



EVROPSKÁ UNIE
Evropské strukturální a investiční fondy
Operační program Výzkum, vývoj a vzdělávání



Laboratoř environmentální analýzy

Ing. Petra Jančová, Ph.D.
Ing. Lenka Šenkárová, Ph.D.

*„Tento výstup lze užít v souladu s licenčními podmínkami Creative Commons BY 4.0 International
(<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/legalcode>).“*



Obsah

Obsah	2
Úvod.....	5
1 Stanovení orthofosforečnanů ve vzorcích pitné, povrchové a minerální vody.....	6
1.1 Úkol.....	6
1.2 Teoretický úvod.....	6
1.2.1 Celkový fosfor	6
1.2.2 Spektrometrie v ultrafialové a viditelné oblasti spektra	7
1.3 Zařízení a příslušenství	10
1.4 Princip fotometrického stanovení rozpuštěných anorganických orthofosforečnanů	11
1.5 Pokyny k vypracování.....	11
1.5.1 Vzorky vody.....	11
1.5.2 Použitá činidla (reagencie)	11
1.5.3 Příprava a měření kalibračních roztoků (standardů) PO_4^{3-}	12
1.5.4 Vlastní stanovení PO_4^{3-} ve vzorcích vod (pitné, povrchové, minerální).....	13
1.6 Vyhodnocení výsledků.....	13
2 Stanovení zákalu ve vzorcích pitné, povrchové a minerální vody	14
2.1 Úkol.....	14
2.2 Teoretický úvod.....	14
2.2.1 Zákal.....	14
2.2.2 Optické analytické metody vyžívané pro měření zákalu (turbidimetrie, nefelometrie, spektrometrie)	14
2.3 Zařízení a příslušenství	15
2.4 Princip stanovení	16
2.5 Pokyny k vypracování.....	16
2.5.1 Použitá činidla (reagencie)	16
2.5.2 Příprava roztoků	16
2.5.3 Volba vhodné vlnové délky (λ) pro měření.....	17
2.5.4 Kalibrace přístroje (spektrofotometru).....	17
2.5.5 Vlastní stanovení zákalu ve vzorcích vod (pitné, povrchové a minerální)	17
2.6 Vyhodnocení výsledků.....	18
3 Stanovení standardních těžkých kovů v kapalných vzorcích pomocí atomové absorpční spektrometrie	19
3.1 Úkol.....	19
3.2 Teoretický úvod.....	19
3.2.1 Těžké kovy	19
3.2.2 Atomová absorpční spektrometrie (AAS); princip metody.....	19
3.3 Zařízení a příslušenství	20
3.4 Pokyny k vypracování.....	23
3.4.1 Neznámé vzorky.....	23
3.4.2 Použitá činidla (reagencie)	23
3.4.3 Příprava roztoků (kalibračních standardů).....	23
3.4.4 Vytvoření aplikace pro stanovení vybraných kovů, parametry analýzy, příprava sekvence měření, optimalizace podmínek měření	24
3.4.5 Měření.....	25
3.5 Vyhodnocení výsledků.....	26

4 Stanovení rtuti ve vzorcích ryb na rtuťovém analyzátoru AMA254.....	28
4.1 Úkol.....	28
4.2 Teoretický úvod.....	28
4.3 Zařízení a příslušenství.....	28
4.4 Princip stanovení.....	29
4.5 Pokyny k vypracování.....	29
4.5.1 Použitá činidla (reagencie).....	30
4.5.2 Příprava analyzovaných vzorků.....	30
4.5.3 Měření.....	30
4.5.4 Parametry analýzy (sušení/ termický rozklad/ čekání) [s].....	30
4.6 Vyhodnocení výsledků a jejich zpracování.....	31
5 Stanovení s využitím iontově selektivních elektrod	32
5.1 Úkol.....	32
5.2 Teoretický úvod.....	32
5.2.1 Fluoridy a možnosti jejich stanovení.....	32
5.2.2 Přímá potenciometrie, iontově selektivní elektrody	32
5.3 Zařízení a příslušenství.....	34
5.4 Princip stanovení.....	34
5.5 Pokyny k vypracování.....	34
5.5.1 Použitá činidla (reagencie).....	34
5.5.2 Příprava pracovního roztoku TISAB.....	34
5.5.3 Příprava kalibračních roztoků.....	35
5.5.4 Příprava vzorků k analýze.....	35
5.5.5 Kontrola pH kalibračních roztoků a připravených vzorků	35
5.5.6 Měření kalibračních roztoků, analýza vzorků.....	36
5.6 Vyhodnocení výsledků.....	36
6 Stanovení nepolárních extrahovatelných látek ve vodném prostředí pomocí plynové chromatografie	39
6.1 Úkol.....	39
6.2 Teoretický úvod.....	39
6.2.1 Nepolární extrahovatelné látky (NEL; uhlovodíky C10–C40).....	39
6.2.2 Chromatografie.....	39
6.3 Zařízení a příslušenství.....	41
6.4 Princip stanovení.....	41
6.5 Pokyny k vypracování.....	42
6.5.1 Použitá činidla (reagencie).....	42
6.5.2 Příprava standardních roztoků.....	42
6.5.3 Vzorky vody k analýze – extrakce, vysušení, přečištění extraktu.....	43
6.5.4 Parametry GC analýzy	43
6.5.5 Měření.....	44
6.6 Vyhodnocení výsledků.....	44
7 Analýza polycyklických aromatických uhlovodíků ve vzorcích pražené kávy pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí	45
7.1 Úkol.....	45
7.2 Teoretický úvod.....	45
7.2.1 Polycyklické aromatické uhlovodíky.....	45
7.2.2 Kapalinová chromatografie.....	46
7.3 Zařízení a příslušenství.....	47
7.4 Princip stanovení.....	47
7.5 Pokyny k vypracování.....	48
7.5.1 Použitá činidla (reagencie).....	48

7.5.2	<i>Příprava směsného roztoku pracovního standardu</i>	<i>48</i>
7.5.3	<i>Extrakt vzorku pražené kávy.....</i>	<i>48</i>
7.5.4	<i>Parametry analýzy</i>	<i>48</i>
7.5.5	<i>Měření.....</i>	<i>49</i>
7.6	<i>Vyhodnocení výsledků.....</i>	<i>49</i>
8	Stanovení léčiv pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie	52
8.1	Úkol.....	52
8.2	Teoretický úvod.....	52
8.2.1	Léčiva	52
8.2.2	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s UV detekcí (HPLC/UV)	52
8.3	Zařízení a příslušenství	53
8.4	Princip stanovení	53
8.5	Pokyny k vypracování.....	53
8.5.1	Použitá činidla (reagencie)	53
8.5.2	Neznámý vzorek – modelový vzorek vody.....	53
8.5.3	Parametry analýzy a měření vzorků.....	54
8.6	Vyhodnocení výsledků.....	54
	Literatura	55
	Symboly a zkratky	60
	Seznam obrázků.....	61
	Seznam tabulek	62
	Příloha	63

Úvod

Laboratorní úlohy v předmětu Laboratoř environmentální analýzy navazují na přednášky, na kterých se studenti seznámí s významnými environmentálními polutanty a metodami jejich stanovení v různých environmentálních matricích (ovzduší, voda, půda, sedimenty, biota).

Tento materiál reprezentuje výběr některých instrumentálních analytických metod, které jsou na poli environmentální analýzy běžně využívány. Pozornost je věnována zejména metodám optickým (spektrometrii v UV/VIS oblasti, atomové absorpční spektrometrii (AAS)), chromatografickým (plynové chromatografii (GC), vysokoúčinné kapalinové chromatografii (HPLC)) a elektrochemickým (iontově selektivním elektrodám (ISE)), které si mohou studenti osvojit v rámci daných laboratorních cvičení.

1 Stanovení orthofosforečnanů ve vzorcích pitné, povrchové a minerální vody

1.1 Úkol

Spektrofotometricky stanovte obsah orthofosforečnanů v předložených vzorcích vod.

1.2 Teoretický úvod

1.2.1 Celkový fosfor

1.2.1.1 Formy výskytu fosforu

Fosfor je významným biogenním prvkem, který se vyskytuje nejen ve vodách (přírodních, odpadních), ale i v sedimentech a kalech. Z analytického hlediska je možné sloučeniny fosforu klasifikovat do tří hlavních kategorií:

- 1) ortofosforečnany, PO_4^{3-} ;
- 2) kondenzované fosforečnany, zahrnující meta-, pyro- a polyfosforečnany:
 - $\text{Na}_2\text{P}_2\text{O}_6$, $\text{Na}_3\text{P}_3\text{O}_9$ (metafosforečnany),
 - $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ (pyrofosforečnany),
 - $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ (tripolyfosforečnany);
- 3) organicky vázaný fosfor. (Patniak, 2010)

Rozpuštěný anorganicky vázaný fosfor se může vyskytovat ve vodách ve formě jednoduchých nebo komplexních orthofosforečnanů nebo polyfosforečnanů v iontové nebo neiontové formě. Polyfosforečnany vyskytující se ve vodách mohou mít strukturu buď řetězovou (katenapolyfosforečnany) nebo cyklickou (cyklopolyfosforečnany).

Mezi formy organicky vázaného rozpuštěného fosforu patří např. fosfáty hexos, fosfolipidy, fosfoproteiny, koenzymy, nukleotidy, nukleové kyseliny, aj. Autotrofní organismy jsou schopné asimilovat fosfor ve formě orthofosforečnanů.

(Kočí et al., 2000)

1.2.1.2 Zdroje úniků

Přírodním zdrojem fosforu ve vodách je rozpuštění a vyluhování některých minerálů (apatit) a zvětralých hornin. Antropogenním zdrojem anorganického fosforu je aplikace fosforečnanových hnojiv a odpadní vody z prádel a dalších provozů, do kterých se dostávají fosforečnany z pracích prostředků. Dalším zdrojem jsou polyfosforečnany, které jsou používány v čistících a odmašťovacích prostředcích, ale také jako protikorozní a protiinkrustační přísady. Zdrojem organického fosforu je fosfor obsažený v živočišných odpadech. (Celkový fosfor, IRZ)

1.2.1.3 Dopady na životní prostředí

Sloučeniny fosforu spolu se sloučeninami dusíku způsobují eutrofizaci vod – všeobecně známým projevem eutrofizace je pravidelný masový rozvoj vodního květu sinic či vegetačního zabarvení tvořeného zelenými řasami nebo i rozsivkami, případně některými druhy vyšších rostlin. (Kočí et al., 2000; Celkový fosfor, IRZ)

1.2.2 Spektrometrie v ultrafialové a viditelné oblasti spektra

Molekulová spektrometrie zahrnuje spektrometrické metody, které jsou založeny na interakcích elektromagnetického vlnění s molekulami analyzovaných látek. Molekuly existují pouze v určitých kvantových stavech, které se liší obsahem energie (E), a proto absorbují elektromagnetické záření pouze určitých vlnových délek (λ). Jestliže molekula přechází ze stavu s nižší energií do stavu s energií vyšší, absorbuje molekula záření o frekvenci ν , která právě odpovídá rozdílu energií mezi energetickými hladinami E_p (vyšší, excitovaná) a E_q (nižší, základní) obou kvantových stavů podle Bohrovy frekvenční podmínky:

$$\Delta E = E_p - E_q = h \cdot \nu = h \cdot c / \lambda \quad (1)$$

kde c je rychlost světla, λ vlnová délka a h je Planckova konstanta ($6,626 \cdot 10^{-34}$ J.s). Metody molekulové absorpční spektrometrie v oblasti UV/VIS jsou založeny na interpretaci změn, které nastávají v molekulách při absorpci záření v rozmezí vlnových délek 190 – 800 nm (viz Tabulka 1). Látky, které absorbují záření pouze v UV, se jeví jako bezbarvé. Látky, které pohlcují z bílého slunečního světla záření s λ mezi 400 až 760 nm, vidí lidské oko jako barevné. Vlnová délka pohlceného záření však neodpovídá barvě látky, kterou vnímáme, ale barvě doplňkové (viz Tabulka 2).

Označení	λ [nm]	Absorbující látky
Vzdálená UV oblast (vakuová)	< 190	nasycené sloučeniny monoenové sloučeniny
Blízká UV oblast	190 – 380	polynenasycené a aromatické sloučeniny
VIS oblast	380 – 760	barevné látky

Tabulka 1 Spektrální oblasti (Koplík, 2019)

λ [nm]	Barva absorbovaného světla	Barva absorbující látky
400 – 435	fialová	žlutozelená
435 – 480	modrá	žlutá
480 – 490	zelenomodrá	oranžová
490 – 500	modrozelená	červenooranžová
500 – 560	zelená	purpurová
560 – 580	zelenožlutá	fialová
580 – 595	žlutooranžová	modrá
595 – 620	červenooranžová	zelenomodrá
620 – 760	červená	modrozelená

Tabulka 2 Komplementarita barev (Koplík, 2019)

Absorbance a **transmittance** jsou dva důležité pojmy užívané při absorpčním měření. Ze vstupního toku záření Φ_0 je část absorbována vzorkem a zbytek projde (v ideálním případě) a je zaznamenán jako vystupující zářivý tok Φ (viz Obrázek 1).



Obrázek 1 Absorpce záření vzorkem

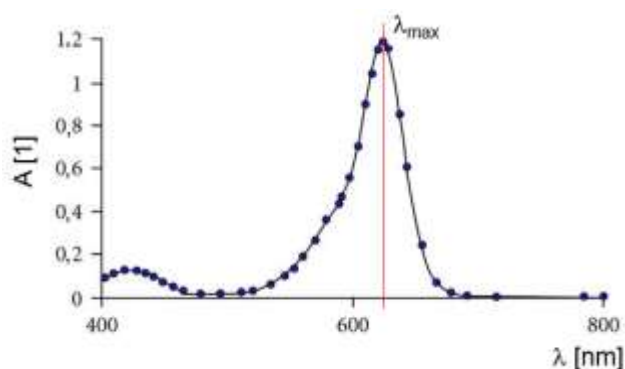
Mírou intenzity absorpce je hodnota transmittance T (propustnost; $T < 1; 0 >$). Ta je definována poměrem toku záření soustavou propuštěného Φ k toku vstupujícímu Φ_0 :

$$T = \Phi / \Phi_0 \quad (2)$$

Absorbance A ($A < 0; \infty >$), je míra absorpce záření a je definována jako:

$$A = -\log T = \log (\Phi_0 / \Phi) \quad (3)$$

Grafickým vyjádřením závislosti absorbance (event. transmittance) na vlnové délce elektromagnetického záření je **absorpční spektrum** (absorpční křivka). Na základě měření absorpčního spektra (viz Obrázek 2) je možné identifikovat látku ve vzorku (kvalitativní analýza); zejména látky organické, s chromoforními skupinami (chromofor je skupina /seskupení atomů v molekule/, která způsobuje absorpci v UV/VIS oblasti), např. konjugovanými dvojnými vazbami, C=O, N=N, N=O, apod. (Holzbecher & Churáček, 1987)



Obrázek 2 Ukázka absorpčního spektra ve VIS oblasti (Absorpční spektrum, ELUC)

Základním vztahem využívaným v kvantitativní spektrometrii je **Lambertův-Beerův zákon**, podle kterého je hodnota absorbance při vlnové délce λ přímo úměrná absorpčnímu molárnímu koeficientu látky v roztoku, koncentraci látky v roztoku a šířce vrstvy vzorku, přes kterou záření prochází. V případě jediné absorbující látky platí:

$$A_{\lambda} = \varepsilon_{\lambda} \cdot l \cdot c = k \cdot c \quad (4)$$

kde A je absorbance látky při vlnové délce λ ; ε_{λ} je molární absorpční koeficient dané látky při vlnové délce λ [$\text{l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$]; l je tloušťka absorpční vrstvy [cm]; c je látková koncentrace dané látky [$\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$]. Z uvedeného vztahu vyplývá, že součin $\varepsilon_{\lambda} \cdot l$ je pro měření stejného analytu při stejné λ a ve stejné kyvetě konstantní a může být nahrazen konstantou k . (Patniak, 2010)

Lambert-Beerův zákon platí pro zředěné roztoky látek, v nichž nedochází k vzájemnému ovlivňování rozpuštěných částic, jimiž prochází monochromatické záření. Pro kvantitativní analýzu je nutné vybrat takovou vlnovou délku, při níž stanovovaná látka silně absorbuje (nejlépe λ_{max} , viz Obrázek 2) a případné interferující látky mají absorpci minimální. (Holzbecher & Churáček, 1987)

Při spektrofotometrickém stanovení (kvantitativní analýza) je možno pracovat metodou přímého srovnání nebo metodou kalibrační křivky, případně metodou standardního přídávku. **Metoda přímého srovnání** využívá standardního roztoku o známé koncentraci, a pak platí:

$$k = A_{st} / c_{st} = A_{vz} / c_{vz} \Rightarrow c_{vz} = (A_{vz} / A_{st}) \cdot c_{st} \quad (5)$$

V praxi většinou nestačí použití roztoku (standardu) o jedné koncentraci, proto se využívá tzv. **metoda kalibrační křivky**. Při tomto postupu je změřena absorbance několika standardů (kalibračních roztoků) o známých koncentracích, při stejné vlnové délce a v téže kyvetě. Z kalibrační křivky ($A = f(c)$), lze ověřit

platnost Lambertova–Beerova zákona. Výsledná závislost by měla být kalibrační přímka procházející počátkem. Tato metoda je použitelná, pokud je stanovována daná látka v jednoduché, snadno napodobitelné matici (např. v pitné vodě). Často je potřeba danou látku stanovit ve složitější matici (např. odpadní vodě nebo biologické matici), a pak může nastat problém s modelovou maticí pro přípravu kalibračních roztoků. V tomto případě je vhodné použít **metodu standardního přídávku**. Při stanovení neznámé koncentrace vzorku (c_{vz}) je změřena absorbance neznámého vzorku (A_{vz}) a následně je koncentrace stanovované látky ve vzorku zvýšena definovaným přídávkem standardu a je změřena odpovídající absorbance roztoku. Stejně jako u metody kalibrační přímky se provádí často více přídávků a koncentrace vzorku se vyhodnocuje pomocí statistických metod (lineární regrese). (Sinica, online)

1.3 Zařízení a příslušenství

Absorpci záření lze měřit na přístrojích, které jsou nazývány jako absorpční spektrometry. Absorpční spektrometr se skládá ze 4 základních částí:

- I. *emisního systému* – tvořeného zdrojem záření se spojitým spektrem v širokém rozmezí λ a dostatečnou energií (pro UV deuteriová nebo vodíková výbojka ($\lambda=180\text{--}360\text{ nm}$), pro VIS oblast wolframová žárovka ($\lambda=360\text{--}3000\text{ nm}$));
- II. *disperzního systému* – monochromátoru – tvořeného vstupní a výstupní štěrbinou, zrcadlovou nebo čočkovou soustavou a rozkladným prvkem (reflexní mřížka, hranol); umožňuje ze spojitého záření postupně izolovat svazek paprsků s úzkým intervalem zvolených λ ;
- III. *absorpčního systému* – roztokem v kyvetě (pro UV křemenné, pro VIS oblast skleněné nebo plastové);
- IV. *detekčního systému* – tvořeného z detektoru záření (fotonka, fotonásobič, ad.) a elektronickým zařízením na zpracování jeho odezvy. (Holzbecher & Churáček, 1987)



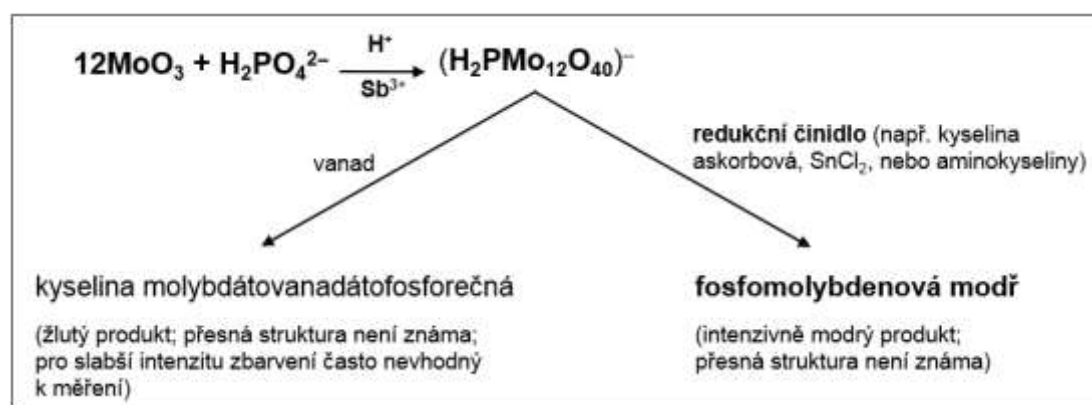
Obrázek 3 Schéma jednopaprskového (vlevo) a dvoupaprskového spektrofotometru (Evans, 2015)

Konstrukčně se spektrometry dělí na jednopaprskové a dvoupaprskové (viz Obrázek 3). V naší laboratoři používaný **spektrální fotometr THERMO**

SPECTRONIC Unicam UV 500 je dvoupaprskový spektrofotometr pracující v oblasti vlnových délek 190 – 900 nm.

1.4 Princip fotometrického stanovení rozpuštěných anorganických orthofosforečnanů

Orthofosforečnany (PO_4^{3-} , HPO_4^{2-} , H_2PO_4^- , H_3PO_4) reagují v prostředí kyseliny sírové za katalýzy antimonitých iontů s molybdenanem amonným. Vzniká kyselina molybdátofosforečná, která redukcí kyselinou askorbovou přechází na fosfomolybdenanovou modř (viz Obrázek 4). Intenzita zbarvení je přímo úměrná koncentraci fosfátů (fosforečnanů) ve vzorku. (Patniak, 2010)



Obrázek 4 Schématické znázornění klíčových reakčních kroků – fotometrické stanovení PO_4^{3-} (Patniak, 2010)

1.5 Pokyny k vypracování

1.5.1 Vzorky vody

Destilovaná voda, pitná vody, povrchová voda, minerální (event. mořská) voda.
Student si sebou do laboratoří přinese vzorky povrchové a minerální (event. mořské) vody!

1.5.2 Použitá činidla (reagencie)

1. *Kyselina sírová; roztok $c(\text{H}_2\text{SO}_4) \approx 9 \text{ mol/l}$;*
 - připraven smícháním 500 ml destilované vody a 500 ml koncentrované H_2SO_4 ($\rho = 1,84 \text{ g/l}$), za stálého míchání a chlazení, v kádince o objemu 2 000 ml.
2. *Kyselina askorbová; roztok 10%;*
 - připraven rozpuštěním 10 g kyseliny askorbové v 90 ml destilované vody. Roztok je možné uchovávat v chladu v láhvi z hnědého skla; je stálý asi 2 týdny.

3. *Kyselý roztok molybdenanu amonného;*
 - připraven smícháním 300 ml kyseliny sírové o $c(\text{H}_2\text{SO}_4) \approx 9 \text{ mol/l}$ (čínidlo 1), roztoku molybdenanu (připraveného rozpuštěním 13 g molybdenanu amonného $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ve 100 ml destilované vody) a roztoku vinanu (připraveného rozpuštěním 0,35 g vinanu antimonylodraskelného $\text{K}(\text{SbO})\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$ (TOXICKÁ LÁTKA) ve 100 ml destilované vody).
 - roztok je možné uchovávat v lednici v láhvi z hnědého skla; je stálý asi 2 měsíce.
4. *Zásobní roztok standardu KH_2PO_4 ; $\rho(\text{PO}_4^{3-}) = 500 \text{ mg.l}^{-1}$;*
 - připraven rozpuštěním 0,7165 g KH_2PO_4 (předem 2 hodiny vysušeného při 105°C) v destilované vodě, v odměrné baňce o objemu 1 000 ml.

1.5.3 Příprava a měření kalibračních roztoků (standardů) PO_4^{3-}

Používané laboratorní nádobí musí být důkladně vyčištěno bez stop čisticích prostředků!

Příprava pracovního roztoku

Ze zásobního roztoku KH_2PO_4 (čínidlo 4) si připravte pracovní roztok o vhodné koncentraci.

Příprava kalibračních roztoků (standardů) orthofosforečnanů o $c = 0 - 1 \text{ mg.l}^{-1}$

Pro přípravu kalibrační řady použijte pracovní roztok o koncentraci, kterou jste si zvolili (diskutujte s vyučujícím). Na základě koncentrace pracovního roztoku si vypočítejte kalibrační řadu o $c(\text{KH}_2\text{PO}_4) = 0 - 1 \text{ mg.l}^{-1}$ (viz Tabulka 3); k přípravě kalibračních standardů použijte odměrné baňky o objemu 50 ml.

CKAL. ROZTOKU [mg.l^{-1}]	VPRAC. ROZTOKU [ml]	V _{H2O} [ml]
0,0		
0,2		
0,4		
0,6		
0,8		
1,0		

Tabulka 3 Příprava 50 ml kalibračních standardů o $c(\text{KH}_2\text{PO}_4) = 0 - 1 \text{ mg.l}^{-1}$

Z připravených kalibračních roztoků odpipetujte 10 ml roztoku, tak aby Vám zůstalo v odměrné baňce 40 ml standardu. Přidejte 1 ml kyseliny askorbové

(činidlo 2) a 2 ml kyselého roztoku molybdenanu (činidlo 3). Roztoky doplňte destilovanou vodou po rysku, promíchejte a nechte 15 minut stát. Při měření postupujte dle návodu přiloženého u přístroje. Kalibrační roztoky proměřte na spektrofotometru při vlnové délce 700 nm, v kyvetách s optickou dráhou 1 cm.

1.5.4 Vlastní stanovení PO_4^{3-} ve vzorcích vod (pitné, povrchové, minerální)

Do odměrné baňky o objemu 50 ml odpipetujte 40 ml vzorku vody (povrchové, pitné, minerální, popř. mořské a destilované /slepý vzorek/). Přidejte 1 ml kyseliny askorbové (činidlo 2) a 2 ml kyselého roztoku molybdenanu (činidlo 3). Baňky doplňte destilovanou vodou po rysku, promíchejte a nechte 15 min stát. Poté proměřte na spektrofotometru při vlnové délce 700 nm, v kyvetách s optickou dráhou 1 cm. (Ultrafialová a viditelná spektrometrie, VŠB)

1.6 Vyhodnocení výsledků

- a) Do protokolu uveďte všechny potřebné výpočty (přípravy roztoků), naměřené hodnoty absorbancí, kalibrační křivku a vypočtené koncentrace orthofosforečnanů ve vzorcích vod (uveďte v jednotkách mg.l^{-1}).
- b) Uveďte, jaký je stanoven limit koncentrace fosforečnanů pro pitnou vodu, a diskutujte s vámi naměřenými výsledky.

2 Stanovení zákalu ve vzorcích pitné, povrchové a minerální vody

2.1 Úkol

Stanovte zákal v předložených vzorcích vod (pitné, povrchové, minerální).

2.2 Teoretický úvod

2.2.1 Zákal

Snížení průhlednosti vody (zákal) je sumární ukazatel obsahu nerozpuštěných i koloidně rozpuštěných anorganických i organických látek ve vodě (např. písek, bahno, řasy či jiné mikroorganismy, oxidy železa, manganu, jílu) a je důležitým kritériem jakosti vody v mnoha aplikacích.

Vysoký zákal tvoří vodu nepitnou z estetických důvodů, snižuje účinnost případné dezinfekce a jeho náhlá změna je významným signálem kontaminace povrchovou vodou.

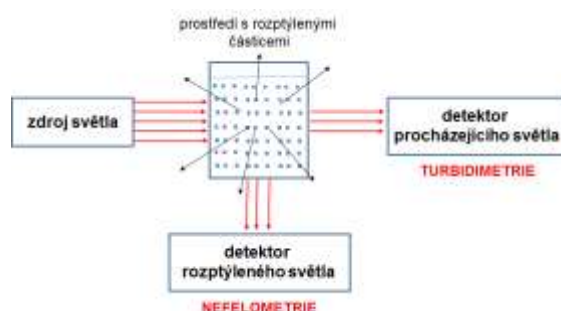
V mnoha případech je měřená hodnota „zákalu“, parametrem se silnou vypovídací schopností – to platí při sledování kvality např. pro výrobu nápojů, pro úpravu pitných a odpadních vod, a pro další oblasti chemie (galvanovny, petrochemický průmysl). (Základní ukazatele kvality pitné vody a co dělat, pokud voda není v pořádku, Sledování kvality měřením zákalu)

2.2.2 Optické analytické metody vyžívané pro měření zákalu (turbidimetrie, nefelometrie, spektrometrie)

Při průchodu světelných paprsků kapalinou, obsahující jemně rozptýlené nerozpuštěné částice (suspenze, koloidní disperze), dochází k rozptylu světla do všech směrů. Intenzita procházejícího světla klesá v závislosti na koncentraci suspendovaných částic, a lze ji zjišťovat pomocí:

TURBIDIMETRIE – měření světelného toku po průchodu prostředím ve směru dopadajícího světelného toku ze zdroje;

NEFELOMETRIE – měření světelného toku, který je částicemi odražen kolmo pod určitým úhlem na směr dopadajícího paprsku; viz Obrázek 5.



Obrázek 5 Rozdělení metod pro měření zákalu kapalin (Kadlec, 2018)

Intenzita rozptýleného světla závisí na:

- a) koncentraci částic ve vzorku – což je měřený parametr;
- b) úhlu rozptylu;
- c) vlnové délce použitého světla – pro částice o průměru menším než $1/10$ vlnové délky je rozptyl stejný ve všech směrech (s rostoucí velikostí částic převládá rozptyl ve směru šíření světla);
- d) vlastnostech nerozpustných částic v kapalině:
 - velikosti částic – s rostoucí velikostí částic až do $1\ \mu\text{m}$ roste i intenzita rozptýleného světla;
 - tvaru částic (koule, zrno, vločka, vlákno či kombinace různých tvarů) – mají za následek změny intenzity rozptýleného světla;
 - barvě částic – příčina větší absorpce světla a následného poklesu intenzity rozptýleného světla;
 - indexu lomu materiálu částic – ovlivňuje úhel, ve kterém dochází k rozptylu světla. (Kadlec, 2018)

Na částicích dochází k rozptylu světla a částečně i jeho absorpci. Prošlé záření má vždy nižší intenzitu než záření dopadající na kyvetu ze světelného zdroje. V turbidimetrii se měření provádí v přímém směru, v ose světelného paprsku zdroje jako u fotometrických postupů. Zvláště ve zředěných roztocích (disperzích) je přechod mezi absorpční fotometrií a turbidimetrií neostrý, a proto lze měřenou veličinu T_b (turbidance), jíž odpovídá u klasické molekulové absorpční spektrofotometrie A (absorbance), vyjádřit vztahem:

$$A = T_b = (\varepsilon + \tau) \cdot l \cdot c \quad (6)$$

kde ε je molární absorpční koeficient; τ je turbiditní koeficient; l je tloušťka měřicí kyvety; c je koncentrace.

Závislost turbidance (absorbance) na koncentraci analytu je obecně nelineární, jde většinou o polynom 2. řádu. V případě vhodně zvolených podmínek je možno závislost aproximovat proložením přímkou. Na tvorbu a velikost částic má výrazný vliv teplota.

K turbidimetrickému měření zákalu se obvykle využívají klasické absorpční fotometry a automatické analyzátory pracující metodou absorpční fotometrie. (Turbidimetrie a nefelometrie, UPOL)

2.3 Zařízení a příslušenství

V laboratoři budete používat **spektrální fotometr THERMO SPECTRONIC Unicam UV 500** – jde o dvoupaprskový spektrofotometr s pevnou šířkou štěrby (1,5 nm), pracující v oblasti vlnových délek 190 – 900 nm. (User manual Local control software Unicam UV series, 2000)

2.4 Princip stanovení

Stanovení zákalu se provádí fotometricky porovnáním vzorku vody s koloidním roztokem formazínu o různých koncentracích. Hodnota zákalu pak udává, že měřená látka pohlcuje a rozptyluje stejné množství světla jako určitá koncentrace standardního roztoku formazínu.

2.5 Pokyny k vypracování

2.5.1 Použitá činidla (reagencie)

- Síran hydrazínu (TOXICKÁ LÁTKA, POTENCIÁLNÍ KARCINOGEN),
- hexamethylentetramin (urotropin).

2.5.2 Příprava roztoků

Formazín – zásobní roztok:

Do odměrné baňky o objemu 500 ml bylo v 25 ml destilované vody rozpuštěno 2,5 g hexamethylentetraminu. Následně byl přidán roztok síranu hydrazínu, připravený rozpuštěním 0,25 g této látky v 25 ml destilované vody. Směs byla promíchána a ponechána 24 hodin při pokojové teplotě, a poté byla doplněna po rysku. Takto připravená suspenze je stálá zhruba 1 měsíc a před použitím je třeba ji dobře promíchat. ((Spektrofotometrické stanovení zákalu, VŠB, TUO)

Formazín je produkt reakce síranu hydrazínu a hexamethylentetraminu. Zákal jedné formazínové jednotky (1 ZF) vznikne reakcí 1,25 mg síranu hydrazínu a 12,5 mg hexamethylentetraminu v 1 litru vody. (Stanovení zákalu, Environmentální servis)

Vypočítejte, jaký je zákal (? ZF) vámi používaného zásobního roztoku formazínu.

Formazín – pracovní roztok:

Ze zásobního roztoku formazínu připravte pracovní roztok; zákal 100 ZF.

Formazín – kalibrační roztoky (standardy), zákal 0 – 40 ZF:

K přípravě kalibračních standardů (viz Tabulka 4) použijte odměrné baňky o objemu 100 ml. Pro přípravu kalibrační řady použijte pracovní roztok (zákal 100 ZF).

CKAL. ROZTOKU [ZF]	VPRAC. ROZTOKU [ml]	V _{H2O} [ml]
0		
1		
2		
5		
10		
CKAL. ROZTOKU [ZF]	VPRAC. ROZTOKU [ml]	V _{H2O} [ml]
20		
30		
40		

Tabulka 4 Příprava 100 ml kalibračních standardů formazínu; zákal 0 – 40 ZF

2.5.3 Volba vhodné vlnové délky (λ) pro měření

Z připravené kalibrační řady vyberte standardy 0 ZF (blank; slepý pokus) a 40 ZF. U nejvíce koncentrovaného roztoku (40 ZF) proměřte absorpční spektrum (závislost absorbance (A) na vlnové délce (λ)), a to v okolí vlnových délek 340 nm (UV), 560 nm (VIS) a 860 nm (IČ). Při měření postupujte dle návodu přiloženého u přístroje.

Získané výsledky diskutujte s vyučujícím, a na základě toho vyberte vhodnou vlnovou délku pro měření kalibrační řady a neznámých vzorků vody.

2.5.4 Kalibrace přístroje (spektrofotometru)

Do kyvet s optickou dráhou 1 cm postupně nalévejte jednotlivé kalibrační roztoky (od 0 do 40 ZF). Proměřte absorbanci všech kalibračních roztoků; jako blank (slepý pokus) použijte roztok 0 ZF. Kyvetu vložte do přístroje a jednotlivé roztoky proměřte při vámi zvolené vlnové délce (viz 2.5.3). Postupujte dle návodu přiloženého u přístroje.

2.5.5 Vlastní stanovení zákalu ve vzorcích vod (pitné, povrchové a minerální)

Při měření postupujte obdobným způsobem, kterým jste postupovali při měření kalibračních roztoků. Dobře protřepaný vzorek (během měření nesmí suspenze sedimentovat) nalijte do kyvety s optickou dráhou 1 cm a měřte při stejné vlnové délce, při jaké jste proměřovali kalibrační roztoky. Proveďte slepé měření s destilovanou vodou a následně proměřte všechny předložené vzorky vod (pitné, povrchové a minerální).

2.6 Vyhodnocení výsledků

Sestavte kalibrační přímku ($A=f(c)$) a z ní následně odečtěte hodnoty zákalu v jednotlivých vzorcích vod.

Do protokolu:

- a) uveďte všechny výpočty (příprava roztoků, výpočet zákalu zásobního roztoku);
- b) dodejte graficky zpracovaná absorpční spektra a diskutujte volbu vámi vybrané vlnové délky pro měření a také případné výhody a nevýhody měření v daných spektrálních oblastech;
- c) výsledky stanovení zákalu (ZF) ve vzorcích vod uveďte na dvě platné číslice;
- d) uveďte maximální hodnotu zákalu povolenou pro pitné vody a diskutujte s vámi naměřenými výsledky.

3 Stanovení standardních těžkých kovů v kapalných vzorcích pomocí atomové absorpční spektrometrie

3.1 Úkol

Stanovte obsah vybraných těžkých kovů (Ni, Cu, Zn, Pb, Cr), metodou kalibrační přímky i standardních přídavek, v předloženém vzorku.

3.2 Teoretický úvod

3.2.1 Těžké kovy

Existuje řada definic těžkých kovů – některé je vymezují podle hustoty, jiné podle atomové hmotnosti nebo protonového čísla, či podle toxicity. Protokol o těžkých kovech k Úmluvě o dálkovém znečišťování přesahujícím hranice států je definuje jako kovy (nebo v jistých případech polokovy), které jsou stabilní a mají měrnou hmotnost vyšší než $4,5 \text{ g.cm}^{-3}$. Do Protokolu jsou zahrnuty i jejich sloučeniny. Těžké kovy mají schopnost putovat atmosférou na velké vzdálenosti (dálkový transport), ukládají se v rostlinách i živočiších (biokumulace) a hromadí se v potravních řetězcích (bioobohacování). (Protokol o těžkých kovech k úmluvě o dálkovém znečišťování ovzduší přesahujícím hranice států, 2011)

Vybrané těžké kovy (As, Cr, Cd, Cu, Ni, Pb, Hg, Zn), jejich základní charakteristiku, zdroje úniků, dopady na životní prostředí a zdraví člověka sumarizuje Tabulka 14 v Příloze.

3.2.2 Atomová absorpční spektrometrie (AAS); princip metody

Atomová absorpční spektrometrie (AAS) je jednou z nejrozšířenějších analytických metod. Tato metoda je vhodná pro analýzu více než 60 prvků, převážně kovových. Pro svou vysokou citlivost a selektivitu se tato spektrometrická analytická metoda využívá pro stanovení obsahu stopových i významných koncentrací jednotlivých kovů v environmentálních vzorcích.

AAS je metoda založená na specifické absorpci monochromatického záření volnými atomy sledovaného prvku v základním elektronovém stavu. Energie pohlceného fotonu odpovídá přechodu valenčního elektronu ze základní energetické hladiny na některou vyšší. Tato metoda využívá tzv. Kirchhoffova zákona (1860), který říká, že volné atomy v plynném stavu jsou schopny absorbovat záření těch vlnových délek, které by kdyby byly excitovány samy vyzařovaly. (Holzbecher & Churáček, 1987)

Záření ze zdroje prochází absorpčním plynným prostředím, které je nejjednodušeji realizováno plamenem. Vzorek s příslušným stanovovaným iontem je zmlžen a vzniklý aerosol je přiváděn do plamene. Zde je odpařeno rozpouštědlo a vznikají volné atomy schopné absorbovat záření o těch energiích, které splňují Bohrovu kvantovou podmínku:

$$h\nu = \frac{hc}{\lambda} = E_p - E_q \quad (7)$$

kde E_p je energie excitovaného stavu atomů, E_q je energie základního stavu, c je rychlost světla, λ je vlnová délka záření a h je Planckova konstanta.

Z absorpčního prostředí vstupuje záření do monochromátoru, kde je izolována vlnová délka vhodné rezonanční čáry (charakteristická pro daný prvek /kov/), na které se sleduje absorpce. Odečítaným signálem na stupnici je zpravidla absorbance, definována jako:

$$A = \log \frac{\Phi_0}{\Phi} = 2,303\chi nd \quad (8)$$

kde Φ_0 je intenzita rezonanční čáry před a Φ po průchodu absorbující vrstvou, χ je atomový absorpční koeficient charakteristický pro dané záření (koeficient úměrnosti), n je počet volných atomů prvku v jednotce objemu a d je délka plamene (tloušťka absorbující vrstvy). Při tom platí, že počet volných atomů n je úměrný koncentraci stanovované složky c ve vzorku:

$$n = pc \quad (9)$$

kde p je tzv. koeficient atomizace. Pro zeslabení záření by tedy měl platit zjednodušený vztah, tzv. Bouguerův-Lambert-Beerův zákon pro AAS:

$$A = \log \frac{\Phi_0}{\Phi} = kc \quad (10)$$

Tento vztah ale nikdy neplatí v širokém koncentračním rozsahu. Je to omezeno zejména vztahem (9), jehož platnost do značné míry závisí na teplotě plamene (příliš teplý plamen vede k ionizaci; studeným plamenem není vzorek dostatečně atomizován). Uplatňuje se také tzv. maticový efekt (přítomnost dalších látek ve vzorku) či režim transportu aerosolu do plamene a řada dalších vlivů. (Atomová absorpční spektrometrie s plamenovou atomizací, UP)

3.3 Zařízení a příslušenství

Základní konstrukční prvky atomového absorpčního spektrometru znázorňuje Obrázek 6.



Obrázek 6 Blokové schéma atomového absorpčního spektrometru

I) Zdroj záření

Jako zdroj primárního záření jsou v AAS využívány:

Výbojka s dutou katodou, plněná neonem nebo argonem, která emituje čárové spektrum prvku, z něhož je dutá katoda zhotovena.

Při stejnosměrném napětí z vnějšího zdroje začne probíhat v lampě doutnavý výboj při pracovním proudu několika mA. Spektrum vzniká tak, že ionizované atomy vzácného plynu bombardují v dutině katody kov a ten se rozprašuje na atomy, které se srážkami excitují a při deexcitaci vysílají charakteristické spektrum. Toto spektrum obsahuje intenzivní rezonanční čáry, na nichž je sledována absorpce. Záření vysílané výbojkou je třeba modulovat (elektricky, mechanicky přerušovačem). Modulací je umožněno měřit jen zářivé toky výbojky, nikoli nemodulované záření plamene (atomizačního prostředí). V současné době jsou vyráběny výbojky s dutou katodou pro více než 60 prvků. Pro prvky, které mají podobné fyzikální vlastnosti a přibližně stejně se i katodicky rozprašují, je možné vyrábět výbojky s více prvkovou katodou, která je v tomto případě zhotovena sintrací směsi dvou až šesti druhů práškových kovů. (Atomová absorpční spektrometrie s plamenovou atomizací, UP)

Bezelektrodová vysokofrekvenční výbojka je tvořena skleněnou baňkou s křemenným okénkem plněnou vhodným množstvím prvku ve směsi jako kov a těkavá sloučenina (např. halogenid kovu) s inertním plynem. Tyto výbojky jsou umístěné v cívce radiofrekvenčního generátoru nebo v rezonanční dutině mikrovlnného generátoru. Emitují velmi úzké čáry s intenzitou až o řád vyšší než výbojky s dutou katodou, vyžadují zvláštní napájecí zdroj a potřebují delší dobu na ustálení emitovaného záření.

Laditelný barviový laser je ideálním zdrojem primárního záření pro vlnové délky nad 300 nm. Jeho záření je vysoce monochromatické, dokonale koherentní, dosahuje vysoké hustoty zářivého toku. Jeho nevýhodou jsou však vysoké pořizovací náklady. (Milde, 2017)

Xenonová oblouková lampa poskytuje intenzivní světelné záření (v širokém rozsahu vlnových délek) pomocí elektrického oblouku. Skládá se z oválné baňky vyrobené z křemenného skla, ve které jsou proti sobě umístěné katoda a anoda v atmosféře xenonu. (Gottwaldová, 2019)

II) Atomizátor – absorpční prostředí

Jako atomizátor se označuje systém, který je schopen s dostatečnou účinností přeměnit stanovovaný prvek na atomární páru, tj. volné atomy v základním nebo excitovaném stavu. Absorpční prostředí tedy musí mít teplotu alespoň 2 000 – 3 000 K. Podle způsobu atomizace rozlišujeme plamenovou AAS (F–AAS) nebo AAS s elektrotermickou atomizací (ETA–AAS).

Nejčastěji používaným atomizátorem je chemický plamen – k hoření dochází chemickou reakcí mezi palivem (např. acetylen, propan-butan, vodík) a oxidovadlem (např. vzduch, oxid dusný). Vlastnosti plamene se liší podle poměru paliva a oxidovadla v palivové směsi. Každý atomový absorpční spektrometr musí být vybaven regulací a měřením průtoku paliva a oxidovadla. K zavádění vzorků do plamene se používá pneumatických zmlžovačů, v nichž se nasávaný roztok rozprašuje na aerosol. (Atomová absorpční spektrometrie s plamenovou atomizací, UP)

III) *Monochromátor*

Za atomizátorem (plamenem) následuje mřížkový monochromátor, který slouží k izolaci záření vhodné vlnové délky. Natáčením mřížky se nastavuje vlnová délka rezonanční čáry na maximum propustnosti. Běžný monochromátor mívá pomocí vstupní a výstupní štěrbin regulovatelnou šířku spektrálního intervalu (0,1 – 2 nm). Šířka spektrálního intervalu se volí tak, aby spolu s rezonančním zářením (šířka profilu rezonanční čáry je ~0,001 nm) nedopadalo na detektor neabsorbující (balastní) záření čar blízkých vlnových délek. (Komínková & Mestek, 2019)

IV) *Detektor záření*

Těsně za výstupní štěrbinu monochromátoru se zařazuje detektor. Častým bývá fotonásobič s fotokatodou, jejíž citlivost je dostačující pro sledovanou oblast spektra (190 – 900 nm). Fotonásobič je zařízení, které přeměňuje velmi slabý záblesk elektromagnetického záření na měřitelný elektrický proud; získaný fotoproud se zesiluje vkládáním napětí na dynody násobiče elektronů, ale také dalším zesilovačem. V AAS se používají fázově citlivé zesilovače laděné na frekvenci modulačního záření výbojky. (Komínková & Mestek, 2019)

Novější přístroje využívají CCD detektor (charge coupled device (CCD) array detector) – jde o zařízení, které přeměňuje energii dopadajícího světla na energii elektrického signálu. (Welz et al., 2003)

V laboratoři budete pracovat s **atomovým absorpčním spektrometrem contrAA 800** (Analytic Jena AG, Německo). Jde o přístroj s kontinuálním zdrojem záření (xenonová oblouková lampa, umožňující multielementární analýzu bez nutnosti výměny lampy; pracuje v oblasti $\lambda = 185 - 900$ nm), monochromátorem s vysokým rozlišením (Echelle monochromátor) a plošným CCD detektorem. Atomový absorpční spektrometr contrAA 800 je plně řízen osobním počítačem prostřednictvím firemního software.

3.4 Pokyny k vypracování

3.4.1 Neznámé vzorky

V odměrné baňce předložené (neznámé) vzorky, obsahující různé koncentrace stanovovaných kovů, doplňte po rysku vodou a důkladně promíchejte.

3.4.2 Použitá činidla (reagencie)

$\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (p.a.); $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (p.a.); $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (p.a.); $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (p.a.); $\text{Cr}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (p.a.)

3.4.3 Příprava roztoků (kalibračních standardů)

Vyučující Vám vybere kovy, které budete na daném laboratorním cvičení stanovovat.

METODA KALIBRAČNÍ PŘÍMKY používá vnějších standardů, jež jsou využívány nezávisle na vlastním analyzovaném vzorku. Kalibrace pomocí vnějších standardů se odehrává před začátkem vlastních měření neznámého vzorku. (Pohanka, 2010)

Z vypočteného a na analytických vahách odváženého množství daných dusičnanů kovů (viz Tabulka 5) připravte základní zásobní roztoky těchto kovů, jež vám byly zadány (100 ml roztoku, $c_m = 0,1 \text{ mg kovu.ml}^{-1}$).

reagencie	navážka [mg]	koncentrace [mg.ml ⁻¹]	
$\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$		Cu	0,1
$\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$		Ni	0,1
$\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$		Pb	0,1
$\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$		Zn	0,1
$\text{Cr}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$		Cr	0,1

Tabulka 5 Příprava 100 ml základních zásobních roztoků kovů

Ze základních zásobních roztoků připravte 250 ml pracovního směsného roztoku o koncentraci jednotlivých kovů (těch, které vám byly zadány) **20 mg.l^{-1}** .

Následně si z pracovního směsného roztoku připravte 100 ml kalibračních roztoků (standardů, Tabulka 6) o koncentraci: **1, 2, 4, 6, 8 $\mu\text{g kovu.ml}^{-1}$** .

CKAL. ROZTOKU [μg kovu.ml ⁻¹]	VPRAC. SMĚS. ROZTOKU [ml]	V _{H2O} [ml]
1		
2		
4		
6		
8		

Tabulka 6 Příprava 100 ml kalibračních roztoků (standardů) kovů

METODA STANDARDNÍCH PŘÍDAVKŮ využívá definovaného přídávku standardu do analyzovaného vzorku a následné porovnání změněného signálu se signálem původním. Vlastní analýza i kalibrace probíhají prakticky ve stejném čase. (Pohanka, 2010)

Závislost signálu na obsahu přidávaných standardů ve vzorku je pak lineární a vytíná na ose x záporný úsek, jehož absolutní hodnota je rovna obsahu složky ve vzorku bez přídávku standardu.

Odpipetujte 4 alikvotní podíly vzorku (25 ml) a přidejte známé množství pracovního směsného roztoku (viz Tabulka 7) o koncentraci 20 mg.l⁻¹, jež jste si připravili pro metodu kalibrační přímky.

Odměrné baňky doplňte po rysku deionizovanou vodou do celkového objemu 50 ml, roztoky promíchejte a změřte jejich absorbanci.

Roztok č.	V _{vzorek} [ml]	V _{standard} [ml]	V _{H2O} [ml]	C _{teoretická} [mg.l ⁻¹]
VZ	25	0	25	–
1	25	5	20	
2	25	10	15	
3	25	20	5	

Tabulka 7 Příprava 50 ml roztoků – metoda standardních přídávků

3.4.4 Vytvoření aplikace pro stanovení vybraných kovů, parametry analýzy, příprava sekvence měření, optimalizace podmínek měření

Nejprve si vytvořte novou měřicí aplikaci (modul Method).

Postupujte dle pokynů vyučujícího, a návodu přiloženého u přístroje.

Údaje pro vytvoření měřicí aplikace jsou následující:

INSTRUMENT

Lamp Current		10 mA
Wavelength	Cu	324.8 nm
	Ni	232.0 nm
	Pb	217.0 nm
	Zn	213.9 nm
	Cr	357.9 nm
Slit Width		0.5 nm
Slit Height		normal
Background Correction		no
Measurement Mode		Integration
Read Time		3 s
Time Constant		0.4 ms
Replicates		5

<i>CALIBRATION</i>	Linear. Least
Calibration Mode	Squares
Conc. Units	$\mu\text{g.ml}^{-1}$
Conc. Decimal Places	2
Zero Before Calibration	yes
Zero Between Samples	yes

Před vlastním měřením si připravte sekvenci měření (modul Sequence). Zadejte počet kalibračních roztoků a blanku; rovněž zadejte počet měřených vzorků.

Po nastavení metody a sekvence měření následuje optimalizace podmínek měření. U atomového absorpčního spektrometru contrAA 800 je postup optimalizace prováděn automaticky – přístroj si samočinně hledá polohu hořáku (4 – 16 mm) a optimální složení plamene (průtok acetyleny 40 – 120 l.h⁻¹), tak aby hodnota měřené absorpce byla maximální.

3.4.5 Měření

Proměřte všechny připravené roztoky – nejprve proměřte standardy a vzorky připravené pro metodu kalibrační přímky. Pokud je naměřená absorpce vzorku vyšší než hodnota absorpce nejkoncentrovanějšího kalibračního standardu, je nutné vzorek vhodně naředit a měření opakovat.

Poté dle pokynů vyučujícího změňte nastavení přístroje (modul Method, „calibration mode“ změňte na „method of additions“ (3 standardy); v modulu Sequence zadejte 1 vzorek) a proměřte připravené roztoky (č. VZ – 3; metoda standardních přídatků). Každý vzorek proměřte 3x.

3.5 Vyhodnocení výsledků

Zaznamenejte všechna naměřená data (Tabulka 8 a 9), abyste následně mohly sestavit kalibrační přímky a spočítat koncentrace stanovovaných kovů v neznámém vzorku (jak metodou kalibrační přímky, tak metodou vícenásobného standardního přídatku).

Do protokolu:

- uved'te optimální podmínky, při kterých bylo měření realizováno (tj. vlnová délka, poloha hořáku, průtoky plynů, ad.);
- nezapomeňte napsat číslo předloženého (neznámého) vzorku;
- uved'te všechny navážky potřebných chemikálií; dále pak všechny výpočty (příprava roztoků, chyba měření), případná ředění vzorku;
- přiložte graficky zpracovaná data (kalibrační přímky), uved'te rovnice kalibračních přímek a hodnoty koeficientů determinace (R^2);
- porovnejte výsledky získané metodou kalibrační přímky a metodou standardních přídatků, výsledky diskutujte.

CKAL. ROZTOKU [μg kovu.ml ⁻¹]	A ₁ [1]	A ₂ [1]	A ₃ [1]	φA [1]	S _R
1					
2					
4					
6					
8					
Zjištěná koncentrace kovů [mg.l ⁻¹] v neznámém (předloženém) vzorku: Cu Ni Pb Zn Cr					

Tabulka 8 Metoda kalibrační přímky – naměřené hodnoty a jejich zpracování

Roztok č.	A₁ [1]	A₂ [1]	A₃ [1]	φA [1]	S_R	Cskutečná [mg.l⁻¹]
VZ						*
1						
2						
3						
* Zjištěná koncentrace kovů [mg.l ⁻¹] v neznámém (předloženém) vzorku: Cu Ni Pb Zn Cr						

Tabulka 9 Metoda standardních přídavků – naměřené hodnoty a jejich zpracování.

4 Stanovení rtuti ve vzorcích ryb na rtuťovém analyzátoru AMA254

4.1 Úkol

Stanovte obsah rtuti ve vzorku rybího masa na rtuťovém analyzátoru AMA 254.

4.2 Teoretický úvod

Většina rtuti (Hg) v prostředí se vyskytuje ve formě kovové rtuti nebo anorganických sloučenin. Kovová rtuť je jako jediný kov za normálních podmínek kapalná (teplota tání: $-38,83\text{ }^{\circ}\text{C}$; teplota varu: $357\text{ }^{\circ}\text{C}$), dochází však k částečnému odpařování. Ve vzduchu může docházet k přeměnám na jiné formy Hg a může být transportována na velké vzdálenosti. Některé mikroorganismy (např. bakterie) mohou přeměňovat anorganickou Hg na organické sloučeniny (biomethylace). Rtuť setrvává v prostředí po dlouhou dobu, zvláště pokud je navázána na malé půdní částice. Tyto částice obvykle zůstávají na povrchu sedimentů a půd; ve vodním prostředí se usazují na dně. Organická rtuť se může hromadit v potravních řetězcích (bioakumulace) – nejvyšší obsahy organické rtuti se nacházejí v těle mořských ryb.

Rtuť se vyskytuje ve všech složkách životního prostředí. Přírodními zdroji Hg v prostředí je zvětrávání přírodních ložisek a sopečné výbuchy. Většina emisí Hg je antropogenního původu – mezi nejvýznamnější zdroje patří: spalování fosilních paliv a odpadu, emise spojené s těžbou a zpracováním rud s obsahem Hg, používání hnojiv a fungicidů s obsahem Hg.

Rtuť je jeden z nejtoxičtějších prvků a toxicita jednotlivých sloučenin Hg je závislá především na jejich rozpustnosti ve vodě. Z tohoto pohledu jsou nejvíce rizikové sloučeniny Hg^{2+} . Toxicita elementární rtuti (Hg^0) je prakticky nulová, protože obtížně vniká do tkání/organismu; mnohem škodlivější jsou její páry. Zvláště nebezpečné jsou organokovové sloučeniny, které se mohou do živých tkání dostat poměrně snadno, např. pouhým stykem s pokožkou. Nejčastěji uváděným příkladem organokovové sloučeniny Hg je dimethylrtuť – známá svou neurotoxicitou (nemoc Minamata) a teratogenitou. Rtuť je kumulativním jedem, z organismu se vylučuje jen velmi pozvolna – koncentruje se především v ledvinách (v menší míře v játrech a slezině). (Ohlašované látky – Rtuť a sloučeniny, IRZ)

4.3 Zařízení a příslušenství

Advanced mercury analyzer AMA 254 je jednoúčelový atomový absorpční spektrofotometr, který se využívá pro stanovení celkového obsahu Hg v pevných a kapalných vzorcích bez potřeby předchozí úpravy vzorku (mineralizace, apod.). Využitím techniky generování par kovové rtuti s následným zachycením

a nabohacením na zlatém amalgamátoru se dosahuje mimořádně vysoké citlivosti stanovení a nezávislosti výsledku stanovení na matici vzorku.

Přístroj AMA 254 je vhodný pro stanovení Hg v nejrůznějších maticích, např. ve vodách (pitných, srážkových, odpadních), v biologickém materiálu (krevním séru, vlasech, rybách), případně v nejrůznějších geomateriálech jako jsou půdy nebo horniny. (Analyzátor rtuti (Hg) AMA 254)

4.4 Princip stanovení

Analyzátor AMA využívá principu generování par kovové Hg. Vzorek o známé navážce (či objemu) je umístěn na spalovací lodičku a povel z řídicího počítače je zaveden do spalovací trubice. Řízeným ohřevem spalovací pece je vzorek vysušen a poté spálen (v případě nehořlavého vzorku je Hg ze vzorku ohřevem uvolněna). Rozkladné produkty procházejí přes katalyzátor, kde je dokončena jejich oxidace a jsou zachyceny látky kyselé povahy (halogeny, oxidy síry, ad.). Rozkladné produkty jsou dále vedeny přes zlatý amalgamátor, kde je selektivně zachycena Hg. Protože rozkladné produkty obvykle obsahují vodní páru, je celá plynová cesta až po výstup z bloku měřících kyvet vyhřívána na 120 °C, aby se zabránilo kondenzaci vody. Po dokončení rozkladu vzorku a stabilizaci teploty je změřeno zachycené množství Hg. Zdrojem záření je rtuťová výbojka a je měřena absorpce charakteristické čáry rtuti atomy Hg v plynném stavu při vlnové délce 253,65 nm.

Rtuť je z amalgamátoru uvolněna krátkodobým ohřevem. Oblak rtuťových par je nosným plynem (kyslíkem) unášen přes delší měřící kyvetu (měřeno jako 1. pík). Potom se prakticky veškerá Hg shromáždí ve zpoždovací nádobce a z ní vstupuje do kratší měřící kyvety. To samé množství Hg je tedy měřeno dvakrát s odlišnou citlivostí (poměr citlivostí první a druhé kyvety je přibližně 15:1); celkový dynamický rozsah je 0,05 - 600 ng Hg v jednom měření. (Advanced Mercury Analyser AMA 254 – manuál k přístroji)

4.5 Pokyny k vypracování

Použitá metoda stanovení rtuti umožňuje nejen analýzu kapalných vzorků, ale i přímou analýzu vzorků pevných. Vaším analyzovaným vzorkem bude vzorek biologického materiálu – vzorek rybího masa (ryby z konzervy nebo mražené vzorky ryb). Máte-li nějakou oblíbenou rybí konzervu, přineste si ji do laboratoře sebou.

Využijte vestavěnou kalibraci přístroje a předem stanovené hodnoty sušiny vzorku.

4.5.1 Použitá činidla (reagencie)

- Komerční certifikovaný standard ASTASOL
(roztok $c(\text{Hg}) = 1\,000 \pm 2 \text{ mg.l}^{-1}$; matrice (v/v) 5% HNO_3).

4.5.2 Příprava analyzovaných vzorků

Standardní roztok Hg pro ověření kalibrace

Pracovní roztok standardu o $c(\text{Hg}) = 0,1 \text{ } \mu\text{g.ml}^{-1}$.

Pevný vzorek (rybí maso)

Veškeré používané pomůcky pro měření je nutné před použitím vyžít v plameni do červeného žáru (odstranění případné kontaminace prachem). Při měření pevných vzorků se navážka, stejně jako v případě kapalných vzorků, řídí předpokládaným obsahem Hg. Parametry analýzy závisí na navážce a povaze vzorku. (Komínková, 2010)

Skalpelem oddělte kousek masa o hmotnosti cca 50 mg a přeneste jej do měřicí lodičky. Přesnou hmotnost vzorku určete na analytických vahách.

4.5.3 Měření

Při měření postupujte dle pokynů vyučujícího a návodu přiloženého u přístroje. Nejprve spusťte analýzu na vyčištění systému. Analýzu opakujte minimálně 3x, do dosažení konstantní hodnoty absorbance.

Poté proměřte slepý pokus (prázdna lodička bez vzorku), měření opakujte 3x. Následně ověřte kalibraci přístroje nadávkováním 100 μl roztoku pracovního standardu o $c(\text{Hg}) = 0,1 \text{ } \mu\text{g.ml}^{-1}$. Výsledek analýzy by měl odpovídat nadávkovanému množství Hg; povolená odchylka je do 20 %. V opačném případě analýzu opakujte.

Před analýzou pevného biologického materiálu spusťte analýzu „Vyčištění systému“ – tím dojde k vyčištění přístroje od stop rtuti pocházející ze standardu. Lodičku se vzorkem rybího masa (cca 50 mg) vložte do přístroje a proveďte měření. Analyzujte celkem 5 vzorků.

Před ukončením měření na přístroji AMA 254, tento opět vyčistěte (spusťte analýzu „Vyčištění systému“).

4.5.4 Parametry analýzy (sušení/ termický rozklad/ čekání) [s]

vyčištění systému:	300/200/45
slepý pokus:	60/150/45
ověření platnosti kalibrace:	60/150/45
analýza pevného vzorku:	60/150/45

4.6 Vyhodnocení výsledků a jejich zpracování

Zapište si hodnotu množství zjištěné rtuti v ng určené na základě vnitřní kalibrace přístroje. Výsledky přepočtete na sušinu vzorku a vyjádřete v ng Hg na gram vzorku. Ze získaných hodnot vypočtete průměr a interval spolehlivosti pro pravděpodobnost 95 % (charakterizuje spolehlivost výsledku).

Použijte metodu pro malý počet opakování ($n < 10$) využívající rozpětí:

$$L_{1,2} = \bar{x} \pm K_{\alpha} R \quad (11)$$

kde L_1 a L_2 označují krajní meze intervalu spolehlivosti, \bar{x} je aritmetický průměr, K_{α} je kritická hodnota Lordova rozdělení pro zvolenou hladinu významnosti α , R je rozpětí ($R = \text{největší} - \text{nejmenší}$ hodnota).

Hodnoty K_n pro výpočet 95% intervalu spolehlivosti naleznete v Tabulce 10.

počet měření n	K_{α} $\alpha = 0,05$	počet měření n	K_{α} $\alpha = 0,05$	počet měření n	K_{α} $\alpha = 0,05$
2	6,35	5	0,51	8	0,29
3	1,30	6	0,40	9	0,26
4	0,72	7	0,33	10	0,23

Tabulka 10 Kritické hodnoty koeficientu K_{α} ((Hodnocení analytických výsledků, UPOL)

Výsledek analýzy pomocí statistického testu porovnejte s přípustnými mezními hodnotami pro obsah rtuti v rybách. Protokol vypracujte podle běžných zvyklostí.

5 Stanovení s využitím iontově selektivních elektrod

5.1 Úkol

Stanovte obsah fluoridů v předložených modelových vzorcích, minerální vodě a zubní pastě.

5.2 Teoretický úvod

5.2.1 Fluoridy a možnosti jejich stanovení

Fluoridy se vyskytují ve všech přírodních a užitkových vodách a jejich koncentrace bývá obvykle nižší než 1 mg.l^{-1} . Ve vodách může být fluor přítomen v různých formách, rozpustných i nerozpustných. Jde především o volný jednoduchý fluoridový ion (F^-), dále pak fluorokřemičitany nebo fluorohlinity (komplexní formy s hliníkem).

Existuje řada norem, podle nichž se stanovují jak jednoduchý volný ion F^- , tak celkové fluoridy. Celkové anorganické fluoridy se stanovují po rozkladu vzorku vody. Ke stanovení jednoduchých fluoridů (všechny druhy vod včetně odpadních) je možné využít fotometrické stanovení se zirkonalizarinem, nebo přímou potenciometrii s fluoridovou iontově selektivní elektrodou (F^- -ISE); v případě vzorků se složitou matricí (např. odpadní voda) je doporučeno před vlastním stanovením upravit vzorek destilací.

Pro málo znečištěné vody (např. pitné, srážkové, podzemní, povrchové) je možné využít metodu iontově výměnné chromatografie nebo F^- -ISE. (Fluoridy, IRZ)

5.2.2 Přímá potenciometrie, iontově selektivní elektrody

Potenciometrie je elektrochemická analytická metoda, při které se měří elektromotorické napětí (rozdíl potenciálů) galvanického článku, složeného z indikační (měrné – potenciál závisí na aktivitě stanovovaného iontu) a referentní (srovnávací – konstantní potenciál; např. argentchloridová) elektrody.

Nejčastějším analytickým využitím potenciometrie je měření pH nebo měření koncentrace iontů iontově selektivními elektrodami (*přímá potenciometrie*) nebo jsou to potenciometrické titrace (*nepřímá potenciometrie*). (Holzbecher & Churáček, 1987)

Iontově selektivní elektrody (ISE)

Iontově selektivní elektrody představují skupinu elektrochemických senzorů, u nichž rozhodující úlohu sehrávají iontově-výměnné rovnováhy na membráně. Většina elektrod je konstruována tak, že membrána fyzicky odděluje zkoumaný roztok s analyzovaným iontem (vnější/externí elektrolyt) od roztoku o konstantním složení (aktivitě) daného iontu uvnitř elektrody (interní

elektrolyt). Na jednotlivých fázových rozhraních systému se uplatňují dílčí potenciály, jež určují výsledný membránový potenciálový rozdíl:



$$\Delta\phi_M = \Delta\phi_{EXT} - \Delta\phi_{INT} = \frac{RT}{z_i F} \ln \frac{(a_i)_{EXT}}{(a_i)_{INT}} \quad (12)$$

kde R je plynová konstanta, T absolutní teplota, z_i náboj iontu, F je Faradayova konstanta, a_i aktivita.

V praxi je vnitřní mezifázový potenciál ($\Delta\Phi_{INT}$) snímán prostřednictvím vnitřní referentní elektrody, zabudované přímo v těle sondy.

Fluoridová elektroda je jednou z nejúspěšnějších iontově selektivních elektrod. F⁻-ISE patří mezi čidla s pevnou membránou; membránu tvoří anorganický monokrystal obsahující elektroaktivní sloučeninu, nejčastěji LaF₃ s příměsí Eu²⁺. Tato elektroda má dobré mechanické vlastnosti, je spolehlivá, poskytuje dostatečnou selektivitu (jedinou vážnou interferenci způsobují ionty OH⁻) a mez detekce. Hodí se k analýze nejrůznějších typů vodných roztoků; je vhodná pro stanovení F⁻, např. v zemědělských, potravinářských a biologických vzorcích. (Manuál ke Kombinované fluoridové iontově selektivní elektrodě, typ 25-092.)

Při přímých potenciometrických měřeních může být využita jak metoda kalibrační křivky, tak metoda standardních přídatků.

Metoda kalibrační křivky je vhodná pro stanovení F⁻, v jednoduchých matricích (např. pitná voda, minerální voda). Při analytických aplikacích, se u F⁻-ISE z praktických důvodů kalibrační křivka často vynáší jako závislost napětí měřeného článku (E) proti záporně vzatému logaritmu koncentrace F⁻ (pF; $-\log c_{F^-}$). Při relativně vysokých koncentracích F⁻ může při měřeních s F⁻-ISE docházet k odchylkám od lineární odezvy. Tato odchylka se projeví (je viditelná) zejména tehdy, měří-li se v koncentrační stupnici pF. Přímo z grafu (rovnice kalibrační přímky) pak lze z hodnoty napětí neznámého vzorku (E_x) odečíst hledaný obsah fluoridu, po odlogaritmování odpovídající hodnoty pF. Je žádoucí, aby koncentrace sledovaného iontu ležela v lineární části kalibrační křivky.

Metoda standardního přídatku je vhodnější pro stanovení koncentrace iontů ve složitější matrici (např. zubní pastě). Základem této metody je měření napětí článku ponořeného do analyzovaného roztoku před přidáním a po přidání standardu o známé koncentraci a definovaném množství.

5.3 Zařízení a příslušenství

- digitální pH/mV metr, magnetická míchačka;
- **kombinovaná fluoridová iontově selektivní elektroda, typ 25-092** (Elektrochemické detektory, s.r.o, Turnov); *čidlo: anorganický monokrystal, referentní elektroda: argentchloridová, zabudovaná v pouzdru.*

5.4 Princip stanovení

Přijde-li F^- -ISE do styku s fluoridovými ionty ve vodném roztoku, vznikne potenciálový rozdíl mezi měrnou a srovnávací elektrodou, který je za daných podmínek úměrný koncentraci fluoridových iontů.

Potenciál měřený v článku s referentní elektrodou lze vyjádřit *Nikolského-Eisenmannovou rovnicí*, která při 25 °C přechází na tvar:

$$E = K' - 0,0592 \log \{a_{F^-} + k_{F^-, OH^-}^{pot} \cdot a_{OH^-}\} \quad (13)$$

K' je specifická konstanta zahrnující všechny neměnné potenciálové příspěvky (např. vnitřní mezifázový potenciál, kapalinový potenciál, asymetrický potenciál membrány, ad.) Veličina k_{F^-, OH^-}^{pot} je příslušný koeficient selektivity ukazující rušivý vliv hydroxylových iontů při měření tímto typem elektrody. Z tohoto důvodu vyžadují analyzované vzorky důslednou kontrolu pH. Pro měření F^- , je vhodné upravit pH komplexním upravovacím roztokem TISAB (Total Ionic Strength Adjustment Buffer) na pH 5 – 6, který současně vhodně upravuje iontovou sílu a maskuje případně přítomné další ionty (např. Al^{3+} , Fe^{3+}), které tvoří komplexy s fluoridovými ionty. (Manuál ke Kombinované fluoridové iontově selektivní elektrodě, typ 25-092.)

5.5 Pokyny k vypracování

5.5.1 Použitá činidla (reagencie)

- zásobní roztok TISAB, $c = 2 \text{ mol.l}^{-1}$;
- standardní roztok fluoridů (NaF), $c = 0,05 \text{ mol.l}^{-1}$

5.5.2 Příprava pracovního roztoku TISAB

Ze zásobního roztoku TISAB ($c = 2 \text{ mol.l}^{-1}$) si připravte pracovní roztok o koncentraci $0,01 \text{ mol.l}^{-1}$.

Vzhledem k nutnosti udržovat optimální rozmezí pH, budete tímto pracovním roztokem TISAB doplňovat (po rysku) všechny připravované roztoky – tzn. kalibrační roztoky i vzorky k analýze!

5.5.3 Příprava kalibračních roztoků

Do označených odměrných baněk o objemu 100 ml připravte řadu 5 kalibračních roztoků, s výslednou koncentrací F^- , v mol.l^{-1} :

$$1 \cdot 10^{-2} \quad 1 \cdot 10^{-3} \quad 1 \cdot 10^{-4} \quad 1 \cdot 10^{-5} \quad 1 \cdot 10^{-6}$$

Pro přípravu kalibračního roztoku o nejvyšší koncentraci použijte zásobní roztok NaF ($c = 0,05 \text{ mol.l}^{-1}$). Dále postupujte metodou postupného ředění, abyste získali roztoky požadované koncentrace.

5.5.4 Příprava vzorků k analýze

Neznámý modelový vzorek

Od paní laborantky obdržíte v odměrné baňce neznámý vzorek F^- ; ten doplňte po rysku pracovním roztokem TISAB.

Minerální voda

Předložený vzorek přelijte do kádinky a na ultrazvukové lázni jej zbavte rozpuštěného CO_2 . Do připravené odměrné baňky o objemu 100 ml odpipetujte 80 ml odplyněného vzorku a doplňte jej po rysku pracovním roztokem TISAB.

Zubní pasta

Do připravené kádinky navažte pomocí kopisti s analytickou přesností cca 2 g zubní pasty, kterou dostanete ve váženice. Přidejte max. 50 ml pracovního roztoku TISAB a intenzivním mícháním skleněnou tyčinkou převed'te veškerou pastu do suspendovaného stavu, až v kádince nezůstanou viditelné kousky nerozmíchané pasty. Poté co usedne vytvořená pěna, kvantitativně převed'te suspenzi do označené odměrné baňky o objemu 100 ml a doplňte pracovním roztokem TISAB po rysku.

5.5.5 Kontrola pH kalibračních roztoků a připravených vzorků

Zapojte adaptér digitálního pH-metru do sítě a zapněte přístroj. Za pomoci pH elektrody proměřte pH všech připravených roztoků (tj. kalibračních roztoků i analyzovaných vzorků). Pokud nebude hodnota pH v požadovaném rozmezí $5,5 \pm 0,1$, upravte pH pomocí $2 \text{ mol.l}^{-1} \text{ HCl}$ nebo $2 \text{ mol.l}^{-1} \text{ NaOH}$, které dle potřeby pozorně dávkujte plastikovými kapátko do jednotlivých roztoků (za stálého míchání a ustálení odezvy).

5.5.6 Měření kalibračních roztoků, analýza vzorků

Po zapojení adaptéru do sítě zapněte přístroj. Pokud se přístroj nenastaví automaticky sám do režimu v měření v milivoltech [mV], přepněte jej ručně. Do úchytky upevněte elektrodu (F^- -ISE) a sejměte z ní ochranný gumový kryt. Elektrodu ponechte cca 5 minut v kalibračním roztoku 1 ($1 \cdot 10^{-2} \text{ mol.l}^{-1}$); čímž dojde k regeneraci membrány a ustálení rovnováhy. Poté elektrodu vyjměte, řádně opláchněte vodou a opatrně usušte papírovou utěrkou (pozor na dotyk s membránou).

Postupně proměřte všechny kalibrační roztoky – postupujte od nejnižší do nejvyšší koncentrace; poté proměřte roztoky vzorků. Příslušnou hodnotu potenciálu [mV] odečítejte v promíchaných roztocích, až dojde k ustavení rovnováhy (to může být i několik desítek sekund, zvláště ve zředěných roztocích); naměřená data si zaznamenejte do laboratorního deníku.

U vzorku zubní pasty proveďte rovněž stanovení metodou vícenásobného standardního přídávku. Nejprve změřte hodnotu napětí pro samotný vzorek (bez přídávku) a poté do téhož roztoku přidejte pipetou 1 ml kalibračního roztoku 1 ($1 \cdot 10^{-2} \text{ mol.l}^{-1}$), a na přístroji odečtěte odpovídající napětí (E_n). Stejný přídavek a odečtení příslušné hodnoty E_n , opakujte ještě 3x.

Po ukončení měření vyjměte a opláchněte elektrodu a tuto vraťte do ochranného pouzdra. Celé pracoviště uveďte do původního stavu.

5.6 Vyhodnocení výsledků

- Sestrojte kalibrační křivku E vs. pF ($-\log c_{F^-}$) pro dané koncentrace použitých kalibračních roztoků. Z podílů zvolených úseků ΔE a ΔpF vypočítejte směrnici S a porovnejte ji s teoretickou hodnotou ($-0,0592$ pro $z_i = -1$ a $t = 25^\circ\text{C}$).
- Kalibrační křivku využijte ke stanovení fluoridu v předložených vzorcích a výsledky uveďte v následující podobě:
neznámý modelový vzorek: $\text{mg } F^- / 50 \text{ ml}$;
minerální voda: $\text{mg } F^- / \text{l}$;
zubní pasta: $\% F^-$. $[M(F^-) = 18,99 \text{ g.mol}^{-1}]$
- Při stanovení F^- v zubní pastě metodou vícenásobného standardního přídávku využijte závislosti $(V_x + n \cdot V_s) \cdot 10^{(E_n/S)}$ vs. $n \cdot V_s$, kde V_x je objem původního vzorku, V_s objem standardního přídávku, symbol E_n představuje aktuální hodnotu napětí při daném počtu přídávků n (pro vzorek je $n=0$, pro první přídavek je $n=1$, atd.).

Obecný vztah pro napětí článku $E = \text{konst} + S \cdot \log c_x$ přechází po aplikaci jednotlivých standardních přídavek (a respektování zředění) na tvar:

$$\begin{aligned} E_0 &= \text{konst} + S \cdot \log c_x && \dots \text{ pro původní vzorek;} \\ E_1 &= \text{konst} + S \cdot \log \{c_x \cdot V_x / (V_x + V_s) + c_s \cdot V_s / (V_x + V_s)\} && \dots \text{ pro 1. stand. přídavek;} \\ E_2 &= \text{konst} + S \cdot \log \{c_x \cdot V_x / (V_x + 2V_s) + c_s \cdot 2V_s / (V_x + 2V_s)\} && \dots \text{ pro 2. stand. přídavek;} \\ E_n &= \text{konst} + S \cdot \log \{c_x \cdot V_x / (V_x + nV_s) + c_s \cdot nV_s / (V_x + nV_s)\} && \dots \text{ pro } n\text{-tý stand. přídavek;} \end{aligned}$$

tzn.

$$\underbrace{(V_x + n \cdot V_s) \cdot 10^{E_n/S}}_y = \underbrace{c_x \cdot V_x \cdot 10^{\text{konst}/S}}_{k \cdot x} + \underbrace{c_s \cdot n \cdot V_s \cdot 10^{\text{konst}/S}}_q \quad (14)$$

Je-li v rovnici přímky (14) veličina $(V_x + n \cdot V_s) \cdot 10^{E_n/S}$ nulová (tj. $y=0$), pak platí:

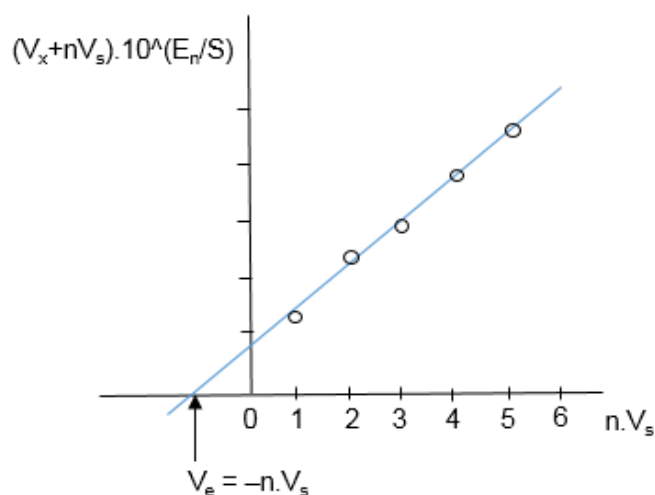
$$c_x = -n \cdot c_s \cdot V_s / V_x \quad \text{neboli} \quad c_x = c_s \cdot V_e / V_x \quad [\text{kde } V_e = -n \cdot V_s] \quad (15a, b)$$

Hledanou koncentraci (obsah) fluoridu ve vzorku pasty zjistíte následujícím způsobem:

- sestavte tabulku, která vám usnadní konstrukci grafu výše uvedené závislosti:

Vzorek	E_n [mV]	$n \cdot V_s$	$(V_x + n \cdot V_s) \cdot 10^{(E_n/S)}$

- jednotlivé hodnoty $(V_x + nV_s) \cdot 10^{(E_n/S)}$ a $n \cdot V_s$ dopočítejte z příslušných experimentálních dat (je možné dosazovat potenciál E_n a směrnici S [mV] a objemy V_x a V_s [ml]);
- byla-li při zpracování kalibrační křivky zjištěna směrnice odlišná od teoretické hodnoty (viz 5.6 a)), použijte k výpočtům experimentálně nalezenou hodnotu S ;
- sestrojte graf (viz Obrázek 7) a z průsečíku s osou x odečtěte zápornou hodnotu ekvivalentního objemu (V_e);



Obrázek 7 Metoda vícenásobného standardního přídatku

- ze vztahu (15b) a po přepočtu koncentrace c_x na požadované jednotky vypočtete obsah fluoridu v zubní pastě; výsledek uveďte ve stejných jednotkách jako v bodě 5.6 b). (Přímá potenciometrie s fluoridovou iontově-selektivní elektrodou)
- d) Výsledky analýzy zubní pasty získané metodou kalibrační přímky a pomocí vícenásobného standardního přídatku vzájemně porovnejte a pokuste se diskutovat případné rozdíly.

6 Stanovení nepolárních extrahovatelných látek ve vodném prostředí pomocí plynové chromatografie

6.1 Úkol

Určete RECOVERY (výtěžnost postupu) při analýze nepolárních extrahovatelných látek (NEL; uhlovodíků C10–C40) obsažených v modelovém vzorku vody.

6.2 Teoretický úvod

6.2.1 Nepolární extrahovatelné látky (NEL; uhlovodíky C10–C40)

V současné laboratorní praxi jsou NEL označovány jako uhlovodíky C10–C40. Zpravidla se jedná o nepolární alifatické, alicyklické, polycyklické nebo alkylované aromatické uhlovodíky s dlouhými nebo rozvětvenými řetězci. (Janoš et.al., 2011)

Zdrojem těchto uhlovodíků může být široké spektrum látek od benzinů, přes petroleje, motorovou naftu, topné a mazací oleje, obráběcí a konzervační prostředky a plastická či viskózní maziva.

Stanovení parametru NEL je dnes častým ukazatelem, který se používá pro posouzení znečištění vzorků životního prostředí a pro sledování jakosti povrchových, odpadních a pitných vod.

Pro stanovení NEL lze využít řadu analytických postupů/metod; těmito jsou: infračervená spektrometrie, ultrafialová spektrometrie, gravimetrie či plynová chromatografie s plamenově ionizační detekcí (GC/FID), na kapilární nepolární koloně. (Pavlovský et.al., 2013)

6.2.2 Chromatografie

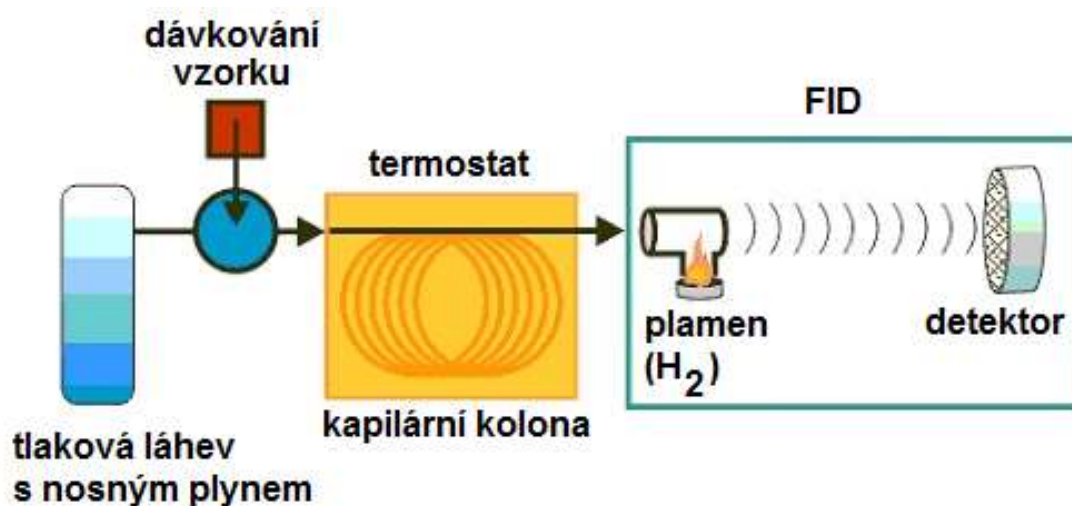
Chromatografie zahrnuje metody dělení směsí chemických látek, založené na mnohonásobném ustavování rovnováhy mezi fázemi, mobilní a stacionární. Chromatografické metody je možno dělit podle různých hledisek: povahy mobilní fáze (kapalinová a plynová chromatografie); uspořádání stacionární fáze (kolonová, plošné uspořádání); účelu (preparativní, analytická); separačního principu (adsorpční, rozdělovací, iontově výměnná, afinitní, gelová permeační); způsobu vyvíjení (eluční /isokratická, gradientová/, vytěšňovací, frontální). (Holzbecher & Churáček, 1987)

Plynová chromatografie (GC) se liší od jiných druhů chromatografie pouze v tom, že mobilní fází je plyn a látky se dělí ve stavu plynném. Při rozdělovací chromatografii v systému plyn–kapalina (GLC) se látky dělí mezi nosným plynem a stacionární kapalnou fází, zakotvenou na pevném nosiči. V chromatografickém systému plyn–tuhá látka (GSC) se látky dělí mezi nosný plyn a tuhý sorbent.

Hlavní součástí plynového chromatografu (viz Obrázek 8) je chromatografická kolona, obsahující vhodnou náplň, opatřená dávkovacím zařízením. Rozlišujeme kolony náplňové (s adsorbentem /GSC/, se stacionární fází na inertním nosiči /GLC/) a kapilární (kapalný polymer na vnitřní straně kapiláry /WCOT/, kapalný polymer zakotvený na nosiči zachyceném na vnitřní stěně kapiláry /SCOT/, pevná stacionární fáze (adsorbent) zachycený na kapiláře chemickou vazbou /PLOT/). (Poustka, 2018)

Kolona je umístěna v termostatu a na výstupu je napojen příslušný detektor. Jako příklady lze uvést: plamenově ionizační detektor (FID), tepelně vodivostní detektor (katarometr, TCD), detektor elektronového záchytu (ECD), dusíko-fosforový detektor (NPD, AFID) či hmotnostní detektor (MS).

Plamenový ionizační detektor (FID) je pro organické látky téměř univerzální, s velkou citlivostí a je použitelný i pro stopovou analýzu. Funkce FID spočívá v tom, že molekuly organických látek, které se dostanou do plamene, se v něm spalují za tvorby různých štěpných produktů (ionty, radikály, elektrony), které umožňují průchod proudu mezi elektrodami. Na elektrody je vloženo tzv. ionizační napětí a proud, který mezi nimi proteče, jenž je úměrný počtu prošlých fragmentů, je po zesílení registrován. (Holzbecher & Churáček, 1987)



Obrázek 8 Schéma plynového chromatografu (Flame Ionization Detector in Gas Chromatography)

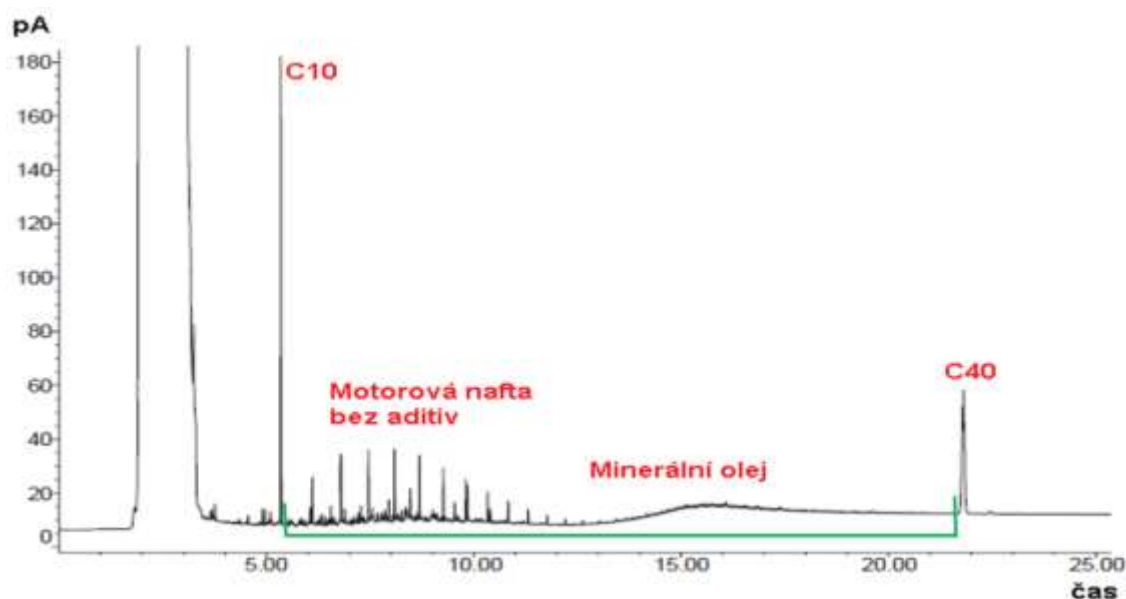
6.3 Zařízení a příslušenství

- **Plynový chromatograf Agilent 7890A GC**
(Agilent Technologie, Praha, ČR)
 - *detektory:* plamenově ionizační detektor (FID),
 - tepelně vodivostní (TCD);
 - *kolony:* PORAPAQ Q 80 – 100 MESH (2 m x 1/8in x 2 mm SS), 19091J-413 30 m HP-5 x 0,32 mm x 0,25 µm film.
- Mikrodávkoč 801 RNE, Hamilton AG
(Bonaduz, Švýcarsko).

6.4 Princip stanovení

Metoda plynové chromatografie umožňuje stanovení NEL (ropného i neropného původu) v koncentracích nad $0,1 \text{ mg.l}^{-1}$ a je vhodná pro všechny druhy užitkových, přírodních a odpadních vod. Vzorek vody je nejprve extrahován vhodným extrakčním činidlem (n-hexan, cyklohexan, heptan apod.). Následuje přečištění extraktu na florisilu, kdy dojde k odstranění polárních látek. Přečištěný extrakt je dále analyzován metodou GC/FID, na kapilární nepolární koloně. Vyhodnocuje se celková plocha píků ležící mezi píky n-dekanu ($\text{C}_{10}\text{H}_{22}$) a n-tetrakontanu ($\text{C}_{40}\text{H}_{82}$).

Standard je tvořen dvěma přesně definovanými minerálními oleji – jako jeden ze standardů může být použita motorová nafta bez aditiv, která by měla poskytovat rozlišné pásy; druhým standardem by měl být minerální olej s bodem varu vyšším než motorová nafta (např. mazivo bez aditiv s rozsahem bodu varu $325 - 460^\circ\text{C}$) a jeho chromatogram by měl poskytovat nerozlišené signály (viz Obrázek 9). (Pavlovský et.al., 2013; Drozdova et al., 2013)



Obrázek 9 Konvenční analýza standardní směsi NEL (50 µg.ml^{-1}), upraveno podle (Hoffmann et. al., 2019)

6.5 Pokyny k vypracování

6.5.1 Použitá činidla (reagencie)

Organická rozpouštědla:

- hexan (bezvodý, 95%);
- aceton (HPLC Plus, pro HPLC, GC, a analýzu reziduí, ≥99,9%).

Standardy uhlovodíků:

- n-dekan (bezvodý, ≥99%), C10;
- n-tetrakontan (≥95,0% (GC)), C40;
- „standard NEL“ (Mineral oil standard mixture Type A and B (EN ISO 9377-2); analytical standard, ~10 mg/mL in heptane).

Další chemikálie:

- síran sodný (bezvodý, ≥99,0%);
- florisil (60-100 mesh, vhodný pro EN ISO 9377-2).

6.5.2 Příprava standardních roztoků

Příprava vzorků (tj. standardů i vlastních vzorků vod k analýze) a následný pracovní postup (úprava extraktu /vysušení, přečištění/, analýza metodou GC/FID) byly upraveny dle postupů (Drozdova et al., 2013; Sandra & David, 2004).

Standardní roztok NEL + C10 + C40 v hexanu; $c = 50 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$

Tento standardní směsný roztok (pracovní standard) je určen pro přímou analýzu pomocí GC/FID.

Směsný roztok pracovního standardu o objemu 200 μl připravte tak, aby obsahoval všechny uvedené látky (tzn. NEL, C10, C40) v koncentraci 50 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$; roztoky do požadovaného objemu doplňujete hexanem.

Pro přípravu pracovního standardu použijte zásobní roztoky, jež vám připravila paní laborantka – pozorně se dívejte, zda berete „standard NEL v hexanu“, nebo „standard NEL v acetonu“!

Nezapomeňte si zapsat přesné koncentrace používaných roztoků!

- zásobní roztok „standard NEL v hexanu“ o koncentraci ~1 $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$;
- zásobní roztok „C10“ o koncentraci ~0,5 $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$;
- zásobní roztok „C40“ o koncentraci ~0,5 $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$.

Standardní roztok NEL + C10 + C40 v acetonu; $c = 500 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$

Tento roztok využijete jako standardní přírůstek do modelového vzorku vody, jež budete analyzovat.

Směsný roztok o objemu 3 ml připravte tak, aby obsahoval všechny uvedené látky (tzn. NEL, C10, C40) v koncentraci 500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; roztoky do požadovaného objemu doplňujete acetonem.

Pro přípravu roztoku použijte:

- *zásobní roztok* „standard NEL v acetonu“ o koncentraci $\sim 1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$;
- *zásobní roztok* „C10“ o koncentraci $\sim 0,5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$;
- *zásobní roztok* „C40“ o koncentraci $\sim 0,5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$.

6.5.3 Vzorky vody k analýze – extrakce, vysušení, přečištění extraktu

- i. K modelovému vzorku vody o objemu 900 ml přidejte 1 ml směsného roztoku standardu (NEL + C10 + C40) v acetonu. Vzorek dobře promíchejte (protřepete). Následně přidejte 50 ml hexanu (extrakčního činidla), nádobu dobře uzavřete a roztok extrahujte po dobu 30 minut na třepačce.
- ii. Opatrně odeberte organickou fázi (extrakt), a tento extrakt zakonzentrujte pod proudem dusíku na objem 10 ml. Vypočítejte koncentraci NEL v takto připraveném extraktu (tj. v 10 ml extraktu).
- iii. Připravte si dva paralelní vzorky – vzorek A a vzorek B.
- iv. Ke 2 ml extraktu (získaného v bodě ii)) přidejte 80 mg bezvodého Na_2SO_4 . Roztok dobře promíchejte/protřepete; roztok dále centrifugujte 2 min při 2 000 rpm.
- v. Odeberte 1,4 ml extraktu (vysušeného pomocí Na_2SO_4 ; získaného v bodě iii)) a k němu přidejte 120 mg florisilu. Roztok dobře promíchejte/protřepete a dále jej centrifugujte 2 min při 2 000 rpm.
- vi. Do suché čisté vialky si odpipetujte 500 μl získaného extraktu (tj. vysušeného a přečištěného; získaného v bodě iv)) jež budete dále analyzovat metodou GC/FID.

6.5.4 Parametry GC analýzy

Analýzu vzorků proveďte na plynovém chromatografu Agilent 7890A GC s FID, na kapilární nepolární koloně (19091J-413 30 m HP-5 x 0,32 mm x 0,25 μm film), jako nosný plyn použijete helium.

Postupujte dle pokynů vyučujícího a návodu přiloženého u přístroje.

Nastavte následující parametry analýzy:

Flow Rate	2.0 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$, constant flow
Oven Temperature	45 °C (hold 1 min), 25 °C/min to 340 °C (hold 2 min)
Injector Temperature	300 °C
Injection Mode	Splitless
Splitless Time	0.80 min

Splitflow	50 ml.min ⁻¹
Detector Temperature	340 °C
Injected Volume	2 µl
Time analysis	30 min

6.5.5 Měření

Po nastavení parametrů analýzy a ustavení podmínek (na přístroji svítí kontrolka READY) analyzujte připravené vzorky. Do plynového chromatografu postupně dávkuje a analyzujete:

- 2 µl standardu (**standard NEL + C10 + C40 v hexanu**); měření opakujte 2x;
- 2 µl vzorku A (extrakt získaný ze vzorku vody);
- 2 µl vzorku B (extrakt získaný ze vzorku vody).

Výsledné chromatogramy si uložte (budete je přikládat do protokolu) a zaznamenejte si celkovou plochu píku, jež budete potřebovat pro následné výpočty.

6.6 Vyhodnocení výsledků

Z naměřených dat určete výtěžnost použitého pracovního postupu (recovery).

Protokol vypracujte dle běžných zvyklostí. Nezapomeňte uvést všechny navážky a výpočty/ředění/přípravy roztoků. Do protokolu rovněž přiložte chromatogramy jednotlivých analyzovaných vzorků; odečtené hodnoty celkové plochy píků uveďte v přehledné tabulce. Získané výsledky diskutujte.

7 Analýza polycyklických aromatických uhlovodíků ve vzorcích pražené kávy pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí

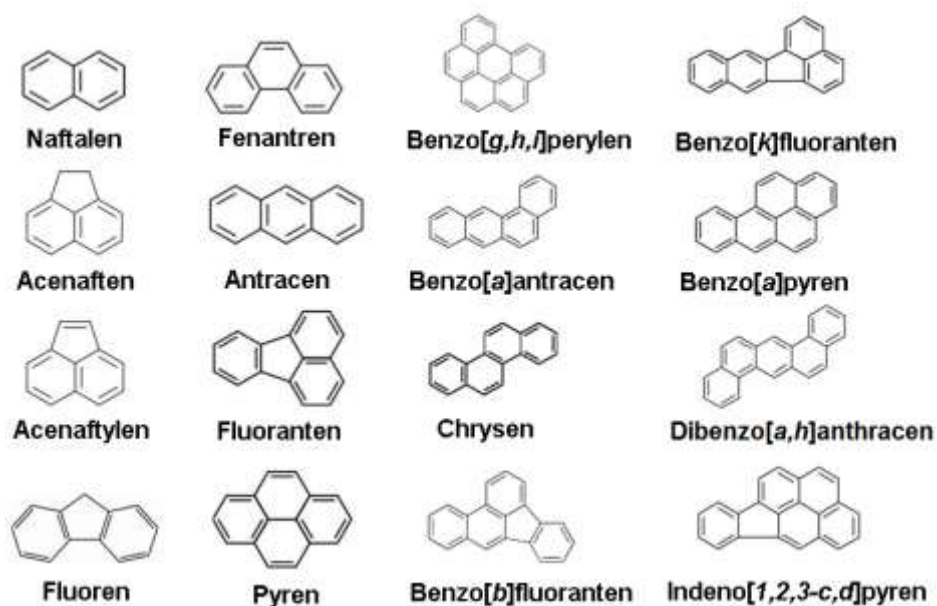
7.1 Úkol

- I. Metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s UV a fluorescenční detekcí (HPLC/DAD a HPLC/FLD) separujte směs polycyklických aromatických uhlovodíků (PAH).
- II. Proveďte kvalitativní analýzu neznámého vzorku – extraktu získaného ze vzorků pražené kávy.

7.2 Teoretický úvod

7.2.1 Polycyklické aromatické uhlovodíky

Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAH) jsou díky stabilitě v životním prostředí řazeny mezi POPs (perzistentní organické polutanty) a jsou považovány za environmentálně prioritní polutanty. Představují širokou skupinu různých látek, které se vyznačují tím, že ve své molekule obsahují kondenzovaná aromatická jádra a nenesou žádné heteroatomy ani substituenty (viz Obrázek 10).



Obrázek 10 Seznam nejvýznamnějších PAH (dle US EPA)

Čisté sloučeniny jsou bílé nebo nažloutlé krystalické pevné látky; velmi málo rozpustné ve vodě, ale dobře rozpustné v tucích a olejích.

PAH jsou látky, které se ve většině případů cíleně nevyrábějí (zpravidla výjimečně pro laboratorní výzkum a analýzu). Naftalen a antracen jsou výjimky, které využití mají: výroba barviv, maziv, rozpouštědel, léčiv, syntetických vláken, plastů

a dalších chemikálií. (Ohlašované látky – Antracen, IRZ; Ohlašované látky – Naftalen, IRZ)

PAH (jako skupina látek obecně) jsou obsaženy v celé řadě běžných produktů dnešního průmyslu, např. motorové naftě, asfaltu, výrobcích z černouhelného dehtu. Proto lze mezi významné antropogenní zdroje PAH zařadit spalovací procesy, koksárenství, rafinerie ropy, zplyňování a zkapalňování uhlí, výrobu hliníku, uvolňování z materiálů, které PAH obsahují, a další. Mezi přírodní zdroje emisí patří přírodní požáry a erupce sopek. (Ohlašované látky – Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU), IRZ)

PAH vznikají i působením vyšších teplot na potraviny při pražení, grilování, pečení, smažení, uzení, apod. K tvorbě PAH dochází pyrolýzou nebo spalováním organické hmoty za nedokonalého přístupu vzduchu při teplotách zejména nad 700 °C, přičemž v tepelně namáhaných potravinách jsou za hlavní prekurzory PAH považovány peptidy, lipidy (steroly), sacharidy, terpeny a listové pigmenty. (Tomaniová et.al., 1997)

PAH jsou toxické pro řadu živých organismů; mohou způsobovat mutace u zvířat, rakovinu a poruchy reprodukce. Jsou to látky perzistentní, schopné transportu atmosférou na velké vzdálenosti (ve formě naadsorbované na zrna sazí a prachových částic). Celá řada látek ze skupiny PAH představuje závažné zdravotní riziko i pro člověka, zejména díky jejich karcinogenním a teratogenním účinkům. (Ohlašované látky – Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU), IRZ)

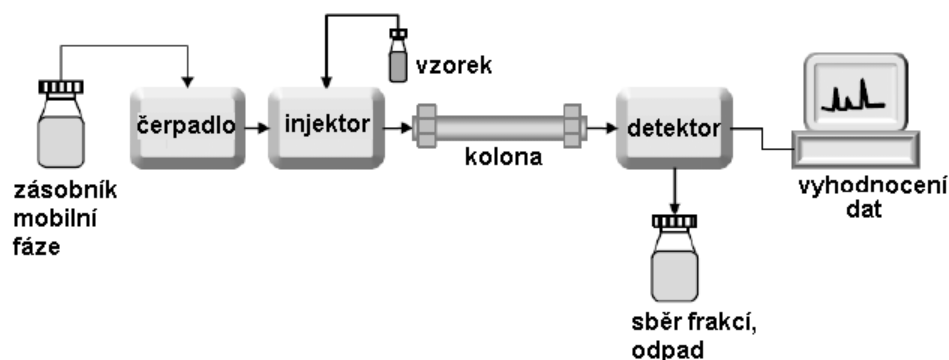
7.2.2 Kapalinová chromatografie

Kapalinová chromatografie (LC; Liquid Chromatography) je separační metoda, která umožňuje dělení všech organických méně těkavých kapalných i tuhých látek, které jsou rozpustné v běžných organických rozpouštědlech a ve vodě nebo zředěných minerálních kyselinách. Zahrnuje všechny chromatografické způsoby separace, kdy je mobilní fáze kapalná. Hlavní výhodou LC je to, že k dělení látek je možno využít všechny vratné dvoufázové separační mechanismy, jako např. adsorpci, chemisorpci, iontovou výměnu, rozdělování mezi dvě nemísitelné kapaliny, mechanismus síťového efektu (gelová permeační chromatografie), aj. (Holzbecher & Churáček, 1987)

V dnešních chromatografických technikách zauímají metody kolonové chromatografie první místo. Využití vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC, High-Performance Liquid Chromatography) v analytických laboratořích, v základním výzkumu i technické praxi je velmi rozsáhlé. Je to metoda velmi flexibilní, v současné době jsou k dispozici různé druhy kolon vhodné pro nejrozmanitější účely. Moderní detekční systémy vynikají vysokou citlivostí, možností dosažení nízkých mezí detekce a stanovitelnosti. Významnou výhodou metody HPLC je rychlost analýzy a možnost automatického vyhodnocení naměřených dat.

Instrumentace v kapalinové chromatografii

Kapalinový chromatograf se obvykle skládá z následujících částí: zásobníků mobilní fáze, zařízení pro programování gradientu, směšovacího zařízení, odplyňovacího zařízení, vysokotlakého čerpadla, tlumiče tlakových pulsů, dávkovacího zařízení (injektoru), předkolony, kolony, detektoru, jímače frakcí a vyhodnocovacího zařízení, počítače. Zjednodušené (blokové) schéma vysokoúčinného kapalinového chromatografu znázorňuje Obrázek 11.



Obrázek 11 Blokové schéma vysokoúčinného kapalinového chromatografu (Czaplicki, 2013)

Detektory v HPLC jsou obecně složitější a rozmanitější než detektory v GC. Jako příklady detektorů lze uvést: UV/VIS spektrometrický nebo detektor diodového pole (DAD), refraktometrický, fluorescenční (FLD), hmotnostní (MS), amperometrický, konduktometrický, ad.

7.3 Zařízení a příslušenství

V laboratoři budete využívat **HPLC systém 1260 Agilent Infinity Prime LC**. Tento přístroj je vybaven detektorem diodového pole (DAD) a fluorescenčním detektorem (FLD). Separace látek bude probíhat na koloně InfinityLab Poroshell 120, délka kolony 100 mm, s náplní EC-C18 (částice silikagelu o velikosti 2,7 μm pokryté kovalentně vázanými okta-decylovými řetězci). Budete tedy využívat chromatografii s reverzními fázemi, RP-HPLC (stacionární fáze je nepolární, mobilní fáze polární).

7.4 Princip stanovení

Jednotlivé složky vzorku jsou na chromatografické koloně separovány na základě rozdílných rozdělovacích koeficientů. Následně jsou rozdělené látky detekovány pomocí detektoru, buď fluorescenčního (FLD; pracujícího na principu měření sekundárního záření (emisního), které látka vydá po absorpci primárního elektromagnetického záření (excitačního)), nebo detektoru diodového pole (DAD; snímajícího celé spektrum v reálném čase bez přerušení chromatografické separace).

Grafickým výstupem chromatografického procesu je chromatogram, vyjadřující závislost signálu na elučním čase (t_R) nebo objemu (V_R). Tyto veličiny slouží ke

kvalitativní analýze, k identifikaci látek (porovnávají se t_R (V_R) látky a standardu). Pro kvantitativní analýzu lze využít metodu kalibrační křivky, vnitřního standardu či metodu standardních přídavek. Odečítá se plocha píku (popř. výška píku).

7.5 Pokyny k vypracování

7.5.1 Použitá činidla (reagencie)

Organická rozpouštědla:

- acetonitril, dichlormethan.

Standardy PAH:

- naftalen, acenaften, antracen, pyren, benzo(a)pyren.

Další chemikálie:

- síran sodný (bezvodý, $\geq 99,0\%$), thiomčovina, prášková měď.

7.5.2 Příprava směsného roztoku pracovního standardu

Připravte si směsný roztok pracovního standardu, který bude obsahovat jednotlivé PAH, tzn. naftalen, acenaften, antracen, pyren a benzo(a)pyren v koncentracích $5 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ v acetonitrilu.

7.5.3 Extrakt vzorku pražené kávy

Extrakt vzorku kávy si přijďte do laboratoře předchystat, po domluvě s paní laborantkou, den před konáním daného laboratorního cvičení. Pokud máte svou oblíbenou kávu, přineste si ji namletou sebou.

Postup přípravy extraktu i následné parametry analýzy jsou upraveny podle postupu [1, 48]. Navažte 2 g mleté kávy a přidejte k ní 10 ml dichlormethanu, 0,2 g práškové mědi a 1 g bezvodého síranu sodného. Takto připravenou směs dobře uzavřete a extrahujte alespoň 12 hodin, při teplotě 30°C , na třepačce.

Před vlastní analýzou směs centrifugujte při 2 000 rpm po dobu 10 minut. Odeberte supernatant, odpařte jej do sucha a následně jej rozpustíte v 1 ml acetonitrilu. Takto připravený vzorek přefiltrujte přes stříkačkový PTFE filtr s velikostí částic $0,22 \mu\text{m}$.

7.5.4 Parametry analýzy

HPLC/DAD

mobilní fáze:	směs acetonitril / voda
gradientová eluce:	0 min: 55 % acetonitrilu; 30 min: 85 %
průtok mobilní fáze:	$0,2 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$
teplota kolony:	25°C
vlnová délka:	254 nm
doba analýzy:	30 minut
nástřik:	$5 \mu\text{l}$

HPLC/FLD

mobilní fáze:	směs acetonitril / voda
gradientová eluce:	0 min: 55 % acetonitrilu; 30 min: 85 %
průtok mobilní fáze:	0,2 ml.min ⁻¹
teplota kolony:	25 °C
vlnová délka:	$\lambda_{\text{excitační}} = 290 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{excitační}} = 430 \text{ nm}$
doba analýzy:	30 minut
nástřik:	5 μl

7.5.5 Měření

Postupujte dle pokynů vyučujícího a návodu přiloženého u přístroje.

Nejprve analyzujte směsný roztok pracovního standardu pomocí metody HPLC/DAD. Následně analyzujte též vzorek za stejných podmínek, jen s tím rozdílem že detekce bude probíhat pomocí fluorescenčního detektoru (HPLC/FLD). Metodou HPLC/FLD analyzujte i vzorek získaný extrakcí pražené kávy. Všechny získané chromatogramy si uložte, budete ji potřebovat k vyhodnocení výsledků. Po ukončení měření, dle instrukcí vyučujícího, dostatečně promyjte chromatografickou kolonu.

7.6 Vyhodnocení výsledků

- a) Ze záznamu analýzy (chromatogramu) směsného standardu PAH, **měřeno HPLC/DAD**, určete základní chromatografické charakteristiky. K výpočtům využijte níže uvedených vztahů; do protokolu pak slovně popište, co tyto charakteristiky vyjadřují. Naměřené údaje (t_M , t_R , $Y_{1/2}$) a vypočtená data (k , n , H) shrňte do Tabulky 11.

	t_R (min)	t_R' (min)	k	$Y_{1/2}$ (min)	n	H (mm)
thiomočovina						
naftalen						
acenaften						
antracen						
pyren						
benzo(a)pyren						

Tabulka 11 Charakteristiky chromatografického procesu (měřeno HPLC/DAD)

<i>mrtvý čas kolony</i>	$t_M = t_R$ (thiomočovina)
<i>redukovaný eluční čas</i>	$t_R' = t_R - t_M$
<i>kapacitní poměr</i>	$k = t_R' / t_M$
<i>počet teoretických pater pro danou látku</i>	$n = 5,545 \cdot (t_R / Y_{1/2})^2$
<i>výškový ekvivalent teoretického patra</i>	$H = L / n$

- b) Ze záznamu analýzy (chromatogramu) směsného standardu PAH, **měřeno HPLC/FLD**, odečtěte retenční časy (t_R) jednotlivých separovaných složek. Naměřená data shrňte do Tabulky 12. Zhodnoťte získané výsledky (hodnoty t_R daných látek /DAD vs. FLD/) a porovnejte velikosti odezvy (plocha event. výška píku daného analytu; měřeno dvěma různými detektory).

označení	t_R (min)	plocha píku (DAD)	plocha píku (FLD)
thiomočovina			
naftalen			
acenaften			
antracen			
pyren			
benzo(a)pyren			

Tabulka 12 Charakteristiky chromatografického procesu (měřeno HPLC/FLD)

- c) Z chromatogramu získaného analýzou extraktu kávy, **měřeno HPLC/FLD**, odečtěte retenční časy (t_R) jednotlivých separovaných složek. Naměřená data shrňte do Tabulky 13, porovnejte je s retenčními časy standardů (t_R) a na základě toho určete přítomnost daných látek v extraktu kávy.

pík č.	t_R (min)	identifikovaná látka
1		
2		
3		
4		
5		
6		
7		
8		
pík č.	t_R (min)	identifikovaná látka
9		
10		

Tabulka 13 Charakteristiky chromatografického procesu (měřeno HPLC/FLD)

- d) Protokol vypracujte dle běžných zvyklostí. Nezapomeňte uvést všechny navážky a výpočty/ředění/přípravy roztoků. Do protokolu rovněž přiložte chromatogramy jednotlivých analyzovaných vzorků; popište jednotlivé retenční charakteristiky včetně jejich výpočtu; výsledky zpracujte do přehledných tabulek. Získané výsledky diskutujte.

8 Stanovení léčiv pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie

8.1 Úkol

Stanovte obsah vybraného léčiva v modelovém vzorku vody.

8.2 Teoretický úvod

8.2.1 Léčiva

Léčiva (humánní i veterinární) jsou látky sloužící k předcházení, léčení a/nebo zmírnění projevů chorob. Účinné látky se vyrábějí průmyslově, a tím, že dochází k jejich rozsáhlému užívání (často i nadužívání), se začaly vyskytovat ve složkách životního prostředí (vody – povrchové, pitné; půda; sedimenty). (Kotyza et.al., 2009)

Spotřeba léčiv je značná a stále se zvyšuje. V Evropské unii je používáno v humánní medicíně přibližně 3 000 různých látek, nejvíce: hormonální přípravky (kontraceptiva), antibiotika (zastavují růst nebo ničí mikroorganismy), analgetika (tlumí bolest), β -blokátory (snižují vysoký krevní tlak), statiny (snižující množství cholesterolu v krvi), antidepresiva (psychofarmaka; léčba deprese), antirevmatika (proti revmatickým chorobám), ad. (Šídllová et. al., 2011)

Primárním zdrojem odpadních léčiv a jejich metabolitů jsou pacienti. Aktivní látky jsou po užití léku z těla vylučovány buď v nezměněné podobě, nebo ve formě jejich metabolitů, prostřednictvím moči nebo stolice. Díky splaškům se dostávají až na čistírny odpadních vod (ČOV), kde však některé z nich nejsou dostatečně zachycovány a tak přecházejí dále do recipientu, kde mohou ovlivňovat přítomné organismy, a následně být transportovány do dalších částí ekosystému. (Kotyza et.al., 2009)

8.2.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s UV detekcí (HPLC/UV)

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC – High Performance Liquid Chromatography) se řadí mezi nejčastěji používané separační metody. Využívá mnohonásobně opakovaného procesu distribuce látek mezi mobilní a stacionární fází, kdy látky ve směsi migrují různou rychlostí ve směru toku mobilní fáze a při průchodu chromatografickým prostředím tak dochází k jejich vzájemné separaci. Jako stacionární fáze (náplň kolon) se používají polární i nepolární adsorbenty. Z polárních adsorbentů je to většinou silikagel, oxid hlinitý, či chemicky vázané stacionární fáze (např. aminopropyl nebo pentafluorofenylpropyl); z nepolárních adsorbentů jsou nejčastěji využívány chemicky vázané nepolární fáze. (Teorie HPLC / Základy HPLC)

Složení mobilní fáze má vliv na účinnost kolony, kapacitní poměr, retenční poměr, rozlišení, dobu analýzy a citlivost. Jako mobilní fáze se většinou používají

organická rozpouštědla (např. acetonitril, methanol), voda, a jejich směsi. (Teorie HPLC / Základy HPLC)

Je-li stacionární fáze polárnější než fáze mobilní, mluvíme o systémech s normálními fázemi, v opačném případě jde o systémy s obrácenými fázemi (chromatografie s reverzními fázemi, RP-HPLC).

8.3 Zařízení a příslušenství

V laboratoři budete využívat **HPLC systém 1260 Agilent Infinity Prime LC**. Tento přístroj je vybaven detektorem diodového pole (DAD), jenž budete využívat k detekci stanovovaných léčiv, a fluorescenčním detektorem (FLD). Separace látek bude probíhat na koloně InfinityLab Poroshell 120, délka kolony 100 mm, s náplní EC-C18 (částice silikagelu o velikosti 2,7 μm pokryté kovalentně vázanými oktadecylovými řetězci).

8.4 Princip stanovení

Jednotlivé složky vzorku jsou na chromatografické koloně separovány a eluát (mobilní fáze s rozdělenými látkami vystupující z kolony) protéká detektorem diodového pole (DAD), který snímá celé spektrum v reálném čase bez přerušení chromatografické separace. Výstupem z detektoru je chromatogram – z polohy píku (retenční čas, t_R) usuzujeme na přítomnost určitých látek (kvalita), z ploch pod píky či z výšek píků lze kvantitativně vyhodnotit obsah dané látky v analyzované směsi.

8.5 Pokyny k vypracování

8.5.1 Použitá činidla (reagencie)

Organická rozpouštědla:

- acetonitril.

Standardy léčiv:

- kofein (stimulans centrální nervové soustavy);
- kyselina salicylová (analgetikum);
- naproxen (nesteroidní protizánětlivé a protirevmatické léčivo).

Další chemikálie:

- kyselina fosforečná.

8.5.2 Neznámý vzorek – modelový vzorek vody

Na začátku laboratorního cvičení dostanete modelový vzorek vody, obsahující léčiva. Vaším úkolem bude:

- I. Zjistit, které léčivo/léčiva máte ve vzorku vůbec obsaženy. K dispozici budete mít standardy léčiv (naproxen, kyselina salicylová, kofein) o koncentraci 100 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$.

II. Zjistit koncentraci přítomného léčiva ve vzorku.

Celý pracovní postup (jednotlivé kroky postupu) i kalibraci navrhuje sami.

Před zahájením práce přednete váš návrh postupu vyučujícímu; diskutujte s ním případné nejasnosti.

8.5.3 Parametry analýzy a měření vzorků

Při měření (obsluhy přístroje) postupujte dle pokynů vyučujícího a návodu přiloženého u přístroje.

K měření pomocí metody HPLC/DAD využijte následujících parametrů analýzy (upraveno dle (Vydrová, 2011):

mobilní fáze:	0,1 % H_3PO_4 /acetonitril; v poměru 80/20; isokratická eluce
průtok mobilní fáze:	0,2 ml.min ⁻¹
teplota kolony:	25 °C
vlnová délka:	230 nm (kyselina salicylová, naproxen); 275 nm (kofein)
doba analýzy:	12 minut
nástřik:	5 µl

8.6 Vyhodnocení výsledků

Protokol vypracujte dle běžných zvyklostí.

Nezapomeňte uvést/popsat celý vámi navržený pracovní postup (jednotlivé kroky a důvody, pro které jste tak postupovali); všechny výpočty/ředění/přípravy roztoků. Do protokolu rovněž přiložte jednotlivé chromatogramy.

Uved'te množství stanovených léčiv v modelovém vzorku vody.

Literatura

- Absorpční spektrum. [online]. *ELUC*. Dostupné z <https://eluc.kr-olomoucky.cz/verejne/lekce/2525>
- Advanced Mercury Analyser AMA 254 – manuál k přístroji.
- *Analyzátor rtuti (Hg) AMA 254*. [online]. Dostupné z <https://www.natur.cuni.cz/geologie/laboratore/laboratore-a-metody/analyzator-rtut-ama254i.pdf>
- Atomová absorpční spektrometrie s plamenovou atomizací. [online]. *Laboratoř analytické chemie, návody pro studenty*. Fakulta chemicko-technologická. Univerzita Pardubice.
- Celkový fosfor. [online]. *Integrovaný registr znečišťování*. Ministerstvo životního prostředí. Dostupné z https://www.irz.cz/sites/default/files/latky/Celkovy_fosfor.pdf
- Czaplicki, S. (2013). Chromatography in Bioactivity Analysis of Compounds. *Column Chromatography*. Retrieved from <https://doi.org/10.5772/55620>
- Drozdova, S., Ritter, W., Lendl, B., & Rosenberg, E. (2013). Challenges in the determination of petroleum hydrocarbons in water by gas chromatography (hydrocarbon index). *Fuel*, 113, 527-536. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2013.03.058>
- Evans, L. (2015). UV-VIS Spectrophotometry: A Brief Background to Spectrophotometry. *Biochrom*. Retrieved from https://biochromspectros.com/media/wysiwyg/support_page/UV-Visible_Spectrophotometry.pdf
- Flame Ionization Detector in Gas Chromatography (FID). [online]. *Science of Chromatography*. Retrieved from <http://chromatographyscience.blogspot.com/2012/10/flame-ionization-detector-in-gas.html>
- Fluoridy. *Integrovaný registr znečišťování*. [online]. Ministerstvo životního prostředí. Dostupné z <https://www.irz.cz/node/147#voda>
- Gottwaldová, J. (2019). *Optické metody*. Katedra laboratorních metod, LF, MU. Dostupné z <https://slideplayer.cz/slide/15031003/>

- *Hodnocení analytických výsledků*. [online]. UPOL. Dostupné z <http://ach.upol.cz/ucebnice/hodnoceni3.htm>
- Hoffmann, A., Tienpont, B., David, F. & Sandra, P. (2019). Ultra-Fast Determination of the Hydrocarbon Oil Index by Gas Chromatography using a Modular Accelerated Column Heater (MACH). *Global Analytical Solution*. Retrieved from <http://www.gerstel.com/pdf/p-gc-an-2006-06.pdf>
- Holzbecher, Z. & Churáček, J. (1987). *Analytická chemie*. 1. vydání. Praha: Státní nakladatelství technické literatury
- Janoš, P., Kuráň, P., & Nováková, J. (2011). Možnosti stanovení uhlovodíků C10-C40 v kompostech a kalech metodou plynové chromatografie s plamenově-ionizačním detektorem s klasickým injektorem s děličem a bez děliče toku. *Chemické Listy*, 105(2), 133-137. Dostupné z http://w.chemicke-listy.cz/docs/full/2011_02_133-137.pdf
- Kadlec, K. (2018). Měření provozních veličin v cukrovarství: Měření optických vlastností kapalin (část 3.). *Listy Cukrovarnické a Řepařské*, 134(12), 420-423. Dostupné z http://www.cukr-listy.cz/on_line/2018/PDF/420-423.pdf
- Kočí, V., Burkhard, J., & Maršálek, B. (2000). Eutrofizace na přelomu tisíciletí. *Eutrofizace 2000* (p. 3-13). Dostupné z http://www.daphne.cz/indikacezivin/images/eutro_tisic.pdf
- Komínková, J. (2010). *Atomová absorpční spektrometrie - stanovení rtuti pomocí analyzátoru AMA 254*. VŠCHT. Dostupné z http://old.vscht.cz/anl/josef/LabAtom/Navod_AMA_2010.pdf
- Komínková, J. & Mestek, O. (2019). Atomová absorpční spektrometrie. VŠCHT, Praha. Dostupné z <https://www.vscht.cz/files/uzel/0005766/AAS.pdf?redirected>
- Koplík, R. (2019). Molekulová absorpční spektrometrie v ultrafialové a viditelné oblasti. *Přednášky z předmětu Speciální analýza potravin*. VŠCHT Praha. Dostupné z https://web.vscht.cz/~koplikr/UV_VIS_spektrometrie.pdf
- Kotyza, J. Soudek, P. Kafka, Z. & Vaněk, T. (2009). Léčiva – „Nový“ environmentální polutant. *Chemické Listy*, 103, 540-547. Dostupné z http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2009_07_540-547.pdf

- Milde, D. (2017). *Atomová absorpční spektrometrie*. Univerzita Palackého, Olomouc. Dostupné z <http://ach.upol.cz/user-files/intranet/03-asx-aas-1505722150.pdf>
- Ohlašované látky (Arsen a sloučeniny (jako As); Chrom a sloučeniny (jako Cr); Kadmium a sloučeniny (jako Cd); Měď a sloučeniny (jako Cu); Nikl a sloučeniny (jako Ni); Olovo a sloučeniny (jako Pb); Rtut' a sloučeniny (jako Hg); Zinek a sloučeniny (jako Zn)). [online]. *Integrovaný registr znečišťování*. Ministerstvo životního prostředí. Dostupné z <https://www.irz.cz/node/20>
- Ohlašované látky. Antracen. [online]. *Integrovaný registr znečišťování*. Ministerstvo životního prostředí. Dostupné z https://irz.cz/sites/default/files/latky/Anthracen_Karta_latky_11012019.pdf
- Ohlašované látky. Naftalen. [online]. *Integrovaný registr znečišťování*. Ministerstvo životního prostředí. Dostupné z https://irz.cz/sites/default/files/latky/Naftalen_Karta_latky_11012019.pdf
- Ohlašované látky. Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU). [online]. *Integrovaný registr znečišťování*. Ministerstvo životního prostředí. Dostupné z https://irz.cz/sites/default/files/latky/PAU_PAH_Karta_latky_11012019.pdf
- Ohlašované látky. Rtut' a sloučeniny (jako Hg). [online]. *Integrovaný registr znečišťování*. Ministerstvo životního prostředí. Dostupné z https://www.irz.cz/sites/default/files/latky/Rtut_a_jeji_slouceniny.pdf
- Patniak, P. (2010). *Handbook of Environmental Analysis : Chemical Pollutants in Air, Water, Soil, and Solid Wastes* (2nd edition). CRC Press, Taylor and Francis Group.
- Pavlovský, J., Vontorová, J. & Praus, P. (2013). *Metody monitorování životního prostředí (studijní opory)*. Vysoká škola Báňská – Technická univerzita Ostrava. Dostupné z <http://doczz.cz/doc/91066/metody-monitorování-životního-prostředí---fmmi>
- Pohanka, M. (2010) Základy statistiky laboratorních experimentů. *Vojenské Zdravotnické Listy*, 79 (2). Dostupné z <https://www.mmsl.cz/pdfs/mms/2010/02/05.pdf>

- Poustka, J. (2018). *Izolační a separační metody*. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze. Fakulta potravinářské a biochemické technologie. Ústav analýzy potravin a výživy. Dostupné z <https://web.vscht.cz/~POUSTKAJ/ISM%20PIGA%20CZ-4%20GC-2-KOLONY-SF JP2018.PDF>
- Protokol o těžkých kovech k úmluvě o dálkovém znečišťování ovzduší přesahujícím hranice států (2011). *Ministerstvo životního prostředí*. Dostupné z [https://www.mzp.cz/C1257458002F0DC7/cz/informacni_brozury_chemicke_latky/\\$FILE/OZV-protokol_o_tezkych_kovech-20120327.pdf](https://www.mzp.cz/C1257458002F0DC7/cz/informacni_brozury_chemicke_latky/$FILE/OZV-protokol_o_tezkych_kovech-20120327.pdf)
- Přímá potenciometrie s fluoridovou iontově-selektivní elektrodou. [online]. *Laboratoř analytické chemie, návody pro studenty*. Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice.
- Sandra, P. & David, F. (2004) A robust method for the determination of mineral oil in water samples (HYDROCARBON OIL INDEX). WATER, Waste water. *Environmental Technology*. Retrieved from https://www.envirotech-online.com/article/water-wastewater/9/pat_sandra_and_frank_david/a_robust_method_for_the_determination_of_mineral_oil_in_water_samples/882
- Sinica, A. [online]. *Spektrofotometrie ve viditelné oblasti spektra*. Dostupné z <https://uanlch.vscht.cz/files/uzel/0012437/0007~~S8svyVcwMjC0BAA.pdf?redirected>
- Sledování kvality měřením zákalu. [online]. *WTW, meracia a analytická technika, s. r. o.* Dostupné z http://www.wtwcz.com/upload/files/Katal_WTW_140-147_Zakal_refraktometry.pdf
- Spektrofotometrické stanovení zákalu. [online]. *Návody do cvičení Instrumentální metody, Organické kontaminanty*. Vysoká škola báňská – Technická univerzita Ostrava – IEI. Dostupné z http://www.janslechtsa.net/odpadari/files/Stul03_Spektrofotometrie_zakal_LS2009.pdf
- Stanovení zákalu. [online]. *Environmentální servis*. Dostupné z <https://www.vo-da.cz/rozbor-vody-podrobne/stanoveni-zakalu/>

- Šídllová, P., Podlipná, R. & Vaněk, T. (2011). Cytostatická léčiva v životním prostředí. *Chemické Listy*, 105, 8-14. Dostupné z http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2011_01_8-14.pdf
- Teorie HPLC / Základy HPLC. [online]. Dostupné z www.hplc.cz
- Tomaniová, M., Kocourek, V. & Hajšlová, J. (1997) Polycyklické aromatické uhlovodíky v potravinách. *Chemické Listy*, 91, 357–366. Dostupné z http://chemicke-listy.cz/docs/full/1997_05_357-366.pdf
- Turbidimetrie a nefelometrie. [online]. *Praktikum ze základních laboratorních metod*. Katedra biofyziky, Přírodovědecká Fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci. Dostupné z [http://biofyzika.upol.cz/userfiles/file/8_Turbidimetrie%20a%20Nefelometrie\(1\).pdf](http://biofyzika.upol.cz/userfiles/file/8_Turbidimetrie%20a%20Nefelometrie(1).pdf)
- Ultrafialová a viditelná spektrometrie. [online]. *Návody do cvičení z předmětu Instrumentální metody, Organické kontaminanty*. Vysoká škola báňská – Technická univerzita Ostrava. Dostupné z http://www.janslechte.net/odpadari/files/Stul%20c.%203_Spektrofotometrie-PO4.pdf
- User manual Local control software Unicam UV series (2000). *Thermo Spectronic*. Retrieved from http://www.vtpup.cz/common/manual/PrF_biofyz_ThermoSpectronic_UV500_manual_EN.pdf
- Vydrová, L. (2011) *Využití separačních metod pro studium biologicky aktivních látek ve vodách*. Disertační práce. Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí. Fakulta chemická. Vysoké učení technické v Brně. Vedoucí práce Milada Vávrová.
- Welz, B., Becker-Ross, H., Florek, S., Heitmann, U., & Vale, M. G. R. (2003). High-resolution continuum-source atomic absorption spectrometry: what can we expect? *Journal Of The Brazilian Chemical Society*, 14(2), 220-229. Retrieved from <https://doi.org/10.1590/S0103-50532003000200007>
- Základní ukazatele kvality pitné vody a co dělat, pokud voda není v pořádku. [online]. *Laboratorní služby*. Dostupné z <https://www.laboratornisluzby.cz/pdf/popis-ukazatelu.pdf>

Symoly a zkratky

AAS	atomová absorpční spektrometrie
CCD	charge coupled device array detector
ČOV	čistírna odpadních vod
DAD	detektor diodového pole
ECD	detektor elektronového záchytu
ETA-AAS	AAS s elektrotermickou atomizací
F-AAS	plamenová AAS
F--ISE	fluoridová iontově selektivní elektroda
FID	plamenově ionizační detektor
FLD	fluorescenční detektor
GC	plynová chromatografie
GLC	plynová rozdělovací chromatografii
GSC	plynová adsorpční chromatografie
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
ISE	iontově selektivní elektroda
LC	kapalinová chromatografie
NEL	nepolární extrahovatelné látky (uhlovodíky C10–C40)
NPD (AFID)	dusíko-fosforový detektor
MS	hmotnostní detektor
PAH	polycyklické aromatické uhlovodíky
PLOT	kapilární kolona – adsorbent zachycený na kapiláře chemickou vazbou
POPs	perzistentní organické polutanty
R ²	koeficient determinace
RP-HPLC	chromatografie s reverzními fázemi
SCOT	kapilární kolona – kapalný polymer zakotvený na nosiči zachyceném na vnitřní stěně kapiláry
ST	standard
TCD	katarometr; tepelně vodivostní detektor
TISAB	komplexní upravovací roztok (Total Ionic Strength Adjustment Buffer)
VZ	vzorek
WCOT	kapilární kolona – kapalný polymer na vnitřní straně kapiláry
ZF	formazínová jednotka (zákal)

Seznam obrázků

<i>Obrázek 1 Absorpce záření vzorkem</i>	8
<i>Obrázek 2 Ukázka absorpčního spektra ve VIS oblasti (Absorpční spektrum, ELUC)</i>	9
<i>Obrázek 3 Schéma jednopaprskového (vlevo) a dvoupaprskového spektrofotometru (Evans, 2015)</i>	10
<i>Obrázek 4 Schématické znázornění klíčových reakčních kroků – fotometrické stanovení PO_4^{3-} (Patniak, 2010)</i>	11
<i>Obrázek 5 Rozdělení metod pro měření zákalu kapalin (Kadlec, 2018)</i>	14
<i>Obrázek 6 Blokové schéma atomového absorpčního spektrometru</i>	20
<i>Obrázek 7 Metoda vícenásobného standardního přídatku</i>	38
<i>Obrázek 8 Schéma plynového chromatografu (Flame Ionization Detector in Gas Chromatography)</i>	40
<i>Obrázek 9 Konvenční analýza standardní směsi NEL ($50 \mu\text{g.ml}^{-1}$), upraveno podle (Hoffmann et. al., 2019)</i>	41
<i>Obrázek 10 Seznam nejvýznamnějších PAH (dle US EPA)</i>	45
<i>Obrázek 11 Blokové schéma vysokoúčinného kapalinového chromatografu (Czaplicki, 2013)</i>	47

Seznam tabulek

<i>Tabulka 1 Spektrální oblasti (Koplík, 2019)</i>	<i>7</i>
<i>Tabulka 2 Komplementarita barev (Koplík, 2019)</i>	<i>8</i>
<i>Tabulka 3 Příprava 50 ml kalibračních standardů o $c(\text{KH}_2\text{PO}_4) = 0 - 1 \text{ mg.l}^{-1}$</i>	<i>12</i>
<i>Tabulka 4 Příprava 100 ml kalibračních standardů formazínu; zákal 0 – 40 ZF....</i>	<i>17</i>
<i>Tabulka 5 Příprava 100 ml základních zásobních roztoků kovů.....</i>	<i>23</i>
<i>Tabulka 6 Příprava 100 ml kalibračních roztoků (standardů) kovů</i>	<i>24</i>
<i>Tabulka 7 Příprava 50 ml roztoků – metoda standardních přídavek.....</i>	<i>24</i>
<i>Tabulka 8 Metoda kalibrační přímky – naměřené hodnoty a jejich zpracování.....</i>	<i>26</i>
<i>Tabulka 9 Metoda standardních přídavek – naměřené hodnoty a jejich zpracování.....</i>	<i>27</i>
<i>Tabulka 10 Kritické hodnoty koeficientu $K\alpha$ ((Hodnocení analytických výsledků, UPOL).....</i>	<i>31</i>
<i>Tabulka 11 Charakteristiky chromatografického procesu (měřeno HPLC/DAD) ...</i>	<i>49</i>
<i>Tabulka 12 Charakteristiky chromatografického procesu (měřeno HPLC/FLD)</i>	<i>50</i>
<i>Tabulka 13 Charakteristiky chromatografického procesu (měřeno HPLC/FLD)</i>	<i>51</i>
<i>Tabulka 14 Kovy nebezpečné pro životní prostředí a zdraví člověka [Ohlašované látky, IRZ].....</i>	<i>63</i>

Příloha

	Arsen a sloučeniny	Chrom a sloučeniny
Základní charakteristika	polokov vyskytující se ve třech alotropických modifikacích (žlutá, černá, šedá); ve sloučeninách stálý v oxidačních stavech: 3–, 3+, 5+	stříbrobílý kov ($T_{\text{tání}} = 1\,907\text{ °C}$); výskyt v oxidačních stavech: 0, 2+, 3+ (nejstálejší), 6+ (silné oxidační účinky)
Použití	přípravky na konzervaci dřeva; pesticidy; slitiny (s Pb, s Cu) – akumulátory; polovodiče GaAs a InAs (LED, tunelové diody, okénka laserů); sklářský průmysl (As_2O_3)	ocelářství (výroba speciálních slitin, galvanické pokovování); soli (Cr^{3+} , CrO_4^{2-}) – vybarvování tkanin, moření a leptání kovů, kožedělný průmysl; výroba organických barviv, anorganické pigmenty; přípravky na konzervaci dřeva; jako inhibitory koroze v chladicích vodách elektráren
Zdroje úniků	<u>přírozené zdroje</u> : zvětrávání hornin a půd; <u>antropogenní zdroje</u> : spalování fosilních paliv (spaliny i popel a struska); nadměrné užívání pesticidů; prostředky na konzervaci dřeva; metalurgický průmysl	spalování fosilních paliv; odpadní vody z/ze: strojírenského, kožedělného a textilního průmyslu, metalurgie a povrchové úpravy kovů; úniky chladicích vod obsahující inhibitory koroze; nakládání s odpady s obsahem chromu (komunální odpady, galvanické kaly apod.)
Dopady na životní prostředí	schopnost kumulovat se v sedimentech; může se zapojovat do potravního řetězce; patří mezi inhibitory biochemických reakcí	Cr^{3+} – silně se váže na záporně nabitě půdní částice či částice nečistot ve vodě; Cr^{6+} – velmi toxický pro vodní organismy; nesorbuje se na půdní částice, je mnohem mobilnější; silné oxidační činidlo; nehromadí se v potravních řetězcích
Dopady na zdraví člověka	vysoce kumulativní (játra, ledviny, nehty, vlasy, chlupy); sloučeniny As^{3+} jsou toxičtější (5x – 20x) než As^{5+} ; poškození buněk nervového systému, jater, ledvin, žaludku, střev, pokožky; anorexie, anemie; karcinogen; teratogen	Cr^{3+} – esenciální stopový prvek zúčastněný v metabolismu savců, při vyšších dávkách je zdraví škodlivý (nepříznivé účinky na respirační systém, imunitní systém); Cr^{6+} – vředy na kůži při dotyku, podráždění nosní sliznice, perforace nosní přepážky při inhalaci, podráždění trávicího ústrojí po orální expozici; nepříznivě působí na ledviny a játra; astmatické potíže (inhalace prachů); klasifikován jako lidský karcinogen způsobující rakovinu plic

Tabulka 14 Kovy nebezpečné pro životní prostředí a zdraví člověka [Ohlašované látky, IRZ]

	Kadmium a sloučeniny	Měď a sloučeniny
Základní charakteristika	stříbrný, měkký, kujný a tažný kov ($T_{\text{tání}} = 767\text{ °C}$); nejběžnější oxidační stav: 2+	načervenalý kov ($T_{\text{tání}} = 1\,083\text{ °C}$), kujný a tažný; vodič elektrického proudu a tepla; dobře odolává korozi; ve sloučeninách v oxidačních stavech: 1+, 2+
Použití	výroba baterií (hlavně Ni-Cd a solárních), pigmentů, lehkotavitelných slitin, pájecích kovů, polovodičů a domácích spotřebičů (vysavače, chladničky, myčky, televizní a rozhlasové přijímače); stabilizátory plastů, legování mědi, tvorba ochranných povlaků a pokovování; fungicidy	výroba elektrických vodičů, trubek, elektromagnetů, elektrických relé, integrovaných obvodů, vypínačů, plechů odolných proti korozi (pokrývání střech); přísada mincovních slitin, bronz; algicidní preparáty
Zdroje úniků	<u>přírodní zdroje</u> : sopečné výbuchy; <u>antropogenní zdroje</u> : těžba a zpracování kadmia; spalování fosilních paliv a odpadů; hnojení fosfátovými hnojivy s obsahem kadmia; využití čistírenských kalů (spalování, aplikace na půdy); galvanické pokovování a výroba Ni-Cd akumulátorů	<u>přírodní zdroje</u> : zvětrávání, sopečné výbuchy, lesní požáry, rozklad biomasy; <u>antropogenní zdroje</u> : těžba a zpracování měděných rud; spalování fosilních paliv a odpadů; odpadní vody z povrchové úpravy kovů; aplikace algicidních preparátů
Dopady na životní prostředí	vazba na půdní částice, jílové půdy, popílek a prachové částice (atmosférická depozice => přechod do vody nebo půdy, distribuce na velké vzdálenosti); bioakumulace (hromadění v potravních řetězcích); toxické pro vodní organismy; negativně ovlivňuje samočisticí schopnost vody	esenciální prvek pro živočichy a vyšší rostliny (ve větším množství značně toxická pro vodní organismy); v půdě vazba na organické látky a jílové částice (většina zůstává v povrchových částech půdy, nedochází k transportu hlouběji)
Dopady na zdraví člověka	toxický prvek výrazně poškozuje ledviny; játra, kosti, plíce, zažívací trakt; nemoc „itai-itai“; pravděpodobný lidský karcinogen (podle klasifikace EPA) – může způsobovat rakovinu plic a prostaty; teratogen	esenciální prvek pro lidský organismus; vysoké dávky způsobují žaludeční a střevní bolesti, poškození jater a ledvin a anemii; některé sloučeniny dráždí kůži, způsobují záněty

Tabulka 14 (pokračování)

	Nikl a sloučeniny	Olovo a sloučeniny
Základní charakteristika	bílý, feromagnetický, kujný, tažný kov; dobrý vodič tepla a elektřiny; nejběžnější oxidační stav: 2+ (v komplexních sloučeninách: 0, 1+, 3+)	lesklý, měkký, stříbrošedý kov ($T_{\text{tání}} = 327,4\text{ °C}$) s velkou odolností vůči korozi; kujný, tažný, špatně vede elektřinu; oxidační stavy: 2+ (nejstálější), 4+
Použití	výroba: nerez oceli (~ 65 %), vysoce legovaných slitin (~ 12 %); slitin (výroba šperků, lodních šroubů, kuchyňského vybavení), nabíjecích baterií (Nikl-hydridové baterie – mobilní telefony), katalyzátorů, keramiky, mincí a odlitků; k barvení skla, k pokovování	výroba baterií, střeliva; pohlcuje RTG záření a γ -paprsky => ochrana na pracovištích; konstrukce nádob na uchovávání koncentrované H_2SO_4 ; pájky (slitiny Pb+Sn); výroba fotografických expozimetrů a fotočlánků (PbS); výroba zápalek a pyrotechnického materiálu (PbO_2)
Zdroje úniků	<u>přírodní zdroje:</u> aerosoly z mořské hladiny, půdní prachy, sopečný popel; lesní požáry; meteoritický prach; <u>antropogenní zdroje:</u> spalování fosilních paliv a odpadů; rafinerie ropy a plynu; těžba a zpracování Ni; aplikace čistírenských kalů do půdy	<u>přírodní zdroje:</u> lesní požáry; do ovzduší se může dostávat ve formě prachu, kouře a aerosolů mořské vody; <u>antropogenní zdroje:</u> těžba a pracování olova; výroba a zpracování akumulátorů; spalování odpadů; aplikace čistírenských kalů a průmyslových kompostů do půdy
Dopady na životní prostředí	váže se na částice osahující Fe a Mn => častý výskyt v půdě a sedimentech; kumulace rostlinami => omezení růstu, potlačení fotosyntézy a transpirace; toxický pro vodní organismy	ve vzduchu se váže na prachové částice (inhalace, smytí deštěm do půdy nebo vody, usazování na vegetaci); vysoký akumulární koeficient => kumulace v sedimentech, kalech, biomase
Dopady na zdraví člověka	při kontaktu způsobuje vznik kožní dermatitidy (niklový svrab); alergie na Ni (6 – 10 % obyvatelstva); potenciální karcinogen (rakovina plic, nosní přepážky, vzácněji hltanu); poškozuje srdce, cévy, zažívací trakt, játra, ledviny, CNS	poškození ledvin, jater, nervového systému (podrážděnost, poruchy pozornosti a paměti, bolesti hlavy, svalový třes, halucinace, prodloužení reakčního času, pokles IQ a rychlosti vedení nervového vzruchu), červených krvinek, cév, svalstva; teratogen; pravděpodobný lidský karcinogen (rakovina plic a ledvin)

Tabulka 14 (pokračování)

	Rtuť a sloučeniny	Zinek a sloučeniny
Základní charakteristika	jediný kov, který je za normálních podmínek tekutý ($T_{\text{tání}} = -38,83\text{ °C}$; $T_{\text{varu}} = 357\text{ °C}$); poměrně špatný vodič tepla, dobrým elektrický vodič; snadno tvoří slitiny (amalgámy) skoro se všemi běžnými kovy (kromě Fe); běžné oxidační stavy: 1+, 2+	měkký lehce tavitelný kov, za normálních teplot křehký; kujný (100 – 150 °C; při teplotách nad 210 °C se opět stává křehkým, za vysokých teplot je znovu měkký a kujný); vede elektrický proud; má vysoký redukční potenciál; ve sloučeninách v oxidačním stavu 2+
Použití	výroba průmyslových chemikálií; elektronika a elektrotechnika; chemie (elektrody); měřicí zařízení (teploměry); zemědělství (moření osiva); farmaceutický průmysl a zubní laboratoře (amalgámy); výroba pyrotechnických rozbušek (třaskavá rtuť – azid rtuťnatý)	čtvrtý průmyslově nejvíce vyráběný kov; antikorozní ochranný materiál především pro Fe a jeho slitiny; výroba odlitků, kovových součástek; mosaz; ZnO – výroba barviv, keramický a sklářský průmysl; ZnS (luminiskuje) – světélkující nátěry, pigment pro dětské hračky; výroba deodorantů, léčiv (masti na vyrážky, vitaminové preparáty)
Zdroje úniků	<u>přírodní zdroje:</u> zvětrávání přírodních ložisek, sopečné výbuchy; <u>antropogenní zdroje:</u> spalování fosilních paliv a odpadu; emise spojené s těžbou a zpracováním rud s obsahem Hg; používání hnojiv a fungicidů s obsahem Hg	spalování fosilních paliv; těžba a zpracování rud; průmyslové odpadní vody (zpracování neželezných rud, mořírny mosazi, zpracování tuků a povrchová úprava kovů); hnojiva s obsahem Zn
Dopady na životní prostředí	ve vzduchu může docházet k přeměně na jiné formy, transport na velké vzdálenosti; perzistence; přeměna anorganických forem na organické (biomethylace) => hromadění v potravních řetězcích (bioakumulace) – nejvyšší obsahy nalézány v mořských rybách a houbách	běžná součást hornin, půd a sedimentů; v půdě většina Zn ve formě vázané na půdní částice, nerozpouští se ve vodě; do podzemních vod se dostává při oxidačním rozkladu sulfidických rud; Zn^{2+} se sorbuje na jíly a huminové koloidy; toxický pro ryby (lososovité) a jiné vodní organismy
Dopady na zdraví člověka	toxická jednotlivých sloučenin závislá na jejich rozpustnosti ve vodě (nejvíce rizikové Hg^{2+} ; toxicita Hg^0 páry); zvláště nebezpečné jsou organokovové sloučeniny => dimethylrtuť/ nemoc Minamata; kumulativní jed (ledviny; játra, slezina)	esenciální stopový prvek; nejčastější případy předávkování: vitamínovými doplňky, jídlem skladovaným v pozinkovaných nádobách (bolesti žaludku, křeče, zvracení, průjem); chronická konzumace velkého množství: vyšší riziko srdečních chorob, ovlivnění imunitního systému

Tabulka 14 (pokračování)