

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	1
	Jednotné pracovní postupy – analýza rostlinného materiálu	Vydání	3
	40130.1 – Stanovení Cu, Ni, Cr, Co, Pb, Cd metodou ETA-AAS	Revize	0

STANOVENÍ Cu, Ni, Cr, Co, Pb, Cd METODOU ETA-AAS

1 Účel a rozsah

Postup je určen pro stanovení mědi, niklu, chromu, kobaltu, olova a kadmia v mineralizátech vzorků rostlinného materiálu připravených podle postupu 40032.1 Mineralizace v uzavřeném systému s mikrovlnným ohřevem nebo podle postupu 40033.1 Mineralizace v částečně uzavřeném systému s mikrovlnným ohřevem.

Poznámky

- 1 *Metoda ETA-AAS je o 2 až 3 řády citlivější v porovnání s plamenovou technikou a uplatní se především při stanovení velmi nízkých obsahů prvků.*

2 Princip

Vzorek nadávkovaný do elektrotermického atomizátoru se po vysušení a termickém rozložení matrice atomizuje při vysoké teplotě. Měří se absorpce charakteristického záření způsobená přítomností atomů měřeného prvku v optické dráze přístroje v průběhu atomizace. Vliv nespecifické absorpce se eliminuje použitím vhodné korekce.

3 Chemikálie

Používají se chemikálie analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak.

- 1 Kyseliny použité pro extrakci nebo mineralizaci vzorků pro modelování matrice při přípravě kalibračních standardních roztoků.
- 2 Argon čistoty 4.8 nebo dusík stejné čistoty nebo vyšší.
- 3 Voda (deionizovaná, demineralizovaná nebo destilovaná), vysoce čistá.
- 4 Základní standardní roztoky stanovovaných prvků o koncentraci 1000 mg/l. Je vhodné použít komerčně dodávané roztoky od ověřeného výrobce.
- 5 Modifikátory matrice připravené z vysoce čistých chemikálií nebo komerčně dostupné roztoky (např. Analytika s.r.o., Merck, FlukaBiochemika).

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	2
	Jednotné pracovní postupy – analýza rostlinného materiálu	Vydání	3
	40130.1 – Stanovení Cu, Ni, Cr, Co, Pb, Cd metodou ETA-AAS	Revize	0

4 Přístroje a pomůcky

- 1 Atomový absorpční spektrofotometr s elektrotermickým atomizátorem a možností korekce nespecifické absorpce.
- 2 Dávkovací pipeta (5 – 50) μl nebo autosampler jako součást spektrofotometru s elektrotermickým atomizátorem.
- 3 Dutokatodové nebo bezelektrodové (EDL) výbojky pro stanovované prvky.
- 4 Grafitová kyveta s platformou pokrytou pyrolytickým grafitem.
- 5 Podvarové destilační zařízení pro přípravu vysoce čistých minerálních kyselin (např. Berghof, Německo).
- 6 Zařízení pro přípravu vysoce čisté demineralizované vody (např. Millipore, USA).

Poznámky

- 2 *Chemikálie a voda (3) používané při mineralizaci, ředění nebo přípravě kalibračních standardů musejí být maximálního dostupného stupně čistoty. Kvalita používané vody se musí pravidelně kontrolovat s ohledem na koncentraci stanovovaných prvků. Pro mineralizaci vzorků a následně pro přípravu kalibračních standardních roztoků se důsledně doporučuje používat podvarově destilované minerální kyseliny, případně komerčně dostupné minerální kyseliny o srovnatelné čistotě.*
- 3 *Také ostatní chemikálie, zejména modifikátory matrice, mohou být zdrojem kontaminace.*
- 4 *Jako chemické modifikátory matrice lze použít tyto roztoky:*
 - roztok $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, $c = 200 \text{ g/l}$ (např. Analytika s.r.o. Praha), ředění na $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 1% roztok, odpovídá 0,05 mg $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ v 5 μl .
 - roztok $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, se připraví rozpuštěním ve vodě (3), 10,5 g hexahydrátu ve 100 ml (10,5% roztok) odpovídá 6 g bezvodého dusičnanu hořečnatého ve 100 ml (6 % roztok), ředění na $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ 0,06 % roztok, odpovídá 0,003 mg $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ v 5 μl , ředění na $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ 0,3 % roztok, odpovídá 0,015 mg $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ v 5 μl .
 - roztok Pd, $c = 10 \text{ g/l}$ v 5% HNO_3 (např. Analytika s.r.o. Praha), ředění na Pd 0,1 % roztok, odpovídá 0,005 mg Pd v 5 μl . Lze také použít komerčně dodávaný roztok Pd, $c = 2 \text{ g/l}$ v 5 % HNO_3 (např. Analytika s.r.o. Praha).
 - směsné roztoky (dodává např. RMI Pardubice), např. pre-mixed matrix modifier 0,005 mg Pd + 0,003 mg $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ v 5% HNO_3 nebo pre-mixed matrix modifier 0,05 mg $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ + 0,003 mg $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ v 1% HNO_3 .
- 5 *Postup přípravy kyselin pro modelování matrice kalibračních standardních roztoků je uveden u příslušného mineralizačního postupu.*

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	3
	Jednotné pracovní postupy – analýza rostlinného materiálu	Vydání	3
	40130.1 – Stanovení Cu, Ni, Cr, Co, Pb, Cd metodou ETA-AAS	Revize	0

5 Pracovní postup

5.1 Příprava standardních roztoků a kalibrační křivky

Všechny kalibrační roztoky se připravují ředěním zásobních certifikovaných standardních roztoků o koncentraci 1000 mg/l (4) metodou postupného ředění. Kalibrační křivky pracovních standardních roztoků se připravují modelováním matrice vzorků, aby byly v prostředí se stejnou koncentrací minerálních kyselin jako v měřených vzorcích. Výsledné prostředí vždy závisí na použitém způsobu mineralizace. Roztoky se připravují vždy čerstvé před měřením.

Doporučený způsob přípravy kalibračních roztoků

Ze základních certifikovaných standardních roztoků jednotlivých prvků 1000 mg/l (4) se postupným zředěním připraví samostatné roztoky o koncentraci 10 mg/l (ředěno 100 ×), z něj 1 mg/l a z něj 0,1 mg/l (v obou krocích ředěno postupně 10 ×). V každém kroku se na 100 ml roztoku přidávají 2 ml koncentrované kyseliny dusičné (1). Tyto pracovní standardní roztoky se doplňují po značku vodou (3) a roztoky o koncentraci 1 mg/l a 0,1 mg/l se použijí pro přípravu jednotlivých kalibračních bodů.

Připravuje se nulový bod kalibrační křivky a dva až tři standardní kalibrační roztoky, které se doplňují roztokem minerální kyseliny modelujícím matici vzorků. Je vhodné připravit směsné kalibrační standardní roztoky pro Cd a Pb a dále směsné kalibrační standardní roztoky pro Co, Cu, Ni, a Cr. Doporučené koncentrace kalibračních roztoků pro jednotlivé prvky jsou uvedeny v tabulce 1.

Příprava směsných kalibračních roztoků pro Cd a Pb

Z pracovního standardního roztoku Cd o koncentraci 100 µg/l se do sady 50ml odměrných baněk postupně pipetuje (5; 2,5; 1; 0,5; 0) ml. Do odměrných baněk se dále pipetuje z pracovního standardního roztoku Pb o koncentraci 100 µg/l postupně (25; 10; 5; 2,5; 0) ml. Odměrné baňky se doplňují po značku roztokem modelujícím matici měřených vzorků.

Příprava směsných kalibračních roztoků pro Cr, Cu, Ni a Co

Z pracovního standardního roztoku Cr o koncentraci 100 µg/l a dále z roztoku Ni o stejné koncentraci se do 50ml odměrných baněk postupně pipetuje (25; 10; 5; 2,5; 0) ml těchto roztoků. Do stejných odměrných baněk se dále pipetuje z pracovního standardního roztoku Co o koncentraci 100 µg/l postupně (10; 5; 2,5; 1; 0) ml. Z pracovního standardního roztoku Cu o koncentraci 1 mg/l se do stejných odměrných baněk pipetuje (5; 2,5; 1; 0,5; 0) ml. Odměrné baňky se doplňují po značku roztokem modelujícím matici měřených vzorků.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	4
	Jednotné pracovní postupy – analýza rostlinného materiálu	Vydání	3
	40130.1 – Stanovení Cu, Ni, Cr, Co, Pb, Cd metodou ETA-AAS	Revize	0

Tabulka 1. Standardní kalibrační roztoky doporučené pro měření (µg/l).

Prvek	ST.0	ST.1	ST.2	ST.3	ST.4
Cd	0	1	2	5	10
Pb	0	5	10	20	50
Cr	0	5	10	20	50
Co	0	2	5	10	20
Ni	0	5	10	20	50
Cu	0	10	20	50	100

Poznámky

- 6 *Metoda byla ověřována pro mineralizáty rostlinného materiálu připravené na suché cestě dle postupu 40034.1, ve kterých je koncentrace kyseliny dusičné zpravidla 2 mol/l. Podle tohoto postupu je třeba vzorky mineralizované z navážky 5 g/50 ml před měřením naředit 10 × vodou (3), takže výsledná koncentrace kyseliny dusičné v mineralizátech připravených pro měření je 0,2 mol/l. Kalibrační standardní roztoky jsou připraveny v 0,2 mol/l kyselině dusičné. Ředění vzorků omezuje vliv matrice a umožňuje měření v lineární části kalibrační křivky.*
- 7 *Pro kalibraci je možné použít pouze jeden standardní kalibrační roztok, ze kterého se další body pro konstrukci kalibrační křivky získají režimem automatické kalibrace. Pokud přístroj není vybaven touto funkcí, je třeba připravit více pracovních standardních kalibračních roztoků. Výsledný objem (standardního roztoku resp. vzorku, blanku a modifikátoru) dávkovaný do kyvety musí být konstantní (zpravidla 20 µl + 5 µl modifikátoru).*
- 8 *Při sekvenčním automatickém provozu a při stanovení více prvků v mineralizátu je vhodné využít směsný pracovní standardní roztok o koncentraci (v µg/l) 100 Pb, 5 Cd, 50 Ni, 20 Cr, 50 Cu, 50 Co.*
- 9 *Použití vyšších koncentrací kyseliny dusičné než asi 0,2 mol/l způsobuje rychlou degradaci pyrolytického povrchu grafitového atomizátoru. Kyvety standardně vydrží přibližně 600 až 700 odpalů (pokud se mineralizáty rostlinného materiálu měří přibližně v 0,2M kyselině dusičné).*
- 10 *Při stanovení je nezbytné věnovat zvýšenou pozornost slepým pokusům připravených mineralizátů a zařazovat do každé mineralizační série 2 slepé pokusy a vhodný IRM.*

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	5
	Jednotné pracovní postupy – analýza rostlinného materiálu	Vydání	3
	40130.1 – Stanovení Cu, Ni, Cr, Co, Pb, Cd metodou ETA-AAS	Revize	0

5.2 Nastavení přístroje a měření

Před vlastním měřením je třeba zkontrolovat a případně upravit polohu dávkovací kapiláry do grafitové kyvety a provést vypálení kyvety bez dávkování vzorku pro identifikaci paměťových efektů z předchozího měření. Dále se kyveta krátce vyčistí 1 až 2 odpaly roztoku zředěné kyseliny (obvykle kalibračního blanku). Při měření se zpravidla odečítá integrovaná plocha signálu po korekci nespecifické absorpce, v některých případech je však vhodnější použít pro vyhodnocení výšku píku. Standardně se dávkuje do grafitového atomizátoru 20 µl mineralizátu vzorku, slepého pokusu nebo kalibračního standardního roztoku. Pokud se používá modifikátor matrice, dávkuje se ještě obvykle 5 µl modifikátoru.

Pro stanovení Cd a Pb se přidává ke vzorku směsný modifikátor, který obsahuje v 5 µl 0,05 mg $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ + 0,003 mg $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$. Pro stanovení Co lze doporučit modifikátor, který obsahuje v 5 µl 0,015 mg $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$. Pro stanovení Co a Cu lze použít také směsný modifikátor, který obsahuje v 5 µl 0,005 mg Pd + 0,003 mg $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$. Cr a Ni lze měřit vzhledem k vysoké atomizační teplotě bez použití chemického modifikátoru matrice.

V tabulkách 2 a 3 jsou uvedeny doporučené vlnové délky měření a optimalizované teplotní programy pro dva rozdílně technicky řešené elektrotermické atomizátory s rozdílným principem korekce pozadí. Přístroj GTA-96 Varian (podélný ohřev, deuteriová korekce nespecifické absorpce) a AAnalyst 600, PerkinElmer (příčný ohřev kyvety a Zeemanovská korekce nespecifické absorpce). Další přístrojové parametry (proud pro žhavení dutokatodových nebo EDL výbojek, optická šířka štěrbin atd.) se nastaví podle doporučení výrobce přístroje nebo na základě optimalizace postupu pro konkrétní přístroj. Velmi vhodné je dávkování do přehřáté kyvety, pokud je přístroj umožňuje. Zejména pro Cd a Pb se osvědčilo dávkování při 85 °C. Výsledný objem dávkovaný do kyvety musí být konstantní. Citlivost stanovení lze zvýšit dávkováním většího objemu vzorku, případně opakovaného dávkování s vysušením po každém dávkování. Pokud je dávkovaný objem vyšší než 20 µl, je třeba prodloužit dobu sušení oproti hodnotám uvedeným v tabulce 2.

Kalibrace se provádí postupným měřením kalibračních standardních roztoků s rostoucí koncentrací. Průběh kalibračních křivek je ve většině případů lineární. Při měření je vhodné zařazovat do série rekalibrační roztok (obvykle po 10 až 20 vzorcích). Velmi užitečné je také automatické nastavení opakovaného vyčištění kyvety po odpalu vzorků s vysokým obsahem určitého prvku (vysokou hodnotou integrované absorpce), pokud to umožňuje softwarové vybavení přístroje. Zejména při větším opotřebování kyvety roste nutnost rekalibrací v průběhu měření. K vyhodnocení se využije programové vybavení přístroje. Provádí se většinou odečtem z kalibrační křivky. Při vysoké úrovni interferencí se použije metoda standardního přídávku.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	6
	Jednotné pracovní postupy – analýza rostlinného materiálu	Vydání	3
	40130.1 – Stanovení Cu, Ni, Cr, Co, Pb, Cd metodou ETA-AAS	Revize	0

Tabulka 2. Příklad přístrojových parametrů pro podélně vyhřívanou kyvetu a dávkování 20 µl. (GTA-96, Varian), deuteriová korekce pozadí.

Prvek	Cu	Pb	Cd	Ni	Co	Cr
Vlnová délka (nm)	324,8	283,3	228,8	232,0	240,7	357,9
Teplotní program grafitové kyvety (teplota/čas)						
Sušení (°C/s)	150/30	100/20	100/20	150/30	150/30	150/30
Sušení (°C/s)		200/20	200/25			
Rozklad (°C/s)	800/5	600/15	500/15	900/5	900/5	800/5
Rozklad (°C/s)	800/5	600/5	500/5	900/15	900/15	800/10
Atomizace (°C/s)	2400/0,9	2100/0	2000/0,8	2400/0,9	2400/0,9	2400/0,9
Atomizace (°C/s)	2400/2	2100/2	2000/2	2400/2	2400/2	2400/2
Čištění (°C/s)	2500/2	2100/2	2100/2	2500/2	2500/2	2500/2

První položka shodně nazvaného teplotního programu udává, za jak dlouho má být dosaženo dané teploty (rychlost ohřevu), druhá položka udává dobu, po kterou při dané teplotě proces probíhá.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	7
	Jednotné pracovní postupy – analýza rostlinného materiálu	Vydání	3
	40130.1 – Stanovení Cu, Ni, Cr, Co, Pb, Cd metodou ETA-AAS	Revize	0

Tabulka 3. Příklad přístrojových parametrů pro příčně vyhřívanou kyvetu (THGA) a dávkování 20 µl (AAnalyst 600, PerkinElmer), Zeemanova korekce pozadí.

Prvek	Cu	Pb	Cd	Ni	Co	Cr
Vlnová délka (nm)	324,8	283,3	228,8	232,0	242,5	357,9
Teplotní program grafitové kyvety (teplota/čas)						
Sušení (°C/s)	110/3	110/3	110/3	110/3	110/3	110/3
Sušení (°C/s)	110/30	110/30	110/30	110/30	110/30	110/30
Sušení (°C/s)	130/15	130/15	130/15	130/15	130/15	130/15
Sušení (°C/s)	130/30	130/30	130/30	130/30	130/30	130/30
Rozklad (°C/s)	1200/10	850/10	600/10	900/15	1400/10	950/10
Rozklad (°C/s)	1200/20	850/20	600/20	900/20	1400/20	950/20
Atomizace (°C/s)	2100/0	1700/0	1650/0	2300/0	2400/0	2400/0
Atomizace (°C/s)	2100/5	1700/3	1650/3	2300/5	2400/4	2400/5
Čištění (°C/s)	2500/1	2450/1	2450/1	2600/1	2600/1	2600/1
Čištění (°C/s)	2500/6	2450/3	2450/3	2600/6	2600/5	2600/6

Jako ochranný plyn se u přístroje AAnalyst 600 používá Ar o průtoku 250 ml/min, v průběhu fáze atomizace je jeho průtok nulový.

Poznámky

- 11 *Veškeré laboratorní sklo, vialky do autosampleru a ostatní používané laboratorní nádobí (pipety, kádinky) je třeba před dalším použitím dobře vypláchnout vodou (3) a loužit ve zředěné kyselině dusičné (asi 10 % V/V, p.a.) nejlépe přes noc a poté dokonale několikrát promýt vodou (3).*
- 12 *Na slepé pokusy, nulové body kalibrační křivky a ostatní standardy se do autosampleru používají oddělené vialky, které již nebudou použity dále na jiné vzorky. Laboratorní sklo určené pro standardy se nesmí používat pro přípravu jiných roztoků a má být vyčleněno pouze pro stopovou analýzu. Odměrné sklo, které se momentálně nepoužívá, se naplní zředěnou kyselinou dusičnou (asi 10 % V/V, p.a.), uzavře a před použitím opět důkladně promyje vodou (3).*

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	8
	Jednotné pracovní postupy – analýza rostlinného materiálu	Vydání	3
	40130.1 – Stanovení Cu, Ni, Cr, Co, Pb, Cd metodou ETA-AAS	Revize	0

- 13 Vzhledem k podstatně většímu vlivu matrice na stanovení nízkých obsahů analytů je nutné použít korekci pozadí. Rušivé vlivy bývají nejčastěji způsobeny přítomností nedisociovaných molekul, radikálů a vysokých koncentrací solí, zejména chloridů, případně fosforečnanů.
- 14 Ve vzorcích se zvláště komplikovanou matricí a vysoce zasolených může dojít k překompenzaci signálu při použití deuteriového korektoru nespecifické absorpce. V těchto případech je vhodnější odečítat výšku signálu nebo použít přístroj s možností korekce nespecifické absorpce využitím Zeemanova jevu případně korektoru typu Smith-Hieftje. Při použití korekce pozadí na principu Zeemanova jevu je potřeba znát průběh kalibračních závislostí. Při vyšších hodnotách koncentrací prochází křivky maximem a výsledek může být zkreslen tím, že jedna hodnota absorbance odpovídá dvěma hodnotám koncentrace. Hodnota absorbance, při které dochází k tomuto jevu, je většinou uvedena v doporučených podmínkách pro každý prvek v software přístroje.
- 15 Korekci pozadí na principu Zeemanova jevu je možné korigovat nespecifickou absorpcí přibližně do hodnot 0,5 až 1 jednotek integrované absorbance. Při překročení hodnoty 1 AU (integrovaná) je již potřeba ověřit výsledek naředěním vzorku a potlačením vlivu matrice.
- 16 Vedle klasických dutokatodových výbojek je velmi výhodné použít EDL lampy nebo jiné zdroje záření s vysokou intenzitou. Tyto zdroje záření jsou vhodné zejména pro lehce těkavé prvky s rezonančními čarami ve vzdálené UV oblasti spektra pod 220 nm. (např. Cd, Pb).
- 17 Všechny používané zdroje záření se žhaví proudem dle doporučení výrobce, stárnutím lamp postupně klesají jejich intenzity (pokud softwarové vybavení umožňuje vyčíslit intenzitu záření lampy, je vhodné si dosažené intenzity záření evidovat), v žádném případě se však nesmí zvyšovat proud lampy nad tuto doporučenou hodnotu, mohlo by dojít k trvalému poškození lampy. EDL lampy je nutné nechat žhavit před měřením asi 30 min, HCL lampy pouze asi 10 min.
- 18 Pokud dávkovací kapilára autosampleru špatně dávákuje i při dobrém nastavení do prostoru grafitového atomizátoru, osvědčilo se její promytí isopropanolem čistoty p.a., který ji dokonale odmastí. Potom je opět nutné důkladně promýt kapiláru vodou (3).
- 19 Správnost měření je třeba ověřit všemi dostupnými metodami (referenční materiály, spiking, metoda standardních přídavek, porovnání výsledků pro různě ředěný vzorek, analýza vzorků z mezilaboratorních porovnávacích zkoušek apod.).
- 20 Některé prvky vykazují píky, které chvostují, zejména Ni, Co, Cr a Cu. V tomto případě je třeba upravit dobu pro čtení signálu.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	9
	Jednotné pracovní postupy – analýza rostlinného materiálu	Vydání	3
	40130.1 – Stanovení Cu, Ni, Cr, Co, Pb, Cd metodou ETA-AAS	Revize	0

- 21 *Pokud není známo složení vzorku, případně se jedná o vzorek velmi komplikované matrice, se pro měření použije metoda standardního přídatku. Míru ovlivnění matricí vzorku lze odhadnout porovnáním směrníc kalibračních závislostí získaných oběma metodami (externí kalibrace a kalibrace metodou standardního přídatku). Pokud se vyskytuje série vzorků přibližně stejné matrice a stejného složení (např. slámy, trávy, zrno apod.), řada přístrojů umožňuje použít metodu tzv. standard addition-calibrate, kdy s pomocí metody standardního přídatku aplikovaného na jeden vzorek se ostatní vzorky vyhodnotí na zjištěnou kalibrační závislost.*

6 Literatura

- 1 Automatická spektrometrie, Sborník přednášek z kurzu, 3. upravené a doplněné vydání, 1998.
- 2 PerkinElmer Instruments: Návod k použití přístroje AAnalyst 600 a aplikační literatura.
- 3 Černohorský, T., Jandera, P.: Atomová spektroskopie, Univerzita Pardubice, 1997.