

Univerzita J. E. Purkyně v Ústí nad Labem

Fakulta životního prostředí

Vybrané úlohy

z instrumentální analýzy

Autor: Ing. Sylvie Grötschelová

Spoluautoři: Dr. Ing. Pavel Kuráň, Doc. PhDr. Jaroslav Rejnek CSc.

Obsah

Úvod.....	3
1 Obecné zásady práce v laboratoři	4
1.1 Vedení záznamů v laboratoři	4
1.2 Chyby měření.....	4
1.3 Vyjadřování analytických výsledků.....	5
2 Elektrochemické stanovení rozpuštěného kyslíku	7
2.1 Stanovení salinity ve vzorku vody	8
2.2 Kalibrace přístroje pro stanovení kyslíku	8
2.3 Stanovení rozpuštěného kyslíku ve vzorku vody	9
2.4 Protokol.....	9
3 Diferenční pulsní polarografie	10
3.1 Seznámení se s přístrojem 797 VA Computrace	12
3.2 Stanovení barviv E 122 a E 124 v limonádách.....	12
3.3 Protokol.....	13
4 Stanovení celkového dusíku ve vodě po mineralizaci	14
4.1 Jednotka DigiPROBE	14
4.2 Mineralizace vzorku vody	15
4.3 Stanovení celkového dusíku	15
4.4 Protokol.....	15
5 Titrační stanovení Cl⁻ iontů	16
5.1 Stanovení titru odměrného roztoku AgNO ₃	17
5.2 Stanovení chloridových iontů ve vzorku vody	17
5.3 Protokol.....	17
6 Kapalinová chromatografie.....	18
6.1 Spuštění přístroje	18
6.2 Spuštění slepého pokusu	19
6.3 Měření kalibrační závislosti.....	19
6.4 Stanovení BTEX ve vzorku vody	19
6.5 Protokol.....	20
7 Stanovení železa metodou plamenové AAS	21
7.1 Příprava.....	23
7.2 Postup práce	24
7.3 Závěry	25
Literatura.....	30

Úvod

Skripta „Vybrané úlohy z instrumentální analýzy“ jsou určena studentům z oborů Ochrana životního prostředí v průmyslu a Odpadové hospodářství na Fakultě životního prostředí a vybraných oborů na Přírodovědecké fakultě Univerzity Jana Evangelisty Purkyně v Ústí nad Labem.

Cílem těchto skript je seznámit studenty se zásadami „správné laboratorní praxe“ včetně zásad pro vyhodnocování měření a prezentaci výsledků. V praktické části jsou uvedeny podrobné pracovní návody pro vybrané úlohy z instrumentální analýzy. Jsou zde zahrnuty techniky, které jsou k dispozici v laboratořích KTEV FŽP a KCH PřF UJEP, jako jsou spektrální metody, elektrochemické metody, chromatografické metody aj.

1 Obecné zásady práce v laboratoři

1.1 Vedení záznamů v laboratoři

Každá laboratoř, která poskytuje služby v oblasti analýzy vzorků, musí vést záznamy o evidenci vzorků. Zadávané vzorky jsou evidovány pod interním číslem laboratoře, vzorky se analyzují jako anonymní a současně se vyhotoví průvodní list, do kterého se zapisují konečné naměřené hodnoty. Po zanalyzování všech zadaných parametrů se podle průvodního listu vystaví protokol.

Záznamy z měření v analytické laboratoři by měly být zapisovány do deníků nebo sešitů, ne na volné listy. Deníky musí být autentické, přehledné, srozumitelné a musí obsahovat veškeré výpočty důležité pro přípravu či vyhodnocení naměřených hodnot. Dále je nutné zapisovat ředění vzorků, navážky vzorků, přípravu kalibračních standardů apod. Pokud je potřeba odstranit chybu v záznamu, je nutné ji opravit tak, aby bylo čitelné původní číslo či text, a změna musí být podepsána osobou, která změnu provedla a musí být doplněna datem opravy. Jestliže jsou vzorky měřeny na přístroji, který vyhodnocuje naměřená data a ukládá je do samostatných souborů, je důležité zapsat si do deníku či záznamu název souboru, aby bylo možné jej kdykoliv dohledat.

1.2 Chyby měření

Výsledky získané opakovaným měřením se obvykle liší a liší se obvykle též od skutečné hodnoty. Rozdíl hodnoty zjištěné od hodnoty skutečné označujeme jako chybu měření. Výsledky chemických analýz mohou být zatíženy chybami náhodnými, soustavnými nebo hrubými.

Náhodné (statistické) chyby vznikají jako výsledek velkého počtu malých a zcela nepravidelných, tzv. elementárních chyb, k nimž dochází náhodně při jednotlivých operacích analytického postupu, popř. při měřeních, tj. při zjišťování hodnot, z nich se vypočítává výsledek. Náhodnými chybami je zatíženo každé stanovení, vyskytují se nepravidelně a bývají obvykle malé.

Soustavné (systematické) chyby mají stálý, pravidelný charakter a zkreslují výsledky vždy v určitém směru, čímž způsobují, že určitá analytická metoda poskytuje např. výsledky soustavně vyšší, nebo nižší. Jejich příčinou je nedokonalý

průběh chemické reakce, která je základem dané analytické metody, dále nevyhovující čistota chemikálií, nepřesnost přístroje, nevhodná kalibrace apod. Soustavné chyby lze nejlépe prokázat analýzou referenčního materiálu a porovnáním výsledku se skutečnou hodnotou.

Hrubé chyby vznikají obvykle z nedopatření nebo jsou zaviněny malou pečlivostí pracovníka, který rozbor prováděl, ale mohou být také způsobeny nevhodnou volbou postupu. Výskyt hrubé chyby vždy velmi závažně ohrozí správnost konečného výsledku, a proto výsledky stanovení, o nichž se lze domnívat, že mohou být hrubou chybou zatíženy, vylučujeme a nepoužijeme je k výpočtu konečného výsledku.

Podle toho, jaký převažující charakter mají chyby, které zatěžují určitou analýzu, rozeznáváme *výsledky správné a výsledky přesné*. *Správné* jsou takové výsledky, které se v průměru dobře shodují se skutečnou hodnotou (jsou zatíženy jen náhodnými chybami). *Přesné* jsou výsledky, které se vzájemně dobře shodují, ale mohou se od skutečné hodnoty lišit o soustavnou chybu.

1.3 Vyjadřování analytických výsledků

ČSN EN ISO/IEC 17025:25 požaduje, aby laboratoře vyhodnocovaly nejistotu svých měření. Nejistotu je možno vyjádřit jako směrodatnou odchylku nebo vypočtený násobek směrodatné odchylky. Při určování nebo odhadování nejistoty konkrétního postupu a analytu je třeba zajistit, aby odhad bral explicitně v úvahu všechny možné zdroje nejistoty a vyhodnotil významné složky.

Mnoho různých faktorů způsobuje, že se výsledek analytického měření téměř jistě odchyluje od skutečné hodnoty. Například vliv teploty měřidla objemu, odražené a rozptýlené světlo ve spektroskopických přístrojích, změny elektrického zdroje, interpretace postupu analytikem a nedokonalé výtěžnosti extrakce mohou potenciálně ovlivnit výsledek. Pokud je to rozumně možné, musí se takové chyby minimalizovat externí kontrolou nebo přímo korigovat například použitím vhodného korekčního koeficientu. Není však možné získat přesnou odchylku jednotlivého výsledku měření od (neznámé) skutečné hodnoty. Z tohoto důvodu se musí odhadovat pravděpodobný rozsah odchylky (nejistota).

Hodnota výsledku měření y spolu s nejistotou měření se uvádí nejčastěji ve tvaru $y \pm U$, kde U je *rozšířená nejistota* charakterizující interval hodnot, ve kterém leží skutečná hodnota veličiny y s určitou apriorní pravděpodobností. Jako hodnota

této pravděpodobnosti se volí nejčastěji 0,95. Doporučovaný formát zápisu konkrétního výsledku x s přiměřeným počtem platných číslic je následující:

(Výsledek): $x \pm U$, tedy např.
celkový dusík: $3,52 \pm 0,14 \%$ (hm.)

Pro práci v laboratořích v tzv. regulované sféře (oblast ochrany zdraví lidí, oblast ochrany životního prostředí aj.) platí poměrně striktní pravidla a bývají v nich zavedeny formální systémy jakosti. Nejběžnější jsou v současné době systémy jakosti podle normy ČSN EN ISO/IEC 17025:2017, podle kterých pracují tzv. akreditované laboratoře (je vhodný pro laboratoře provádějící rutinní analýzy) a systém tzv. správné laboratorní praxe – SLP (good laboratory practice, GLP) vhodný spíše pro provádění nerutinních studií.

2 Elektrochemické stanovení rozpuštěného kyslíku

Obsah rozpuštěného kyslíku je důležitým ukazatelem čistoty v souvislosti s jejím znečištěním biogenními prvky a organickými látkami. Stanovení obsahu rozpuštěného kyslíku lze provádět buď velmi pracnou jodometrickou titrací nebo v současné době velmi rychle a pohodlně potenciometricky s membránovou sondou.

Metoda využívá sondy, která se skládá z dvojice kovových elektrod a vhodného elektrolytu, které jsou od měřeného prostředí odděleny tenkou selektivní membránou z plastu. Funkce membrány spočívá v tom, že nepropouští vodu ani iontové rozpuštěné látky, ale propouští pouze plyny, a z nich jen kyslík reaguje s elektrodami. Vzhledem k potenciálovému rozdílu mezi elektrodami kyslík difundující membránou je na katodě redukován na hydroxidové ionty a na anodě vcházejí do roztoku kovové ionty. Takto vznikající proud je přímo úměrný transportní rychlosti kyslíku membránou a vrstvou elektrolytu, a tedy i parciálnímu tlaku rozpuštěného kyslíku ve vzorku vody za dané teploty a daného atmosférického tlaku. Propustnost membrány pro plyny se značně mění s teplotou, proto většina moderních přístrojů změnu teploty kompenzuje.

Metoda se používá pro stanovení rozpuštěného kyslíku ve všech druzích vod. Přednostně je použitelná tam, kde selhává jodometrická metoda, tj. u vod silně zbarvených či velmi zakalených nebo u vod s obsahem látek, které vážou jod.

Vlastní práce

- Stanovení salinity ve vzorku vody
- Kalibrace přístroje pro stanovení kyslíku
- Stanovení množství kyslíku ve vzorku vody



Obr. Multifunkční přístroj firmy inoLab

2.1 Stanovení salinity ve vzorku vody

Jelikož některé vzorky obsahují větší množství solí (větší než 1 g.l^{-1}), které ovlivňují naměřenou hodnotu množství kyslíku, je potřeba před stanovením kyslíku provést stanovení salinity. Naměřená hodnota se musí zadat do přístroje. Rozsah hodnot pro salinitu se pohybuje v rozmezí od 0 do 70.

K přístroji inoLab připojíme vodivostní elektrodu. Poté ji ponoříme do měřeného roztoku. Pomocí kláves \wedge a \vee nastavíme na displeji stavový symbol Sal. Zároveň se zobrazí hodnota naměřené salinity. Za stálého míchání vyčkáme na ustálení měřené hodnoty. Po stanovení salinity odpojíme vodivostní čidlo a zapojíme kyslíkovou sondu.

2.2 Kalibrace přístroje pro stanovení kyslíku

Kyslíkové elektrody stárnou. Tyto změny mají vliv na strmost kyslíkové elektrody. Výsledkem je zobrazení nepřesných hodnot měření. Kalibrací se určí aktuální hodnota strmosti elektrody a uloží se do paměti přístroje. Většinou se kalibruje v pravidelných intervalech jednou za dva týdny. Kalibrace se provádí ve vzduchu nasyceném vodními parami v kalibrační nádobce OxiCal®-SL.

Po kalibraci přístroj automaticky vyhodnotí aktuální stav elektrody a její relativní strmost. Vyhodnocení se zobrazí na displeji. Relativní strmost nemá vliv na správnost měření. Její nízké hodnoty ukazují, že v brzké době dojde k vyčerpání elektrolytu a elektroda bude muset být regenerována. Hodnoty relativní strmosti se pohybují v rozmezí 0,6 až 1,25.

K přístroji připojíme kyslíkovou elektrodu. Destilovanou vodou ovlhčíme houbičku v kalibrační nádobce. Nesmí být mokrá. Do této nádoby vložíme kyslíkovou elektrodu a upevníme ji. Na přístroji opakovaně stiskneme klávesu CAL, dokud se na displeji nezobrazí režim kalibrace. Poté stiskneme klávesu RUN ENTER a na displeji začne blikat symbol AR. Jakmile je dosaženo ustálené hodnoty, přestane na displeji AR blikat. Pokud kalibrace je ukončena, na displeji se zobrazí hodnota zjištěné relativní strmosti. Stisknutím klávesy M přejdeme do režimu měření reálných vzorků.

2.3 Stanovení rozpuštěného kyslíku ve vzorku vody

Nejprve opakovaně stiskneme klávesu CAL, dokud se na displeji nezobrazí symbol Sal. Pomocí kláves \wedge a \vee nastavíme na displeji naměřenou hodnotu salinity. Stisknutím klávesy M přejdeme zpátky do režimu měření. Do 250 ml kádinky odpipetujeme 100 ml vzorku vody a ponoříme elektrodu do roztoku. Z přístroje zaznamenáme hodnotu a měření opakujeme ještě 6x. Poté změříme obsah kyslíku v pitné vodě, také celkem 7x. Naměřené hodnoty zprůměrujeme a vypočítáme směrodatnou odchylku stanovení.

2.4 Protokol

Protokol musí obsahovat:

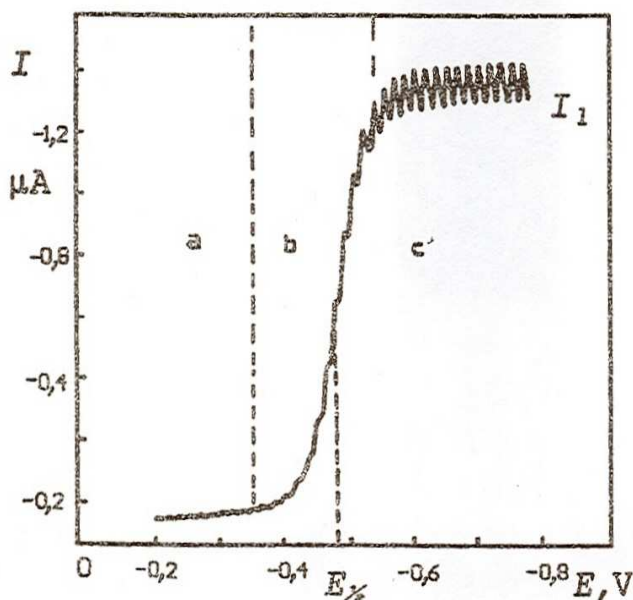
- Název práce
- Princip
- Použité chemikálie a přístroje
- Výpočty
- Závěr

3 Diferenční pulsní polarografie

Polarografie je voltmetrická metoda s jednou polarizovatelnou a jednou nepolarizovatelnou elektrodou. Jako polarizovatelnou elektrodu volíme v klasickém provedení rtuťovou kapkovou elektrodu, nepolarizovatelnou elektrodou je buď velkoplochá rtuťová elektroda (rtuťové dno) nebo některá z běžných referenčních elektrod.

Závislost proudu na potenciálu znázorňuje polarografická křivka: $E_{1/2}$ je tzv. půlvlnový potenciál, který je pro danou látku konstantní. Tvar polarizační křivky závisí jen na polarizaci rtuťové kapkové elektrody, která zase závisí na složení roztoku. Polarizační křivka má tři oblasti:

- oblast polarizace:** vložené napětí nedosahuje hodnoty potřebné k průběhu elektrochemické reakce. Proud je proto prakticky nulový. Nepatrná hodnota proudu se nazývá nabíjecí nebo kapacitní proud.
- oblast depolarizace:** proud je způsoben redukcí látky na katodě např. $\text{Cu}^{2+} + 2\text{e}^- \rightarrow \text{Cu}$. Příslušné činidlo se nazývá depolarizátor (Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ag^+).
- oblast limitního difúzního proudu:** úbytek přeměněných látek v okolí elektrody se vyrovnává difúzí. Velikost limitního difúzního proudu udáváme výškou vlny.



Obr. Polarizační křivka

Každý depolarizátor snižuje polarizaci jinou měrou, což se projeví různým umístěním vlny na ose napětí. Polohu vlny posuzujeme podle tzv. půlvlnového potenciálu $E_{1/2}$ (tj. difúzní proud dosáhne poloviční hodnoty limitního I). $E_{1/2}$ má konstantní hodnotu nezávislou na koncentraci depolarizátoru (hodnoty jsou tabelovány). Je-li v roztoku více složek s dostatečně odlišnými hodnotami $E_{1/2}$ (o 0,2 V), vytváří každá složka svou vlastní vlnu. Získáme tak polarografické spektrum.

U většiny analýz je nutno odstranit kyslík z roztoku, protože se redukuje na katodě a jeho polarografické maximum zastíní křivky jiných složek. Proto do roztoku zavádíme inertní plyn, např. dusík.

Diferenční pulsní polarografie je mnohem citlivější metodou než klasická polarografie. Použitím visící kapkové elektrody s mechanickým odtrháváním kapek se výrazně snižuje spotřeba rtuti. Napětí vkládané mezi polarizovatelnou a srovnávací elektrodu se mění po malých přírůstcích. Na konci každého přírůstku napětí je vložen obdélníkový napěťový impuls. Proud je měřen vždy před začátkem pulsu a před jeho koncem a je zjištěna diference mezi těmito proudy ΔI . Tato diference se vynáší v závislosti na vkládaném napětí.

Vlastní práce

- Seznámení se s přístrojem 797 VA Computrace
- Stanovení barviv E 122 a E 124 v limonádách



Obr. Polarograf 797 VA Computrace

3.1 Seznámení se s přístrojem 797 VA Computrace

Nejprve zapneme polarograf, pustíme bombu s dusíkem a zapneme počítač. Tlak na dusíkové láhvi musíme během měření kontrolovat. Otevřeme soubor pro měření a otevřeme soubor barviva. Pokud je metoda již aktivní, překontrolujeme parametry přístroje uvedené v tabulce. Nejprve ve složce Windows otevřeme složku Working Metod specifications, poté Edit parameters. Pod záložkou Voltametric a Determination jsou uvedena data.

Tabulka 1. Parametry k přístroji CA computrace

Initial purge time (s)	30
Equilibration time (s)	5
Mode	Differential Pulse
Electrode	HMDE
Start potential (V)	- 0,2
End potential (V)	- 0,9
Pulse amplitude (V)	0,05005
Pulse time (s)	0,04
Voltage step (V)	0,005951
Voltage step time (s)	0,4

3.2 Stanovení barviv E 122 a E 124 v limonádách

Stanovení barviv E 122 (Azorubin) a E 124 (Ponceau 4R) je vhodné provádět metodou standardních přídávků, kdy se do roztoku limonády přidává známé množství barviva v několika opakováních.

Do polarografické nádoby odpipetujeme 50 ml 0,1 M octanu amonného (blank). Po probublání a proměření blanku přidáme do roztoku 200 µl limonády. Vzorek probubláme a proměříme. Pak do polarografické nádoby přidáme 10 µl 0,001 M barviva E 122 a 20 µl 0,001 M barviva E 124. Vzorek opět probubláme a proměříme. Přídavek opakujeme ještě jednou. Po skončení měření vyhodnotíme naměřená data pomocí Excelu a vypočítáme množství barviva v mg.l⁻¹.

$$M_{122} = 502,4 \text{ g.mol}^{-1}$$

$$M_{124} = 604,48 \text{ g.mol}^{-1}$$

3.3 Protokol

Protokol musí obsahovat:

- Název práce
- Princip
- Použité chemikálie a přístroje
- Výpočty
- Závěr

4 Stanovení celkového dusíku ve vodě po mineralizaci

Obsah celkového dusíku ve vodě je dán součtem koncentrací dusíku všech anorganických a organických dusíkatých sloučenin obsažených ve vzorku. Zjištění hodnoty obsahu celkového dusíku je důležité při stanovení látkové dusíkové bilance povrchových vod a biologických čistírenských zařízení odpadních vod. V pitných vodách se hodnota celkového dusíku nestanovuje. Obsah celkového dusíku se udává jako hmotnostní koncentrace v mg.l^{-1} .

Při fotometrickém stanovení celkového dusíku metoda spočívá v tom, že amoniakální dusík, dusitany a četné sloučeniny s organicky vázaným dusíkem přítomné ve zkoušeném vzorku se oxidují na dusičnany, které jsou v dalším reakčním kroku redukovány na dusitany. **Celkový dusík je tedy sumárně stanovován jako dusitanový dusík.** Oxidace a mineralizace vzorku alkalickým roztokem peroxodisíranu probíhá v mineralizační nádobce při teplotě 120 °C. Následná redukce dusičnanů na dusitany probíhá v redukční kolonce, která obsahuje poměděné kadmium.

Vlastní práce

- Seznámení se s mineralizační jednotkou DigiPROBE
- Mineralizace vzorku vody
- Stanovení celkového dusíku

4.1 Jednotka DigiPROBE

Popis a použití mineralizační jednotky je popsán v samostatném návodu v laboratoři. Po prostudování daného návodu nastavíme jednotlivé parametry rozkladu. V operačním menu nastavíme teplotu rozkladu 120 °C, dobu vytápění na 60 minut a ukončení zahřívání na „OFF“.

4.2 Mineralizace vzorku vody

Do dvou rozkladných nádobek odpipetujeme 25 ml vzorku vody a přidáme do každé 0,5 g peroxodisíranu draselného naváženého s přesností na 1 mg. Vzorky vložíme do rozkladné jednotky a necháme je při 120 °C mineralizovat 80 minut. Po skončení mineralizace vyjmeme vzorky z rozkladné jednotky a umístíme je do stojanu v digestoři. Rozložené vzorky převedeme do 50 ml odměrných baněk a doplníme destilovanou vodou po rysku. Vzorky uchováme do příštích laboratoří.

4.3 Stanovení celkového dusíku

Ze zásobního roztoku $1000 \text{ mg.l}^{-1} \text{ NO}_3^-$ odpipetujeme x, y, z ml roztoku do 50 ml odměrných baněk, aby koncentrace v jednotlivých baňkách byla 25, 50, 100, 150 $\text{mg.l}^{-1} \text{ NO}_3^-$. Z těchto připravených roztoků odpipetujeme po 1 ml roztoku do reakčních ampulí od firmy Merck. K tomu opatrně přidáme 1 ml roztoku N-3K. Reakční ampuli uzavřeme a promícháme. Necháme ji 10 minut reagovat, poté proměříme kalibrační body na spektrofotometru.

Z rozložených vzorků odpipetujeme 1 ml roztoku do reakčních ampulí. K tomu opět opatrně přidáme 1 ml roztoku N-3K. Reakční ampuli uzavřeme a promícháme. Necháme ji 10 minut reagovat, vzorky proměříme na spektrofotometru při vlnové délce 338 nm a vypočítáme množství dusíku ve vzorku.

4.4 Protokol

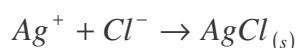
Protokol musí obsahovat:

- Název práce
- Princip
- Použité chemikálie a přístroje
- Výpočty
- Závěr

5 Titrační stanovení Cl⁻ iontů

Chloridové ionty se titrují odměrným roztokem dusičnanu stříbrného v silně kyselém prostředí za vzniku málo rozpustného chloridu stříbrného v přítomnosti kombinované stříbrné elektrody. Metoda je vhodná pro stanovení chloridů ve vodách barevných či zakalených, ve kterých by barevný přechod v bodě ekvivalence byl těžko postřehnutelný.

Při stanovení probíhá tato reakce:



Vlastní práce

- Seznámení se s přístrojem Titrino 794
- Stanovení titru odměrného roztoku AgNO₃
- Stanovení chloridových iontů ve vzorku vody



Obr. Automatický titrátor Titrino 794

5.1 Stanovení titru odměrného roztoku AgNO_3

Do malé kádinky odvážíme 0,5 g základní látky chloridu sodného s přesností 0,1 mg. Navážku kvantitativně převedeme do 100 ml odměrné baňky a doplníme po rysku destilovanou vodou. Z připraveného zásobního roztoku odpipetujeme 1 ml NaCl do 150 ml kádinky a naředíme přibližně na 100 ml destilovanou vodou a okyselíme jednou až třemi kapkami HNO_3 (1+1). Do kádinky ponoříme elektrodu s míchadlem a pomocí počítače spustíme titraci. Množství titračního činidla si zapíšeme a opakujeme titraci ještě dvakrát. Z naměřených hodnot vypočítáme přesnou koncentraci AgNO_3 a výsledek uvedeme jako průměr.

5.2 Stanovení chloridových iontů ve vzorku vody

Do 150 ml kádinky odpipetujeme 100 ml odpadní vody, okyselíme a ztitrujeme. Podle množství spotřebovaného titračního činidla (mělo by být 8 až 12 ml) odpipetujeme větší nebo menší množství měřeného vzorku. Pokud se spotřeba činidla pohybuje již v uvedeném intervalu, opakujeme stanovení ještě dvakrát. Z naměřených hodnot vypočítáme průměrné množství chloridových iontů v mg.l^{-1} .

$$M_{\text{NaCl}} = 58,443 \text{ g.mol}^{-1}$$

$$M_{\text{Cl}} = 35,453 \text{ g.mol}^{-1}$$

5.3 Protokol

Protokol musí obsahovat:

- Název práce
- Princip
- Použité chemikálie a přístroje
- Výpočty
- Závěr

6 Kapalinová chromatografie

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (high-performance liquid chromatography - HPLC) patří mezi separační metody pro oddělování složitých směsí látek. Vysokých účinností separace se ve srovnání s klasickou kolonovou kapalinovou chromatografií dosahuje použitím stacionárních fází zakotvených na malých částicích pravidelného tvaru a jednotné velikosti, které homogenně vyplňují kolonu. Samotný separační proces probíhá na základě různé intenzity interakce dělených látek se stacionární fází. Stacionární fáze je v kontaktu s mobilní fází zabezpečující transport separovaných látek, které se uvolní se stacionární fází nebo s ní vůbec neinterakují. Průtok mobilní fáze přes kolonu je zabezpečen vysokotlakou pumpou – proto se tato metoda označuje i pojmem „vysokotlaká kapalinová chromatografie – HPLC. Dávkuje se malá množství vzorku, řádově desítky až stovky mikrolitrů.

Vlastní práce

- Spuštění přístroje, nastavení parametrů pro průtok a složení mobilní fáze
- Spuštění slepého pokusu
- Měření kalibrační závislosti pro standardy BTEX (benzen, toluen, etylbenzen, xyleny)
- Stanovení BTEX ve vzorku vody

6.1 Spuštění přístroje

Zapnou se postupně hlavní vypínače v pořadí pumpa, detektor, interface, odplyňovač mobilní fáze (degasér), počítač. Po naběhnutí operačního systému Windows se z plochy spustí program D-7000. V programu se stlačí ikonka „i“ pro inicializaci systému. Poté se otevře menu „File“, „Open“ a vloží se metoda „Labaky_BTEX“ a tabulka vzorků „sample table“ Labaky_BT. Překontroluje se průtok a složení mobilní fáze podle pokynů vyučujícího. Poté se zapne vysokotlaká pumpa a spustí se okno pro sběr dat „data acquisition“.

6.2 Spuštění slepého pokusu

Po ustálení základní linie se pomocí 1 ml stříkačky nastříkne čisté rozpouštědlo (methanol), aby se ověřila jeho čistota i vliv na tvar chromatografického záznamu. V případě opakovaného výskytu nečistot se po analýze standardů (bod 2.3) určí jestli se jedná o stanovované látky BTEX. Když áno, zjistí se plochy píků pro jednotlivé BTEX v slepém pokusu, které se odečtou od zjištěných hodnot pro jednotlivé standardy a neznámý vzorek vody.

6.3 Měření kalibrační závislosti

Ze zásobního roztoku o koncentraci 5000 ppm (v/v) se ředěním do metanolu připraví sada kalibračních roztoků směsi BTEX o koncentracích 50 mg/l, 100 mg/l, 200 mg/l, 400 mg/l, 800 mg/l. Hustoty jednotlivých BTEX pro přepočet ppm (v/v) na mg/l jsou uvedeny v tabulce 1. Jednotlivé standardy se nastříknou dvakrát pomocí 1 ml stříkačky do kapalinového chromatografu. Měří se retenční čas jednotlivých BTEX a průměrná plocha ze dvou měření, která se získá vyhodnocením chromatografického záznamu integrací pro jednotlivé píky. Naměřené hodnoty retenčních časů, ploch a průměrné hodnoty ploch pro jednotlivé BTEX se sepíšou do tabulky. Ze získaných hodnot ploch pro jednotlivé koncentrace BTEX a známých koncentrací se sestrojí kalibrační závislost.

6.4 Stanovení BTEX ve vzorku vody

Z neznámého vzorku vody se třikrát nastříkne 20 µl pomocí 1 ml stříkačky. Pomocí retenčních časů se zjistí přítomnost BTEX v neznámém vzorku, která se ověří srovnáním UV-Vis spekter jednotlivých BTEX v neznámém vzorku se spektry naměřenými pro standardy BTEX. Po identifikaci jednotlivých BTEX v neznámém vzorku uvedeným postupem se vyhodnotí plochy pro jednotlivé BTEX a vypočte se průměrná hodnota ze tří měření. Z kalibrační křivky se odečítá graficky i výpočtem koncentrace BTEX v neznámém vzorku ze vztahu:

$$y = ax + b$$

kde y – plocha píku jednotlivých BTEX pro danou koncentraci
 x – koncentrace (mg/l) jednotlivých standardů BTEX
 a – směrnice kalibrační křivky
 b – úsek na osy y

6.5 Protokol

Protokol musí obsahovat:

- Název práce
- Princip
- Použité chemikálie
- Popis použitého přístroje a chromatografického systému (typ, kolona, složení mobilní fáze, průtok)
- Výpočty - příprava kalibračních standardů, sestavení a graf kalibrační křivky

- Výsledek – výpočet množství jednotlivých BTEX v neznámém vzorku vody
- Závěr

Tabulka 2. Hustoty BTEX

Aromát	Měrná hmotnost (g/cm ³)
Benzen	0,879
Toluen	0,867
EtBe	0,867
Xyleny	0,869

7 Stanovení železa metodou plamenové AAS

Princip metody atomové absorpční spektrometrie (AAS) je založen na měření absorpce elektromagnetického záření volnými atomy v plynném stavu. Volné atomy v plynném stavu jsou podle Kirchhoffova zákona schopny absorbovat záření těch vlnových délek, které samy vyzařují. Za normální teploty je většina atomů absorbujiícího prostředí v základním energetickém stavu. Je-li takovýto soubor vystaven účinkům elektromagnetického záření, jsou jím nejsilněji absorbovány čáry, které odpovídají přechodu valenčních elektronů ze základního stavu do některého z excitovaných stavů. Tyto čáry jsou označovány jako rezonanční čáry.

Je-li atom prvku vystaven působení svazku paprsků elektromagnetického záření příslušné vlnové délky, může dojít k absorpci světelného kvanta a atom přechází do excitovaného stavu. Pro absorpci záření platí obecně Lambert-Beerův zákon, který můžeme pro čárové spektrum psát ve tvaru

$$I = I_0 \cdot e^{-\epsilon \cdot n \cdot l} \quad (1)$$

kde I_0 a I je intenzita elektromagnetického záření před a po průchodu absorbujiícím prostředím, ϵ je atomový absorpční koeficient (je charakteristický pro danou vlnovou délku), n je počet volných atomů daného prvku v jednotce objemu a l je délka absorbujiící vrstvy.

V AAS měříme zeslabení paprsku elektromagnetického záření po průchodu analytickým prostředím. Pro analytické účely se matematický vztah výše uvedeného Lambert-Beerova zákona upravuje. Zlogaritmováním vztahu získáme výraz pro absorbanci

$$A = \log(I/I_0) = 2,303 \cdot \epsilon \cdot n \cdot l \quad (2)$$

Ze vztahu je zřejmé, že absorbance je přímo úměrná koncentraci atomů n a délce absorbujiící vrstvy l . Konstantou úměrnosti je absorpční koeficient, jehož hodnota závisí na způsobu vyjádření koncentrace. Z uvedeného je zřejmé, že metoda AAS je metodou srovnávací, při níž se výsledek získává porovnáním signálu vzorku se signálem srovnávacích roztoků.

Složení srovnávacích roztoků se přitom přizpůsobuje složení vzorků tak, aby do postupu kalibrace byly zahrnuty rušivé vlivy. Pokud má studovaný vzorek jednoduché složení, je možné provést kalibraci metodou kalibrační křivky. V tomto případě se připraví čisté roztoky stanovovaného prvku nebo modelové srovnávací

roztoky, které napodobují chemickým složením roztoky vzorků. Koncentrační oblast těchto standardů musí být volena tak, aby měření bylo prováděno v lineární části závislosti absorbance na koncentraci prvku v roztoku. Po proměření absorbance jednotlivých standardů je nutno sestavit kalibrační křivku, tj. graficky vynést závislost změřené absorbance na koncentraci prvku ve standardních roztocích. Změřením absorbance analytu lze potom z kalibrační křivky odečíst přímo koncentraci sledovaného prvku v analytu.

Pokud má matrice vzorku komplikovanější charakter a nedovoluje přípravu složitějších srovnávacích roztoků, nebo pokud složení matrice není známo, je nutné použít kalibrační metodu standardních přídavek. Také tuto metodu je možné použít pouze v oboru koncentrací, které odpovídají lineární části příslušné kalibrační křivky. Při této kalibrační metodě se z analytu odpipetují čtyři alikvotní podíly, ke třem se přidají známá množství stanovovaného prvku (je-li množství stanovovaného prvku ve vzorku x , budou vhodné přídávky $x/2$, x a $2x$). Všechny tři roztoky se doplní na stejný objem rozpouštědlem a změří se jejich hodnoty absorbance. Naměřené hodnoty absorbance se vynesou do grafu proti přidaným koncentracím a závislost se extrapoluje. Průsečík, který získáme prodloužením přímky do záporné části osy koncentrací udává koncentraci stanovovaného prvku v analytu. Výsledek lze také vyhodnotit numericky (potom postačí pouze roztok s jedním přídávkem) ze vztahu

$$c_A = \frac{A_1 c_p}{A_2 - A_1} \quad (3)$$

kde A_1 je absorbance roztoku bez přídávku, A_2 je absorbance roztoku s přídávkem o koncentraci c_p . Moderní přístroje umožňují zpracovávat výsledky, včetně sestrojování kalibračních grafů, počítačovou technikou.



Obr. Atomový absorpční spektrometr

7.1 Příprava

1. Zopakujte si pojmy absorpce, transmitance, absorbance, zářivý tok, svítivost, rychlost světla, vlnová délka, kmitočet elektromagnetického záření.
2. Ujasněte si význam Lambertova - Beerova zákony pro vyjádření absorpce záření, podmínky za nichž platí a příčiny odchylek od ideálního průběhu.
3. Zopakujte si kalibraci přístroje, jehož princip měření je založen na závislosti měřené veličiny na koncentraci látky ve vzorku.
4. Zopakujte si zásady statistického vyhodnocení naměřených výsledků

Pomůcky:

Odměrné baňky 50 cm³ - 5 ks
Dělená pipeta 1, 5 a 10 cm³
PE nádoby 100 cm³ - 8 ks
Nálevka do odm. baněk - 5 ks
Atomový absorpční spektrometr
Spectr AA 20+ s vybavením
Kompresor na vzduch
Byreta 50 cm³ se stojanem - 3 ks

Chemikálie:

Roztok železa ($w = 10 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$) ve 2 %-HNO₃
Deionizovaná voda
Analyzovaný vzorek
Tlaková láhev s acetylenem

7.2 Postup práce

- 1) Připravte soubor standardních roztoků železa o objemu 50 cm³ o hmotnostní koncentraci 1, 2, 3, 4, 5 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ pro měření metodou kalibrační křivky (roztoky označte Standard 1 - Standard 5).
- 2) Podle pokynů (skripta Rejnek, J., Kolský, V., Loučka, T., Sobotka, J.: Cvičení z instrumentální analýzy. PF UJEP, Ústí n. L. 1993. Str. 60-72) připravte atomový absorpční spektrometr k měření. Údaje o podmínkách měření запиšte do tab. 1.
- 3) Proveďte měření metodou kalibrační křivky. Jako slepého pokusu použijte deionizovanou vodu, jejíž hodnotu absorbance změřte 10 krát. Poté měřte hodnoty absorbance připravených standardních roztoků Standard 1 - Standard 5 (každý standard také 10 krát). U každé série měření vypočítejte aritmetický průměr absorbance, směrodatnou odchylku s jednotlivých měření a relativní směrodatnou odchylku s_R v procentech. Výsledky měření a výpočty запиšte do tab. 2.
- 4) Za podmínek, za kterých jste prováděli měření absorbance standardních roztoků, změřte 10x absorbanci neznámého vzorku. Z naměřených hodnot vypočítejte aritmetický průměr hodnot absorbance, směrodatnou odchylku, relativní směrodatnou odchylku a interval spolehlivosti. Výsledky měření a vypočtené hodnoty запиšte do tab. 3.
- 5) Podle údajů uvedených v tab. 4 připravte soubor roztoků pro měření metodou standardních přídavek. Tyto roztoky označte symboly ADD 0 - ADD 3. Požadované roztoky získáte odpipetováním příslušného množství neznámého

vzorku a přidavného roztoku železa a doplněním do požadovaného objemu deionizovanou vodou.

- 6) Beze změny parametrů přístroje, které byly nastaveny v kroku 3 proveďte měření metodou standardních přídavek. Proměřte postupně absorbanci roztoků ADD 1 až ADD 0. Měření každého roztoku proveďte 5x. Výsledky měření a vypočtené hodnoty zapište do tab. 5.

7.3 Závěry

- 1) Do protokolu uveďte konkrétní údaje o parametrech přístroje.
- 2) Výsledky i následné výpočty získané při měření zaznamenejte do tabulky 6.
- 3) Z výsledků uspořádaných v tab. 2 sestrojte kalibrační přímkou jako závislost hodnot absorbance **a** na hodnotách koncentrace **c**. Vyjádřete matematickou rovnici kalibrační přímkou. Do téhož grafu vynesete i závislost absorbance na koncentraci železa v roztoku při měření metodou standardních přídavek. Hodnotu absorbance roztoku ADD 0 vynesete v grafu přímo do osy absorbance. Průsečík přímkou se zápornou částí osy koncentrace určí hodnotu koncentrace železa v roztoku ADD 0 ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$). Také v tomto případě vyjádřete rovnici získané přímkou.
- 4) Z obou kalibračních metod vypočítejte množství železa v předloženém vzorku, výsledky uveďte do tabulky 6.
- 5) Porovnejte výsledky měření, kterých bylo dosaženo použitím obou kalibračních metod, vyhodnoťte obě metody.

Protokol z laboratorní úlohy

Stanovení železa metodou plamenové atomové absorpční spektrometrie

Jméno:

Datum:

Tab. 1 Parametry atomového absorpčního spektrometru

Typ přístroje	Varian SpectrAA 20+
Žhavicí proud zdroje	mA
Šířka štěrby	nm
Vlnová délka	nm
Plamen	vzduch - acetylen
Průtok oxidovadla	dílek
Průtok paliva	dílek
Doba měření	s
Výška hořáku	mm

Tab. 2 Výsledky měření standardních roztoků pro konstrukci kalibrační přímky

	c $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$	a ₁ a ₆	a ₂ a ₇	a ₃ a ₈	a ₄ a ₉	a ₅ a ₁₀	a	s	S _R %
S ₀									
S ₁									
S ₂									
S ₃									
S ₄									
S ₅									
Směrnice				Koncentrace při absorbanci					

Vysvětlivky: S₀ - S₅ - slepý vzorek a standardní roztoky, a₁ - a₁₀ - absorbance slepého a standardních roztoků, a - průměrná hodnota absorbance, s - směrodatná odchylka jednotlivých měření, s_R - relativní směrodatná odchylka.

Tab. 3 Hodnoty absorbance vzorku získané měřením metodou kalibrační křivky a vypočtené hodnoty koncentrace železa ve vzorku

a_1	a_2	a_3	a_4	a_5	$Q_1 =$
					$Q_2 =$
a_6	a_7	a_8	a_9	a_{10}	$a =$
					$s =$
$c =$		$\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$	$s =$		$\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$
$L_1(c) =$		$\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$	$s_R =$		$\%$
$L_2(c) =$		$\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$			$L_2 =$

Vysvětlivky: $a_1 - a_{10}$ - absorbance vzorku, a - průměrná hodnota absorbance, s - směrodatná odchylka jednotlivých měření, s_R - relativní směrodatná odchylka, L_1, L_2 - dolní a horní mez intervalu spolehlivosti pro hodnoty absorbance a hodnoty koncentrace

Tab. 4 Příprava roztoků pro měření metodou standardních přídavek

Roztok	V cm^3	V_1 cm^3	V_2 cm^3	c_i $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$
ADD 1	30	5	25	
ADD 2	30	10	20	
ADD 3	30	20	10	
ADD 0	30	/	30	

Vysvětlivky: V - objem odpipetovaného vzorku, V_1 - objem přidavného roztoku železa o koncentraci $w = 10 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$, V_k - objem deionizované vody, potřebné k doplnění roztoku do objemu 60 cm^3 , c_i - teoretická koncentrace železa v roztoku

Tab. 5 Hodnoty absorbance získané měřením metodou standardních přídavek a vypočtené hodnoty koncentrace železa ve vzorku

Roztok	a_j	a_2	a_3	a_4	a_5	a	s_R %	c_i $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$
ADD 1							%	
ADD 2								
ADD 3								
ADD 0								
$k =$	$c_o =$				$s_o =$			
$s_{R0} =$	%	$L_1(c) =$			$L_2(c) =$			
		$\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$			$\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$			
		$\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$			$\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$			

Vysvětlivky: $a_1 - a_5$ - absorbance vzorku, a - průměrná hodnota absorbance, s - směrodatná odchylka jednotlivých měření, s_R - relativní směrodatná odchylka, L_1, L_2 - dolní a horní mez intervalu spolehlivosti pro hodnoty koncentrace, k - směrnice přímky, c_i - teoretická koncentrace železa v roztoku, c_o - hodnota obsahu železa ve vzorku ADD 0, s_{R0} - relativní směrodatná odchylka vztahovaná k hodnotě c_o , s_o - směrodatná odchylka jednotlivých měření vztahovaná k hodnotě c_o

Tab. 6 Porovnání hodnot měření obsahu železa v neznámém vzorku metodou kalibrační křivky a metodou standardních přídavek

Metoda měření	Koncentrace			Směrnice k
	c $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$	s $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$	s_R %	
Kalibrační přímka				
Stand. přídavky				

Závěry:

Literatura

1. J. Zýka a kolektiv: Analytická příručka 2, SNTL/ALFA Praha 1980
2. M. Suchánek a kol.: Validace analytických metod, EURACHEM-ČR Praha 1998
3. M. Suchánek: KVALIMETRIE 12. Průvodce jakostí v analytické chemii, EURACHEM-ČR Praha 2003
4. ČSN EN ISO/IEC 17025 Posuzování shody – Všeobecné požadavky na způsobilost zkušebních a kalibračních laboratoří, Český normalizační institut 2005
5. ČSN EN 25814 Jakost vod: Stanovení rozpuštěného kyslíku, Elektrochemická metoda s membránovou sondou, Český normalizační institut 1995
6. Z. Holzbecher, Churáček a kol.: Analytická chemie, SNTL Praha 1989
7. manuál k titrátoru Titrino 794 od firmy Metrohm
8. P. Klouda: Moderní analytické metody, nakladatelství Pavel Klouda, 2003