Ewa Szmidt
Instytut Transportu Samochodowego

PREPARATYKA W ANALIZACH ŚLADOWYCH PRÓBEK ŚRODOWISKOWYCH METODAMI ABSORPCJI ATOMOWEJ

Od kilku dekad monitorowane są wszystkie składowe środowiska naturalnego pod kątem skażenia metalami w stężeniach śladowych (wody morskie i rzeczne, osady, organizmy żywe, gleby, rośliny, zwierzęta a także żywność). Monitoring nastawiony na oznaczanie całkowitej zawartości analitu w próbkach wymaga kompleksowego rozwoju całej metodologii związanej z analizami, przy użyciu technik atomowej spektroskopii absorpcyjnej i emisyjnej. W zakres analizy wchodzi zarówno sam pomiar jak i etapy preparatyki. Wieloletnie doświadczenia wskazują, że precyzyjne przygotowanie próbki jest absolutnie krytyczną częścią analizy, ponieważ jest odpowiedzialne za najbardziej znaczące i często ukryte źródła błędnych wyników. Błędy spowodowane zanieczyszczeniami dotyczą używanych reagentów, narzędzi oraz techniki wykonywania pomiarów. Zwykle mogą one być zminimalizowane przy zachowaniu odpowiednich środków ostrożności. Innym problemem jest możliwość utraty analitu na każdym z etapów poprzedzających samo oznaczenie. W takim przypadku odpowiedzialna za błędy analityczne jest nieodpowiednio dobrana metodologia. Jest to szczególnie częste w przypadku próbek stałych, które muszą być w pierwszym etapie przeprowadzone do roztworu, przed wykonaniem analizy. Taka kolejność działań jest charakterystyczna dla większości technik spektroskopowych, używanych rutynowo w laboratoriach. W niektórych typach próbek (np. tkanki zwierzęce), roztwarzanie nie stanowi problemu i może być osiągnięte kilkoma metodami. Z drugiej strony, wyjątkowo trudno roztwarzają się materiały posiadające w składzie krzemiany (gleby, osady, rośliny). Całkowite roztworzenie takich próbek nie jest możliwe przy użyciu prostych metod. Niniejszy przegląd sumuje stan wiedzy dotyczący możliwości preparatyki próbek środowiskowych, reprezentujących szerokie spektrum składów chemicznych. Przedstawiono główne rodzaje błędów mogących towarzyszyć analizie na każdym z jej etapów. Dodatkowo przedyskutowano możliwy wpływ procedury preparatywnej na jakość pomiaru.

PREPARATION IN THE ANALYSIS OF THE ENVIRONMENTAL TRACE SAMPLES USING ATOMIC ABSORPTION METHODS

For several decades, all the natural environment components have been monitored for the trace levels metal contamination (sea and river water, sediments, living organisms, soil, plants, animals and food). Monitoring set for determination of the total content of an analyte in a sample requires comprehensive development of the methodology related to the analyses, using the techniques of atomic absorption and emission spectroscopy. The scope of the analysis includes both the measurement itself and the stages of preparation. Many years of experience have shown that accurate sample preparation is an absolutely critical part of the analysis, because it is responsible for the most significant and often hidden sources of erroneous results. Errors caused by pollutions concern reagents, tools and techniques of measurement used. Typically, they can be minimized while maintaining the proper precautions. Another problem is the possible loss of analyte in each of the stages before the indication. In such a case, responsible for analytical errors is poorly selected methodology. This is especially true in the case of solid samples which need to be, in a first step, carried into the solution, prior to analysis being carried out. This sequence of activities is typical for most spectroscopic techniques, used routinely in laboratories. In some types of samples (for example, animal tissues), dissolution is not a problem, and can be accomplished in several ways. On the other hand, it is extremely difficult to dissolve materials composed of silicates (soils, sediments, plants). Complete dissolution of such samples it is not possible by using simple methods. This review sums up the state of knowledge concerning the possibility of preparation of environmental samples, representing a wide range of chemical compositions. The main types of errors that may accompany the analysis on each of its stages, have been presented. In addition, discussed is the possible impact of preparative procedures on the quality of the measurement.

1. Wstęp

Niniejszy przegląd nie przedstawia wszystkich aspektów dotyczących analizy śladowej, skupia się raczej na prześledzeniu, krok po kroku, poszczególnych etapów procesu analitycznego, pod kątem zagrożeń mogących przyczynić się do otrzymania błędnego wyniku. Za punkt początkowy przyjęto pobranie próbki (tzw. próbkowanie), natomiast za końcowy uznano interpretację uzyskanych wyników analizy. Opracowanie może również służyć jako pomoc dla analityków realizujących badania metodami spektroskopii atomowej. Problemy związane z zanieczyszczeniami środowiska [1], mogą być modelowane dzięki rzetelnym danym, otrzymanym poprzez pomiary kilku parametrów chemicznych i fizycznych. Badane zjawiska są głównie chemicznej natury i dlatego kontrolowanie odpowiednich parametrów, prowadzących do ich identyfikacji i ewentualnej kontroli, jest ściśle związane z analizą chemiczną. Z uwagi na to, że analiza chemiczna odgrywa dominującą rolę w badaniach środowiskowych, wyłącznie właściwa interpretacja danych uzyskanych w odpowiednich warunkach, może zagwarantować sukces późniejszych opracowań czy wniosków. W świetle powyższego niezbędne jest zaadaptowanie odpowiedniej strategii analitycznej, reprezentowanej przez następujące punkty:

- ✓ ścisła definicja problemu do rozwiązania,
- ✓ selekcja oraz pobranie próbek powiązanych z problemem (próbkowanie),
- ✓ odpowiednia metoda preparatywna,
- ✓ dokładne oznaczenie elementów związanych z problemem,
- ✓ walidacja metody i oszacowanie otrzymanych wyników,
- ✓ interpretacja wyników jako funkcji badanego problemu,
- ✓ istotne wnioski.

Próbki pobierane do analizy w celu monitorowania środowiska są segregowane na kilka kategorii, będących implikacją trudności analitycznych związanych z rozkładem skomplikowanej matrycy lub/i zakresem stężeń do oznaczenia:

- ✓ wody [2] (pitne, powierzchniowe, gruntowe, deszczowe, ściekowe) - niska zawartość badanych substancji, zwykle konieczne wstępne zatężanie,
- ✓ gleby [3], osady [4], zawiesiny, pyły – zawartość krzemianów,
- ✓ próbki roślinne - zróżnicowana zawartość nierozpuszczalnych krzemianów,
- ✓ wody morskie [5] (stężenia ultra niskie), płyny biologiczne - bardzo skomplikowana matryca: krew [6], mleko [7], lub bardzo zmienna matryca – mocz [8],
- ✓ odpady (miejskie lub przemysłowe) - olbrzymie trudności w zapewnieniu reprezentatywnej próbki [9].

W większości laboratoriów, specjalizujących się w analizach próbek nieorganicznych, analizy śladowe są zazwyczaj wykonywane przy użyciu technik spektrometrii atomowej. Spektrometry w zdecydowanej większości są przystosowane do analiz próbek ciekłych. Tylko kilku producentów oferuje wyposażenie do metod spektrometrycznych, umożliwiających bezpośrednie analizy próbek stałych. Do metod takich należą: XRFS (X-ray Fluorescence Spectrometry) oraz iskrowa/łukowa AES (Arc/Spark Atomic Emission Spectrometry). Te dwie techniki były użytkowane powszechnie od lat sześćdziesiątych ubiegłego wieku. Obecnie pokrywają z trudem wymagania stawiane analizom śladowym próbek środowiskowych. Jednakże do dziś są używane w niektórych gałęziach przemysłu ze względu na aspekty praktyczne ich stosowania. Analizy

wymienionymi metodami mogą być wykonane bezpośrednio na stałej próbce, co wiąże się z ominięciem wielu problemów związanych z rozpuszczaniem materiału.

W diagnostyce środowiskowej i medycznej oznaczanie zawartości śladowych jest wykonywane już od lat siedemdziesiątych przy pomocy technik absorpcji i emisji atomowej [10]. FAAS (Flame Atomic Absorption Spectrometry) oferuje zakres detekcji stężeń analitu w próbce rzędu od µg/l do mg/l, zależnie od tego, jaki pierwiastek poddawany jest analizie. Dzięki metodzie ETAAS (Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry) można określić stężenie pierwiastka na poziomie średnio µg/l. Jednakże wszystkie techniki AAS (Atomic Absorption Spectrometry) są ograniczone do oznaczania metali. Równolegle do nich stosowana jest technika ICP-AES (Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry), wykazująca możliwości detekcji pomiędzy FAAS a ETAAS. Używana jako jedyna technika analityczna nie daje wszechstronnych możliwości, ale połączenie wzbudzania cząstek metodą ICP ze spektrometrią mas (MS) pozwala osiągnąć granice detekcji na poziomie ng/l, a czasem niższych. Połączenie ICP-AES oraz ICP-MS pozwala na oznaczanie również niemetali. Co więcej, w porównaniu z technikami AAS wydajność technik opartych na plazmie jest znacznie lepsza. Z drugiej strony wykorzystywanie plazmy do wzbudzania atomów wiąże się ze znacznie częstszym występowaniem różnego rodzaju interferencji, wpływających negatywnie na wyniki analiz wykonywanych tą metodą.

Biorąc pod uwagę nieustanne ulepszanie działania instrumentów analitycznych, cały czas również obniża się granica wykrywalności substancji w próbkach badanych. W związku z tym wzrasta wpływ błędów popełnianych podczas operacji wykonywanych na próbkach na wynik analizy. W przypadku stosunkowo dużych zawartości badanych pierwiastków błędy te są poza zakresem pomiaru przyrządu. Gdy zawartości są niskie niebezpieczeństwo wprowadzania zanieczyszczeń do próbki jest niezwykle duże. Wybór właściwej metody preparatyki próbek, jakość jej zastosowania oraz odpowiednie środowisko laboratoryjne stają się wówczas krytycznymi elementami prawidłowo wykonanej analizy śladowej.

W dalszej części pracy wymieniono kilka pojęć [11], które pomogą zrozumieć ogólne zasady rządzące analizą śladową. Po pierwsze należy zaznaczyć, że analiza chemiczna stanowi zespół ściśle zdefiniowanych i powiązanych kroków. Na przykład wybór metody preparatyki zależy od techniki pomiaru i na odwrót. W przypadku gdy ma się do czynienia z próbką o nieznanym składzie nie wystarczy zastosować jedną, wybraną na podstawie intuicji, nie zwalidowaną metodę (mineralizacji, rozpuszczania, techniki pomiarowej, itp.). Zbiór kryteriów analitycznych musi być wybrany po dogłębnym rozważeniu ostatecznego celu – wiarygodnych wyników pod względem dokładności i precyzji. Problem ten jest bardzo obszerny, z tego względu omówione zostaną najważniejsze punkty dotyczące etapów preparatyki próbek, czyli ich zasady, korzyści i wady. To co pozostaje analitykowi, to dobranie odpowiedniej metodologii preparatyki jako funkcji typu próbki, dostępnego wyposażenia oraz imperatywów analizy.

W celu ujednolicenia metod badawczych oraz zapewnienia powtarzalności i odtwarzalności wyników, część laboratoriów wykonuje analizy zgodnie z międzynarodowymi normami ISO. Normy te obejmują badania wszystkich właściwie materiałów metodami chromatograficznymi oraz spektrometrycznymi (FAAS, GFAAS, ETAAS, ICP-OES, ICP-AES, ICP-MS). W zakres każdej normy wchodzi zasada metody, wymagane odczynniki, roztwory wzorcowe, odniesienia, wymagania sprzętowe, opis metody, zasady pobierania próbek oraz sposób wyrażania wyników. Dzięki temu możliwe są porównania międzylaboratoryjne a także walidacja metod. Aby dana jednostka

badawcza miała prawo wykonywania analiz zgodnie z jakąkolwiek normą, musi uzyskać akredytację PCA (Polskiego Centrum Akredytacji). Proces akredytacji jest czasochłonny i pracochłonny, dlatego nie wszystkie laboratoria się na nią decydują, chociaż jest to zalecane.

2. Charakterystyka próbek, definicje i ograniczenia

Próbki do analiz środowiskowych i medycznych występują jako ciecze lub ciała stałe. Można je podzielić na próbki wodne (różne próbki wody, napoje, mleko, krew, osocze, mocz) lub o innej matrycy płynnej (oleje). W rutynowych analizach metodami spektroskopowymi, dedykowanymi do roztworów wodnych, metody analizy próbek płynnych o innej matrycy muszą być specjalnie zaadaptowane. Próbki stałe mogą być z kolei organiczne (rośliny, tkanki zwierzęce) lub nieorganiczne (gleby, osady). Przed analizą próbki stałe są, ogólnie rzecz biorąc, rozpuszczane według odpowiednio dobranej procedury. Każdy przypadek wymaga indywidualnego podejścia, które jest wybierane w zależności od składu analizowanej próbki. W praktyce rozważany jest sposób reagowania matrycy głównej i pierwiastków śladowych z dodanym rozpuszczalnikiem.

W celu uproszczenia problemów związanych z analizą próbek stałych można od razu założyć, że część organiczna próbki będzie rozłożona i wyeliminowana w poszczególnych etapach preparatyki (metodami spektroskopowymi nie jest możliwe oznaczanie wodoru, tlenu, węgla, azotu itp.). Analizowana pozostałość będzie zawierała jedynie komponenty mineralne, choć ich zawartość może być bardzo różna. Składniki główne, wyrażone jako sucha pozostałość (zazwyczaj stanowiące matrycę), są obecne w stężeniach od kilkudziesięciu do dziesiątych części procenta (w próbkach środowiskowych zazwyczaj Ca, K, Mg, P). Mniej liczne obecne są w stężeniach ok. 0,1% (np. Fe, Al). Natomiast zawartość pierwiastków śladowych i ultra śladowych wyrażana jest w μg/g (ppm) oraz w ng/g (ppb). Te zakresy stężeń są ustalane arbitralnie i mogą stanowić wskazówkę w kwestii problemów pojawiających się w trakcie analizy. Można przyjąć, że błąd rzędu 1% jest nie do zaakceptowania w przypadku oznaczania składników matrycy. Ale wartości otrzymywane podczas analizy z błędem sięgającym 10% są generalnie do przyjęcia w przypadku analizy śladowej lub ultra śladowej, czyli w sytuacji gdy stężenie badanego składnika oscyluje na granicy jego wykrywalności daną metodą.

Ze względu na wysokie zawartości składników głównych matryca próbki jest czynnikiem odpowiedzialnym za interferencje obserwowane podczas pomiarów innych elementów, obecnych w mniejszych stężeniach. Matryca stanowi ponadto najważniejszy czynnik warunkujący rozpuszczenie próbki. W zależności od typu próbki proces rozpuszczania zawiera kilka kroków. Termin „mineralizacja" dotyczy próbek posiadających całkowicie lub częściowo organiczną matrycę (tkanki zwierzęce i roślinne, próbki żywności, gleby). Natomiast termin „rozpuszczanie" używany jest w odniesieniu do próbek pochodzenia nieorganicznego. Przed analizą komponenty organiczne obecne w próbce muszą być rozłożone lub/i wyeliminowane bardzo precyzyjnie, zgodnie z odpowiednią procedurą mineralizacyjną. Przy użyciu różnych reagentów materiał organiczny zostaje rozłożony do dwutlenku węgla, tlenków azotu oraz wody. W ten sposób uwalniane są do roztworu pierwiastki początkowo z nim związane. Po procedurze mineralizacji uzyskana pozostałość powinna być głównie nieorganiczna. Poddawana jest ona następnie końcowemu etapowi rozpuszczania, w taki sam sposób jak próbki posiadające wyłącznie nieorganiczną matrycę (skały, metale). Dla bardziej skomplikowanych materiałów (skład organiczno-nieorganiczny: gleby, muły, rośliny),

używane reagenty chemiczne oraz metody fizyczne pełnią zazwyczaj dwie role (mineralizacja i rozpuszczanie) jednocześnie.

3. Główne źródła błędów

Zapewnienie dokładności wyników nie jest łatwe z powodu dużej liczby kroków analitycznych, rozpoczynających się od próbkowania, poprzez procedury preparatywne, a kończąc na samym oznaczeniu. Zależnie od natury i pochodzenia próbki, a także od innych czynników, błędy mogą się pojawiać w różnych etapach analizy. Skutkują one zarówno stratami analitu (niekompletny odzysk po procesie roztwarzania), jak i jego zanieczyszczeniem (zawyżony odzysk).

Straty analitu mogą być spowodowane takimi zjawiskami, jak: parowanie, absorpcja, adsorpcja, transformacja, strącanie lub współstrącanie (jako rezultat zastosowanej techniki preparatywnej). Istnieją przypadki, w których strata analitu jest pozorna. Występujące podczas pomiaru interferencje powodują podobny efekt jak zaniżenie ilości badanej substancji w roztworze, skutkujące wygaszeniem sygnału analitycznego. Zjawisko jest przypisywane tzw. efektom matrycowym, będącym wynikiem różnic w składzie chemicznym między wzorcami kalibracyjnymi a próbkami. W takim przypadku technika pomiarowa jest odpowiedzialna za generowanie błędów, zatem jest sprawą pierwszorzędnej wagi odróżnienie tego typu błędu od innych, będących skutkiem określonej procedury preparatywnej.

Zanieczyszczenia, będące częstym problemem, spowodowane są dodawaniem (cyklicznie lub przypadkowo) niezaniedbywalnych ilości analitu podczas różnych etapów analizy. Pochodzą one z używanych reagentów lub otaczającej atmosfery. Im oznaczane zawartości analitu są niższe, tym zanieczyszczenia odgrywają większą rolę. Zanieczyszczenia pochodzące od reagentów są zwykle przenoszone z jednej próbki do drugiej i stanowią błędy systematyczne. Inne źródła błędów, z jednej strony łatwiejsze do uniknięcia, z drugiej strony są przypadkowe i zmienne. W związku z tym jest konieczne oszacowanie ogólnego zanieczyszczenia próbki. Jest to realizowane za pomocą kilku reprezentatywnych ślepych prób oraz odpowiedniej interpretacji otrzymanych wyników. Ważna jest również świadomość analityka w kwestii wymienionych źródeł pochodzenia zanieczyszczeń.

3.1. Próbkowanie

Próbkowanie jest pierwszym i jednym z najważniejszych kroków w analizie. Zapewnia reprezentatywność pobranej próbki. Z tego powodu jest również największym potencjalnym źródłem błędów. Próbkowanie nie należy jednakże do protokołu analitycznego, zatem zostaną przedstawione tylko jego najbardziej kluczowe aspekty. Jeśli próbkowanie jest wykonywane bez niezbędnej wiedzy, przy użyciu nieodpowiednich narzędzi, bez zachowania szczególnej ostrożności, wówczas zarówno przypadkowe jak i systematyczne błędy mogą towarzyszyć tej czynności, uzyskując przy tym wartość kilku rzędów wielkości, co w analizie śladowej jest nie do przyjęcia. Więcej informacji o próbkowaniu jest dostępne w literaturze [12,13].

3.2. Zbieranie i przechowywanie

W zależności od analizowanych próbek oraz oznaczanych pierwiastków narzędzia do pobierania próbek, urządzenia filtrujące oraz naczynia do przechowywania próbek muszą być ostrożnie dobierane oraz starannie czyszczone, w celu zminimalizowania ryzyka

możliwego zanieczyszczenia próbek. Wszelkie naczynia używane w tym celu muszą być myte, płukane, a następnie moczone przez 12h w 1-10% (v/v) kwasie azotowym, analitycznej czystości. Przed użyciem, naczynia powinny być przemyte wodą dejonizowaną o wysokiej czystości. Podczas zbierania próbek i ich przechowywania ryzyko zanieczyszczeń jest wysokie i bywa wręcz krytyczne jeśli dotyczy próbek o niskich zawartościach pierwiastków oznaczanych. Tak jest na przykład w przypadku wód naturalnych. Możliwa jest także utrata analitu. W celu zminimalizowania strat analitu w wyniku adsorpcji jonów metali na ściankach naczyń lub na zawieszonych w cieczy cząstkach, zebrane próbki mogą być przechowywane przez krótki czas w chłodniach, a przez dłuższy czas w zamrażalnikach. Z tego samego powodu wodne roztwory próbek są zakwaszane kwasem azotowym natychmiast po pobraniu (zwykle do osiągnięcia pH<1,5). Takie działanie jest zwykle wystarczające do uniknięcia osadzania się pierwiastków śladowych na ścianach naczyń przez względnie długi czas. Należy tutaj nadmienić, że w praktyce niezwykle trudno jest wprowadzić z powrotem do roztworu raz zaadsorbowane na ściankach jony metalu, nawet przy użyciu drastycznych metod, do których należy bardzo silne zakwaszanie oraz następujące po nim energiczne wytrząsanie.

Kolejnym sposobem uniknięcia strat analitu w wyniku adsorpcji jest natychmiastowe zamrożenie próbki oraz jej odmrożenie tuż przed pomiarami. Jest to najlepsza metoda przechowywania wód naturalnych, ponieważ zakwaszanie roztworu może spowodować desorpcję pierwiastków śladowych, zaadsorbowanych na cząstkach stałych tworzących zawiesinę w badanej próbce. Jeśli niezbędne jest zbadanie całkowitej zawartości pierwiastków śladowych w próbce wody, wówczas rozpuszczenie zawiesiny jest pożądane, chociaż bywa problematyczne. Dlatego też zwykle próbkę poddaje się filtracji (zwykle na filtrach membranowych o porowatości 0,45 μm), następnie oznacza się oddzielnie część ciekłą oraz pozostałość stałą na filtrze, po odpowiednim procesie rozpuszczania. Ostatecznie szacuje się udział zawartości badanego pierwiastka w poszczególnych frakcjach oraz oblicza się całkowitą zawartość w próbce początkowej.

3.3. Preparatyka

W większości przypadków, przygotowanie próbki stałej do badań zawiera kilka etapów: suszenie (powietrze, suszarka laboratoryjna), homogenizacja (mieszanie, kruszenie), mielenie (młyny, moździerze) oraz następujące po nich mineralizacja i rozpuszczanie. Otrzymany roztwór jest ostatecznie przenoszony do kolby o ustalonej objętości. Niektóre z tych etapów mogą być źródłem zanieczyszczeń, z uwagi na typ naczyń stosowanych oraz czystość reagentów oraz użytej wody, ale również ma na to wpływ otaczające powietrze. Dodatkowo, mielenie stosowane przed procedurą roztwarzania, może zanieczyszczać próbkę poprzez zużycie ścierne (abrazję) części moździerza lub młyna i kul. Często stosowane moździerze agatowe prezentują twardość analogiczną jak kwarc, zawsze obecny w glebach i osadach. W takich przypadkach powinno się do mielenia używać moździerzy o większej twardości, na przykład z węglika boru lub korundu. Jednakże użycie korundu jako materiału moździerza wiąże się z zanieczyszczeniem próbek przez Al, Mg, Ba, Cu oraz Zn.

Etapy preparatyki próbek wymagają użycia reagentów i naczyń wykonanych z porcelany, szkła, kwarcu, PTFE, platyny lub różnych tworzyw sztucznych. Zanieczyszczenia obecne w reagentach stanowią ważne (i często systematyczne) źródła błędów. Dlatego rynek odczynników chemicznych oferuje, obok reagentów o zwykłej czystości analitycznej, również odczynniki o jeszcze większej czystości (suprapur, ultrapur, specpur). Ich użycie pozwala uniknąć wielu z systematycznych błędów. Istnieje

możliwość oczyszczania reagentów we własnym zakresie już w laboratorium, lecz należy pamiętać, że takie procedury wymagają odpowiedniego sprzętu, wykonanego z kosztownych materiałów (kwarc, PTFE) oraz wymagają wysokich umiejętności od operatora.

Z powyższego wynika ewidentnie, że właściwa preparatyka próbki ma ogromne znaczenie dla poprawności całej analizy. Ryzyko zanieczyszczenia próbki rośnie wraz z temperaturą, ciśnieniem, długim kontaktem próbki z naczyniem, a także odwrotnie proporcjonalnie do malejącego stężenia analitu. Aby zminimalizować ryzyko kontaminacji próbki, należy spełnić kilka zasad:

- ✓ skonsultować stworzone procedury z określonymi w literaturze (o ile istnieją) oraz wziąć pod uwagę realny cel analizy. Większość skomplikowanych procedur nie zawsze jest najlepsza,
- ✓ zapewnić czyste środowisko w laboratorium (wyciągi, piece, piece muflowe, mikrofalówki, itp.),
- ✓ do kruszenia, mielenia oraz homogenizowania używać urządzeń wytworzonych z odpowiednich materiałów (uniknięcie zanieczyszczenia próbek),
- ✓ ograniczyć masę próbek analizowanych oraz objętość używanych naczyń do niezbędnego minimum (minimalizacja kontaktu roztworu próbki z naczyniem),
- ✓ używać reagentów oraz wody wyłącznie wysokiej czystości oraz minimalizować zużywane ilości,
- ✓ czyścić starannie naczynia (moczyć w kwasach, z następującym po nim obfitym płukaniem w wodzie dejonizowanej),
- ✓ nie używać używanych naczyń, aby uniknąć adsorpcji elementów śladowych na ściankach zużytych i startych naczyń,
- ✓ uprościć przemieszczanie próbek, unikać filtrowania oraz przenoszenia roztworów między naczyniami i urządzeniami, jeśli nie jest to absolutnie konieczne,
- ✓ wykonać kilka ślepych prób z tymi samymi reagentami, naczyniami, z zachowanymi warunkami preparatyki, w celu oszacowania możliwych zanieczyszczeń oraz wykonania ewentualnej korekty wyników,
- ✓ sprawdzić odzyski składników przy użyciu materiałów odniesienia lub materiałów o podobnym składzie, dla wszystkich etapów i procedur. Jeśli odzyski będą niekompletne, znaleźć powód odróżniający na etapie preparatyki (czynnik odpowiedzialny - preparatyka) oraz pomiarów (czynnik odpowiedzialny – interferencje).

3.4. Pomiary

Próbki ciekłe oraz rozpuszczone próbki stałe są zwykle poddawane analizie bezpośrednio, bez uprzedniego przygotowania. Jedyny problem stanowi zbieranie i przechowywanie wód do analiz, co zostało omówione wcześniej. W odniesieniu do metod spektroskopowych nie ma konieczności podejmowania szczególnych środków ostrożności. Jeśli tylko zmierzone zawartości pierwiastka analizowanego są zadowalające w kwestii głównych kryteriów użytej metody (czułość, limity detekcji, zakres dynamiczny) oraz możliwe interferencje są znane i pod kontrolą, analizy roztworów mogą być przeprowadzone automatycznie, wszystkimi nowoczesnymi metodami spektroskopowymi. Oczywiście jest bardzo pomocne, jeśli operator zna w przybliżeniu możliwe zawartości analitu oraz główne komponenty matrycy w celu zadecydowania, czy dodatkowe rozcieńczenie jest pożądane czy też nie. Niektóre typy płynów wymagają jednak pewnych szczególnych środków ostrożności przy pomiarach, na przykład w przypadku kontaktu

koagulatów krwi z niektórymi chemikaliami (chlorek lub azotan palladu), często używanymi jako modyfikatory w analizach ETAAS. W nowoczesnych aparatach możliwe jest wprowadzanie próbki i modyfikatorów oddzielnie, skutkujące uniknięciem ich wzajemnego kontaktu.

Aparaty pomiarowe mogą również stanowić źródło zanieczyszczeń. Najbardziej znany przykład jest związany z analizami śladowymi metodą ETAAS, po długim czasie użytkowania z użyciem modyfikatorów. Ni, często używany jako wydajny modyfikator w analizach As i Se, z czasem zanieczyszcza cały atomizer. Jeśli aparat jest następnie używany do oznaczeń śladowych niklu, zanieczyszczenia całego systemu są bardzo znaczące. Podobnie materiał i kondycja rur zapewniających transport roztworu do systemu nebulizacji oraz aerozolu do palnika w ICP-AES, a w szczególności w analizach ICP-MS mogą być źródłem zjawisk adsorpcji/desorpcji, prowadzących do błędnych wyników.

Błędy spowodowane interferencjami są związane z samą techniką pomiarową. Zasadniczo są zdefiniowane jako błędy spowodowane wyłącznie składem chemicznym próbki badanej. Ten rodzaj efektów dotyczy nieco innego tematu niż etapy preparatyki, dlatego nie będzie tu omawiany. Dokumentacja dotycząca początków badań nad interferencjami i metodami ich niwelowania jest dostępna w literaturze [14,15,16]. Mimo to zostaną przedstawione pewne przykłady problemów wynikających z użycia szczególnych reagentów podczas etapów preparatyki, ponieważ raz użyte będą nieodłączną częścią analizowanej próbki, mającą wpływ na wynik analizy.

Typ kwasu użyty w procedurach preparatywnych może mieć istotne konsekwencje podczas pomiarów. Jest powszechnie wiadome, że we wszystkich technikach spektroskopii atomowej kwas azotowy jest najlepszym reagentem, stosowanym w mineralizacji próbek. Mimo czasem obserwowanego stłumienia sygnału analitycznego w jego obecności (np. w ICP-AES), nie ma poważniejszych problemów analitycznych przy stosowaniu kwasu azotowego w stężeniach do 10%, (czasem nawet wyższych) we wszystkich technikach spektroskopowych, przynajmniej tak długo jak jego stężenie jest adekwatne do obecnego we wzorcach i próbce. Podobnie nadtlenek wodoru, dodawany do większości procedur mineralizacyjnych, jest rzadko odpowiedzialny za problemy natury analitycznej.

Obecność kwasu chlorowodorowego nie jest kłopotliwa w przypadku analiz metodą ICP-AES; jednak z drugiej strony jego stosowanie bez dodatków jest zabronione w analizach ETAAS, z uwagi na możliwość tworzenia się chlorków analitu i generowania interferencji fazy gazowej i/lub spektralnych [14]. Podczas atomizacji część analitu znajduje się w stanie lotnym w postaci niezdysocjowanych chlorków, skutkujących generowaniem niekorzystnej absorpcji molekularnej, kompensowanej przez urządzenie korygujące tło (korekcja deuterowa, Zeemana). Z tego powodu sygnał absorpcji atomowej analitu jest zredukowany. Jeśli użycie kwasu chlorowodorowego jest nie do uniknięcia, dodatek kwasu azotowego pozwala ograniczyć opisany problem. W praktyce stosuje się mieszaninę obu tych kwasów w stosunku 3:1, odpowiadającemu wodzie królewskiej.

W niektórych analizach metodą ICP-MS kwas chlorowodorowy (solny) jest również niepożądany. Głównie w analizach arsenu [17], ponieważ tworzy połączenia z argonem, obecnym w komorze jonizacyjnej, o identycznej masie atomowej jak jony arsenu. Obie drobiny wykrywane są jednocześnie, prowadząc do otrzymywania zawyżonych zawartości arsenu.

Ze względu na dużą lepkość, użycie kwasu siarkowego jest zwykle unikane, mimo jego dużej skuteczności w mineralizacji próbek organicznych. Użycie tego kwasu jest niepożądane zwłaszcza w technikach analitycznych, gdzie wprowadzenie próbki do aparatu jest zapewniane dzięki nebulizacji (FAAS, ICP-MS, ICP-AES). Powstające

interferencje fizyczne są związane ze zmianami w tworzeniu lub/i transporcie aerozolu, jeśli istnieją fizyczne różnice między próbką a wzorcem (wzorce są zazwyczaj rozpuszczone w kwasie azotowym, względnie solnym). Poza tym, zwłaszcza w przypadku kwasu siarkowego, jego stężenie musi być identyczne we wszystkich analizowanych próbkach, co w praktyce jest nie do zrealizowania. Część wprowadzonego do próbki kwasu naprawdę uczestnicząca w procesie mineralizacji jest nie do określenia, podobnie jak nadmiarowa reszta, która pozostała w roztworze.

W procesach suchej mineralizacji dodaje się czasami niektóre rodzaje popiołów, w celu zredukowania lotności analitu (As, Sc, Te), oraz zintensyfikowania rozkładu matrycy organicznej. Rozkład matryc organicznych jest realizowany najczęściej przez duży dodatek azotanu magnezu lub/i tlenku magnezu przed spopielaniem w wysokich temperaturach [18]. Wysoka zawartość magnezu w finalnych roztworach nie jest kłopotliwa przy oznaczaniu pozostałych pierwiastków. Wyjątek stanowią oznaczenia metodą ETAAS pierwiastków o długościach fal w pobliżu głównej linii absorpcji magnezu, z powodu występowania wysokiej absorpcji tła.

4. Rozpuszczanie próbek stałych

Pobrane do badań próbki stałe są zwykle zbyt heterogeniczne aby można je było analizować bezpośrednio. Ten problem implikuje wstępne działania, podejmowane w celu wytworzenia próbek reprezentatywnych, o parametrach odpowiednich do analiz. W tym celu próbkę suszy się w atmosferze otaczającej lub w suszarce laboratoryjnej (zwykle w 75°C dla rtęci, 105°C dla innych pierwiastków). Dla niektórych typów próbek coraz częściej stosuje się liofilizację (suszenie lub wymrażanie). Pozwalają one na zabezpieczenie oryginalnej tekstury próbki lub/i ułatwiają późniejsze jej kruszenie.

W przypadku suchych próbek stałych o większej twardości (gleby, osady), może być zastosowane kilka typów mielenia (na mokro i na sucho): ręcznie (moździerze) lub mechanicznie (kule, młot, młyn walcowy i tarczowy, itp.). Urządzenia do rozdrabniania wykonane są z materiałów o różnej twardości, którą należy dopasować do twardości rozdrabnianej próbki (stal, agat, węglik boru, węglik wolframu, korund, itp.). Homogenizacja innych typów próbek stałych (tkanki roślinne i zwierzęce, żywnościowe) jest realizowana za pomocą różnych rodzajów mikserów. W celu ułatwienia procesu homogenizacji świeżych próbek organicznych mogą one być mielone po zanurzeniu w ciekłym azocie.

W następnych rozdziałach będą omawiane głównie przypadki oznaczania całkowitej zawartości analitu w próbce. To implikuje potrzebę ilościowego roztwarzania próbek. W niektórych przypadkach (gleby, osady, rośliny) spełnienie tego warunku jest zbyt pracochłonne lub zabiera zbyt wiele czasu, aby znalazło zastosowanie w rutynowych analizach metodami spektroskopowymi. Na przykład w analizach środowiskowych są często zastępowane prostszymi i łatwiejszymi do zastosowania procedurami. Jednak zastępcze metody rzadko prowadzą do otrzymywania dokładnych zawartości badanych pierwiastków.

5. Mineralizacja - rozłożenie materii organicznej

Próbki organiczne lub mieszane są poddawane dwóm odrębnym etapom, które często występują jednocześnie: mineralizacja i rozpuszczanie. Próbki nieorganiczne po prostu są rozpuszczane. Skład chemiczny próbek środowiskowych waha się od całkowicie

nieorganicznych (lotne popioły) do czysto organicznych (tłuszcze), lecz generalnie są pośrednią kombinacją tych dwóch skrajności. Oznacza to, że całkowite rozpuszczenie próbek analizowanych nie może być osiągnięte w jednym etapie, przy użyciu pojedynczego reagenta. W praktyce liczba etapów i odczynników jest podyktowana składem matrycy próbki. Próbki organiczne i mieszane są przenoszone do roztworu dzięki kilku typom procesów utleniania części organicznej, a nieorganiczna reszta w postaci stałej jest roztwarzana za pomocą kwasu. W procesach suchego spopielania organiczna matryca ulega rozkładowi poprzez kalcynację w wysokiej temperaturze, a otrzymany popiół jest następnie rozpuszczany w stężonych kwasach. W większości nowoczesnych procedur na mokro mineralizacja oraz rozpuszczenie próbek jest zapewniona dzięki stosowaniu kombinacji mocnych kwasów w różnych proporcjach, często z dodatkiem nadtlenku wodoru.

5.1. Suche spopielanie

Mineralizacja materiału organicznego jest wykonywana poprzez spopielanie w wysokiej temperaturze, przy ciśnieniu atmosferycznym, w temperaturowo programowanych piecach [19]. Zazwyczaj stosowana temperatura w tym etapie to 450°C. Jako dodatek do tradycyjnych pieców muflowych, przystosowanych do suchego spopielania, oferowane są również piece mikrofalowe, specjalnie zaadaptowane do uzyskiwania wysokich temperatur.

Funkcjonuje również niskotemperaturowa procedura spopielania (LTA – Low Temperature Ashing) w plazmie tlenowej, podtrzymywanej napięciem o częstotliwości radiowej. Wadą tej metody jest wysoki koszt niezbędnych instrumentów i mała dostępność na rynku. Dodatkowo, niskotemperaturowe spopielanie jest metodą bardzo czasochłonną.
W procesach mineralizacji wysokotemperaturowej świeża lub suszona (zwykle 103-105°C) próbka jest ważona i umieszczona w odpowiednim (najczęściej platynowym) tyglu, a następnie wkładana do pieca. Program pieca sukcesywnie podnosi temperaturę aż do 450°C i utrzymuje ją przez kilka godzin. Otrzymany popiół jest roztwarzany w odpowiednim kwasie. Następnie roztwór jest przenoszony do kolby miarowej, dopełniany do kreski i analizowany. W zależności od początkowego stanu próbki wyniki są podawane względem wagi suchej lub świeżej próbki.

Zastosowanie procedury suchego spopielania jest stosunkowo proste i umożliwia mineralizowanie wielu próbek jednocześnie. Oprócz wymienionej, procedura ta ma jeszcze kilka ważnych zalet:

- ✓ możliwość spopielania dużych ilości próbki oraz rozpuszczania uzyskanego popiołu w małych objętościach kwasu (zazwyczaj azotowego lub chlorowodorowego). Oznacza to przeprowadzenie wstępnego zatężania analizowanego pierwiastka już na etapie mineralizacji, skracając analizę o jeden etap,
- ✓ otrzymany popiół jest pozbawiony dodatków organicznych, co skłania do wyboru ICP-AES, ICP-MS, FAAS, jako techniki analitycznej,
- ✓ matryca próbki spopielonej jest bardzo uproszczona jeśli chodzi o skład chemiczny, co przekłada się na korzystne właściwości roztworu po rozpuszczeniu. Zwykle jest on przejrzysty, bezbarwny, bez zapachu, co bardzo rzadko zdarza się w przypadku roztwarzania na mokro,
- ✓ metoda pozwala na zredukowanie ilości zużywanych reagentów oraz ogranicza ilość potrzebnych naczyń do przechowywania próbki.

Suche spopielanie może być stosowane do mineralizacji materiałów organicznych, tkanek zwierzęcych, roślin oraz próbek żywności i innych. Właściwie zastosowane

zapewnia całkowitą destrukcję związków organicznych, rozkładanych do postaci węglanów lub tlenków. Wybór właściwej temperatury spopielania jest niezbędny dla zapewnienia ilościowego rozłożenia części organicznej bez strat analitu, spowodowanej przez odparowanie lub przez adsorpcję na nierozpuszczalnych cząstkach, powstających w wyniku reakcji użytych reagentów z matrycą próbki. Rezultatem takich reakcji mogą być różnego typu tlenki. Źródłem powstawania cząstek stałych może być niekiedy materiał tygla. Najlepszym materiałem na tygiel do suchego spopielania jest platyna, odporna na wszystkie kwasy z wyjątkiem wody królewskiej, jednak z drugiej strony koszt tygla platynowego podnosi koszty analizy. Temperatury stosowane w procesie spopielania wahają się zwykle od 450°C do 500°C i są na tyle wysokie by zapewnić całkowite utlenienie materiału organicznego, jednocześnie pozwalając na uniknięcie odparowania większości pierwiastków (z wyjątkiem Hg, Se, As). Ponadto zmniejszenie strat analitu jest realizowane również poprzez powolne podwyższanie temperatury podczas procesu (czas całkowity trwania spopielania to około 4h). Długi czas ogrzewania i chłodzenia zapobiega lokalnym samozapłonom próbki i w konsekwencji stratom analitu.

Jeśli spopielanie jest prowadzone w warunkach optymalnych, otrzymany popiół jest koloru białego lub jasnoszarego. Jeśli utlenienie części organicznej nie jest kompletne, obecne są w popiele ciemniejsze drobiny ciemnoszare lub czarne, stanowiące niecałkowicie utleniony węgiel. Utrudnia on w wysokim stopniu dalsze rozpuszczanie próbki w kwasach, dlatego próbka musi zostać ponownie zwilżona 1ml kwasu azotowego i ponownie kalcynowana przez 1h, zazwyczaj w temperaturze spopielania. Po takim zabiegu popiół jest zwykle czysty i łatwo rozpuszczalny.

Poniżej podano skuteczne i sprawdzone procedury roztwarzania próbek organicznych, z wyłączeniem tych które zawierają krzemiany [20].

Procedura I:

- ✓ zważenie w tyglu platynowym 1-5g wysuszonej próbki (105°C) lub do 20g próbki świeżej,
- ✓ włożenie tygla z próbką do zimnego pieca muflowego i powolne podgrzewanie do temperatury 450°C przez 4h (6h w przypadku próbek świeżych),
- ✓ utrzymywanie temperatury przez 16h,
- ✓ po ochłodzeniu, dodanie 2 ml stężonego kwasu azotowego, ogrzanie próbki do temperatury wrzenia na płycie grzejnej,
- ✓ po schłodzeniu, przeniesienie ilościowe do kolby miarowej o pojemności 50 ml lub 100 ml i dopełnienie wodą dejonizowaną do kreski.

Próbki roślinne zawierające krzemiany można roztwarzać metodą zaproponowaną przez Comite Inter-Instituts d'Etude des Techniques Analytiques (CII) [21]. Może ona być stosowana do rozpuszczania gleb i osadów.

Procedura II:

- ✓ zważenie w tyglu platynowym 1-3g wysuszonej próbki (105°C),
- ✓ włożenie tygla z próbką do zimnego pieca muflowego i powolne podgrzewanie do temperatury 450°C przez 4h,
- ✓ utrzymywanie temperatury przez 16h,
- ✓ po ochłodzeniu, zwilżenie pozostałości 2 ml dejonizowanej wody, dodanie 3 ml stężonego kwasu azotowego oraz 2 ml stężonego kwasu fluorowodorowego,
- ✓ powolne odparowanie do sucha w łaźni piaskowej lub na płycie grzejnej,
- ✓ powtarzanie powyższego etapu dwukrotnie z dodatkiem 2 ml HNO_3 i 1 ml HF,
- ✓ rozpuszczenie pozostałości w 2 ml HNO_3, po 15 minutach dodanie 20 ml demineralizowanej wody i ogrzewanie do łagodnego wrzenia,

- ✓ po ochłodzeniu, przeniesienie ilościowe roztworu do kolby miarowej o pojemności 50 lub 100 ml i dopełnienie wodą do kreski.

Oprócz wielu korzyści suche spopielanie ma też pewne ograniczenia. Mimo, że zostało wielokrotnie dowiedzione, iż spełnia wymagania większości analiz w kwestii preparatyki próbek [22], to jednak wysoka temperatura powoduje bardziej lub mniej wyraźne odparowanie części analitu. W przypadku analiz środowiskowych to niebezpieczeństwo dotyczy rtęci, arsenu i selenu. Inne lotne pierwiastki takie jak kadm, ołów czy tal tolerują, bez strat na parowanie, zazwyczaj stosowane temperatury spopielania.

Analizy rtęci, szczególnie lotnego pierwiastka, wymagają obowiązkowo roztwarzania na mokro. Z drugiej strony As i Se, w szczególnych warunkach oferują korzyści płynące z suchego spopielania. Dodatek związków wspomagających spopielanie - głównie MgO i/lub $Mg(NO_3)_2$ pozwalają na tworzenie mniej lotnych połączeń z selenem i arsenem. Wydajność związków wspomagających spopielanie bardzo zależy od początkowej formy analitu. Na przykład po spopieleniu próbek roślin lądowych odzyski As i Se są bardzo spójne i rozsądne, natomiast zupełnie inaczej zachowują się próbki roślin pochodzenia wodnego. Z drugiej strony używanie związków wspomagających spopielanie powinno być stosowane z zachowaniem szczególnej ostrożności, ponieważ nieliczne korzystne przypadki ich użycia nie mogą być generalizowane - przy rutynowym stosowaniu, odpowiednie procedury wymagają czasochłonnej walidacji dla każdej analizowanej próbki. W dodatku ich użycie zwiększa wielokrotnie całkowitą zawartość rozpuszczonych substancji stałych w roztworze, utrudniając tym samym analizę pierwiastków śladowych. Z powyższych powodów roztwarzanie próbek zawierających As i Se powinno być przeprowadzane głównie za pomocą roztwarzania na mokro.

Procedura suchego spopielania nie zapewnia rozpuszczenia krzemianów, w konsekwencji wszystkich składników z nimi związanych chemicznie. Taki problem pojawia się zwykle w przypadku próbek roślinnych, ponieważ elementy pochodzenia roślinnego zawierają różną zawartość krzemianów. Po przeprowadzeniu mineralizacji bez wyeliminowania krzemianów, równoznacznej z niekompletnym rozpuszczeniem, odzyski analitu są bardzo nieduże, zwłaszcza pierwiastków śladowych. Najlepszym przykładem, obrazującym efekty tego zjawiska, jest oznaczanie glinu, częściowo wiązanego z krzemianami i względnie często występującego w roślinach [23]. Jeśli odzysk glinu z takich próbek jest niewielki w porównaniu z materiałami odniesienia, należy zastosować opisaną wyżej procedurę II. Krzemiany są rozpuszczane za pomocą stężonego HF, ponieważ tworzą z nim lotne fluorki SiF^{6-}, mogące być w tej postaci przeprowadzone do roztworu. Problem trudno rozpuszczalnych krzemianów dotyczy nie tylko suchego spopielania - w procedurach roztwarzania na mokro krzemiany również roztwarza się za pomocą kwasu fluorowodorowego. Konieczne jest w takich przypadkach stosowanie naczyń z PTFE.

5.2. Utleniające roztwarzanie kwasami (roztwarzanie na mokro)

W porównaniu z suchym spopielaniem procedury mineralizacji wykorzystujące stężone kwasy prezentują dużą różnorodność, dotyczącą wyboru reagentów i ich mieszanin, jak również urządzeń stosowanych do przeprowadzania mineralizacji [19]. W literaturze można znaleźć wiele procedur [23], ilustrujących brak uzgodnień choćby w obrębie jednej rodziny próbek. Dlatego nie można podać żadnej precyzyjnej procedury, którą można zastosować do wielu próbek. Chociaż ogólne, podstawowe zasady istnieją, to mogą być zastosowane dopiero po rozważaniach dotyczących natury próbki i jej składu, tak samo jak składu reagującej mieszaniny kwasów czy celu analizy. Nie zawsze jest to łatwe zadanie,

dlatego do rutynowych analiz preferowane są dobrze zdefiniowane i proste metody suchego spopielania, jeśli jest to możliwe.

Aktualnie celem monitoringu środowiskowego jest oznaczanie całkowitej zawartości badanego składnika w próbkach. Chociaż w niektórych przypadkach celem oznaczenia może być tylko określona postać analitu w próbce lub jego rozkład w różnych frakcjach próbki (analizy mineralogiczne, chemiczne, granulometryczne). Wówczas tylko metody roztwarzania na mokro są w stanie sprostać temu zadaniu, ponieważ mogą prowadzić do całkowitego rozpuszczenia równie dobrze jak do selektywnego przeniesienia analitu do roztworu. Prawidłowy wynik analizy będzie zależał między innymi od doboru reagentów, prawidłowej ich kombinacji oraz stężeń. Możliwości selektywnego oznaczania analitu w różnych frakcjach dotyczą głównie gleb i osadów. W praktyce, wymienione poniżej procedury roztwarzania na mokro mogą być wybrane i zaadaptowane, jeśli spełniają wymienione, dobrze zdefiniowane kryteria:

- ✓ *procedury całkowitego rozkładu* są zazwyczaj stosowane w obecności HF, w połączeniu z innymi stężonymi kwasami. Zazwyczaj taka kombinacja pozwala na rozpuszczenie wszystkich elementów obecnych w próbce (z wyjątkiem krzemu, który jest odparowywany przez ogrzewanie do sucha, niektóre inne pierwiastki również mogą być częściowo odparowane, np. bor). Do zwalidowania procedury niezbędne jest przeprowadzenie analizy z użyciem materiałów odniesienia o rekomendowanych zawartościach składników;
- ✓ *silne działanie kwasami* jest przeprowadzane z użyciem mieszaniny mocnych kwasów, z wyjątkiem HF. Są one lepiej adaptowalne do rutynowych analiz niż w pierwszym przypadku, lecz niewystarczające w niektórych przypadkach (gleby, osady) z uwagi na obecność krzemianów. Różnice między całkowitym rozkładem a silnym działaniem kwasami nie mają większego znaczenia dla celów geochemicznych, silne działanie jest skuteczne dla części przypadków, np. do oszacowań poziomu skażenia środowiska. Rozpuszczanie gleb, osadów i mułów jest przeprowadzane przy użyciu wody królewskiej (1 ml stężonego HNO_3 + 3 ml HCl na 1g suchej próbki). Z drugiej strony, w porównaniu z całkowitym roztwarzaniem, walidacja tej procedury jest bardziej dyskusyjna, biorąc pod uwagę odzyski niektórych pierwiastków, które zależą między innymi od składu matrycy próbki. Z tego co wiadomo na temat częściowych procedur, istnieje tylko kilka certyfikowanych materiałów odniesienia dla wielu pierwiastków i różnych typów działania kwasami;
- ✓ *łagodne działanie kwasami* powinno być w zasadzie używane do symulacji transferu pierwiastków w środowisku (np. asymilacja pierwiastków śladowych z gleby przez rośliny). Obecnie nie ma międzynarodowych norm dla tego rodzaju procedur, ponieważ każdy kraj preferuje własne rozwiązania i technologie;
- ✓ *szczególne przypadki* są reprezentowane przez selektywne roztwarzanie w celu określenia możliwych asocjatów analitu z głównymi składnikami próbki (np. z częścią organiczną, tlenkami żelaza, węglikami). W tym przypadku również nie istnieją uregulowania międzynarodowe.

Podczas rozpuszczania próbki do oznaczeń całkowitej zawartości pierwiastków większość procedur roztwarzania na mokro wymaga użycia jednego lub kilku spośród sześciu reagentów. Wśród nich cztery przyczyniają się do rozłożenia materii organicznej (kwas azotowy, siarkowy, nadchlorowy oraz nadtlenek wodoru). Kwas chlorowodorowy oraz fluorowodorowy raczej zapewniają rozpuszczenie składników nieorganicznych. Przed dyskusją o ich użytecznych połączeniach pomocne będzie omówienie ich działania pojedynczo:

- ✓ *kwas azotowy* jest najczęściej używanym wstępnym utleniaczem do rozkładu materii organicznej. Reaguje łatwo zarówno z węglowodorami aromatycznymi jak i alifatycznymi, ułatwiając ich utlenianie, estryfikację oraz nitrowanie, prowadząc do produktów reakcji w postaci prostych kwasów karboksylowych. Jest to czynnik o dużym znaczeniu w rozkładzie materiałów środowiskowych [18]. Stężony kwas azotowy wrze w temperaturze około 120°C, co ułatwia jego usuwanie z roztworu po zakończeniu utleniania, jednocześnie ograniczając skuteczność jego działania. Jest on używany często łącznie z kwasem siarkowym (który częściowo rozkłada bardziej odporne materiały dzięki podnoszeniu punktu wrzenia całego roztworu), z kwasem nadchlorowym (który kontynuuje utlenianie po odparowaniu kwasu azotowego) lub z nadtlenkiem wodoru, z uwagi na jego świetne właściwości utleniające;
- ✓ *kwas siarkowy* jest głównym składnikiem bardzo skutecznych i często stosowanych mieszanin w procedurach roztwarzania na mokro: HNO_3+H_2SO_4+H_2O_2. Oddziaływanie kwasu siarkowego ze składnikami organicznymi jest bardzo skomplikowane, w korzystnych warunkach może on powodować utlenianie, sulfonowanie, estryfikację, hydrolizę estrów, dehydratację lub polimeryzację [18]. Z punktu widzenia roztwarzania najważniejsze są reakcje utleniania i dehydratacji. Niezależnie od działania własnego, obecność kwasu siarkowego w mieszaninach zawierających inne czynniki utleniające, znacznie podnosi punkt wrzenia mieszaniny (temperatura wrzenia H_2SO_4 = 330°C), co wzmaga działanie pozostałych utleniaczy. Główne wady związane z używaniem kwasu siarkowego to jego skłonność do tworzenia nierozpuszczalnych osadów oraz paradoksalnie, jego wysoki punkt wrzenia. Nierozpuszczalność siarczanów metali ziem rzadkich może powodować trudności w analizie substancji relatywnie w nie bogatych, jak mleko czy kości. Niektóre pierwiastki śladowe również tworzą nierozpuszczalne siarczany, najlepiej poznanym przykładem jest ołów. Wysoka temperatura wrzenia powoduje trudności z usunięciem kwasu po zakończeniu utleniania. Kolejną wadą kwasu siarkowego, jak już wcześniej wspomniano, jest jego duża gęstość, która może być przyczyną różnego rodzaju interferencji w technikach analitycznych, gdzie transport próbki odbywa się za pomocą nebulizacji. Ponadto, obecność siarczanów w próbkach generuje chemiczne interferencje, które normalnie są rzadkością. Z powodu wszystkich opisanych niedogodności związanych z użyciem kwasu siarkowego, celowe jest unikanie dodawania H_2SO_4 do mieszanin roztwarzających;
- ✓ *kwas nadchlorowy* stosowany z wiedzą i niezwykle ostrożnie, jest niesłychanie skuteczny w rozkładaniu materiałów organicznych i z technicznego punktu widzenia, mieszanina kwasu azotowego i nadchlorowego posiada prawdopodobnie mniej wad niż wszystkie pozostałe mieszaniny. Ponieważ jednak kwas nadchlorowy wykazuje skłonność do spontanicznej eksplozji, jest zalecane unikanie jego używania. W wyjątkowych sytuacjach wymagających użycia kwasu nadchlorowego, próbki organiczne są poddawane wstępnie utlenianiu za pomocą czystego kwasu azotowego. Wstępne utlenianie pozwala wyeliminować źródła zagrożenia wybuchem kwasu nadchlorowego. Nadmiar HNO_3 pełni zatem rolę ochronną w procedurach roztwarzania z użyciem kwasu nadchlorowego. Ogólne instrukcje dotyczące stosowania kwasu nadchlorowego w mieszaninach roztwarzających można znaleźć w literaturze [24];
- ✓ *nadtlenek wodoru.* Mieszaniny kwasów z dodatkiem nadtlenku wodoru są szczególnie skuteczne w procesach utleniania materii organicznej. Wzmocniona siła utleniająca nadtlenku wodoru w obecności H_2SO_4 polega na tworzeniu „in situ" kwasu nadtlenojednosiarkowego H_2SO_5, który wprowadza grupy bogate w tlen do wielu rodzajów molekuł organicznych [18]. W połączeniu z działaniem dehydratacyjnym

kwasu siarkowego ten typ reakcji powoduje gwałtowny rozkład substancji organicznych na mniejsze molekuły, które łatwo opuszczają środowisko reakcji.

Tak samo jak w przypadku suchego spopielania również procedury roztwarzania na mokro mają wady. Są one przypisywane adsorpcji, parowaniu lub zjawiskom współstrącania. Jednakże zjawiska te mają mniejsze znaczenie niż w procedurach suchego spopielania. Po pierwsze, temperatury stosowane w procesach roztwarzania na mokro są znacznie niższe niż te w suchym spopielaniu. Po drugie, straty analitu na ściankach naczyń są mniej częste. Reakcje elementów śladowych z pozostałymi składnikami próbki są ograniczone. Niemniej trzy zjawiska powinny być odnotowane:

- ✓ współstrącanie analitu z osadem tworzącym się z głównych składników matrycy reagującej mieszaniny. Najlepiej znanym przykładem jest współstrącanie ołowiu z siarczanem wapnia w przypadku dużej zawartości wapnia i obecności kwasu siarkowego w mieszaninie mineralizacyjnej. Osad ten stanowi zagrożenie dla rzetelności analizy i powinno się unikać tego rodzaju sytuacji, nawet za cenę zmiany całej procedury na inną,
- ✓ obecność chloru w próbce lub mieszaninie roztwarzającej. Roztwarzanie próbki w obecności kwasu azotowego zapewnia zwykle ulatnianie jonów chlorkowych w postaci chlorku nitrozylu. Zjawisko to ma miejsce w temperaturze niższej niż ulatnianie pozostałych składników. Jeśli kwas azotowy nie jest obecny w mieszaninie reakcyjnej, obserwowane są straty niektórych lotnych pierwiastków takich jak german czy arsen,
- ✓ Niecałkowite rozpuszczenie. Jest ono spowodowane nieadekwatnym wyborem rodzaju lub ilości reagentów, nieprawidłowym programem ogrzewania mieszaniny (temperatura, czas) lub ograniczonymi możliwościami użytego oprzyrządowania. Innymi słowy mieszanina reakcyjna jest, z chemicznego punktu widzenia, niezdolna do rozłożenia próbki, żadne urządzenie (nawet skomplikowane) nie jest w stanie rozpuścić próbki w satysfakcjonującym stopniu. Takie problemy mogą się pojawić nawet w nowoczesnych systemach grzewczych, na przykład mikrofalowych.

Wybór procedury i sprzętu musi być zorientowany na typ i naturę matrycy próbki. Całościowy przegląd dotyczący mokrego roztwarzania oraz jego zastosowań z użyciem urządzeń mikrofalowych był opublikowany przez Lambe i Halla [23]. Może on być również pomocny przy wyborze konwencjonalnych procedur mokrego roztwarzania, ponieważ procesy chemiczne zachodzące w próbkach są w obu przypadkach jednakowe.

Mineralizacja i rozpuszczanie próbek czysto organicznych zwykle nie są problematyczne. Większość procedur roztwarzania na mokro z użyciem pojedynczego kwasu (zwykle azotowego) lub mieszaniny kwasów z dodatkiem utleniaczy (najczęściej kwas azotowy z nadtlenkiem wodoru) jest skuteczna. W celu wzmocnienia działania wymienionych reagentów w przypadku bardziej odpornych próbek, nieliczne procedury uwzględniają dodanie kwasu siarkowego lub nadchlorowego. Mineralizacja przebiega zarówno w otwartych jak i zamkniętych systemach.

Klasyczne systemy otwarte (roztwarzanie przy ciśnieniu atmosferycznym) realizowane są w naczyniach szklanych lub z PTFE, z chłodnicą zwrotną lub bez, grzane w konwencjonalny sposób (palnik Bunsena, płyta grzejna, łaźnia piaskowa) [25]. Wstępnie wysuszona lub świeża próbka, po zważeniu w naczyniu mineralizacyjnym, poddawana jest działaniu mieszaniny kwasów i ogrzewana do wrzenia tak długo aż proces mineralizacji i rozpuszczanie się zakończy. Następnie roztwór jest przenoszony ilościowo do kolby miarowej i dopełniany. Jeśli po procesie zostanie nierozpuszczalna pozostałość, to należy ją przefiltrować, a następnie rozpuścić stosując inną procedurę i poddać analizie.

W ciągu ostatnich lat otwarte systemy zaczęły się rozwijać w kierunku zwiększenia wydajności roztwarzania. Zwykłe stanowiska mineralizacyjne, składające się z pojedynczego naczynia, zostały zastąpione przez systemy zawierające kilka naczyń, wyposażonych w chłodnice zwrotne. Stosuje się je w celu ograniczenia strat analitu przez odparowanie, lecz również po to by ograniczyć parowanie mieszaniny reakcyjnej. Takie połączenie wielu naczyń zapewnia mineralizację dużych serii próbek. Równolegle systemy otwarte, ogrzewane mikrofalowo są dostępne na rynku w wersji manualnej i zautomatyzowanej.

Systemy zamknięte [26] (roztwarzanie ciśnieniowe) są reprezentowane głównie przez różne modele bomb ciśnieniowych z PTFE, z obudową ze stali nierdzewnej, bądź bez niej. Obudowa jest montowana w celu podniesienia odporności urządzenia na wysokie ciśnienia. Czasem bomby wykonane są z wysokociśnieniowych naczyń kwarcowych. W niektórych przypadkach, tylko takie systemy są w stanie zapewnić całkowity rozkład materii organicznej w próbce (np. tłuszcze). Roztwarzanie takim sposobem oferuje korzyści płynące zarówno z podwyższonej temperatury jak i ciśnienia. Jest ono znacznie bardziej wydajne niż konwencjonalne roztwarzanie na mokro. Nie występują straty analitu spowodowane odparowaniem oraz możliwe jest rozkładanie trudniejszych próbek. Czynnikiem ograniczającym stosowanie bomb ciśnieniowych jest niewielka ilość próbki organicznej, która może być rozłożona tym sposobem (0,1-0,2 g). Jedynym odczynnikiem używanym do roztwarzania jest kwas azotowy, bardzo rzadko stosuje się niewielki dodatek kwasu siarkowego. Stosowanie kwasu nadchlorowego oraz w mniejszym stopniu nadtlenku wodoru jest odradzane z powodu dużego ryzyka eksplozji w styczności z materią organiczną.

Bomby ciśnieniowe mogą być ogrzewane w piecach laboratoryjnych do temperatur 120-200°C lub wyższej, w dedykowanych piecach mikrofalowych. Korzyści ze stosowania bomb ciśnieniowych niesie ze sobą ta pierwsza alternatywa, nie tylko ze względu na znacznie niższy koszt zwykłego pieca, ale z uwagi na możliwość używania naczyń z PTFE umieszczonych w płaszczu stalowym. Układ taki jest bardziej wytrzymały na wysokie ciśnienia (do 150 barów, w niektórych przypadkach nawet do 350 barów). W przypadku bomb stosowanych razem z piecami mikrofalowymi, płaszcz może być stosowany wyłącznie z tworzyw sztucznych, co powoduje, że osiągane w nich ciśnienia są niższe.

Dla próbek o mieszanym składzie (organiczno-nieorganicznym) procedury i reagenty stosowane do mineralizacji są bardzo podobne jak w przypadku próbek organicznych. Tylko nieorganiczna część narzuca konieczność bardziej szczegółowego roztwarzania, zazwyczaj osiąganego przy pomocy mieszaniny kilku kwasów. Na przykład kwas azotowy używany pojedynczo lub z dodatkiem nadtlenku wodoru do mineralizacji próbek czysto organicznych, może być zastąpiony wodą królewską, zapewniającą łatwiejsze rozpuszczanie części mineralnej w próbce o mieszanym składzie. Niestety trzeba tu powtórzyć już dyskutowany problem krzemianów. Woda królewska nie zapewnia ich rozpuszczenia i konieczne są dodatkowe etapy roztwarzania, zazwyczaj kwasem fluorowodorowym. Z praktycznego punktu widzenia ten problem jest znacznie bardziej skomplikowany w procedurach na mokro niż w suchym spopielaniu. Kilka czynników dotyczących stosowania HF przyczynia się do utrudnień w metodach roztwarzania na mokro:

- w procedurach klasycznych, naczynia reakcyjne są zwykle szklane, a materiał ten jest rozpuszczany przez HF. Zatem procedury rozpuszczania muszą być przeprowadzone w naczyniach z PTFE, nie zawsze dostępnych w żądanym rozmiarze. Suche spopielanie jest realizowane w tyglach platynowych, odpornych na ten odczynnik,

- mineralizacja próbki kwasem fluorowodorowym jest połączona z odparowaniem do sucha, stosowanym w celu rozłożenia krzemianów, uwolnienia złączonych z nim składników oraz ulotnienia się krzemu. Dodatkowo, chociaż naczynia z PTFE nie ulegają destrukcji pod wpływem HF, to podczas odparowania do sucha lub prawie do sucha, pojawia się ryzyko przegrzania próbki skutkujące mniejszym lub większym uszkodzeniem wewnętrznej powierzchni naczynia. Nieprzezroczystość naczyń PTFE nie ułatwia dojrzenia czy kontrolowania tego zjawiska,
- komplikacje mogą być jeszcze większe w przypadku stosowania bomb ciśnieniowych, ponieważ odparowanie do sucha jest w nich nie do osiągnięcia. Niektóre urządzenia zostały zmodyfikowane w celu przezwyciężenia tej niedogodności, lecz wiąże się to z możliwością wydostawania się par na zewnątrz bomby i zanieczyszczenia reszty urządzenia.

Pomimo braku uzgodnień dotyczących procedur roztwarzania, istnieje pełen wybór literatury dotyczącej etapów preparatyki próbek [27,28]. W konsekwencji analityk musi oszacować ich wydajność, ewentualnie zmodyfikować niektóre parametry i zwalidować własną procedurę. Obecnie rynek oferuje wiele urządzeń do roztwarzania na mokro bardzo wydajnych i stosunkowo prostych, również dzięki możliwości automatyzacji. Dotyczy to zwłaszcza systemów mikrofalowych. W tych urządzeniach transfer energii z mieszaniny reakcyjnej do próbki jest lepszy niż w konwencjonalnych systemach grzewczych. Ogrzewanie mikrofalowe wykazuje dużą wydajność w przypadku tworzyw sztucznych, w których należy rozłożyć długie łańcuchy polimerowe. Należy również przyznać, że mineralizacja mikrofalowa jest obecnie przeważającą techniką, stosowaną w laboratoriach analitycznych. Jednakże wpływ na to może mieć fakt, że mniej eleganckie, choć skuteczne systemy, np. do suchego spopielania, nie wytrzymują konkurencji z systemami mikrofalowymi. Niezależnie od używanego sprzętu, brak ujednoliconej metodologii dotyczącej roztwarzania na mokro, z czy bez mikrofal, wskazuje na brak komunikacji i współpracy ze strony analityków z różnych krajów.

6. Wnioski

W opracowaniu przedstawiono etapy kompletnego procesu preparatyki próbek analitycznych na przykładzie próbek środowiskowych, począwszy od pobrania próbki, skończywszy na roztworze gotowym do pomiarów. Metody, procedury i odczynniki mogą być zaadaptowane do każdego innego rodzaju badanych próbek, gdyż próbki środowiskowe obejmują swą różnorodnością niemal wszystkie typy matryc.

Po podaniu kilku przydatnych definicji, opisane zostały możliwe źródła błędów popełnianych na etapie preparatyki oraz opisano pokrótce kilka błędów pomiarowych. Zanieczyszczenia wprowadzane do próbek wraz ze stosowanymi odczynnikami stanowią najczęstsze źródło błędnych wyników wykonywanych analiz. Również procesy chemiczne zachodzące w próbkach na skutek dodawanych reagentów, stanowią poważne zagrożenie. Należą do nich desorpcja, adsorpcja, strącanie, parowanie i inne zjawiska dotyczące analizowanych pierwiastków. Najczęstszym powodem zafałszowanych wyników mających swoje źródło w technice pomiarowej jest występowanie interferencji spektralnych, chemicznych i fizycznych.

Z przeprowadzonych rozważań wynika również, że z dwóch rozważanych metod roztwarzania próbek stałych, suche spopielanie jest znacznie lepiej zdefiniowane niż roztwarzanie na mokro. Z tego względu, gdy tylko jest to możliwe, ta metoda jest preferowana do przeprowadzania próbek stałych do roztworu.

Z przeprowadzonych rozważań wynika, że duża liczba czynników związanych z preparatyką próbek może mieć decydujący wpływ na rzetelność całej analizy. Dotyczy to nie tylko wydajności i praktycznej użyteczności dostępnych procedur, ale również ich kompatybilności z wymaganiami narzucanymi przez techniki pomiarowe. Należy zatem zredukować liczbę etapów procedury do absolutnego minimum, w celu ograniczenia zanieczyszczenia próbek analitycznych oraz możliwości utraty analitu.

LITERATURA:

[1] M. Tuzen, "Determination of heavy metals in fish samples of the middle Black Sea by GFAAS", Food Chemistry 80 (2003) 119-123.

[2] P. Liang, L. Peng, "Ionic liquid-modified silica as sorbent for preconcentration of cadmium prior to its determination by flame atomic absorption spectrometry in water samples", Talanta 81 (2010) 673–677.

[3] P. Török, M. Žemberyová, "A study of the direct determination of Cd, Cr, Cu, Pb and Zn in certified reference materials of soils by solid sampling electrothermal atomic absorption spectrometry", Spectrochimica Acta Part B 66 (2011) 93–97.

[4] L. Elci, U. Divrikli, A. Akdogan, A. Hol, A. Cetin, M. Soylak, "Selective extraction of chromium(VI) using a leaching procedure with sodium carbonate from some plant leaves, soil and sediment samples", Journal of Hazardous Materials 173 (2010) 778–782.

[5] J.Y. Cabon, "Determination of Cu and Mn in seawater by GFAAS with the use of hydrofluoric acid as a chemical modifier", Spectrochimica Acta Part B 57 (2002) 939-950.

[6] K. Shrivasa, D. Kumar Patel, "Separation and preconcentration of trace level of lead in one drop of blood sample by using GFAAS", Journal of Hazardous Materials 176 (2010) 414-417.

[7] E. Yigmatepe, M. Yaman, "Determination of molybdenum in biological samples by flame atomic spectrometry after preconcentration on activated carbon", Monatsh Chem (2011) 142:131–136.

[8] J. Sardans, F. Montes, J. Peñuelas, "Determination of As, Cd, Cu, Hg and Pb in biological samples by modern electrothermal atomic absorption spectrometry", Spectrochimica Acta Part B 65 (2010) 97–112.

[9] M. Hoenig, "Inorganic analysis of solid wastes: an analyst's view-point", Trends in Analytical Chemistry 17 (1998) 272-276.

[10] A. Gonzalvez, M. L. Cervera, S. Armenta, M de la Guardia, "A review of non-chromatographic methods for speciation analysis", Analytica Chimica acta 636 (2009) 129-157.

[11] M. Hoenig, "Preparation steps in environmental trace element analysis-facts and traps", Talanta (2001), 1021-1038.

[12] M. Stoeppler, "Sampling and Sample Preparation", Springer-Verlag, Berlin 1997.

[13] Ph. Quevauviller, "Quality Assurance in environmental Monitoring: Sampling and sample Pretreatment", VCH, Weinheim, 1995.

[14] B. Welz, "Atomic Absorption Spectrometry", Viley-VCH, Weinheim, Germany, 1999, ISBN: 3-527-28571-7.

[15] L.H.J. Lajunen, "Spectrochemical Analysis by Atomic Absorption and Emission", Royal Society of chemistry, Cambridge, 1992.

[16] Z. El-Gohary, "Theoretical and experimental treatment of the spectral interferences in atomic absorption spectroscopy", J. of Quantitative Spectroscopy @ Radiative Transfer 75 (2002) 389-396.

[17] Z. Arslan, J. F. Tyson, "Determination of trace elements in siliceous samples by ICP-MS after precipitation of silicon as sodium fluorosilicate", Microchim Acta (2008) 160: 219–225.

[18] T.T. Gorsuch, "Destruction of Organic Matter", Pergamon Press, 1970.

[19] D. Bakircioglu, Y. B. Kurtulus, G. Ucar, "Determination of some traces metal levels in cheese samples packaged in plastic and tin containers by ICP-OES after dry, wet and microwave digestion", Food and Chemical Toxicology 49 (2011) 202–207.
[20] M. Pinta, "Spectrometrie d'Absorption Atomique: Applications a l'Analyse Chimique", Masson, Paris, 1979 (in French).
[21] C.I.I. Comiteinter Instituts D'etude desTechniques Analytiques, Fresenius J. Anal. Chem. 345 (1993) 230-233.
[22] M.Pinta, "Méthodes de référence pour la détermination des éléments minéraux dans les végétaux. Détermination des éléments Ca, Mg, Fe, Mn, Zn et Cu par absorption atomique", Oleagineux, 28 (1973) 87-92.
[23] K.J.Lambe, S.J.Hill, "Microwave digestion procedures for environmental matrices . Critical Review", Analyst 123 (1998) 103R-133R.
[24] "Notes on perchloric acid and its handling in analytical work", Analytical Methods Commitee, Aanalyst 84 (1959) 214.
[25] K. Nemati, N. K. Abu Bakar, M. R. Bin Abas, E. Sobhanzadeh, K. H. Low, "Comparative study on open system digestion and microwave assisted digestion methods for metal determination in shrimp sludge compost", Journal of Hazardous Materials 182 (2010) 453–459.
[26] H. Altundag, M. Tuzen, "Comparison of dry, wet and microwave digestion methods for the multi element determination in some dried fruit samples by ICP-OES", Food and Chemical Toxicology 49 (2011) 2800–2807.
[27] R. Chakraborty, A.K. Das, M.L.Cervera, M. de la Guardia, "Literature study of microwave-assisted digestion using electrothermal atomic absorption spectrometry", Fresenius J. Anal. Chem. 355 (1996) 99-111.
[28] L. Dunneman, J. Bergerow, A. Bucholski, "Sample Preparation for Trace Analysis", in: Ullmann's Encyclopedia of Industrial chemistry, vol. B 5, Verlag Chemie, Weinheim, (1994), p. 65.