	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	1
	<b>Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv</b> 10280.1 – Stanovení obsahu selenu metodou AAS-HG	Vydání	1
		Revize	1

## STANOVENÍ OBSAHU SELENU METODOU AAS-HG

### 1 Rozsah a účel

Metoda specifikuje podmínky pro stanovení obsahu selenu pro mineralizáty krmiv připravené mineralizací na mokré cestě za normálního tlaku. Metody používané pro stanovení selenu se volí dle typu analyzovaného vzorku, požadované přesnosti a citlivosti stanovení a podle komplikovanosti matrice vzorku. Metoda generování hydridů se uplatní především při stanovení velmi nízkých a stopových obsahů selenu, které jsou pro běžné krmné směsi typické. Při vyšším obsahu selenu ve vzorku lze použít metodu ICP-OES.


### 2 Princip

Ve vzorku krmné směsi se obsah selenu stanoví po rozkladu na mokré cestě 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. Vyhodnocení probíhá metodou kalibrační křivky. Kalibrační roztoky se připravují modelováním matrice měřeného vzorku.

### 3 Chemikálie

Používají se chemikálie analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak.

- 1 Kyselina dusičná,  $\text{HNO}_3$ , koncentrovaná 65%,  $\rho(\text{HNO}_3) = 1,40 \text{ g/ml}$ .
- 2 Kyselina sírová,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , koncentrovaná 96%,  $\rho(\text{H}_2\text{SO}_4) = 1,83 \text{ g/ml}$ .
- 3 Peroxid vodíku,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , roztok, 30%.
- 4 Kyselina chlorovodíková,  $\text{HCl}$ , koncentrovaná 36% až 38%,  $\rho(\text{HCl}) = 1,18 \text{ g/ml}$ .
- 5 Voda (deionizovaná, demineralizovaná nebo destilovaná).
- 6 Kyselina chlorovodíková,  $\text{HCl}$ , roztok,  $c(\text{HCl}) = 5 \text{ mol/l}$ .  
Příprava: 430 ml kyseliny chlorovodíkové (4) se přidá do 500 ml vody (5) a po vytemperování se doplní na objem 1000 ml.
- 7 Hydroxid sodný  $\text{NaOH}$ , 1% vodný roztok.  
Příprava: 10 g hydroxidu sodného se rozpustí ve vodě (5), převede se do 1000ml odměrné baňky a doplní se vodou (5) po značku.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	2
	<b>Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv</b>	Vydání	1
		10280.1 – Stanovení obsahu selenu metodou AAS-HG	Revize

- 8 Tetrahydridoboritan sodný ( $\text{NaBH}_4$ ), 0,5% roztok v 1% roztoku NaOH.  
Příprava: 5 g tetrahydridoboritanu sodného se rozpustí v 1% roztoku hydroxidu sodného (7), převede se do 1000ml odměrné baňky a doplní se tímto roztokem po značku.
- 9 Základní certifikovaný standardní roztok selenu o koncentraci 1000 mg/l.
- 10 Argon čistý.
- 11 Acetylen čistý a vzduch tlakový pro FAAS.

#### 4 Přístroje a pomůcky

- 1 Atomový absorpční spektrofotometr s výbojkou s dutou katodou pro Se.
- 2 Křemenná trubice s přívodní křemennou trubicí uprostřed (tvar písmene T), vyhřívána na teplotu (900 – 1000) °C plamenem acetylen – vzduch.
- 3 Přídavné zařízení ke generaci plynných hybridů.
- 4 Mineralizační zařízení vícemístné s programátorem teploty.

### 5 Postup


#### Mineralizace

Do mineralizačních trubic se naváží 2 g upraveného vzorku krmiva s přesností 0,001 g a přidá se 10 ml kyseliny dusičné (1). Trubice se umístí do mineralizačního bloku a nechá se stát přes noc. Druhý den se směs postupně zahřívá v mineralizačním bloku 15 min při 100 °C, 10 min při 140 °C a 1,5 h při 180 °C. Pak se směs ochladí, přidají se 2 ml kyseliny dusičné (1) a 1 ml kyseliny sírové (2) a pokračuje se v zahřívání 60 min při 180 °C. Po opětovném ochlazení se přidá po kapkách 2 ml až 4 ml roztoku peroxidu vodíku (3) a dále se mineralizuje 10 min při 160 °C. Po ukončení mineralizace se směs filtruje do 50ml odměrné baňky přes středně hustý filtr (např. FILTRAK č. 389). Filtr se promývá kyselinou chlorovodíkovou (6). Obsah baňky se po vytemperování doplní roztokem kyseliny chlorovodíkové (6) po značku a promíchá se. Pro každou měřenou sérii se připraví slepý pokus tak, že se provedou stejné operace s vyloučením vzorku.

#### Kalibrace a příprava kalibračních standardních roztoků

Pro přípravu kalibračních standardních roztoků se použije certifikovaný komerčně dodávaný základní standardní roztok Se o koncentraci 1000 mg/l (9). Ze základního standardního roztoku se postupným ředěním kyselinou chlorovodíkovou (6) připraví pomocný pracovní standardní roztok I o koncentraci  $c(\text{Se}) = 1 \text{ mg/l}$ .

Z takto připraveného roztoku se připraví pomocný pracovní standardní roztok II o koncentraci  $c(\text{Se}) = 0,1 \text{ mg/l}$  tak, že do 100ml odměrné baňky se pipetuje 10 ml pracovního standardního roztoku I a doplní se kyselinou chlorovodíkovou (6) po značku.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	3
	<b>Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv</b>	Vydání	1
	10280.1 – Stanovení obsahu selenu metodou AAS-HG	Revize	1

Kalibrační standardní roztoky o koncentraci selenu (0; 1; 2; 5; 10; 20) µg/l se připraví odpipetováním (0; 1; 2; 5; 10; 20) ml pomocného pracovního standardního roztoku II do 100ml odměrných baněk. Kalibrační standardní roztoky o koncentraci selenu (50; 100; 200) µg/l se připraví odpipetováním (5; 10; 20) ml pomocného pracovního standardního roztoku I do 100ml odměrných baněk. Přidá se 1 ml koncentrované kyseliny dusičné (1) a roztoky se doplní roztokem kyseliny chlorovodíkové (6) po značku. Po pečlivém promíchání se nechají stát při laboratorní teplotě. Kalibrační standardní roztoky se připravují čerstvé před každým měřením.

### Nastavení přístroje a měření

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


Měří se při vlnové délce 196 nm vymezené štěrbinou o optické šířce 1 nm na přístroji (1) nastaveném podle pokynů výrobce. Integrace signálu probíhá 10 s po prodlevě pro ustálení signálu 50 s. Odečítá se integrovaná výška signálu v hodnotách absorbance. Použití korekce pozadí není zapotřebí. Roztoky vzorků se dávkuje peristaltickou pumpou do přidavného zařízení pro generaci hydridů rychlostí (7 – 10) ml vzorku/min. Současně je do generátoru dávkován druhým kanálem peristaltické pumpy roztok tetrahydridoboritanu sodného (8). Jako nosný plyn se používá argon (10). Průtok nosného plynu se upraví podle použitého přístroje, obvykle asi na 300 ml/min. Před vlastním měřením se pro ustavení rovnováhy v generátoru hydridů nasává cca 3 min promývací roztok kyseliny chlorovodíkové (6) a roztok NaBH<sub>4</sub> (8). Poté se několikrát krátce nasaje malé množství nejvyššího kalibračního roztoku stanovovaného prvku a znovu se nasává cca 3 min promývací roztok.

Před kalibrací se obvykle opakovaně měří kalibrační blank, aby byl dosažen co nejstabilnější signál. Kalibrační roztoky se dávkuje od nejnižší koncentrace a následně se měří mineralizáty vzorků. Je třeba kontrolovat stabilitu měření častým zařazováním kalibračních standardů, popřípadě provést recalibraci.

Koncentrace stanovovaného prvku 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**

1 *Hlavními interferenty stanovení selenu metodou hydridů jsou 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 může způsobovat významné rušení. V tomto případě je nezbytné pro vyhodnocení použít místo klasické externí kalibrace metodu standardního přídatku.*

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	4
	<b>Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv</b> 10280.1 – Stanovení obsahu selenu metodou AAS-HG	Vydání	1
		Revize	1

- 2 *Přítomnost mastných látek a některých kovů vede k poklesu citlivosti stanovení. Pokud dojde k výraznému snížení citlivosti stanovení vlivem kontaminace ze vzorků, je nutné vyčistit vlastní rozkladné trubice a celý hydridový systém. Pro čištění se osvědčila horká lučavka královská, zředěná vodou v poměru (1 : 5) s následným propláchnutím vodou (5).*
- 3 *S ohledem na křížovou kontaminaci a možné vzájemné interference je nutné důsledně dodržovat oddělené aparatury pro stanovení ostatních hydridových prvků (As, Sb).*

## 6 Výpočet a vyjádření výsledků

Obsah selenu v krmných směsích v mg/kg se vypočte podle následujícího vztahu

$$X = \frac{c \times V}{Y \times 1000}$$

kde

- $X$  je obsah Se ve vzorku (mg/kg),  
 $c$  naměřená hodnota Se ( $\mu\text{g/l}$ ),  
 $Y$  navážka původního roztoku (g),  
 $V$  objem, ve kterém je vzorek rozpuštěn (ml).