**Oznaczanie zawartości wybranych metali w próbkach wina za pomocą atomowej spektrometrii absorpcyjnej z atomizacją w płomieniu**

**Wino** to napój alkoholowy o skomplikowanym składzie matrycy. Zawiera ono zarówno związki organiczne (kwas winowy, etanol, kwas cytrynowy itp.), składniki mineralne (różne w zależności od stosowanych surowców), a także substancje dodawane w trakcie procesu produkcji (zanieczyszczenia, środki konserwujące, grzybobójcze itp.). W związku z tym jakość i skład trunku w dużej mierze zależy od odmiany stosowanych winogron, warunków uprawy a także procesu technologicznego zastosowanego do produkcji.

Orientacyjne zawartości najistotniejszych makro- i mikroelementów podana na 100 g wina:

* potas (80-100 mg),
* fosfor (10-30 mg),
* wapń (10-15 mg),
* magnez (5-10 mg),
* sód (3-5 mg),
* żelazo (0,5-1,0 mg),

oraz w śladowych ilościach - cynk, miedź i selen.

**Atomowa spektrometria absorpcyjna** (ASA, określana też skrótem AAS z ang. *atomic absorption spectrometry*) to technika analityczna pozwalająca oznaczyć zawartość wybranych pierwiastków chemicznych (głównie metali) w próbkach ciekłych, stałych i gazowych. Polega na pomiarze absorpcji promieniowania monochromatycznego o specyficznej długości fali przez swobodne atomy. Pomiary z wykorzystaniem techniki ASA zachodzą na drodze wielu procesów fizykochemicznych taki jak odparowanie, atomizacja i wzbudzenie próbki. Zjawiska te mogą zachodzić na drodze spalania badanej próbki w płomieniu (FAAS z ang. *flame atomic* *absorption spectrometry*) lub elektrotermicznie z zastosowaniem pieca grafitowego (GFAAS z ang. *graphite furnace* *atomic* *absorption spectrometry* lub ETAAS z ang. *electrothermal* *atomic* *absorption spectrometry*).

Aby mogła zajść absorpcja określonego promieniowania, dostatecznie duża liczba atomów musi znajdować się w stanie podstawowym. Wcześniejsze wzbudzenie nie jest potrzebne, co jest dużą zaletą metody absorpcji atomowej. Zgodnie z prawem promieniowania Kirchhoffa pierwiastek w stanie podstawowym absorbuje promieniowanie jakie emituje w stanie wzbudzonym.

Zależność tą można opisać używając poniższego wzoru:

$$A=γ\frac{N\_{p}fl}{a}$$

gdzie A – absorbancja, γ– współczynnik stały, Np – liczba atomów w stanie podstawowym, f – moc oscylatora, *l* – długość drogi absorpcji, *a* – współczynnik zależny od konturu i szerokości linii.

Do analizy ilościowej wykorzystuje się zależność, w której absorbancja jest wprost proporcjonalna do liczby atomów w jednostce objętości, czyli do ich stężenia oraz do grubości warstwy absorbującej. Zależność tą opisuje równanie:

$$A=ε∙b∙N$$

gdzie:

ɛ **–** molowy współczynnik absorpcji (wielkość charakterystyczna dla danego rodzaju atomów i określonej długości fali);

*b* – długość drogi optycznej (szerokość płomienia palnika w przypadku FAAS);

*N* – ilość wolnych atomów na drodze promieniowania, którą można zamienić na proporcjonalnie z nią związane stężenie atomów (*c*) w próbce, co w stałych warunkach pomiaru dla określonej długości fali daje liniową zależność:

$$A=a∙c$$

gdzie: *a* – współczynnik proporcjonalności.

Głównymi elementami spektrometru absorpcji atomowej są:

**–** źródło promieniowania;

**–** system wprowadzania próbki;

**–** atomizer;

**–** monochromator;

**–** detektor;

**–** rejestrator (komputer).



Rys. 1. Uproszczony schemat spektrometru absorpcji atomowej contrAA 800D z atomizacją płomieniową.

*Źródło promieniowania* – lampa ksenonowa, która emituje ciągłe widmo przy dużej intensywności. Dzięki specjalnej budowie elektrody i ciśnieniu wewnętrznemu lampy ksenonowej o krótkim łuku, temperatura promieniowania sięga ok. 12 000 K co przekłada się na płynną emisję w całym zakresie (185nm – 900nm), a to sprowadza się do wyeliminowania konieczności zmiany lampy w toku analizy.

*Atomizer płomieniowy* – przejście próbki ze stanu ciekłego do aerozolu zachodzi w procesie nebulizacji. Nebulizacja, czyli rozpylanie polega na rozproszeniu analizowanego roztworu w strumieniu gazu nośnego w delikatną mgłę zawierającą małe kropelki fazy ciekłej rzędu mikrometrów i przeprowadzeniu aerozolu w sposób jednorodny poprzez komorę mieszania do płomienia. Większe krople są oddzielane grawitacyjnie i są usuwane poprzez syfon. Jako gaz nośny najczęściej stosuje się układ powietrze (gaz utleniający) **–** acetylen (gaz palny), ponieważ jest on odpowiedni do analizy większości pierwiastków. Stosowanie układu acetylen – podtlenek azotu jest wymagane w trudnych do atomizacji pierwiastków takich jak bor, glin czy krzem.

*Monochromator* – wysoką selektywność analizy zapewnia podwójny monochromator o wysokiej rozdzielczości bazujący na pryzmacie i siatce Echelle. Uzyskuje się wysoką rozdzielczość spektralną.

*Detektor* – wysokorozdzielczy detektor CCD (z ang. *Charge–Coupled Device,* urządzenie ze sprzężeniem ładunkowym) czyli cichy, wrażliwy na promieniowanie UV półprzewodnik znajdujący się w szczelinie wyjściowej monochromatora, umożliwia uzyskanie dla każdej analizowanej próbki widma absorpcyjnego o wysokiej rozdzielczości. Cechy te pozwalają na wykorzystanie ASA w analizie jakościowej i ilościowej.

1. **Cel ćwiczenia**

Celem ćwiczenia jest zapoznanie się z absorpcyjną spektrometrią atomową z płomieniowym wzbudzeniem próbki. W trakcie ćwiczenia wykonane zostanie oznaczenie zawartości magnezu i żelaza w próbkach wina metodą krzywej kalibracyjnej i dodatku wzorca.

1. **Odczynniki**
* Wzorcowy roztwór magnezu, 1000 mg/L;
* Wzorcowy roztwór żelaza, 1000 mg/L;
* Kwas azotowy (V) (HNO3);
* Woda wolna od związków organicznych i redukujących;
1. **Aparatura i sprzęt laboratoryjny**
* Spektrometr absorpcji atomowej contrAA 800D firmy AnalyticJena;
* Probówki typu Falcon, 50 mL;
* Pipety automatyczne;
* Kolby jednomiarowe o pojemności 1L oraz 100 mL;
* Bibuła filtracyjna;
* Lejek szklany.
1. **Przygotowanie roztworów do wykreślenia krzywych kalibracyjnych**

a) Przygotować w kolbie miarowej o pojemności 1L roztwór 2% HNO3;

b) Przygotować roztwory wzorcowe Mg i Fe o stężeniu 100 mg/L poprzez rozcieńczenie 500 µL roztworów wzorcowych tych pierwiastków o stężeniu 1000 mg/L roztworem 2% HNO3 (przygotowanym w pkt.a) do objętości 50 mL:

c) Przygotować serie roztworów do sporządzenia krzywych wzorcowych według poniższych tabel:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Probówka** | **Objętość roztworu Mg o stężeniu 100 mg/L****[mL]** | **Objętość roztworu 2% HNO3****[mL]** |
| **Mg 1** |  |  |
| **Mg 2** |  |  |
| **Mg 3** |  |  |
| **Mg 4** |  |  |
| **Mg 5** |  |  |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Probówka** | **Objętość roztworu Fe o stężeniu 100 mg/L****[mL]** | **Objętość roztworu 2% HNO3****[mL]** |
| **Fe 1** |  |  |
| **Fe 2** |  |  |
| **Fe 3** |  |  |
| **Fe 4** |  |  |
| **Fe 5** |  |  |

**3. Uruchomić spektrometr absorpcji atomowej i ustawić odpowiednie procedury.**

**4. Zarejestrować widma absorpcji pierwiastków w sporządzonych roztworach przy długości fali 202 nm dla Mg i 248 nm dla Fe jako odnośnik stosując roztwór 2% HNO3.**

1. **Oznaczenie zawartości Mg i Fe w próbkach wina dwoma technikami wzorcowania**

Otrzymane próbki wina do oznaczenia Mg i Fe rozcieńczyć 10-krotnie i przefiltrować.

a) Metoda krzywej kalibracyjnej

Przy zastosowaniu parametrów jak w pkt. 3 zarejestrować widma absorpcji Mg i Fe w przygotowanej do badań próbce wina.

b) Metoda dodatku wzorca

Sporządzić roztwory według poniższych tabel:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Probówka** | **Objętość próbki wina** | **Objętość roztworu Mg o stężeniu 100 mg/L****[mL]** |
| **Wino**  |  |  |
| **Wino + Mg 1** |  |  |
| **Wino + Mg 2** |  |  |
| **Wino + Mg 3** |  |  |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Probówka** | **Objętość próbki wina** | **Objętość roztworu Fe o stężeniu 100 mg/L****[mL]** |
| **Wino** |  |  |
| **Wino + Fe 1** |  |  |
| **Wino + Fe 2** |  |  |
| **Wino + Fe 3** |  |  |

Zarejestrować sygnały absorpcji Mg i Fe w przygotowanych roztworach przy zastosowaniu parametrów jak w pkt. 3.

1. **Opracowanie uzyskanych wyników**
2. Sporządzić wykresy kalibracyjne obu pierwiastków jako wartości absorbancji w funkcji stężenia analitu.
3. Na postawie wykresów kalibracyjnych i uzyskanych wartości absorbancji w próbce wina wyliczyć zawartości badanych pierwiastków w 100 mL trunku z uwzględnieniem zastosowanych rozcieńczeń i porównać z wartościami rzeczywistymi.
4. Sporządzić wykresy zależności absorbancji od stężenia dodanego pierwiastka na podstawie danych uzyskanych metodą dodatku wzorca.
5. Na postawie wykresów sporządzonych w pkt c) wyliczyć zawartości badanych pierwiastków w 100 mL trunku z uwzględnieniem zastosowanych rozcieńczeń i porównać z wartościami rzeczywistymi.
6. Porównać ze sobą wyniki uzyskane przy zastosowaniu obu technik wzorcowania, wyjaśnić ewentualne różnice i ocenić, która technika prowadzi do otrzymania bardziej wiarygodnych wyników podczas oznaczania metali w winie.

**Literatura**

1. Metody spektroskopowe w chemii analitycznej pod redakcją A. Cygańskiego Wydawnictwo WNT, Warszawa 2009
2. Ocena i kontrola jakości wyników pomiarów analitycznych, rozdział: Walidacja procedur analitycznych, pod redakcją J. Namieśnika, P. Konieczki Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, Warszawa 2015
3. Metody analitycznej spektrometrii atomowej – teoria i praktyka, pod redakcją W. Żyrnickego, J. Borkowskiej-Burneckiej, E. Szmyd i E. Bulskiej, Wydawnictwo Malamut, Warszawa 2010
4. https://m.ciop.pl/CIOPPortalWAR/file/74116/20141030046&BP\_3\_2013\_s24\_28.pdf