

Atomová absorpční spektrofotometrie

Doc. MUDr. Petr Schneiderka, CSc.

**Tvorba a ověření e-learningového prostředí pro integraci
výuky preklinických a klinických předmětů na LF UP a
FZV UP v Olomouci**

Reg. č.: CZ.1.07/2.2.00/15.0313

Úvod

- Atomová absorpční spektrofotometrie (AAS) je metoda sloužící ke stanovení koncentrace většího počtu převážně kovových prvků
- V laboratorní medicíně se nejčastěji využívá ke stanovení vápníku, hořčíku, lithia, železa, mědi, hliníku, zinku, chromu, arsenu, kadmia, olova, manganu, molybdenu a rtuti v lidském séru, moči a jiných biologických materiálech

Úvod

- AAS se uplatňuje při měření koncentrace těchto prvků i ve vzorcích vnějšího prostředí, potravin a vody
- AAS má širší aplikační spektrum než plamenová emisní fotometrie, je citlivější, ale potřebná technologie je významně složitější
- Jedná se o sofistikovanou exaktní metodu, která zpracovává limitované série vzorků a je pouze zčásti automatizovatelná (v bezplamenovém provedení)

Principy atomové absorpční spektrofotometrie

- Principem AAS je absorpce monochromatického světla volnými atomy kovů v plynném stavu. Absorbované záření odpovídá přechodu ze základního energetického stavu na vyšší energetickou hladinu. Kovové atomy absorbují pouze světlo takových vlnových délek, které samy mohou emitovat.
- Absorpční spektrum má podobně jako emisní spektrum čárový charakter. Každé spektrální čáře v emisním spektru odpovídá jedna čára stejné vlnové délky v absorpčním spektru. Atomy absorbují nejvíce ty spektrální čáry (vlnové délky), které samy nejsilněji emitují.

Základní informace (1)

- Čáry, které nejvíce absorbují, se nazývají rezonanční čáry a na nich se sleduje úbytek záření.
 - Vlnová délka světelného zdroje, jakou kovový atom v plynném stavu absorbuje, je pro daný prvek charakteristická.
 - Při stanovení se využívá skutečnosti, že úbytek záření při této vlnové délce závisí na množství atomů absorbujícího prvku v základním stavu.
- Pro účely stanovení kovů metodou AAS je nutné převést kovové ionty do stavu volných atomů. To se děje zahříváním v plameni nebo elektrotermicky.

Základní informace (2)

- Podle zvoleného způsobu se AAS dělí na:
 - Plamenovou AAS (Flame atomic absorption spectrometry, FAAS)
 - Elektrotermickou AAS (Electrothermal atomic absorption spectrometry, ETAAS).
- Teplem se v obou případech přerušují chemické vazby, ionty jsou redukovány příjmem elektronů ze spalování a vznikají volné atomy.
 - Do určité míry může docházet také k excitaci volných atomů.
 - K vyloučení rušivého záření a pro izolaci rezonanční čáry je do optické dráhy umístěn monochromátor.

Přístrojové vybavení a měření (1)

- Atomový absorpční spektrofotometr pro plamenovou AAS se skládá z:
 - Atomizéru s nasávacím zařízením pro vzorek
 - Přívodu plynů a hořáku
 - Optického systému (zdroje/zdrojů záření, monochromátoru)
 - Detektoru a indikačního a vyhodnocovacího zařízení (on-line PC a vyhodnocovací software)
 - Pomocným a doplňkovým zařízením jsou tlakové láhve s plyny, vzduchový kompresor, exhaustor, mikrovlnná mineralizační pec s příslušenstvím a běžná laboratorní vybava

Přístrojové vybavení a měření (2)

- Základním krokem metody AAS je **atomizace** vzorku, a to v případě FAAS atomizace plamenem
- Ta začíná ve zmlžovači (mlžné komoře, nebulizéru), kde se pneumatically tvoří jemný aerosol složený ze vzorku a směsi paliva, např. acetylenu se vzduchem
- Aerosol se přivádí ke štěrbinovému laminárnímu hořáku a zde v plameni vzniká vlastní absorpční prostředí.

Přístrojové vybavení a měření (3)

- U bezplamenové (elektrotermické) AAS se atomizace provádí elektrickým zahříváním roztoku vzorku umístěného v grafitové nebo wolframové lodičce
- S rostoucí teplotou se nejprve odpaří rozpouštědlo, potom proběhne pyrolýza a nakonec atomizace
- Cyklus končí čisticí fází s nejvyšší teplotou, a zařízení je tím připraveno k analýze dalšího vzorku

Přístrojové vybavení a měření (4)

- Zdrojem světla je obvykle **výbojka** s dutou katodou
- Pro každý stanovovaný kovový prvek je nutno mít výbojku, jejíž katoda je zhotovena ze stejného kovu, jako je ten měřený.
 - Taková výbojka totiž emituje záření s čárovým spektrem, které je pro daný prvek charakteristické. Jedině tak lze u vybraných rezonančních čar detekovat absorpci atomy měřeného prvku.
 - V praxi se používají výbojky multiprvkové, jejichž katody jsou zhotoveny ze slitin několika kovů a umožňují proto měřit všechny přítomné prvky.
 - Existují však také jiné typy zdrojů záření, např. vysokofrekvenční bezelektroodové výbojky naplněné inertním plynem spolu s určitým množstvím dotyčného kovu nebo jeho soli.

Přístrojové vybavení a měření (5)

- Světlo ze zdroje prochází celou šířkou plamene. Za hořákem je umístěn mřížkový **monochromátor**, jímž se izoluje charakteristická rezonanční čára.
- Detektorem záření je **fotonásobič**, vzniklý proud se po zesílení měří a získané hodnoty se dále zpracovávají.

Přístrojové vybavení a měření (6)

- Vzhledem k tomu, že se jedná o metodu relativní, je třeba porovnat naměřené hodnoty vzorků s hodnotami referenčního materiálu, tedy **kalibrací**.
- To lze provést zhotovením kalibrační křivky na základě měření standardních roztoků o známé koncentraci nebo metodou standardního přídatku.
 - Sestrojení křivky kalibrační závislosti i extrapolaci a výpočet koncentrace měřeného prvku ve vzorku vykonává software přístroje.



Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky

Videosekvence „Atomový absorpční spektrofotometr“ (1)

- Základní kroky stanovení vápníku, hořčíku a zinku v lidském séru metodou plamenové atomové absorpční spektrofotometrie jsou demonstrovány na přístroji AAS Solaar M6 (viz schéma).
- Pod společnou karosérií přístroje jsou uloženy:
 - Plamenový AAS (při čelním pohledu je umístěn v levé části)
 - Bezplamenový AAS (v pravé části)
 - Uprostřed leží prostor pro výbojky
- V detailním pohledu po otevření dvířek můžeme vidět prostor hořáku a pod ním směšovací komoru s nasávací kapilárou pro vzorek. Další detailní záběr ukazuje otevřený prostor s výbojkami v otočném karuselu.

Videosekvence „Atomový absorpční spektrofotometr“ (2)

- K nezbytnému příslušenství patří tlakové láhve s plyny, výpočetní a řídicí jednotka s PC a příslušným software, odsávací zařízení (exhaustor) a mikrovlnná mineralizační pec
- Laborantka si podle požadavků na žádankách připraví označené vzorky a registruje je do software přístroje.
- Před vlastní analýzou je třeba biologický materiál mineralizovat
 - Vzorky pacientů a také standardní roztoky a kontrolní materiály se pipetují do speciálních teflonových rozkladných nádobek
 - Přidávají se k nim odměřené objemy kyseliny dusičné a peroxidu vodíku o nejvyšší čistotě („oxidační směs“)

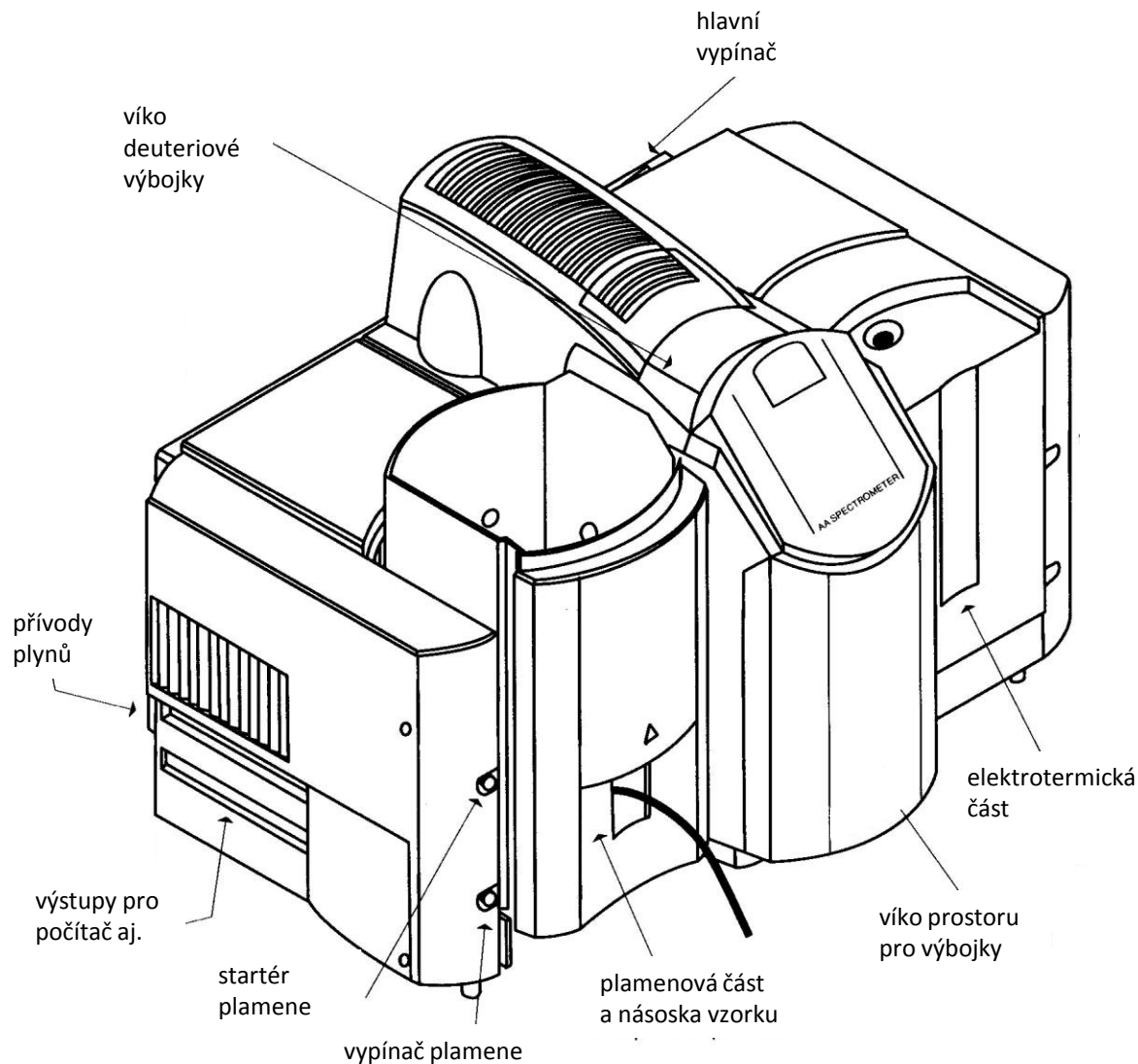
Videosekvence „Atomový absorpční spektrofotometr“ (3)

- Kyvety se vzduchotěsně uzavřou a přenesou do mikrovlnné pece, kde za zvýšené teploty, tlaku a účinkem oxidační směsi proběhne mineralizace
- Po skončení mineralizace se teflonové kyvety otevřou a mineralizované vzorky se z nich kvantitativně přenesou do označených odměrných baněk
- Obsah baněk se po zažehnutí plamene atomového absorpčního spektrofotometru postupně nassává na vstupu plamenové části přístroje a proměřuje se
- Do každé série měření vzorků pacientů se zařazuje a měří také kontrolní materiál (vnitřní kontrola kvality)

Videosekvence „Atomový absorpční spektrofotometr“ (4)

- Získané výsledky jsou automaticky přepočítány na hodnoty koncentrace a zobrazeny na displeji řídicího počítače
 - Po odsouhlasení se mohou vytisknout a odeslat cestou laboratorního informačního systému (kde se současně archivují) do nemocničního informačního systému.
- Popsaná metoda je v podstatě manuální a velmi náročná na práci kvalifikované obsluhy
 - Laboratorní část preanalytické fáze je zde prodloužena o několikastupňovou úpravu vzorku biologického materiálu mineralizací
 - Výrazně vyniká důležitost vnitřní kontroly kvality.

Atomový absorpční spektrofotometr



Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky

Literatura

- Štern P. a kol.: Obecná a klinická biochemie pro bakalářské obory studia, Karolinum Praha, 2. vydání 2011
- Schneiderka P. a kol.: Stanovení analytů v klinické biochemii, 1.část, Karolinum Praha 1999
- Doležalová V. a kol.: Laboratorní technika v klinické biochemii a toxikologii. Učební text IDVPZ Brno, 1995. ISBN 80-7013-198-5
- Komínková J., Mestek O.: Atomová absorpční spektrometrie. V učebním textu Krofta J. a kol. Návodů pro laboratorní cvičení z analytické chemie II., VŠCHT Praha 1997