i>Pozor: stiskem tlačítka Optimize na této stránce se otevře okno, ve kterém je možné sledovat okamžité hodnoty absorbance. Optimalizace složení plamene se bude provádět manuálně, tlačítka v tomto okně nestlačujte!</i>

Tabulka I: Údaje pro vytvoření měřící aplikace

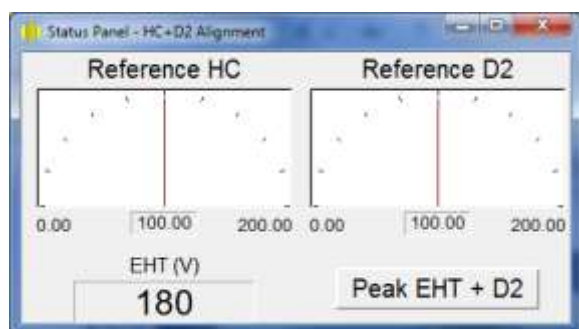
prvek	měď	chrom	hořčík	vápník
Description				
Element	Cu	Cr	Mg	Ca
Instrument				
Lamp Current	8 mA	8 mA	5 mA	5 mA
Wavelength	327,4 nm	425,4 nm	285,2 nm	422,7 nm
Slit Width	0,5 nm	0,5 nm	0,5 nm	0,5 nm
Slit Height	normal	normal	normal	normal
Background Correction	ne	ne	ano	ne
Measurement				
Measurement Mode	Integration	Integration	Integration	Integration
Read Time	3,0 s	3,0 s	3,0 s	3,0 s
Time Constant	0,4 ms	0,4 ms	0,4 ms	0,4 ms
Replicates	5	5	5	5
Calibration				
Calibration Mode	Conc. Least Square	Conc. Least Square	Conc. Least Square	Conc. Least Square
Conc. Units	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml
Conc. Decimal Places	2	2	3	2
Zero Before Calibration	ano	ano	ano	ano
Zero Between Samples	ano/ne*	ano/ne*	ano/ne*	ano/ne*

* pro optimalizaci polohy hořáku a složení plamene **ano**, pro měření kalibrace a vzorků **ne**

Optimalizace podmínek měření

Nastavení polohy VDK

V modulu *Instruments* se klikne pravým tlačítkem myši v levé horní části nákresu přístroje. Z nabídky se vybere *Optimize: HC/DC*. Na obrazovce počítače se zobrazí dva ukazatele emitovaného světelného toku. Levý ukazatel zobrazuje emisní světelný tok VDK, pravý ukazatel emisní světelný tok korektoru pozadí (Obr. 6).



Obr. 6: Stavový panel ovládacího programu

Pomocí šroubů umístěných na boku přístroje se VDK nastaví do takové polohy, kdy je stav levého ukazatele maximální. Poloha korektoru pozadí se nenastavuje! Po ukončení justace se stiskne tlačítko *Peak EHT+D2*, tím se provede recalibrace napětí na fotonásobiči (EHT). Pokud se výchylnka ukazatele významně změní, celý postup se opakuje.

Nastavení horizontální polohy hořáku

Před zapálením plamene se provede předběžné seřízení horizontální polohy hořáku pomocí točítka (2). Obraz červeného paprsku emitovaného VDK se pozoruje na proužku bílého papíru a měl by procházet přesně nad štěrbinou hořáku po celé její délce.

Nastavení vertikální polohy hořáku

Po optimalizaci VDK se podle výše uvedeného postupu zapálí plamen, v případě Cr se pracujeme s redukčním plamenem (mírně svítivým), pro Ca a Mg se volí stechiometrické složení plamene a pro Cu spíše oxidační plamen chudý palivem. Složení plamene se reguluje pouze točítkem (8) (*FUEL*). Okamžitě po zapálení se začne do plamene zmlžovat destilovaná voda. Hořák je po pravé straně označen stupnicí 0–8 dílků, nastavte hořák nejprve do polohy 0. V modulu *Samples* upravte tabulku tak, aby obsahovala deset řádků a v každém řádku zadejte typ vzorku *Sample*. Jména vzorků budou odpovídat poloze hořáku. Spustíte měření pomocí tlačítka *Start*. Během celého měření se zmlžuje stále stejný kalibrační roztok, obvykle ten s nejvyšší koncentrací, a pro každý další vzorek zvyšujete polohu hořáku o polovinu dílku. Poloha, které odpovídá maximální naměřená absorbance je poloha optimální, a všechna další měření se budou provádět právě na ní. Naměřené hodnoty absorbancí se vynesou do grafu.

Nastavení složení plamene

Podobným způsobem se nastaví optimální složení plamene. Toto je kritické zejména při stanovení Cr. Postupuje se tak, že se po jedné polovině dílku stupnice rotametru mění průtok acetyleny od jednoho dílku dílků (silně oxidační nesvítivý plamen s přebytkem vzduchu) až po max. čtyři dílky na stupnici (silně svítivý redukční plamen s přebytkem paliva) rotametru (8). V modulu *Samples* upravte tabulku tak, aby obsahovala alespoň deset řádků a v každém řádku zadejte typ vzorku *Sample*. Jména vzorků budou odpovídat poloze hořáku (1–4 dílky). Spustíte měření pomocí tlačítka *Start*. Během celého měření se zmlžuje stále stejný kalibrační roztok jako v případě nastavování vertikální polohy hořáku. Pro každý další vzorek přidáváte půl dílku acetyleny. Průtok, kterému odpovídá maximální naměřená absorbance je průtok optimální, a všechna další měření se budou provádět právě při něm. Naměřené hodnoty absorbancí se vynesou do grafu.

Po ukončení optimalizace složení plamene je vhodné proměřit i neznámé vzorky a porovnat je s měřeným standardem. Pokud je absorbance vzorku vyšší než absorbance nejkoncentrovanějšího kalibračního roztoku, je nutno jej před vlastním měřením kalibrační křivky a vzorků naředit.

Měření kalibrační závislosti a vzorků metodou atomové absorpční spektrometrie

Před měřením se vzorky v odměrné baňce doplní po rysku, v případě směsi Cr a Cu se před doplněním okyselí 1 ml konc. HNO_3 , důkladně promíchají a případně naředí (viz výše). Pro vlastní měření se připraví tabulka v modulu *Samples* tak, aby obsahovala nejméně sedm řádků. První vzorek bude typu *Calibration*, ostatní budou typu *Sample*. U těchto vzorků zvolte název odpovídající označení vzorku. Je také vhodné udělat u měřených vzorků poznámku, zda a jakým způsobem byly naředěny.

Po aktivaci měření pomocí tlačítka *Start* se nejprve měří nulový kalibrační standard (Blank), potom kalibrační roztoky a nakonec vlastní vzorky o neznámém složení. Každý vzorek se proměří třikrát; postupuje se tak, že se střídavě měří vzorek A a B. Mezi začátkem zmlžování roztoku a aktivací měření absorbance musí být ponechána dostatečná časová rezerva k dosažení ustáleného stavu, postačující doba je pět vteřin. Pokud některý vzorek leží

mimo rozsah kalibrace a posluchači nemají předem připravený naředěný vzorek, musí se po dodatečném naředění vzorku proměřit znova celá kalibrační křivka.

V modulu *Results* se na obrazovce počítače zapíše průměrná hodnota absorpance (Abs), hodnota relativní směrodatné odchylky vypočtená z jednotlivých opakování měření (RSD) a hodnota koncentrace odečtená z kalibrační křivky (Conc.).

Zpracování výsledků a protokolu

Výsledkem měření jsou nalezené hmotnostní koncentrace stanovovaného prvku v zadaných vzorcích uváděné v mg/l. V případě, že vzorek byl před měřením naředěn, je nutné provést přepočty.

Kromě principu měření AAS musí protokol obsahovat tabelárně a graficky zpracované výsledky optimalizace signálu, měření kalibračních křivek a vlastních vzorků. Nezapomeňte uvést číslo vzorku. Součástí protokolu je i příprava kalibračních roztoků včetně výpočtu navážek příslušných chemikálií.

V protokolu musí být dále uvedeny optimální podmínky, při kterých bylo měření absorpce prováděno, tj. vlnová délka, šířka spektrálního intervalu, napájecí proud výbojky, poloha hořáku, průtoky plynů, hodnota napětí na fotonásobiči. Součástí protokolu bude přiložený vytištěný graf kalibrační závislosti. Výslednou hmotnostní koncentraci uvádějte jako průměr měření s intervalem spolehlivosti na hladině významnosti 0,95.

Kontrolní otázky

1. Jaký je fyzikální princip AAS?
2. Co vyjadřuje Kirchhoffův zákon?
3. Které přechody elektronů označujeme za rezonanční?
4. Čemu odpovídají základní rezonanční čáry?
5. Jak je definována absorpance a transmitance a jaký je mezi nimi vztah?
6. Co je atomový absorpční koeficient a na čem závisí?
7. Co vyjadřuje zákon Bouguerů-Lambertův a Beerův?
8. Které optické veličiny a závislosti sledujeme v AAS a za jakým analytickým účelem?
9. Co znamená pojem „charakteristická koncentrace“?
10. Kterou oblast spektra vlnových délek využívá AAS?
11. Uveďte základní stavební prvky AA-spektrofotometru pro plamenovou atomizaci.
12. Co je zdrojem primárního záření v AAS?
13. Které instrumentální faktory mají vliv na citlivost a charakteristickou koncentraci v plamenové AAS?
14. Jaké metody používáme k vyhodnocení koncentrace prvku ve vzorku?
15. Na čem závisí přesnost a správnost stanovení prvku ve vzorku?
16. Jaké jsou hlavní analytické aplikace AAS?
17. Jakým způsobem je nejčastěji vytvořeno absorpční prostředí v AAS a jakých teplot v něm musí být dosaženo?
18. Co slouží k izolaci rezonančních linií a jaká je funkce tohoto zařízení?
19. Co je detektorem záření v AAS a jaký je jeho princip?
20. Jak je formulován Boltzmannův zákon poměrného zastoupení atomů v nižším a vyšším energetickém stavu?