

第三章 實驗部分

一、儀器設備及材料

1. 石墨電熱式原子吸收光譜儀 (graphite-furnace atomic absorption spectrophotometer , 簡稱 GFAAS):

Hitachi Z-2700 型附有偏極化茲曼背景校正器 (polarized Zeeman background corrector)。

2. 鈹中空陰極燈管 (beryllium hollow cathode lamp):

購自 Hitachi Co. (Japan)。電流設定在 10 mA , 波長設定在 234.9 nm 處 , 狹縫寬度 (slit width) 選用 1.3 nm , 使用前需先將鈹燈管預熱約 30 分鐘 , 使達到穩定的電流。

3. 石墨管 (Pyro Tube HR):

使用 pyro tube HR (Hitachi Co. , part No. 7J0-8880)。

4. 氬氣 (argon):

使用高純度氬氣 (99.99%) 作為石墨式原子吸收光譜儀的帶動氣體 (carrier gas) 與冷卻氣體 (cooling gas) , 購自台中大統氧氣行。

5. 微波消化系統 (microwave accelerated reaction system):

CEM 微波消化儀器公司產品 (U.S.A.) , 型號 MARS-5 , 為密閉式的消化系統 , 附有溫度控制的 sensor , 可依 ramping time 和 holding time 所設定的時間進行加溫。

外層微波消化瓶使用 HP-500 型 (材質是 Teflon-PFA , 體積約為 120 mL)。微波功率最高可輸出 1200 W , 也可

設定連續微波 300 W 與 600 W，爐腔最多可放置 13 組密閉式樣品瓶。

6. 內層微量樣品鐵氟龍消化瓶：

CEM 產品，體積 7 mL，用於微量樣品(< 0.1g)的消化，型號 920271。

7. 抽氣櫃 (hood)：

(Lab Art) 北友科技股份有限公司生產，台灣。

8. 可調式微量吸量管 (adjustable digital micropipet)：

(a) John Poulten Ltd. (England) 產品

型號 R880/A，可調範圍由 5.0 至 50.0 μ L。

(b) eppendorf (Germany) 產品

可調範圍由 2.00 至 20.00 μ L。

(c) Mettler-Toledo GmbH (Germany) 產品

可調範圍由 20 至 200 μ L 和 100 至 1000 μ L。

(d) Gilson (France) 產品

可調範圍由 1.00 至 5.00 mL。

9. 可拋棄式微量滴管 (disposable pipet tip)：

材質是 polypropylene 製成。

10. 轉動混合器 (vortex mixer)：

Thermolyne Corporation(Iowa , U.S.A.), 型號 37600。

11. 三向閥：

Hamilton 公司產品，型式 HVP-3 valve，鐵氟龍材質

12. 量瓶 (volumetric flask)：

Iwaki Glass Co.(Japan) 產品 , 10.0、 25.0、 50.0、 100、 500 mL 等體積 , pyrex 材質 , A 級品。

13. 刻度吸量管 (graduated pipet) :

Iwaki Glass Co.(Japan) 產品 , 1.00、 2.00、 5.00、 10.0 mL 等體積 , pyrex 材質。

14. 微量注射針筒 (microsyringe) :

Hamilton 公司產品 , 10, 25, 50, 100 和 500 μ L , 供配製樣品及取出樣品 (甲醇溶液) 注入 GFAAS 之用。

15. 玻璃注射針筒 :

100 mL (實際可容納的體積大約 130 mL), TOP , 日本東京株式會社產品。

16. 電子天平 :

Mettler (Switzerland) 產品 , 型號 AJ 100 , 可秤至 0.0001 g。

17. 抽氣幫浦 :

Gast 產品 , 型號 DOA-P104-AA。

18. 真空乾燥器 :

一般乾燥器 (玻璃製) 附有抽氣裝置 , 內裝有藍色矽膠 (silica gel) 及過氯酸鎂 $Mg(ClO_4)_2$ 之吸水劑。

19. Oasis cartridge :

Oasis HLB particle (Water 公司產品) , 由 N-vinyl pyrrolidone (親水性) 及 divinylbenzene (親油性) 以 1 : 1 組成的分子聚合物 (copolymer) , 屬於極性小的材質 , particle size = 54.4

μm 。在本實驗中，秤取約 150 mg oasis particle 放入一支 pp 材質的 cartridge，由於 oasis particle 中有些成分可能對 $\text{Be}(\text{acac})_2$ 的收集會產生干擾，因此，每支 oasis cartridge 需先做前處理 (pre-treatment) 的步驟，流程如下：依序加入約 2 mL 甲醇、10 mL 純水、25 mL 水溶液 (含有 11.3 mmol pH=6 之醋酸銨緩衝溶液和 25 μL acac)，最後，以 1 mL 甲醇流洗後，備用。當天使用前，需先加入 2 mL 甲醇，將 cartridge condition，再加入 10 mL 純水，將殘留的甲醇移走，並充滿水後，即可使用。

20. pH 試紙：

Universal test paper, pH 1.0 - 11.0, Toyo Roshi Kaisha, Ltd.
(Japan)。

21. 棕色瓶 (brown bottle)：

10、20、50 及 100 mL 等體積，Pyrex 玻璃材質，Iwaki Glass Co. (Japan)。

二、藥品與試劑

1. 純水：

東海大學地下水經過軟水系統後，加以蒸餾，再經過 Millipore Simplicity system (made in France)，即經陰陽離子混合樹脂 (simpliPak 1) 進行去離子化及 0.2 μm 濾膜過濾後，所得的純水 (電阻大於 18.0 megaohm-cm)。

2. 超純硝酸 (HNO_3 , optima nitric acid)：

購自 Fisher Chemical Co. (Pittsburgh, Pa, U.S.A.), 濃度約為 70% (w/w), 含鈹殘留濃度小於 5 ppt (即 ng/L), 其餘的金屬含量介於 0.01 至 20 ppt 之間, 作為消化橄欖葉樣品之用。

3. 硝酸 (HNO_3 , GR 級):

Merck 公司產品, GR 級, 濃度約 65% (w/w), 用純水稀釋為 1 : 1 (約 8 M) 之溶液, 作為清洗玻璃器皿之用。

4. 鈹儲備標準溶液 (stock standard solution)

使用 $\text{Be}_4\text{O}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_6$ 配製於 2% HNO_3 中, 購自 Merck (ICP standard), 濃度為 1000 mg/L of Be^{2+} 。

5. 乙醯丙酮 (acetylacetone, 又名 2,4-pentanedione):

分子式為 $\text{CH}_3\text{COCH}_2\text{COCH}_3$, 購自 Tokyo Chemical Industry Co. , 純度 99%。

6. 醋酸 (CH_3COOH , glacial acetic acid):

購自 Aldrich and Sigma, 純度 99.99%, 濃度約 17.5 M。

7. 醋酸銨 ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$, ammonium acetate):

購自 Merck, GR 級。

8. 甲醇 (CH_3OH , methanol):

購自 Merck, GR 級, 純度 99.8%。

9. 雙氧水 (H_2O_2 , hydrogen peroxide):

購自 Merck, 濃度約為 35% (w/w)。

10. 重鉻酸鉀 ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, potassium dichromate):

購自 Merck, GR 級, 純度 99.8%。

11. 濃硫酸 (H_2SO_4 , sulfuric acid) :
購自 Merck , GR 級 , 純度 99.8% (w/w)。
12. 氨水溶液 ($\text{NH}_3(\text{aq})$, ammonium hydroxide) :
購自 ARCH Co. , Norwalk , U.S.A. , semiconductor grade。
13. 橄欖葉標準參考品 (Certified Reference Material , BCR No. 62) , 購自 Office for Official Publications of the European Communities, Belgium (歐洲) , 但未註明鉍的含量或濃度 , 其它主要元素之 certified values 見附錄一。
14. 四種橄欖葉實際樣品 , 採自台灣中部和北部 , 分別為台中市東大附小、新竹縣寶山鄉、彰化縣田尾鄉和桃園縣大溪鄉的橄欖樹。

三、玻璃器皿之清洗

1. 配製洗劑 (cleaning solution) :

秤取約 5 g 之 $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (Merck , GR 級) , 加入約 10 mL 純水 , 攪拌微溶後 , 緩緩加入濃硫酸 (Merck , GR 級 , 約需用 200 mL) 於溶液中 , 並一面攪拌 , 直到全溶且呈現暗黑色。冷卻後 , 倒入玻璃瓶中保存 , 作為清洗玻璃器皿中的有機物質。

2. 酸洗劑 :

以 Merck (GR 級) 硝酸和純水配製成 1 : 1 的溶液 (約為 8 M HNO_3) , 分裝成 3 瓶 , 分別標示為清洗空白試液 (blank) , 低濃

度 (約 ppb), 和高濃度 (約 ppm) 之用。

3. 玻璃器皿以下列步驟清洗：

- (1) 用自來水將殘留在瓶壁上的樣品試劑盡量沖洗掉。
- (2) 用洗劑浸泡，移除玻璃器皿內的有機物質。
- (3) 用自來水沖洗，將殘留的洗劑沖洗掉。
- (4) 用酸洗劑 (8 M HNO₃) 浸泡隔夜 (超過 12 h)。
- (5) 用去離子水清洗酸液。
- (6) 最後用純水淋洗，晾乾備用。

四、實驗步驟

1. 藥品和溶液之配製

- (1) 10.0 mg-Be/L 之 Be²⁺ 配製於甲醇中之標準溶液 取 100 μL 1000 mg/L 之 Be²⁺ 儲備溶液，放入 10.0 mL 量瓶中，以甲醇定量至刻度，即為 10.0 mg-Be/L 之 Be²⁺ 標準溶液，每天配製。
- (2) 100 μg-Be/L 之 Be²⁺ 配製於甲醇中之標準溶液 取 100 μL 10.0 mg/L 之 Be²⁺ 溶液，放入 10.0 mL 量瓶中，以甲醇定量至刻度，即為 100 μg-Be/L 溶液，每天配製。
- (3) 醋酸銨緩衝溶液之配製 (於純水中) 秤取約 18.23 g CH₃COONH₄，加入 770 μL 冰醋酸，以純水稀釋至 50 mL，即為 5.0 M，pH 值約為 6.0 之醋酸銨緩衝溶液，保存於 4 °C 冰箱備用，每月配製。

(4) 醋酸銨緩衝溶液之配製 (於甲醇中)

秤取約 1.46 g $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ ，加入 62 μL 冰醋酸，以甲醇稀釋至 10.0 mL，即為 2.0 M，pH 值約為 6.0 之醋酸銨緩衝溶液，每天配製，作為配製檢量線之用。

(5) 氫氧化銨溶液之配製

量取 31 mL 濃氨水，用純水稀釋至 500 mL，即為 1.0 M $\text{NH}_3(\text{aq})$ ，作為橄欖葉經微波消化後，調整酸性消化溶液之 pH 值。

2. 橄欖葉樣品之來源、保存及添加已知量鉍於橄欖葉樣品中之配製

橄欖葉(Olive leaves)參考樣品粉末狀，購自歐洲(BCR CRM No. 62)，但未註明鉍的含量或濃度，此樣品經真空乾燥後，即可秤重使用。其餘四種實際樣品的前處理步驟如下：將採得的橄欖葉用清水洗淨後，在空氣中晾乾約 1 至 2 天，然後放入烘箱用 105 烘乾約 4 小時，涼到室溫後，使用 mortar and pestle 將樣品磨碎並使其通過 40 mesh 的篩網 (顆粒小於 420 μm)，混合均勻後，儲存於棕色瓶中備用。由於濃度是以乾重 (dry weight) 表示，為了確保這些橄欖葉樣品屬於完全乾燥的狀態並隨時可以取用，因此，須先將樣品(約 1 至 2 g)放入真空乾燥器內至少 24 小時，內裝有過氯酸鎂 (magnesium perchlorate, Merck GR 級) 和 silica gel 作為吸水劑。

推估橄欖葉中鉍的含量可能很低，因此，秤取適量(約 20 mg)

橄欖葉樣品 (BCR No.62, 約含有 0.20 ng Be) 放入微量樣品鐵氟龍消化瓶 (約 7 mL, 如圖 3-1 所示) 後, 用微量注射針筒 (microsyringe) 取適量 (如 0.200 ng Be²⁺) 配製於甲醇中 (100 μg-Be/L) 之 Be²⁺ 標準溶液添加於橄欖葉樣品。將鐵氟龍瓶的蓋子打開, 置於室溫下隔夜, 使甲醇從橄欖葉樣品中揮發, 而使鈹停留於橄欖葉樣品上, 藉此模擬橄欖葉樣品中的鈹 (約含有 0.40 ng Be²⁺), 作為探討本實驗的各項變數和求回收率。

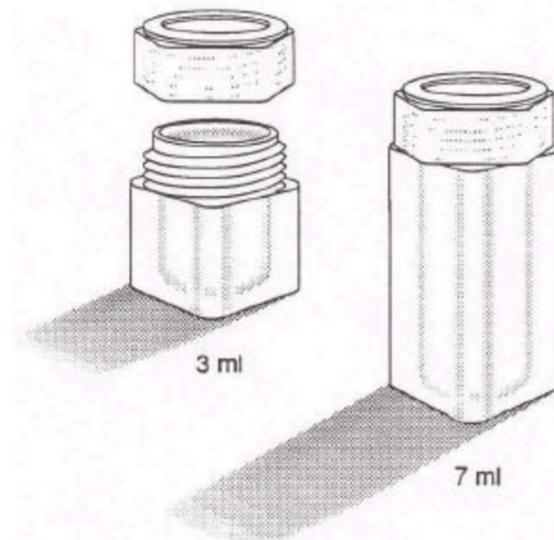


圖 3-1 微量樣品鐵氟龍消化瓶

3. 橄欖葉中鈹的測定方法

由於橄欖葉 BCR CRM No.62 的參考樣品中尚未有 Be 的確認值, 因此本實驗使用標準添加法來求橄欖葉中鈹的含量和濃度。

實驗流程圖如圖 3-3 所示。先稱取乾燥橄欖葉樣品 (約 20 ± 0.1 mg) 放入 7-mL 鐵氟龍消化瓶中，分別添加配製在甲醇中的鈹 (0 - 0.300 ng) 於橄欖葉樣品中，將瓶蓋打開，放置隔夜，使甲醇揮發並讓鈹停留在樣品上。次日，加入適量 (約 650 μ L) 濃硝酸，將消化瓶蓋子旋緊，在室溫下先反應約 1 小時，使橄欖葉樣品溶於酸中，然後打開消化瓶瓶蓋，讓部分反應生成的 NO_2 氣體排除。再使用特殊鎖瓶器工具 (P/N 301610, 20 in-lb) 將 7-mL 鐵氟龍消化瓶瓶蓋鎖緊[(如圖 3-2 所示)，以減少樣品經微波加溫消化時之漏失]，放入大的鐵氟龍 (120 mL) 瓶中 (內裝有約 10 mL 的純水)，然後置於微波消化裝置的系統中，開始作第一階段的微波消化。等 7-mL 鐵氟龍瓶冷卻至室溫後，再加入適量 (約 50 μ L) 的過氧化氫，再做第二階段的微波消化。

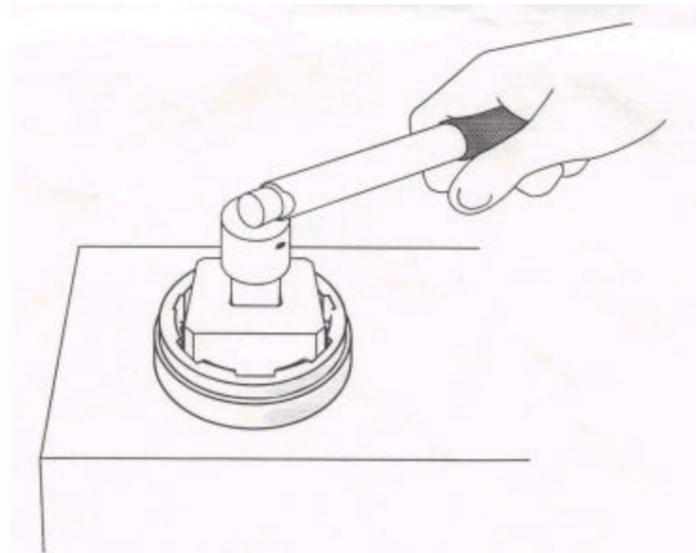


圖 3-2 鎖瓶工具圖

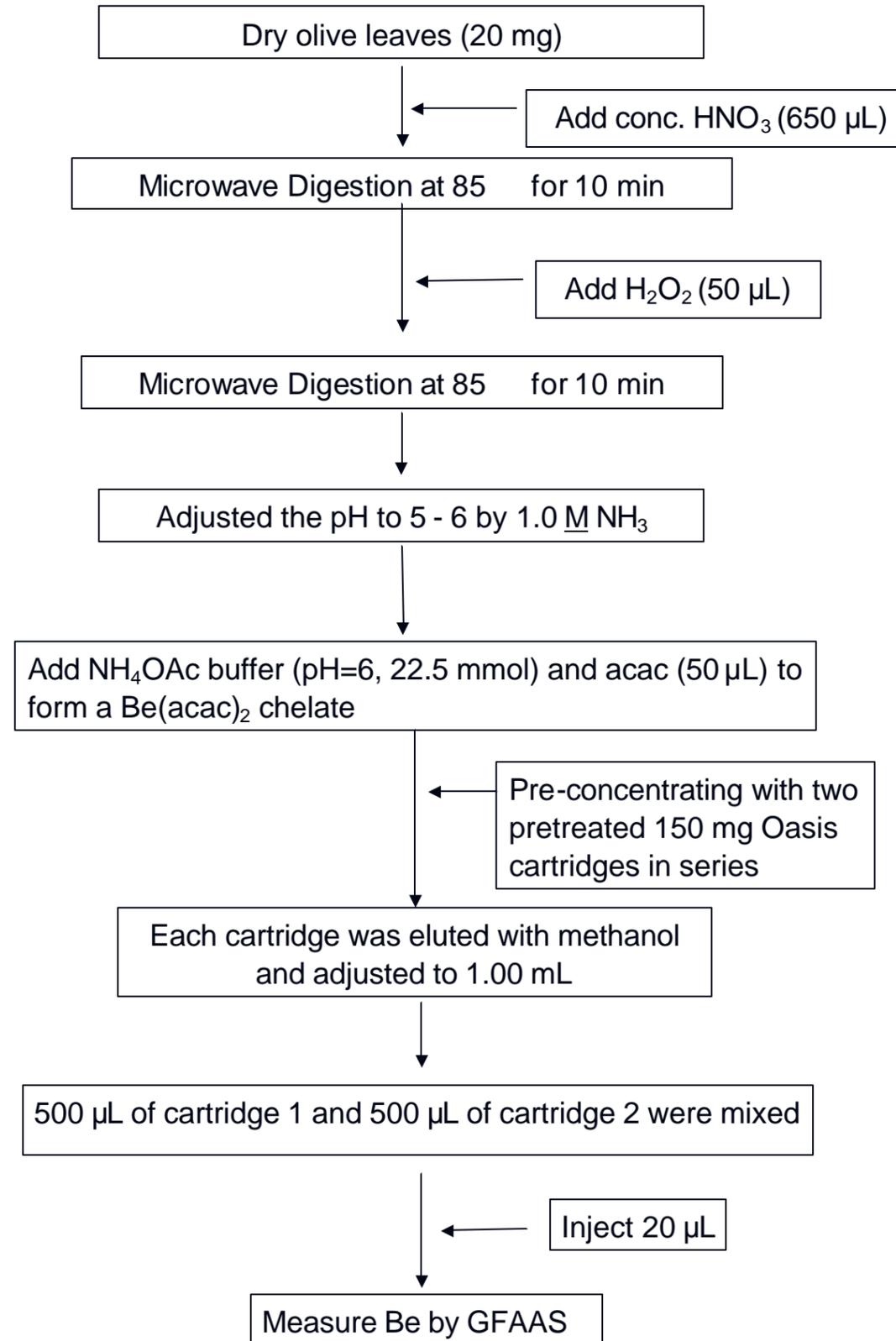


圖 3-3 實驗流程圖

當微波消化完畢且 7-mL 鐵氟龍瓶冷卻至室溫後，將消化液倒入燒杯（200 mL）中，用純水沖洗鐵氟龍瓶數次，使殘留在鐵氟龍瓶壁上的消化液能完全被收集於燒杯中，再以 $\text{NH}_{3(\text{aq})}$ 調整消化液之 pH 值至 5.0 - 6.0 後，加入適量（22.5 mmol）之醋酸銨緩衝溶液（配製於純水中，pH=6.0）和適量（50 μL ）的 acac，在室溫混合反應約 1 h，使 acac 與溶液中的鈹形成穩定的螯合物 $[\text{Be}(\text{acac})_2]$ 後，流經兩支自製串聯的 Oasis cartridge（各填裝有 150 mg Oasis particle, Waters Co.）。經預濃縮步驟後，每支 cartridge 用甲醇將 $[\text{Be}(\text{acac})_2]$ 之螯合物洗出，並定量至 1.00 mL（使用 2.00 mL 附有刻度的玻璃管，每一刻度為 0.1 mL）。由 cartridge 1 和 cartridge 2 各取出 500 μL 混合均勻後，使用微量注射針筒（microsyringe）取出 20 μL 注入石墨管，依加溫程式（表 3-1）將鈹原子化，測定其吸收峰高度，換算為吸光度（absorbance），由標準添加法的檢量線，可求得橄欖葉中鈹的含量。

表 3-1 使用石墨式原子吸光儀測定橄欖葉中 Be^{2+} (濃縮於甲醇後) 的加溫程式

Step	Start Temp. ()	End Temp. ()	Duration Time (sec)	Flow Rate of Argon (mL/min)
Drying	55	60	35	200
Drying	60	70	20	200
Drying	70	120	20	200
Drying	130	400	30	200
Ashing	650	650	40	200
Atomization	2500	2500	2	0
Cleaning	2600	2600	5	200

4. 直接將鈹配製在甲醇中之檢量線

先準備九支小試管 (2.0 mL), 各加入 50 μL acac 和 250 μL 配製於甲醇中之醋酸鈹緩衝溶液 (2.0 M, pH=6.0), 然後加入適量 (如 0 - 8 μL 100 $\mu\text{g/L}$) 配製於甲醇中的 Be^{2+} 標準溶液, 最後用甲醇定量至 1.00 mL, 在室溫混合反應約 1 小時使形成 $\text{Be}(\text{acac})_2$ 的螯合物後, 取出 20 μL 注入 GFAAS, 依表 3-1 之加溫程式測定鈹的吸光度。以吸光度為 y 軸, 鈹的含量為 X 軸, 繪製一檢量線。

5. 橄欖葉中鈹經 Oasis cartridge 之固相濃縮步驟

固相濃縮主要分為四個步驟: Condition, Load, Rinse, 和

Elute，詳述如下：

(1) Condition

是提供一個合適的吸附環境，並且移除 cartridge 中的不純物。本實驗先使用 2 mL 甲醇流經每個自製的 Oasis cartridge (填充有 150 mg Oasis particle, Waters Co.), 再用 10 mL 純水清洗，將殘留的甲醇移走。因為如有甲醇殘留於 Oasis cartridge 時，當樣品之消化液通過時，會帶走一部份 $\text{Be}(\text{acac})_2$ 螯合物，造成待測物的流失。所以在 condition 的過程中，當甲醇通過 Oasis cartridge 後，需以注射針筒對 cartridge 施一正向推壓並推送數次，使甲醇盡量被移走，再用適量 (如 10 mL) 的純水清洗並使純水充滿整個 Oasis cartridge。

(2) Load

將消化後，且已加入 NH_4OAc buffer 和 acac 之水樣流經兩支串聯的 Oasis cartridges，使水樣中之 $\text{Be}(\text{acac})_2$ 能滯留於 cartridge 上。等水溶液全部流經 Oasis cartridge 後，再借助馬達抽氣的方式，將殘留在注射筒內的水樣，盡量全部流經 Oasis cartridge，如圖 3-4 所示。

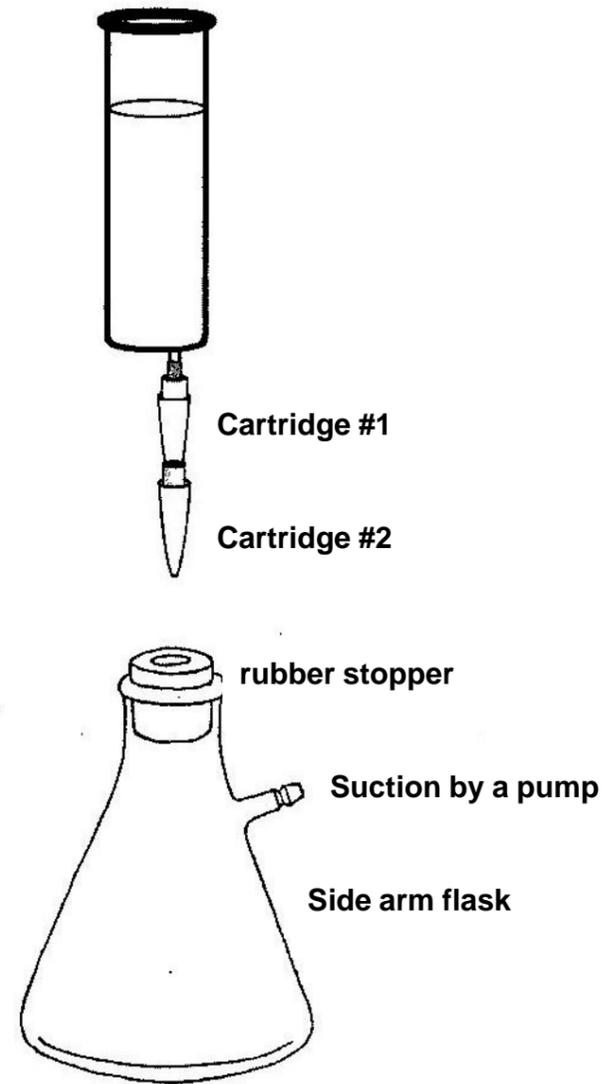


圖 3-4 固相萃取濃縮步驟裝置圖

(3) Rinse

原則上是以純水作為溶劑，將不需要的物質（或鹽類）洗出，但保留待測物於 cartridge 上。但在本實驗中，若使用純水沖洗時，因部分 $\text{Be}(\text{acac})_2$ 螯合物會被沖走，因此將此步驟省略。

(4) Elute

以適當的溶劑將待測物從 cartridge 中沖洗出。本研究使用甲

醇作為溶劑，將 Be(acac)₂螯合物從 Oasis cartridge 洗出，每個 cartridge 大約使用 1 mL 的甲醇沖洗，並定量至 1.00 mL。

6. 石墨式原子吸光儀之設定條件

石墨式原子吸光儀所使用的條件如表 3-2 所列。

表 3-2 使用石墨式原子吸光儀測定鉍之設定條件

設定項目	設定值
GFAAS	Hitachi Company , Z-2700
Light Source	Hitachi Be Hollow Cathode Lamp
Lamp Current	10.0 mA
Wavelength	234.9 nm
Slit Width	1.3 nm
Carrier Gas	200 mL Ar/min
Interrupted Gas at Atomization	0 mL/min
Sample Volume Introduced	20 µL
Tube Type	Pyro Tube HR
Signal Mode	Peak Height
Background Correction	Zeeman Mode

7. 以添加回收率和標準添加法檢量線之斜率作為本方法可行性之評估

由於橄欖葉參考樣品中尚未有鉍的確認值，因此添加已知量的鉍於橄欖葉中，求其回收率。此外，也需檢驗由標準添加法檢

量線所得之斜率與直接將鉍配製在甲醇中檢量線之斜率是否靠近 (即相對誤差是否在 5%以內), 作為本方法可行性之評估。在標準添加法中, 添加回收率的計算是將測得之吸光度值代入標準添加法檢量線 ($y = mx + b$) 之 y , 求得 x 值作為分子, 所添加鉍的量作為分母, 乘以 100, 即為添加回收率。