

P. Schneiderka, Ústav patologické fyziologie LFUP a OKB FN Olomouc

## Atomová absorpční spektrofotometrie

### Úvod

Atomová absorpční spektro(foto)metrie (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, ale uplatňuje se při měření koncentrace těchto prvků i ve vzorcích vnějšího prostředí, potravin a vody. Má tedy 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 a základní informace

Principem atomové absorpční spektrofotometrie 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. Čáry, které nejvíce absorbují, se nazývají rezonanční (analytické) čáry a na nich se tedy 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. Podle zvoleného způsobu se AAS dělí na plamenovou AAS (Flame atomic absorption spectrometry, FAAS) a na elektrotermickou AAS (Electrothermal atomic absorption spectrometry, ETAAS). Teplem se v obou případech přerušuje 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

Atomový absorpční spektrofotometr pro plamenovou AAS se skládá z atomizéru s nasávacím zařízením pro vzorek, přívodem plynů a hořákem, dále ze zdroje (zdrojů) záření, monochromátoru a dalších součástí dvoupráskového optického systému, 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.

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

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

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, a jedině tak lze u

vybraných rezonančních čar detekovat jejich 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 bezelektrodové výbojky naplněné inertním plynem spolu s určitým množstvím dotyčného kovu nebo jeho soli.

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.

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.

### **Videosekvence „Atomový absorpční spektrofotometr“**

Základní kroky stanovení vápníku, hořčíku a zinku v lidském séru metodou plamenové atomové absorpční spektrofotometrie demonstrujeme na starším přístroji AAS Solaar M6 (viz schéma).

Pod společnou karosérií tohoto přístroje jsou uloženy jak plamenový AAS (při čelním pohledu je umístěn v levé části), tak bezplamenový AAS (v pravé části). Prostor pro výbojky leží uprostřed.

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.

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 a přidávají se k nim odměřené objemy kyseliny dusičné a peroxidu vodíku o nejvyšší čistotě („oxidační směs“).

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 nasává na vstupu plamenové části přístroje a proměřuje se. Do každé série měření vzorků pacientů se zařazuje a měří také kontrolní materiál (vnitřní kontrola kvality).

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, protože laboratorní část preanalytické fáze je zde prodloužena o několikastupňovou úpravu vzorku biologického materiálu mineralizací. Tím více vyniká důležitost vnitřní kontroly kvality.

## **Doporučená 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. Návody pro laboratorní cvičení z analytické chemie II., VŠCHT Praha 1997