

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	1
	Jednotné pracovní postupy – analýza rostlinného materiálu	Vydání	3
	40170.1 – Stanovení selenu metodou atomové absorbční spektrometrie s generací hydridů (AAS-HG)	Revize	0

STANOVENÍ SELENU METODOU ATOMOVÉ ABSORBČNÍ SPEKTROMETRIE S GENERACÍ HYDRIDŮ (AAS-HG)

1 Účel a rozsah

Postup je určen pro stanovení obsahu selenu v mineralizátech vzorků rostlinného materiálu připravených mineralizací na mokré cestě. Vzhledem k velmi specifickému způsobu stanovení obsahuje tento i kompletní postup mineralizace vzorků.

Poznámky

- 1 *Obsah selenu v mineralizátech vzorků rostlinného materiálu lze stanovit rovněž metodou ICP-MS, která je uvedena v JPP Zkoušení krmiv, postup č. 10290.1.*

2 Princip

Ve vzorku rostlinného materiálu se obsah selenu stanoví po rozkladu směsí kyseliny dusičné, kyseliny sírové a peroxidu vodíku metodou atomové absorpční spektrometrie s hydridovou technikou (AAS-HG). Mineralizát vzorku se dávkuje do aparatury na generování hydridů. Selenovodík vzniklý reakcí s tetrahydridoboritanem sodným se vede proudem inertního plynu do křemenné rozkladné trubice vyhřívané plamenem nebo elektricky, která je umístěná v optické ose přístroje. Zde dochází k termickému rozkladu selenovodíku atomizací vytvořeného hydridu a atomární selen způsobí absorpci charakteristického záření. Signál se vyhodnocuje metodou kalibrační křivky. Kalibrační roztoky se připravují modelováním matrice měřeného vzorku.

3 Chemikálie

Používají se chemikálie analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak.

- 1 Tetrahydridoboritan sodný, NaBH_4 .
- 2 Hydroxid sodný, NaOH .

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	2
	Jednotné pracovní postupy – analýza rostlinného materiálu	Vydání	3
	40170.1 – Stanovení selenu metodou atomové absorbční spektrometrie s generací hydridů (AAS-HG)	Revize	0

- 3 Tetrahydridoboritan sodný, roztok, $c(\text{NaBH}_4) = 0,5 \%$.

Příprava: Do 1000ml odměrné baňky se naváží 10 g hydroxidu sodného (2), rozpustí se v asi 500 ml vody (14) a přidá se 5 g tetrahydridoboritanu sodného (1). Roztok se míchá do úplného rozpuštění a po vytemperování se doplní vodou (14) po značku. V případě potřeby se tento roztok může filtrovat přes filtrační papír nebo přes membránový filtr porosity $0,45 \mu\text{m}$ pomocí vakuové filtrace. Roztok se přechovává v plastové lahvi v chladu a temnu, je stálý asi 2 měsíce.

- 4 Kyselina chlorovodíková koncentrovaná, HCl (36 – 38) %, $\rho(\text{HCl}) = 1,18 \text{ g/ml}$.

- 5 Kyselina dusičná koncentrovaná, HNO_3 65 %, $\rho(\text{HNO}_3) = 1,40 \text{ g/ml}$.

- 6 Peroxid vodíku, H_2O_2 , roztok 30%.

- 7 Kyselina sírová koncentrovaná, H_2SO_4 96 %, $\rho(\text{H}_2\text{SO}_4) = 1,83 \text{ g/ml}$.

- 8 Kyselina chlorovodíková, $c(\text{HCl}) = 5 \text{ mol/l}$.

Příprava: Do 1000ml odměrné baňky se naleje asi 500 ml vody (14), přidá se 430 ml koncentrované kyseliny chlorovodíkové (4) a po vytemperování se doplní po značku.

- 9 Základní standardní roztok selenu o koncentraci 1000 mg/l. Je vhodné použít komerčně dodávaný roztok od ověřeného výrobce, např. Analytika s.r.o. Praha.

- 10 Pomocný standardní roztok selenu o koncentraci 10 mg/l.

Příprava: Do 100ml odměrné baňky se pipetuje 1 ml základního standardního roztoku selenu (9) a baňka se doplní po značku vodou (14).

- 11 Pracovní standardní roztok selenu o koncentraci 0,1 mg/l.

Příprava: Do 500ml odměrné baňky se pipetuje 5 ml pomocného standardního roztoku selenu (10) a baňka se doplní po značku vodou (14).

- 12 Acetylen čistý a vzduch tlakový pro FAAS.

- 13 Argon čistoty 4,8 případně dusík shodné čistoty nebo vyšší.

- 14 Voda (deionizovaná, demineralizovaná nebo destilovaná).

4 Přístroje a pomůcky

- 1 Analytické váhy s přesností nejméně 0,001 g.

- 2 Mineralizační zařízení vícemístné s programátorem teploty.

- 3 Pipety nebo automatické dávkovače pro dávkování koncentrovaných kyselin s přesností $\pm 0,1 \text{ ml}$.

- 4 Atomový absorpční spektrofotometr s výbojkou pro selen s přidavným zařízením pro generování a termický rozklad hydridů.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	3
	Jednotné pracovní postupy – analýza rostlinného materiálu	Vydání	3
	40170.1 – Stanovení selenu metodou atomové absorbční spektrometrie s generací hydridů (AAS-HG)	Revize	0

5 Postup

5.1 Mineralizace vzorku

Do mineralizačních trubic se naváží ($2 \pm 0,001$) g upraveného vzorku a přidá se 10 ml koncentrované kyseliny dusičné (5). Trubice se umístí do mineralizačního bloku a nechají se stát přes noc. Druhý den se směs se vzorkem postupně zahřívá 15 min při 100 °C, 10 min při 140 °C a 90 min při 180 °C. Po ochlazení směsi se přidají 2 ml koncentrované kyseliny dusičné (5) a 1 ml koncentrované kyseliny sírové (7) a směs se dále zahřívá 60 min při 180 °C. Po ochlazení se přidá po kapkách (2 – 4) ml 30% peroxidu vodíku (6) a směs se zahřívá 10 min při 160 °C. Po ukončení mineralizace se mineralizát filtruje přes středně hustý filtr (např. FILTRAK č. 389) do 50ml odměrné baňky. Obsah baňky se po vytemperování doplní kyselinou chlorovodíkovou (8) po značku a promíchá se. Pro každou měřenou sérii se připraví slepý pokus tak, že se provedou stejné operace s vyloučením vzorku.

Poznámky

- Při zvoleném způsobu mineralizace je potřeba zajistit, aby nedocházelo ke ztrátám selenu a ke kontaminaci ze vzduchu. Zároveň musí být zaručena mineralizace všech vyskytujících se forem selenu. Proto jsou vhodnější postupy s mineralizací v uzavřených tlakových nádobkách (mikrovlnný způsob ohřevu, autokláv apod.) nebo v zařízení se zpětnými vodním chladiči s nástavci, které lze případně považovat za pseudo-uzavřený systém. Rozklady vzorků pomocí kyselin na suché cestě se nedoporučují zejména z hlediska přísné kontroly teploty spalování a nutného přídatku oxidačních činidel, které převedou těkavé sloučeniny selenu na soli kyslíkatých kyselin. Při spalování v muflové peci do teploty 450 °C se např. doporučuje přidat ke vzorkům oxidační činidlo dusičnan hořečnatý nebo oxid hořečnatý.*
- Připravené mineralizáty vzorků rostlinného materiálu podle uvedeného postupu jsou v matrici 5 mol/l kyseliny chlorovodíkové. Tato koncentrace HCl by měla zabezpečit dostatečně kyselé prostředí pro průběh dokonalé redukce Se(VI) na Se(IV) a následnou schopnost tvorby hydridu. Při použití jiného způsobu mineralizace vzorků (s jinou kombinací minerálních kyselin s různou oxidační schopností) je potřeba otestovat způsoby redukce vzorků před měřením metodou generování hydridů. Podle literatury se doporučují používat postupy předredukce s přidavkem alikvotního podílu koncentrované kyseliny chlorovodíkové k mineralizátu za studena nebo zahříváním na vodní lázni 60 min při 70 °C nebo (20 – 40) min při (80 – 90) °C. V každém případě je nutné způsob předredukce ověřit pro zvolený způsob mineralizace, aby redukce proběhla důsledně, nebo aby naředěním vzorku nedošlo ke zpětné oxidaci Se(IV) na Se(VI).*

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	4
	Jednotné pracovní postupy – analýza rostlinného materiálu	Vydání	3
	40170.1 – Stanovení selenu metodou atomové absorbční spektrometrie s generací hydridů (AAS-HG)	Revize	0

- 4 *Jako možný způsob předredukce selenu při použití jiného způsobu mineralizace vzorku než uvedeného v tomto postupu lze doporučit následující postup. Do 25ml odměrné baňky se napipetuje (1 – 5) ml mineralizátu vzorku, 2,5 ml kyseliny chlorovodíkové koncentrované (4) a 2,5 ml vody (14). Obsah baňek se promíchá a baňky se umístí bez zátky na vodní lázeň, kde 60 min při 70 °C probíhá předredukce Se(VI) na Se(IV). Po ochlazení na laboratorní teplotu se obsah baňek doplní vodou (14) po značku.*

5.2 Příprava kalibračních standardních roztoků

Jednotlivé kalibrační standardní roztoky se připraví pipetováním příslušného objemu pracovního standardního roztoku (11) do 100ml odměrných baňek podle tabulky 1. Do každé baňky se přidá 0,5 ml koncentrované kyseliny dusičné (5) a roztoky se doplní kyselinou chlorovodíkovou (8) po značku.

Tabulka 1. Příprava standardních kalibračních roztoků

Pipetovaný objem roztoku (11) (ml)	0	1	2	5	10	20
Koncentrace Se (µg/l)	0	1	2	5	10	20

5.3 Postup měření

Před začátkem měření se přístroj optimalizuje na maximální citlivost podle doporučení výrobce. Nejprve se vyladí a testuje celý systém kapilár zmlžováním vody (14), tzn. upraví a nastaví se průtoky činidel, nosného plynu a přítlaky hadiček. Po zapnutí a nažhavení lampy se plamenový hořák nebo elektrická pícka nastaví do optické dráhy tak, aby průchod paprsku ze zdroje záření přes křemennou trubici byl maximální.

Příklad podmínek měření pro spektrometr SpecrAA300 Varian, hydridové zařízení firmy Labtech:

Selen se měří při vlnové délce 196 nm vymezené štěrbinou o optické šířce 1 nm. Křemenná kyveta délky 15 cm je vyhřívána plamenem acetylen-vzduch na teplotu (900 –1000) °C. Signál se integruje 8 s až 10 s po programové prodlevě 30 s od začátku nasávání vzorku. Použití korekce pozadí není zapotřebí. Roztoky vzorků se dávkuje peristaltickou pumpou do přídavného zařízení pro generaci hydridů rychlostí (7 – 10) ml vzorku/min. Současně se do generátoru dávkuje druhým kanálem peristaltické pumpy roztok tetrahydridoboritanu sodného (3). Jako nosný plyn se používá argon (13). Průtok nosného plynu se nastaví na asi 300 ml/min. Před vlastním měřením se pro ustavení rovnováhy v generátoru hydridů nasává asi 3 min promývací roztok kyseliny chlorovodíkové (8) a roztok tetrahydridoboritanu sodného (3). Poté se několikrát krátce nasaje malé množství nejvyššího kalibračního roztoku stanovovaného prvku a znovu se nasává asi 3 min promývací roztok (8). Poté se postupně nasávají kalibrační roztoky od nejnižší koncentrace a následovně mineralizáty vzorků.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	5
	Jednotné pracovní postupy – analýza rostlinného materiálu	Vydání	3
	40170.1 – Stanovení selenu metodou atomové absorbční spektrometrie s generací hydridů (AAS-HG)	Revize	0

Koncentrace selenu se určí z měřeného signálu absorbance vzorku s použitím kalibrační závislosti stanovovaného prvku. Od takto získané koncentrace se odečte koncentrace prvku ve slepém pokusu.

Poznámky

- 5 *Hlavními interferenty stanovení selenu metodou generování hydridů jsou kovy Cu, Ni, Fe, As, Sb, Bi, Ge, Ag, Hg, Sn. V průběhu tvorby hydridů může být řada těchto prvků redukována až do elementárního stavu a při vyšších koncentracích ve vzorku způsobovat významné rušení. V tomto případě je nezbytné pro vyhodnocení použít místo klasické externí kalibrace metodu standardního přídávku. Velmi kritickým prvkem je např. měď, která již při koncentracích převyšujících 1 mg/l může způsobit depresi signálu selenu. Vysoké koncentrace mědi nejsou v rostlinných vzorcích příliš běžné, nicméně v případě potřeby lze přidat k mineralizátu vzorku maskující činidlo 1,10-phenantrolin. Roztok 1,10-phenantrolinu se připraví rozpuštěním 5 g monohydrátu 1,10-phenantrolinu čistoty p.a ve 100 ml vody (14) s přidavkem několika kapek koncentrované kyseliny chlorovodíkové (4) a doplněním po značku vodou (14), roztok se uchovává v lednici. Při přípravě je nutné rozpouštět chemikálii ve slabě kyselém prostředí, ve vodě (14) se velmi špatně rozpouští.*
- 6 *Měření selenu v mineralizátech vzorků se doporučuje realizovat v co nejkratší době po jejich přípravě, nejlépe do 1 týdne po provedené mineralizaci.*
- 7 *Správná funkce a vlastní stanovení s použitím zařízení pro generování hydridů může být významně ovlivněno přítomností některých organických látek nebo stop některých kovů. Pokud dojde k výraznému snížení citlivosti stanovení vlivem kontaminace ze vzorků, je nutné vyčistit křemennou kyvetu hydridového systému. Pro čištění se velmi osvědčila směs 3 dílů koncentrované kyseliny fluorovodíkové a 7 dílů koncentrované kyseliny dusičné. Tato směs se nechá (5 – 10) min působit na vnitřní povrch křemenné kyvety. Potom se kyveta několikrát důkladně proplachuje vodou (14). Při čištění se musí přísně dodržovat pravidla bezpečnosti práce s kyselinou fluorovodíkovou. Zejména je nutné odvětrávat pracovní prostor a pracovat s plastovým nádobím. Pro čištění celého systému peristaltické pumpy, teflonových kapilár a přívodních hadiček se také osvědčil teplý roztok lučavky královské, tj. 70 ml koncentrované kyseliny dusičné (5) a 200 ml koncentrované kyseliny chlorovodíkové (4) se zředí vodou (14) na celkový objem 1000 ml.*
- 8 *S ohledem na možnost křížové kontaminace a vzájemných interferencí je nutné důsledně používat oddělené aparatury pro stanovení ostatních hydridotvorných prvků (As, Sb). U aparatury pro kontinuální dávkování je vhodné používat pro ostatní hydridotvorné prvky kromě oddělené křemenné kyvety také samostatnou celou hydridovou aparaturu.*

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	6
	Jednotné pracovní postupy – analýza rostlinného materiálu	Vydání	3
	40170.1 – Stanovení selenu metodou atomové absorbční spektrometrie s generací hydridů (AAS-HG)	Revize	0

- 9 *Pro stanovení hydridotvorných prvků obecně je velmi vhodné použít bezelektrodové výbojky (EDL lampy) jako zdroje záření, pokud to instrumentace AAS umožňuje. EDL lampy jsou zvláště vhodné pro lehce těkavé prvky s rezonančními čarami ve vzdálené UV oblasti spektra pod 220 nm (As, Se, Sb). Jejich použití značně potlačuje šum přístroje, mají větší živostnost oproti klasickým HCL výbojkám a umožňují dosáhnout vyšší citlivosti stanovení a lepší linearitu koncentračních závislosti. EDL lampu je nutné nechat žhavit před měřením asi 30 min, HCL lampu stačí žhavit asi 10 min.*

6 Výpočet a vyjádření výsledků

Výsledný obsah selenu ve vzorku se vypočte podle vztahu

$$X = (C_V - C_B) \times V/m \times 1000$$

kde

X obsah selenu ve vzorku v mg/kg,

C_V koncentrace selenu ve filtrátu nebo extraktu v $\mu\text{g/l}$ odečtená z kalibračního grafu,

C_B koncentrace selenu v $\mu\text{g/l}$ v roztoku slepého pokusu,

m hmotnost navážky vzorku v g,

V celkový objem filtrátu nebo extraktu v ml.

7 Literatura

- 1 Urbánková, E., Holcová, H.: Stanovení selenu v rostlinách a příbuzných materiálech metodou atomové absorpční spektrometrie s technikou generace hydridů, Bulletin 1999, Laboratorní odbor, roč. 3, č.1.
- 2 Automatická spektrometrie, Sborník přednášek z kurzu, 3. upravené a doplněné vydání, 1998.
- 3 Automatická spektrometrie, Sborník přednášek z kurzu, 3. upravené a doplněné vydání, 1998.
- 4 Černohorský, T., Jandera, P.: Atomová spektroskopie, Univerzita Pardubice, 1997.
- 5 ISO 20280:2007. Soil quality-Determination of arsenic, antimony and selenium in aqua regia soil extracts with electrothermal or hydride generation atomic absorption spectrometry.