

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie

SPECIAČNÍ ANALÝZA CHROMU V PRACHOVÝCH
ČÁSTICÍCH

Speciation analysis of chromium in particulate matter of urban
dust

Diplomová práce
studijního programu Klinická a toxikologická analýza

Praha 2010

Marcela Rybínová

Tato diplomová práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MSM 0021620857 a grantového projektu GAČR: 521/09/1150.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitele Doc. RNDr. Petra Rychlovského, CSc. a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 29. dubna 2010.

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli Doc. RNDr. Petru Rychlovskému, CSc. za odborné vedení, rady, připomínky a v neposlední řadě za jeho ochotu a trpělivost. Poděkování patří také Doc. Ing. Jiřině Szákové, CSc. z České zemědělské univerzity v Praze za vstřícný přístup při spolupráci.

ABSTRAKT

Iontově výměnná chromatografie v kombinaci s atomovou emisní spektrometrií s indukčně vázanou plazmou (ICP-AES) byla využita k provedení speciální analýzy chromu (Cr). Speciace Cr má význam zejména proto, že se jednotlivé specie liší svou toxicitou. Zatímco Cr(III) je považován za netoxický, Cr(VI) byl klasifikován jako lidský karcinogen.

Cílem předkládané práce bylo vyvinout jednoduchou metodu pro stanovení specií Cr (Cr(III) a Cr(VI)) v částicích polétavého prachu. Jako optimální vyluhovací činidlo pro eluci chromu z polétavého prachu v zahřívané ultrazvukové lázni byl zvolen směsný roztok 2% KOH s přídavkem 3% Na₂CO₃. Na modelových roztocích i praktických vzorcích bylo ověřeno, že při použití daného činidla je Cr(VI) stabilní. Pozornost byla věnována také studiu optimálních separačních podmínek (např. volba pH mobilní fáze). Detekční limit pro Cr(VI) byl 12 ng.ml⁻¹. Na závěr práce byla metoda ověřena analýzou certifikovaného referenčního materiálu (BCR CRM 545, svářecský prach Cr(VI) zachycený na filtru). Dosaženo bylo dobré shody mezi certifikovanou hodnotou (40,16 ± 0,60 µg.g⁻¹) a experimentálně určenou hodnotou (37,83 ± 1,14 µg.g⁻¹).

Předmětová hesla: analytická chemie

Klíčová slova: chrom, speciální analýza, prachové částice, extrakce, vyluhovací činidlo, atomová emisní spektrometrie, indukčně vázané plazma, HPLC, iontově výměnná chromatografie

ABSTRACT

Anion-exchange chromatography with inductively coupled plasma - atomic emission spectrometry (ICP-AES) has been used for the speciation of chromium (Cr). Chromium speciation has attracted attention because of the different toxicity, Cr(III) is relatively non-toxic and Cr(VI) has been classified as a human carcinogen.

The aim of the present study was to develop simple method for the speciation analysis of Cr (Cr(III) and Cr(VI)) in particulate matter of urban dust. A combination of 2% KOH + 3% Na₂CO₃ has been chosen as the optimal reagent for the extraction of chromium from particulate matter. It was found that there was no conversion of Cr(VI) into Cr(III). The effect of separation parameters such as acidity of mobile phase was also studied. The detection limit for Cr(VI) was about 12 ng.ml⁻¹.

Results for the determination of Cr(VI) were confirmed by the analysis of standard reference material (BCR CRM 545, Cr(VI) in welding dust loaded on a filter) with good agreement between certified ($40,16 \pm 0,60 \mu\text{g.g}^{-1}$) and found ($37,83 \pm 1,14 \mu\text{g.g}^{-1}$) values.

Subject word: analytical chemistry

Key words: chromium, speciation analysis, dust particles, extraction, leaching agent, atomic emission spectrometry, inductively coupled plasma, HPLC, ion-exchange chromatography

OBSAH

1 CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE	10
2 TEORETICKÁ ČÁST	11
2.1 Speciační analýza	11
2.1.1 Frakcionace.....	12
2.1.1.1 Aplikace metod chemické frakcionace na ovzduší.....	13
2.2 Chrom a význam jeho speciace	15
2.2.1 Základní charakteristika	15
2.2.2 Dopady na zdraví člověka	16
2.2.3 Výskyt v životním prostředí	17
2.2.4 Způsoby stanovení.....	18
2.3 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie	20
2.3.1 Stacionární fáze v HPLC	21
2.3.2 Mobilní fáze v HPLC	22
2.3.3 Iontově výměnná chromatografie.....	22
2.4 Atomová emisní spektrometrie.....	23
2.4.1 Experimentální uspořádání.....	24
2.4.1.1 Indukčně vázané plazma.....	24
2.5 Hodnocení výsledků měření	25
2.5.1 Měření.....	25
2.5.2 Šum.....	25
2.5.3 Kalibrace.....	25
2.5.3.1 Metoda standardního přídatku	26
2.5.4 Mez detekce a mez stanovitelnosti	26
2.5.5 Opakovatelnost	27
2.5.6 Certifikovaný referenční materiál.....	27
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	28
3.1 Použité chemikálie.....	28
3.2 Použité přístroje a zařízení	29
3.3 Aparatura	30

3.4 Postupy měření	31
4 VÝSLEDKOVÁ ČÁST A DISKUZE.....	32
4.1 VÝBĚR VYLUHOVACÍHO ČINIDLA.....	32
4.1.1 Kyselina octová (CH_3COOH)	32
4.1.2 Hydroxid draselný (KOH).....	36
4.1.2.1 Vliv koncentrace KOH na chování obou forem chromu.....	37
4.1.2.2 Vliv přídavku HNO_3 na stanovení.....	39
4.1.2.3 Porovnání citlivosti.....	40
4.1.2.4 Vliv pH mobilní fáze	43
4.1.2.5 Časová stabilita.....	44
4.1.2.6 Shrnutí dosažených výsledků	47
4.2 ZÁKLADNÍ CHARAKTERISTIKY KOMBINOVANÉHO STANOVENÍ Cr(III) a Cr(VI).....	49
4.2.1 Kalibrační závislost	49
4.2.2 Mez detekce a mez stanovitelnosti, opakovatelnost.....	50
4.2.3 Základní charakteristiky stanovení pro Cr(VI).....	50
4.3 SPECIACE CHROMU V REÁLNÝCH VZORCÍCH.....	53
4.3.1 Extrakce praktického vzorku	53
4.3.2 Celkový obsah chromu ve vzorku	54
4.3.3 Výluh reálného vzorku připravený ve směsi KOH + HNO_3	56
4.3.4 Výluh připravený v KOH	60
4.3.4.1 Výluh praktického vzorku připravený pouze v KOH, bez přídavku HNO_3 před separací	61
4.3.5 Výluh připravený v 2% KOH + 3% Na_2CO_3	63
4.3.5.1 Praktický vzorek - Strahov	66
4.4 REFERENČNÍ MATERIÁL	68
5 ZÁVĚR.....	71
6 SOUPIS BIBLIOGRAFICKÝCH CITACÍ.....	73

SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ

AAS	atomová absorpční spektrometrie
AFS	atomová fluorescenční spektrometrie
AES	atomová emisní spektrometrie
ICP-AES	atomová emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem
BCR	Community bureau of reference
c	koncentrace
CDTA	kyselina cyklohexan-1,2-diamin-N,N,N,N-tetraoctová
CE	kapilární elektroforéza
CRM	certifikovaný referenční materiál
DCP	stejnoseměrné plazma
DTPA	diethylenetriaminpentaoctová kyselina
E ₁	energie základního elektronového stavu [J]
E ₂	energie excitovaného stavu [J]
ΔE	vyzářená energie [J]
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
ET-AAS	elektrotermická atomová absorpční spektrometrie
F-AAS	plamenová atomová absorpční spektrometrie
FIA	průtoková injekční analýza
g	gram
GC	plynová chromatografie
GC-MS	kombinovaný systém plynové chromatografie s hmotnostním spektrometrem
GF-AAS	atomová absorpční spektrometrie s grafitovou píčkou
GTF	glucose tolerance factor
h	Planckova konstanta [6,626.10 ⁻³⁴ J.s]
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
IARC	International Agency for Research on Cancer
ICP	indukčně vázané plazma
ICP-MS	hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem
IEC	iontově výměnná chromatografie
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
J	Joule
k	citlivost
K _s	součin rozpustnosti
kW	kilowatt
l	litr

LOD	mez detekce
LOQ	mez stanovitelnosti
MF	mobilní fáze
mg	miligram
min	minuta
MIP	mikrovlnně indukované plazma
ml	mililitr
mm	milimetr
mmol	milimol
mol	mol
MPa	megapascal
M_r	relativní molekulová hmotnost
MS	hmotnostní spektrometrie
ng	nanogram
nm	nanometr
NMR	nukleární magnetická resonance
NPK-P	nejvyšší přípustná koncentrace [mg.m^{-3}]
PDCA	kyselina pyridin-2,6-dikarboxylová
PEL	přípustný expoziční limit [mg.m^{-3}]
PM	aerodynamický průměr částic [μm]
Q_{MF}	průtok mobilní fáze [ml.min^{-1}]
R	korelační koeficient
RP-HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie s obrácenými fázemi
rpm	otáčky za minutu (revolutions per minutes)
RSD	relativní směrodatná odchylka [%]
s	sekunda
s	směrodatná odchylka
SEC	gelová permeační chromatografie
t	čas [s]
μg	mikrogram
μl	mikrolitr
μm	mikrometr
$\bar{x}$	aritmetický průměr
ν	frekvence záření [Hz]
Φ	hustota zářivého toku
λ	vlnová délka [nm]
σ	směrodatná odchylka
$^{\circ}\text{C}$	stupeň Celsia

1 CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE

Předkládaná diplomová práce přímo navazuje na diplomovou práci Petry Voldřichové, která byla vypracována na katedře analytické chemie v roce 2009. Zmíněná práce byla zaměřena na optimalizaci podmínek pro separaci Cr(III) a Cr(VI) metodou HPLC s detekcí ICP-AES. Dále byly stanoveny základní charakteristiky tohoto kombinovaného stanovení a byla sledována stabilita obou anorganických forem Cr ve vybraných vyluhovacích činidlech používaných k postupné extrakci (frakcionaci) chromu z pevných vzorků pocházejících z životního prostředí. V práci bylo zjištěno, že použití extrakčních činidel využívaných běžně k frakcionaci je nevhodné, protože v nich není zaručena stabilita formy Cr(VI).

Cílem této práce pokračovat v hledání vhodného vyluhovacího činidla, při jehož použití by nedocházelo ke změně poměru obsahu Cr(VI)/Cr(III). Dalším úkolem práce bylo určit optimální podmínky pro separaci Cr(III) a Cr(VI) s přídavkem vybraného činidla a stanovit základní charakteristiky tohoto stanovení.

Následným záměrem diplomové práce pak bylo metodu aplikovat na praktické vzorky; využít činidlo k přípravě výluhů ze vzorků polévatvého prachu a stanovit množství obou specií diskutovaného prvku ve výluzích kombinovanou metodou HPLC-ICP-AES.

Posledním cílem pak bylo ověřit správnost navržené metody analýzou certifikovaného referenčního materiálu.

Práce byla vypracována ve spolupráci s katedrou agrochemie a výživy rostlin České zemědělské univerzity v Praze.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Speciační analýza

Podle definice IUPAC pojmem speciační analýza rozumíme analytické aktivity směřující k identifikaci nebo ke stanovení jedné nebo více jednotlivých chemických specií ve vzorku. Chemická specie je specifická forma prvku definovaná izotopickým složením, elektronovým oxidačním stavem, případně strukturou komplexu či molekuly.

Speciace nějakého konkrétního prvku znamená rozložení jednotlivých definovaných chemických specií tohoto prvku v daném systému.

Za kvalitativní speciační analýzu lze považovat analytické aktivity vedoucí k identifikaci jednotlivých chemických specií ve vzorku; za kvantitativní speciační analýzu potom aktivity směřující ke stanovení koncentrace (nebo hmoty) jedné nebo více identifikovaných specií ve vzorku [1].

Jednotlivé specie vymezené svými fyzikálními, chemickými a biologickými vlastnostmi mají různou toxicitu, mobilitu v životním prostředí, schopnost akumulace v živých organismech. Informace o celkové koncentraci např. kovu tak mají malý, často klamný význam [2]. Speciační analýza tedy poskytuje možnost lépe porozumět chemickým a biochemickým procesům a může podat ucelenější informace o toxicitě, či naopak esencialitě jednotlivých sloučenin stopových prvků [3]. Významná je především speciační analýza vzorků úzce souvisejících se zdravím člověka. Jsou to vzorky potravin a surovin pro jejich výrobu, vzorky pocházející z životního prostředí či vzorky tělních tekutin a tkání [4].

Vlastní provedení speciační analýzy lze obecně rozdělit do několika fází:

- a) příprava vzorku (zahrnuje např. filtraci, extrakci, acidifikaci [5])
- b) separace jednotlivých specií prvků
- c) detekce a stanovení hledaného prvku v izolované frakci pomocí vybrané prvkově selektivní detekční techniky
- d) identifikace struktury vazebného partnera prvku pomocí vhodné molekulově specifické detekční techniky (MS, NMR...).

Metody speciální analýzy existují v off-line uspořádání (s časovým odstupem) nebo on-line (bezprostředně po sobě). Výhodnější a v dnešní době prakticky výhradně používané je on-line uspořádání pomocí tandemových (hyphenated) technik.

K separaci jednotlivých specií je nejčastěji využívána kapalinová a plynová chromatografie (HPLC, GC) nebo kapilární elektroforéza (CE). K detekci pak prvkově selektivní detektory, obvykle přístroje pro atomovou spektrometrii (AAS, AFS, ICP-AES, ICP-MS). Spojení účinné separační techniky s vysoce citlivým detektorem je realizováno buď přímým propojením (HPLC-ICP-AES a HPLC-ICP-MS) nebo je použit vhodný spojovací článek (interface). Spojení s interface musí být často doplněno derivatizačním stupněm (generování těkavých sloučenin, ethylace...) a to buď před detekčním krokem, nebo ještě před separačním krokem [3].

2.1.1 Frakcionace

Frakcionace zahrnuje analytické postupy, které nevedou k úplné identifikaci chemické specie, ale charakterizují pouze skupiny specií [3]. Jedná se, dle definice IUPAC, o proces třídění analytů nebo skupiny analytů v dané matici na základě fyzikálních (velikost, rozpustnost) nebo chemických (vazby, reaktivita) vlastností.

Pro stanovení frakcí chemických prvků v půdách, sedimentech, čistírenských kalech a jiných biologických odpadech, kompostech, popílcích, pevných spadech či odpadech z těžby minerálů a rud se v praxi používají metody postupné extrakce. Jedná se o metody časově náročné, které zahrnují několik samostatných kroků (3-8), přičemž vyšší selektivity se dosahuje zapojením více extrakcí za sebou podle dobře definovaného postupu.

K postupné extrakci se využívá řada extrakčních činidel, přičemž platí, že každé následující je buďto silnější, nebo chemicky zcela odlišné od předchozího. Mezi nejčastěji používaná činidla patří voda, neutrální roztoky anorganických solí (CaCl_2 , NaNO_3), roztoky solí s upraveným pH ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$) či slabé roztoky chelatačních činidel (DTPA, EDTA). Selektivita jednotlivých činidel je ovlivněna zejména chemickými vlastnostmi zvoleného extrakčního činidla, experimentálními parametry,

sekvencí jednotlivých kroků, matričními vlivy (např. readsorpcí prvků) či heterogenitou vzorku.

Extrakční postup je popsán několika parametry, které je třeba dodržovat, protože i malá změna experimentálních podmínek má za následek významné změny ve frakcionaci prvků. Mezi zmíněné parametry patří např. použitá extrakční činidla, posloupnost jednotlivých extrakčních kroků, koncentrace použitých chemikálií, pH extrakčního činidla, poměr vzorku k extrakčnímu činidlu, doba a způsob extrakce (třepání, míchání), teplota použitá pro příslušnou extrakci [6].

2.1.1.1 Aplikace metod chemické frakcionace na ovzduší

V ovzduší, resp. v částicích prašného aerosolu ovzduší, se nachází řada toxikologicky významných prvků. Aerosolové částice spolu v atmosféře interagují, shlukují se, rozpadají a jejich odstraňování se děje cestou suché a mokré depozice. Do ovzduší se prachové částice dostávají přírodními procesy jako je např. vulkanická činnost či zvětrávání zemské kůry, nebo procesy antropogenními; z průmyslové činnosti, spalovacími procesy apod. Zejména polévaté popílký jsou významným nositelem zdraví škodlivých látek, včetně mnoha toxických prvků. Mezi zdraví škodlivé prvky patří: As, Be, Cd, Cl, Co, Cr, F, Hg, Mn, Ni, P, Pb, Sb, Th, U. Těžké kovy se vyskytují převážně s hlavními složkami vzorků, jako jsou oxidy, karbonáty, organické látky a minerály, na které jsou různě vázány.

Frakcionace se v první řadě provádí podle velikosti částic. Velikost částic totiž ovlivňuje procesy jako depozice, doba setrvání, rozptyl částic a vdechování. Částice o velikosti nad 2,5 μm vznikají převážně mechanickými procesy a jsou odstraňovány v intervalu hodin až dnů blízko zdroje zátěže běžnou gravitací. Malé částice pod 2,5 μm mají delší dobu setrvání v atmosféře a jsou spojovány především s antropogenními zdroji znečištění. Z hlediska zdravotního mají největší význam frakce částic o velikosti kolem 1 μm , které pronikají hluboko do plic a hromadí se tam.

Před samotnou frakcionací musí být samozřejmě vzorky aerosolů z ovzduší nejprve vhodně odebrány. K tomuto účelu slouží speciální zařízení; dochází k záchytu na filtry různých materiálů a velikostí, které se volí na základě účelu sledování. Nehomogenita

odebraného prachu na filtrech je odstraňována tím, že se zpracovává celý filtr. Konkrétně pro účely zdravotního monitoringu bývají odebírány frakce o velikosti PM_{10} a $PM_{2,5}$ (aerodynamický průměr částic). Vzorky jsou neopakovatelné.

Volba extrakčního postupu se při aplikaci na ovzduší řídí obecnými zásadami [6]:

1. Volit co nejmenší počet kroků
2. Kontrolovat kontaminace v každém kroku
3. Zvolená metoda musí umožnit odlišit složky zachycené na částicích prašných aerosolů od těch zabudovaných pevně v matrici
4. Volit dostatečně selektivní činidla s vysokou extrakční účinností
5. Výběr extrakčního činidla se řídí povahou analytu, sledovanou chemickou formou a charakterem matrice, ze které se sloučenina extrahuje
6. Účinnost extrakčního činidla je ovlivněna jeho koncentrací, pH prostředí, poměrem kapalina/pevný vzorek, způsoby třepání a míchání a dobou trvání extrakce
7. Chemické vlastnosti extrakčního činidla ovlivňují jeho selektivitu
8. Nutno testovat vliv dalších parametrů ovlivňujících extrakční proces
9. Volit dostatečně citlivé metody stanovení s ohledem na odběry prašných aerosolů na filtry a jejich nízké navážky
10. Nutno stanovovat i totální obsahy analytů z důvodu určení hmotnostní bilance.

Na ovzduší je dle [6] možné aplikovat např. metodu postupné extrakce, tzv. modifikovanou BCR metodu, která zahrnuje použití několika činidel; každému z nich je vzorek vystaven po dobu 16 hodin za vzniku následujících frakcí:

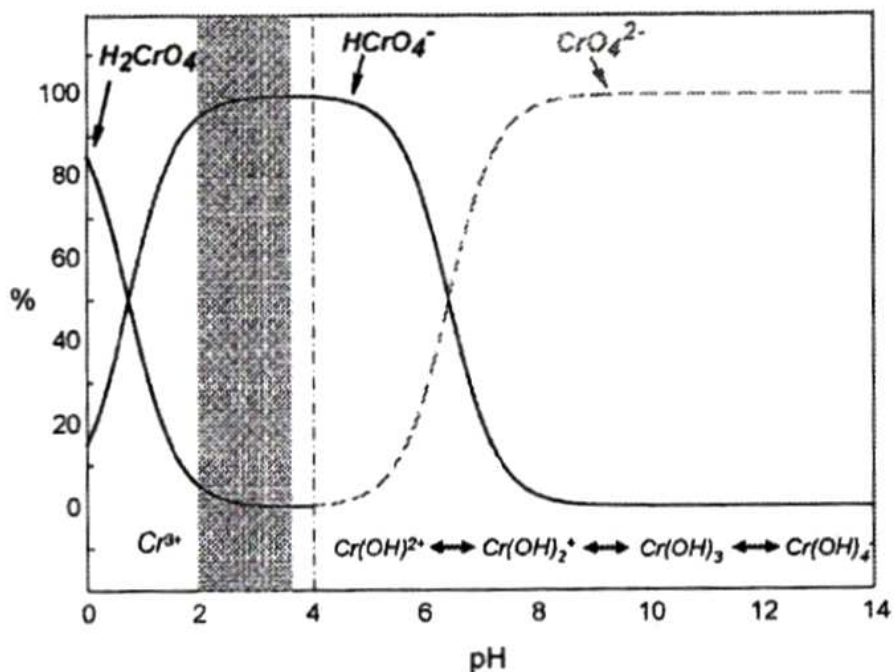
- Extrakce $0,11 \text{ mol.l}^{-1} \text{ CH}_3\text{COOH}$ v poměru 1:50 (w/v)
 - F1 – výměnná frakce
- Extrakce $0,1 \text{ mol.l}^{-1} \text{ NH}_2\text{OH.HCl}$ v poměru 1:50 (w/v), pH = 2
 - F2 – frakce vázaná na oxidy
- Extrakce $8,8 \text{ mol.l}^{-1} \text{ H}_2\text{O}_2$ v poměru 1:20 (w/v), odpaření při 80 °C a dále přidavek $1 \text{ mol.l}^{-1} \text{ CH}_3\text{COONH}_4$ v poměru 1:50 (w/v), pH = 2
 - F3 – frakce vázaná na organické látky a některé sulfidy
- Rozdíl celkového obsahu prvku a součtu předchozích frakcí
 - F4 – reziduální frakce.

Reakční směs je, dle BCR metody, po skončení každého kroku centrifugována při 2500 otáčkách za minutu po dobu 15 min. Roztoky se po extrakci okyselí 0,1 ml 65% HNO_3 a doplní vodou do 10 ml (v případě, že je brána navážka vzorku 100 mg nebo vzato 10 exponovaných filtrů) a uloží se při teplotě 4 °C do doby měření.

2.2 Chrom a význam jeho speciace

2.2.1 Základní charakteristika

Chrom je kovový prvek, který se vyskytuje v několika chemických podobách s oxidačními čísly od 0 (volný chrom) do VI (chromany a dichromany). Pouze jeho trojmocné (Cr(III)) a šestimocné (Cr(VI)) formy jsou dostatečně stálé, aby je bylo možné nalézt ve složkách životního prostředí [7]. Toxicita obou forem se značně liší; Cr(VI) je asi 100-1000krát toxičtější [8]. Kromě toxicity se sloučeniny chromu liší také svou biodostupností či pohyblivostí. Sloučeniny Cr(VI) jsou v porovnání se sloučeninami Cr(III) vysoce rozpustné, sloučeniny Cr(III) jsou naproti tomu snadněji adsorbovatelné na různé pevné povrchy [9]. Chrom se nachází v půdách, vodách, horninách, sopečném prachu a plynu, ale i v rostlinných a živočišných tkáních. Jeho zdrojem je především lidská činnost [10]. V závislosti na pH prostředí se Cr(VI) vyskytuje ve formě CrO_4^{2-} , HCO_4^- nebo $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$. Dominantní formy Cr(III) v životním prostředí jsou pak hydroxo komplexy Cr(OH)^{2+} nebo Cr(OH)_3 [5]. Distribuční diagram Cr(III) a Cr(VI) specií chromu ve vodných roztocích je zobrazen na Obr. 2.1 [11] a je z něj patrný právě vliv pH na zastoupení Cr(III) a Cr(VI) . Lze z něj také vyčíst, že existuje pouze poměrně úzká oblast rozmezí pH (na obrázku vyznačená černým svislým pruhem), ve které se specie Cr(III) vyskytuje ve formě iontu. Při pH vyšším než 4 začíná Cr(III) vytvářet nerozpustné hydroxo-aqua komplexy. Naopak pH o hodnotě nižší než 2 není např. vhodné aplikovat na separační kolonu; Cr(VI) přechází do podoby H_2CrO_4 .



Obr. 2.1 Distribuční diagram Cr(III) a Cr(VI) specií chromu ve vodném systému

Z uvedených základních skutečností o rozdílném chování Cr(III) a Cr(VI) je jisté zřejmé, jak velký význam má provádění speciální analýzy chromu.

2.2.2 Dopady na zdraví člověka

Cr(III) patří mezi esenciální stopové prvky zúčastněné v metabolismu savců. Je součástí GTF (glucose tolerance factor); napomáhá při eliminaci glukózy z krevního řečiště. Obecně lze říci, že se podílí na udržování metabolismu glukózy, proteinů a tuků [12-15]. Místně vyvolávají sloučeniny Cr(III) poškození (např. žaludeční vředy, křeče, změny na kůži) pouze u velmi citlivých osob.

Rozpustné sloučeniny Cr(VI) jsou svým místním účinkem daleko nebezpečnější, důležitou úlohu přitom hraje jejich vysoký oxidační potenciál a také lehkost, se kterou pronikají biologickými membránami [10, 16, 17]. Ačkoliv má lidské tělo efektivní detoxikační mechanismy, pomocí nichž je Cr(VI) redukován na Cr(III), může docházet (právě během přeměny na stálejší formu) ke vzniku reaktivních forem kyslíku

zodpovědných za řadu nežádoucích procesů. Těmi jsou např. oxidativní stres, poškození DNA či modulace p53 genu, který reguluje vznik nádorů [17].

Inhalace prachů Cr(VI) sloučenin vyvolává astmatické potíže, po požití působí na počátku leptavě na gastrointestinální trakt, následovat může šok nebo až smrt. Dlouhodobé profesní působení Cr(VI) se projevuje leptavým účinkem na kůži a sliznici (proděravění nosní přepážky), tvorbou vředů a nádorů (dutiny nosní, plic a zažívacího traktu) [18].

Nejzávažnějším účinkem sloučenin Cr(VI) je právě jejich karcinogenita a mutagenita. Jsou silnými alergeny. Popsány jsou také jejich nefrotoxické a hepatotoxické účinky. V poslední době je poukazováno i na možnou teratogenitu solí šestimocného chromu [19]. International Agency for Research on Cancer (IARC) klasifikovala Cr(VI) jako lidský karcinogen [20].

Významným antidotem je kyselina askorbová (vitamin C, který sloučeniny Cr(VI) převádí již zmíněnou redukcí na netoxické sloučeniny Cr(III)) [18].

2.2.3 Výskyt v životním prostředí

Jak již bylo uvedeno, v životním prostředí se Cr nachází zejména v důsledku lidské činnosti; např. v atmosféře činí podíl z antropogenních zdrojů až 60-70 % [5]. Mezi antropogenní zdroje emisí chromu patří zejména [21]:

- Spalování fosilních paliv
- Odpadní vody ze strojírenského, kožedělného a textilního průmyslu
- Odpadní vody z metalurgie a povrchové úpravy kovů
- Úniky chladících vod obsahujících inhibitory koroze
- Nakládání s odpady s obsahem chromu (komunální odpady, galvanické kaly...).

Chrom se ve většině přírodních vzorků nachází přibližně v koncentracích $\mu\text{g.l}^{-1}$, vzorky pocházející z atmosféry obsahují koncentrace nižší (ng.m^{-3}) [5, 10]. Je však nutné rozlišovat mezi různými lokalitami; znečištěné průmyslové oblasti obsahují Cr nejvíce.

Chrom je v nízké koncentraci přítomen ve všech typech půd, v sopečném prachu a plynech. Veškerý chrom přírodního původu je ve stavu Cr(III). Cr(III) se silně váže na záporně nabitě půdní částice a proto jen malá část proniká z půdy do podzemních vod. Ve vodě se většina Cr(III) váže na částice nečistot a spolu s nimi klesá ke dnu, velká část nenasorbovaného Cr(III) tvoří nerozpustné koloidní hydroxidy; proto je ve vodě obvykle přítomno jen malé množství rozpuštěného Cr(III). Cr(VI) je velmi toxický pro vodní organismy. Na rozdíl od Cr(III) se vyskytuje ve formě záporně nabitých komplexů, nesorbuje se na půdní částice a je mnohem mobilnější. Je však velmi silným oxidačním činidlem, v přítomnosti jakékoliv organické hmoty se poměrně rychle redukuje na Cr(III). Proto nebezpečí vysokých koncentrací Cr(VI) hrozí jen v blízkosti jeho zdroje. Pokud nejsou organické látky přítomné, je Cr(VI) za aerobních podmínek stabilní po dlouhou dobu. V anaerobním prostředí se redukuje velmi rychle. Chrom se nehromadí v potravních řetězcích. V ovzduší je chrom vázán na prachové částice. Průměrná doba setrvání v atmosféře činí deset dní, poté mokrou nebo suchou depozicí přechází do vody nebo půdy.

V České republice platí pro koncentrace chromu v ovzduší pracovišť následující limity:

pro sloučeniny Cr(VI): PEL = $0,05 \text{ mg.m}^{-3}$, NPK-P = $0,1 \text{ mg.m}^{-3}$

pro ostatní sloučeniny Cr: PEL = $0,5 \text{ mg.m}^{-3}$, NPK-P = $1,5 \text{ mg.m}^{-3}$ [21].

2.2.4 Způsoby stanovení

Přestože lze v literatuře najít poměrně velké množství odkazů věnujících se stanovení chromu a v poslední době se objevují snahy o harmonizaci a standardizaci postupů, zdá se, že plně uspokojivé řešení vyhovující pro široké spektrum materiálů (zejména vzorků životního prostředí) nebylo dosud nalezeno [22]. Publikované články na toto téma všeobecně demonstují vysokou selektivitu a senzitivitu, ale potřebě zachování jednotlivých specií zmiňovaného kovu na úrovni detekce je věnována jen malá pozornost. Problémem je také nedostatek postupů, jak vhodně uchovávat či předupravovat vzorky [5].

Konkrétně při analýze tuhých vzorků bývá kritickým stupněm právě extrakce, převedení jednotlivých forem do roztoku. Nesmí přitom dojít k posunu rovnováhy, zejména redukci Cr(VI) [22]. K tomuto účelu byla navržena různá extrakční činidla, např. soli typu CaCl_2 či MgCl_2 , slabé kyseliny (CH_3COOH , $(\text{COOH})_2$), silné kyseliny HCl , HNO_3 , HClO_4 nebo báze NaOH či Na_2CO_3 . Problémem ale zůstává, že Cr(VI) je citlivý na redukci v kyselém prostředí, zatímco Cr(III) je náchylný k oxidaci v prostředí silně alkalickém [5]. Obtížnost extrakce souvisí také s interferujícími elementy matrice, např. s ionty Fe [23, 24] nebo Cl [9]. Matrice tedy v některých případech hraje rozhodující úlohu v analytických procedurách, a to právě z toho důvodu, že její komponenty mohou změnit oxidační stav analytu [25].

Souhrnné informace o používaných metodách poskytují některé přehledné články [5, 10, 25, 26]. Ze separačních technik se využívá průtokové injekční analýzy (FIA) [27, 28], či různé varianty vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) a to zejména ty z nich, které jsou vhodné pro separaci iontů (iontová chromatografie) [22, 23, 29-32]. Při iontové chromatografii se nejčastěji využívá kolon s aniontovými měniči pro speciaci Cr(VI), zatímco Cr(III) prochází kolonou bez zachycení. Aby došlo k retenci Cr(III), je třeba tuto specii převést do podoby negativního komplexu [5]. K tomu se používá např. komplexotvorné činidlo EDTA, CTDA, PDCA [22]. Retence obou forem bylo dosaženo také použitím dionexových kolon [22, 33], tedy kolon obsahujících multifunkční měniče iontů (aniontové i kationtové výměnné skupiny).

K detekci se nejčastěji volí spektroskopické metody jako např. F-AAS [34, 35], GF-AAS [36-40], ET-AAS [20, 29, 41] a ICP tandemové techniky; ICP-AES [40, 42-46] či ICP-MS [9, 11, 30, 31, 35, 46-50]. Použít lze např. také spektrofotometrickou [51, 52] či chemiluminiscenční [33, 53] detekci.

Odborné články týkající se stanovení chromu konkrétně v prachových částicích ovzduší jsou tyto [20, 23, 29, 36, 39, 40, 42, 45, 49, 50].

Dodejme ještě, že Integrovaný registr znečišťování spravovaný Ministerstvem životního prostředí na svých oficiálních webových stránkách uvádí, že instrumentální on-line metody stanovení chromu konkrétně v ovzduší dosud nebyly vyvinuty.

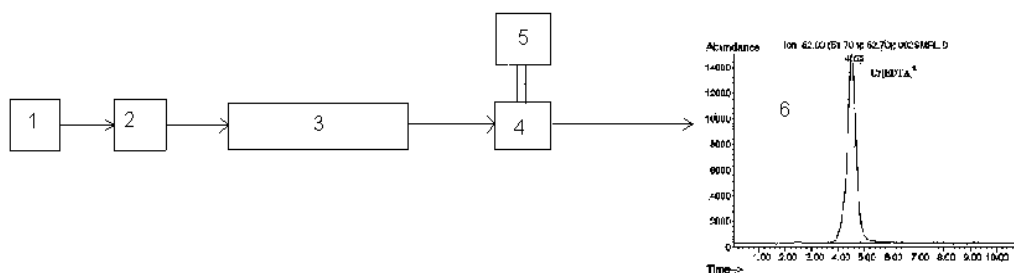
2.3 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) patří mezi analytické separační metody. Byla vyvinuta počátkem 70. let 20. století z plynové chromatografie (GC). Vysokých účinností (řádově desítek tisíc pater na metr délky kolony) se dosahuje použitím stacionárních fází tvořených malými částicemi pravidelného tvaru a jednotné velikosti, které homogenně vyplňují kolonu. Průtok mobilní fáze zajišťuje vysoký tlak (jednotky až desítky MPa). Dávkuje se malá množství vzorku v řádech jednotek až desítek mikrolitrů. K detekci jsou nutné citlivé detektory umožňující kontinuální monitorování látek na výstupu z kolony. Signál detektoru je zpracováván počítačem.

Výhodou HPLC je zejména široká oblast použitelnosti; metodou je možné analyzovat ionty, látky polární i nepolární, málo těkavé, tepelně nestabilní i vysokomolekulární. Uvádí se, že zhruba 80 % veškerých známých látek je možné analyzovat právě HPLC. Za další výhodu lze považovat možnost ovlivňovat separaci složením mobilní fáze (na rozdíl od GC není inertní a významně se podílí na separaci). Nevýhodou pak je (ve srovnání s GC) náročnější instrumentace a složitější mechanismus separace. Vývoj HPLC stále probíhá a směřuje především k miniaturizaci kolon i celkového zařízení [54].

Separace probíhá v separační koloně, která obsahuje dvě fáze - stacionární (nepohyblivou) a mobilní (pohyblivou). Různé analyty podléhají různé distribuci mezi oběma fázemi, jsou rozdílně zadržovány a zpoždovány. Obecně lze říci, že separace závisí na vlastnostech analyzovaných látek, na jejich interakcích s mobilními a stacionárními fázemi, na typu a vlastnostech stacionární fáze, na složení mobilní fáze, na geometrických parametrech kolony, dávkovacího zařízení, detektoru a spojovacích cest (mimokolonové příspěvky k rozšiřování elučních zón), na průtoku a pracovní teplotě. Účinnost kolony charakterizuje, jak moc se na koloně rozšiřují zóny separovaných látek. Její mírou je počet teoretických pater dané kolony a výškový ekvivalent teoretického patra.

Blokové schéma chromatografu je znázorněno na Obr. 2.2 [55].



Obr. 2.2 Blokové schéma chromatografu

1 – zdroj mobilní fáze, 2 – zařízení pro vstřik vzorku, 3 – kolona, 4 – detektor, 5 – zařízení pro zpracování signálu detektoru, 6 – výsledný chromatogram

2.3.1 Stacionární fáze v HPLC

Dle použité stacionární fáze lze kolony rozdělit na náplňové a monolitické. Při použití náplňových kolon má na separaci rozhodující vliv velikost a uspořádání částic. Čím jsou částice menší, tím je separace účinnější. Běžně se používají částice velikosti 5 až 10 μm ; v současnosti jsou dostupné komerční náplně s velikostí částic 2 μm i menšími. Platí také, že separace je účinnější tehdy, pokud mají částice pravidelný (kulový) tvar, jednotnou velikost a kolona je jimi homogenně naplněna. Naopak za nevýhodu těchto kolon lze považovat skutečnost, že i při nejdokonalejším naplnění kolony zaujmají částice asi jen 75 % jejího objemu. V průběhu používání se působením vysokých tlaků náplň sesedá a kolony se tak znehodnocují.

Při použití monolitických stacionárních fází je kolona zcela vyplněna polymerem organického či anorganického původu o definované pórovitosti. Polymer vzniká uvnitř kolony vhodnou polymerační reakcí v roztoku. I přes některé výhody těchto kolon, jako je velká mechanická stabilita a odolnost vůči změnám pH, vysoká pórovitost a vysoká účinnost separace i při velkých průtocích mobilní fáze, jsou v praxi stále nejpoužívanější tradiční kolony náplňové. Délka kolony bývá 5 – 25 cm, průměr několik mm [54].

2.3.2 Mobilní fáze v HPLC

Jak již bylo uvedeno výše, mobilní fáze v HPLC není inertní a významně se podílí na separačním procesu. Její složení (a tudíž i průběh separace) lze ovlivnit změnami složení rozpouštědel, pH, iontové síly, iontově párovými činidly apod. Mobilní fáze je především charakterizována polaritou a selektivitou. V detektoru by měla dávat minimální signál. Viskozita, stlačitelnost a toxicita by měly být co nejnižší.

2.3.3 Iontově výměnná chromatografie

Pro potřeby speciální analýzy se z technik kapalinové chromatografie používá iontově výměnná chromatografie (IEC), gelová permeační chromatografie (SEC) a chromatografie s reverzními fázemi (RP-HPLC) [3]. Při zpracování této práce byla využívána právě separace založená na iontové výměně.

Iontově výměnná chromatografie se používá pro separaci látek iontové povahy; pro silné elektrolyty (silné báze, kyseliny i soli) i slabé, které lze na iontovou formu převést disociací či protonizací. Tento typ chromatografie se využívá také k analýze aminokyselin, čištění peptidů a proteinů.

Iontově výměnná chromatografie je založená na interakcích mezi kationy analytu v mobilní fázi s negativně nabitými funkčními skupinami stacionární fáze (měnič kationů-katex) nebo naopak; na interakcích aniontů analytu s pozitivně nabitými funkčními skupinami stacionární fáze (měnič anionů-anex) [3]. Jako měniče kationů se využívají hlavně karboxylové ($-\text{COOH}$) skupiny či sulfoskupiny ($-\text{SO}_3\text{H}$), jako měniče anionů pak aminoskupiny ($-\text{NH}_2$) a tetraalkylamoniové skupiny ($-\text{N}^+(\text{R}_3)$). Z mobilních fází se používají tlumivé roztoky, jejichž ionty (protiionty) jsou v dynamické rovnováze s ionty měniče. Čím vyšší bude koncentrace protiiontů, tím více budou zadržovány tyto ionty měničem a tím rychlejší bude eluce analytů z kolony [54].

2.4 Atomová emisní spektrometrie

Atomová emisní spektrometrie je (zejména se zdrojem indukčně vázaného plazmatu) dle evropských i US norem pojednávajících o kontrole odpadů a enviromentální analýze doporučenou metodou pro stanovení anorganických polutantů [56].

Teorie metody, která se zabývá zkoumáním a využitím záření vysílaného excitovanými atomy (popřípadě ionty) prvků a jejíž počátky sahají do šedesátých let 19. století, je dle [57] následující: Dodáním energie (působením vysokých teplot) ve zdroji se zkoumaná látka převede do excitovaného atomárního stavu. Setrvání atomů v tomto metastabilním stavu je krátkodobé a přechodem zpět do stavů energeticky chudších vysílá vzorek záření, které je polychromatické, ale ne spojité. Skládá se ze záření určitých vlnových délek, charakteristických pro prvky přítomné v látce. Rozkladem vysílaného polychromatického záření optickým zařízením se získá čárové spektrum; poloha čar ve spektru (jejich vlnová délka) určuje kvalitativní složení vzorku a jejich intenzita je za určitých experimentálních podmínek užívána pro kvantitativní hodnocení vzorků.

Energie, která je vyzářena ve formě fotonu při přechodu excitovaných atomů zpět na nižší hladinu odpovídá rozdílu dvou energetických stavů ($E_2 > E_1$):

$$\Delta E = E_2 - E_1 = h \cdot \nu \quad (2.1)$$

kde E_2 je energie excitovaného stavu, E_1 energie základního stavu, h je Planckova konstanta [$6,626 \cdot 10^{-34}$ J.s], ν je frekvence emitovaného záření.

Každý prvek má své charakteristické čárové spektrum. Pro kvantitativní hodnocení, tedy pro identifikaci prvku podle polohy jeho čar ve spektru, se užívá vztah:

$$\log \Phi_\lambda = b \cdot \log c + \log a \quad (2.2)$$

kde Φ_λ je hustota zářivého toku vlnové délky λ příslušející danému prvku, c je koncentrace prvku ve vzorku, konstanty a a b souvisejí s experimentálními podmínkami.

2.4.1 Experimentální uspořádání

Přístroje pro AES bývají složeny z budícího zdroje, spektrálního přístroje (optického systému s disperzním prvkem) a detektoru s konečným vyhodnocením signálu (počítač).

V budícím zdroji dochází v důsledku dodání energie k rozložení, atomizaci a převedení vzorku do plynného prostředí, plazmatu. Jeho atomy jsou zde excitovány a vysílají záření. Jako zdroj budící energie může být použit plamen, elektrický výboj, plazma nebo laser.

V dnešní době se stále více používají právě plazmové zdroje. Plazma je definováno jako plyn (nejčastěji vzácný plyn argon), který je z více než 1% ionizován. Je elektricky vodivé, navenek ale nevykazuje žádný náboj. Získat ho lze pomocí elektrického výboje v plazmovém plynu. Dle způsobu získání elektrického výboje, rozlišujeme stejnosměrné plazma (DCP), mikrovlnně indukované plazma (MIP) a indukčně vázané plazma (ICP). ICP bylo využito i při zpracování předkládané diplomové práce.

2.4.1.1 Indukčně vázané plazma

Indukčně vázané plazma (ICP) vzniká indukčním přenosem vysokofrekvenční energie z budícího vysokofrekvenčního generátoru cívkou, která představuje obvykle 2–3 závity primárního vinutí transformátoru, plazma tvoří vinutí sekundární – závit nakrátko. Radiofrekvenční elektrický proud prochází kovem indukční cívky. Proud vytváří magnetické pole s vektorem intenzity rovnoběžným s křemennou trubicí. Elektrony uvnitř vložené křemenné trubice jsou vzniklým elektromagnetickým polem urychleny a svoji energii předávají atomům plynu (Ar), který se tak zahřívá a ionizuje.

Hlavní součástí přístroje ICP-AES je plazmová hlavice, ve které se vytváří vlastní plazma mající tvar prstence. Středem plazmatu (tzv. analytickým kanálkem) proudí aerosol vzorku. Hlavice je tvořena třemi koaxiálními křemennými trubicemi. Vnitřní kapilární spolu s nosným plynem (Ar) přivádí aerosol vzorku, střední je přiváděn vlastní plazmový plyn (Ar) a konečně vnější trubicí se přivádí chladicí plyn (Ar nebo N₂) [57].

2.5 Hodnocení výsledků měření

2.5.1 Měření

Měřením rozumíme soubor činností, jejichž cílem je stanovit hodnotu veličiny [58]. Při měření vyjadřujeme kvantitativně, tj. číselnou formou a v určitých jednotkách úroveň určité rozhodující veličiny, která charakterizuje vlastnost daného objektu. Naměřená hodnota může sama představovat požadovanou informaci, častěji ale musí být na požadovanou informaci převedena. Obvyklým případem bývá výpočet hodnoty požadované veličiny z výsledků různých měření [59].

2.5.2 Šum

Šum, který osciluje okolo základní linie je charakterizován frekvencí a amplitudou. Součet pozitivních a negativních výchylek šumu je v dostatečně dlouhém časovém intervalu roven nule. Takový šum je označován za tzv. bílý šum. Nenulovou sumou se vyznačuje tzv. náhodný šum. Pojmem drift potom rozumíme šum, jehož suma vykazuje časovou závislost v následných intervalech pozorování [60].

2.5.3 Kalibrace

Kalibrace je empirický postup zjištění závislosti mezi měřenou veličinou a požadovanou informací. Provádí se pomocí standardů se známým obsahem analytu nebo pomocí referenčních materiálů se známým celkovým složením. Podle způsobu použití se standardy dělí na vnější (používají se nezávisle na analyzovaném vzorku, představují tedy samostatné vzorky) a vnitřní (standard se přidává přímo do analyzovaného vzorku).

Za nejdokonalejší se pokládá použití sady referenčních materiálů jako vnějších standardů. Ty však bývají dosti nákladné a navíc nejsou vždy k dispozici [59].

V této diplomové práci byla kalibrace provedena metodou využívající vnější standardy; postupně byla změřena odezva pro několik standardů obsahujících známé množství analytu. Výsledky měření signálů standardů pak byly zpracovány graficky jako závislost $y = f(c)$ a regresní analýzou byla získána rovnice regrese

$$y = a \cdot c + b \quad (2.3)$$

kde y je odezva přístroje, c koncentrace analytu, a konstanta úměrnosti, b představuje signál slepého pokusu (blanku).

Konstanta a má význam citlivosti stanovení daným přístrojem, tj. odpovídá směrnici hledané koncentrační závislosti.

$$a = dy/dc \quad (2.4)$$

2.5.3.1 Metoda standardního přídavku

Metoda je alternativním kalibračním postupem, kdy se obvykle neznámý vzorek rozdělí na dvě části a k jedné z nich se přidá známé množství analytu (přídavek). Tyto dva roztoky (původní a s přídavkem) se analyzují. Předpokládá se, že rozdíl analytické odezvy roztoků je způsoben přidaným množstvím analytu. Tímto způsobem se určí kalibrační bod pro stanovení koncentrace analytu v původním vzorku [58].

2.5.4 Mez detekce a mez stanovitelnosti

Mez detekce (LOD) je nejmenší koncentrace analytu ve vzorku, kterou můžeme danou analytickou metodou detekovat, nikoliv však nezbytně stanovit jako exaktní hodnotu.

Mez stanovitelnosti (LOQ) je nejmenší koncentrace analytu ve vzorku, kterou můžeme danou analytickou metodou ještě stanovit s přijatelnou přesností a správností.

Pro potřeby této práce byly zmíněné parametry určeny jako trojnásobek ($LOD = 3\sigma$), resp. desetinásobek ($LOQ = 10\sigma$) směrodatné odchylky σ , získané proměřením vzorků o nízké, ještě detekovatelné koncentraci analytu a to desetkrát, co nejtěsněji za sebou.

2.5.5 Opakovatelnost

Opakovatelnost je vlastností metody, ne výsledku. Podmínky opakovatelnosti jsou ty, při nichž se nezávislé výsledky zkoušek získají toutéž metodou, na identických zkoušených jednotkách, v téže laboratoři, týmž operátorem, za použití téhož vybavení, během krátkého časového rozmezí [58].

V předkládané práci byla opakovatelnost vyjadřována jako relativní směrodatná odchylka (RSD) co nejtěsněji za sebou naměřených hodnot deseti vzorků.

$$RSD(\%) = 100 \cdot \frac{s}{\bar{x}} \quad (2.5)$$

kde s je směrodatná odchylka, $\bar{x}$ je aritmetický průměr naměřených hodnot.

2.5.6 Certifikovaný referenční materiál

Referenční materiál je materiál, jehož jedna nebo více hodnot vlastností je dostatečně homogenní a dobře stanovená, aby mohl být použit ke kalibraci přístroje, posouzení měřící metody nebo k přiřazení hodnot materiálům.

Certifikovaný referenční materiál je referenční materiál doprovázený certifikátem, jehož jedna nebo více hodnot vlastností je certifikována postupem, který vytváří návaznost na správnou realizaci jednotky, v níž jsou hodnoty vlastností vyjádřeny, a jehož každá certifikovaná hodnota je doprovázená nejistotou při uvedené hladině spolehlivosti [58].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité chemikálie

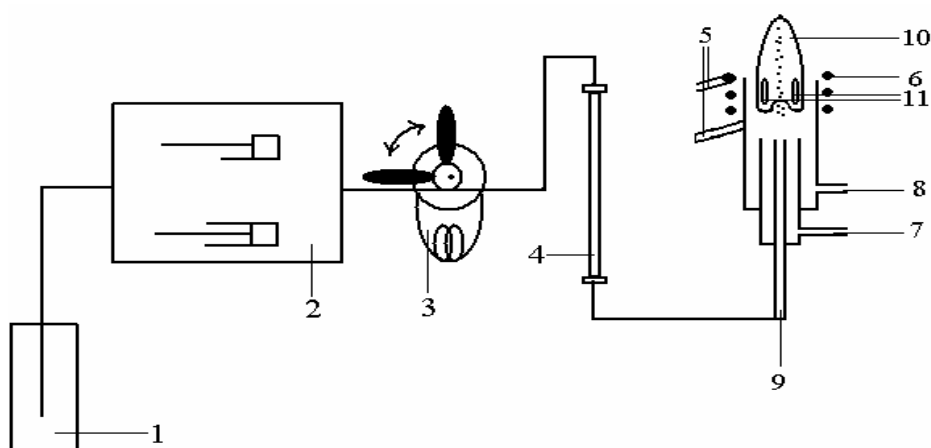
- Pro přípravu všech roztoků byla používána deionizovaná voda připravená zařízením Milli Q_{PLUS} (Milipore, USA)
- Chroman draselný (K_2CrO_4 ; $M_r = 194,19$; Lachema, Brno)
- Dusičnan chromitý ($\text{Cr}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$; $M_r = 400,15$; Lachema, Brno)
- Mobilní fáze (pufry) byly připraveny z:
 - Octan amonný ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$ p.a.; $M_r = 77,08$; Lach-Ner, Neratovice)
 - Chloristan sodný ($\text{Na}_2\text{ClO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ p.a.; $M_r = 140,46$; Lachema, Brno)
 - Kyselina dusičná (65% HNO_3 p.a.; Merck, Německo)
 - Methanol (CH_3OH p.a.; $M_r = 32,04$; Lachema, Neratovice)
- Pro přípravu vyluhovacích činidel byly použity:
 - Kyselina octová (CH_3COOH)
 - 99% p.a.; Lachema, Neratovice
 - 99,8% (testováno na přítomnost oxidovatelných látek); Sigma Aldrich, Německo
 - 99,99+% (testováno na kovy; čistota pro ultrastopovou analýzu); katalogové číslo: 338826; Sigma Aldrich, Německo
 - Hydroxid draselný (KOH ; $M_r = 56,11$; Lach-Ner, Neratovice)
 - Kyselina dusičná (65% HNO_3 p.a.; Merck, Německo)
 - Uhličitan amonný (Na_2CO_3 ; $M_r = 105,99$; Lachema, Brno)
- Další používané chemikálie:
 - Chelaton IV (CDTA) ($\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_8 \cdot \text{H}_2\text{O}$; $M_r = 364,35$; Merck, Německo)
 - Komplexotvorné činidlo
 - Síran železnato-amonný ($\text{FeSO}_4(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; $M_r = 392,16$; Lachema, Brno)
 - Chlorid draselný (KCl ; $M_r = 74,56$; Lachema, Brno)
 - Studium interferencí

3.2 Použité přístroje a zařízení

- Atomový emisní spektrometr s indukčně vázaným plazmatem VISTA-PRO (Varian, Australia) připojený k řídicímu počítači a ovládaný softwarem ICP Expert (Varian, Australia)
 - Nastavení spektrometru: RF příkon 1,2 kW, průtok plazmového plynu 15 l.min⁻¹, průtok argonu zamlžovačem 0,9 l.min⁻¹
 - Obsah chromu byl simultánně měřen na čarách 205,560 nm, 267,716 nm, 276,653 nm a 283,563 nm
- Kolona HAMILTON PRP-X100, 250 x 4,6 mm, 5 µm (PEEK) (katalogové číslo: 79181) (Hamilton, USA)
 - Chromatografické dělení forem Cr
- HPLC pumpa 2150 (LKB Bromma, Dánsko)
 - Čerpání mobilní fáze
- Dávkovací ventil 9725i (PEEK) (Rheodyne, USA) se smyčkou o objemu 200 µl
- Hamilton stříkačka o celkovém objemu 1 ml (Hamilton Bonaduz, Švýcarsko)
 - Dávkování vzorků
- Laboratorní pH metr pHM 82 (Radiometr, Dánsko) s kombinovanou skleněnou elektrodou, nakalibrovaný standardními kalibračními roztoky o pH 7 a 4
 - Úprava pH

3.3 Aparatura

Pro zjišťování obsahu obou specií chromu byla během celé doby využívána kombinovaná technika HPLC-ICP-AES. Spojení obou metod bylo uskutečněno přímým propojením výstupu z chromatografické kolony se vstupem zamlžovače spektrometru prostřednictvím teflonové kapiláry (délka 100 mm, vnitřní průměr 0,3 mm). Schéma aparatury je zobrazeno na Obr. 3.1 [55].



Obr. 3.1 Schéma propojení techniky HPLC a ICP-AES

1 – nádoba na mobilní fázi, 2 – HPLC pumpa, 3 – dávkovací ventil se smyčkou, 4 – chromatografická kolona, 5 - přívod energie z RF generátoru, 6 – indukční cívka, 7 – plazmový plyn, 8 – chladicí plyn, 9 – injektor pro přívod aerosolu vzorku, 10 – analytická zóna, 11 – plazmový prsten

3.4 Postupy měření

Roztoky pro měření připravené rozředěním zásobních roztoků na požadované koncentrace byly uschovávány v plastových nádobkách o objemu 50 ml. Na HPLC kolonu bylo vždy dávkováno 200 μl vzorku. Současně s nadávkováním vzorku byl spuštěn záznam kontinuálního měření obsahu Cr ovládacím softwarem ICP spektrometru (ICP Expert). Prvkově specifický detektor (ICP-AES) byl standardně nastaven (viz. podkap. 3.2) pro kontinuální měření obsahu Cr v požadovaném časovém intervalu.

Signál chromu byl sledován na několika vlnových délkách najednou, pro vyhodnocení pak byla používána čára 205,560 nm. Hodnotícím kritériem byla dosažená výška (ve většině případů) a plocha píku. Plocha píku byla určována pouze v případě konstrukce kalibračních závislostí a při proměřování praktických vzorků. Software spektrometru normálně neumožňuje vyhodnotit plochu píku; ty byly získány pomocí Origin 6.1. Získaná data byla dále zpracovávána za využití softwaru Microsoft Excel a do konečné grafické podoby upravována za využití programu Origin 6.1.

Optimální experimentální podmínky pro separaci specií byly převzaty z diplomové práce Petry Voldřichové (2009) a jsou shrnuty v Tab. 3.1. Postupy týkající se konkrétních pokusů jsou pak podrobněji popsány v kapitole Výsledková část a diskuze.

Tab. 3.1 Optimální podmínky kombinovaného stanovení

Parametr	Hodnota
Sledovaná vlnová délka [nm]	205,560
Složení mobilní fáze	50 mmol.l ⁻¹ CH ₃ COONH ₄
	10 mmol.l ⁻¹ NaClO ₄
pH mobilní fáze	7,0
Průtoková rychlost mobilní fáze [ml.min ⁻¹]	1,5
Dávkovaný objem vzorku [μl]	200
Komplexotvorné činidlo	30 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ CDTA

4 VÝSLEDKOVÁ ČÁST A DISKUZE

4.1 VÝBĚR VYLUHOVACÍHO ČINIDLA

První část diplomové práce byla zaměřena na výběr vhodného vyluhovacího činidla pro extrakci, která se používá k frakcionaci Cr z praktických vzorků polétavého prachu. Činidlo bylo vybíráno na základě pokusů uskutečněných v modelovém systému obsahujícím standardní roztoky Cr(III) a Cr(VI).

Vycházeno bylo z výsledků diplomové práce [4], kde už zmíněná problematika byla řešena. Uvedená práce se zabývala testováním kyselých vyluhovacích činidel pro speciální analýzu chromu. Byla testována vyluhovací činidla běžně používaná při frakcionaci: kyselina octová, hydroxylamin a octan amonný. V práci bylo ověřeno, že tato vyluhovací činidla jsou pro speciální analýzu nevhodná, protože okamžitě mění poměr zastoupení obou specií chromu ve vzorku (ve všech případech dochází k redukci Cr(VI)).

V předkládané práci byla nejprve ověřována domněnka, zda v případě použití kyseliny octové jako vyluhovacího činidla nemohou za redukci Cr(VI) odpovídat nečistoty obsažené v této kyselině. Na modelových roztocích chromu byly tedy testovány tři různé roztoky kyseliny octové od různých výrobců a různé čistoty.

4.1.1 Kyselina octová (CH_3COOH)

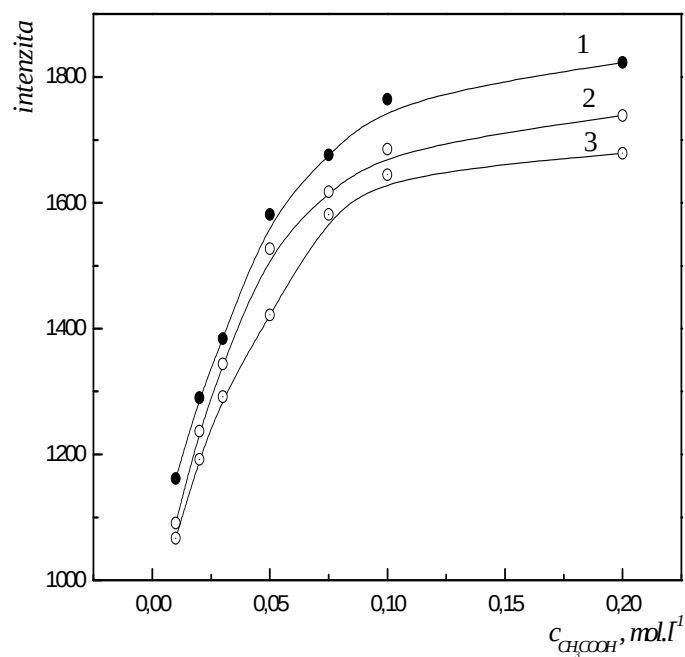
Při frakcionaci se jako jedno z vyluhovacích činidel používá roztok $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ CH_3COOH [4]. V této práci byla použita kyselina octová různých stupňů čistoty s cílem zjistit, zda kyselina vyššího stupně čistoty poskytne lepší výsledky. Lze totiž předpokládat, že s rostoucím stupněm čistoty klesá podíl oxidovatelných nečistot, které mohou být příčinou narušení kvantitativního poměru obou specií Cr ve vzorku.

Byla připravena série roztoků obsahujících $5 \text{ }\mu\text{g.ml}^{-1}$ Cr(III); $5 \text{ }\mu\text{g.ml}^{-1}$ Cr(VI); směs Cr(III) a Cr(VI) o stejné koncentraci; vždy s přídavkem komplexotvorného činidla

a CH_3COOH různých koncentrací a čistot. Testovány byly kyseliny následujících čistot: **I**: 99% (Lachema), **II**: 99,8% (Sigma-Aldrich, prošla testem s chromsírovou kyselinou) a **III**: 99,99+% (Sigma-Aldrich, ultrastopová čistota). Testování stability v prostředí vyluhovacího činidla bylo provedeno za optimálních experimentálních podmínek (viz. podkap. 3.4) a to ihned po přidání vyluhovacího činidla - kyseliny.

Z výsledků zobrazených na Obr. 4.1 a 4.2 je patrné, že chování všech tří kyselin bylo v závislosti na rostoucí koncentraci kyseliny stejné. Nejintenzivnější signál Cr(III) byl pozorován při použití CH_3COOH **I**, což pravděpodobně souvisí s anorganickou čistotou kyseliny. CH_3COOH **I** obsahuje nejvíce nečistot Cr(III) a vzorek tak dle intenzit signálů vykazuje největší množství této specie. Stejně vysvětlení má i fakt, že s nárůstem koncentrace kyseliny rostla ve všech třech pokusech i odezva Cr(III) (rostlo množství anorganických nečistot Cr(III)). Svou roli v nárůstu intenzity odezvy také pravděpodobně hrál jistý podíl redukováného Cr(VI) (ve směsných vzorcích).

U Cr(VI) naopak dochází ke snížení intenzity signálu bez ohledu na použitou kyselinu. Postupný pokles může právě souviset s organickými nečistotami v použitých kyselinách. Tyto nečistoty mohou ve vzorku oxidovat a způsobovat tak redukci Cr(VI) .



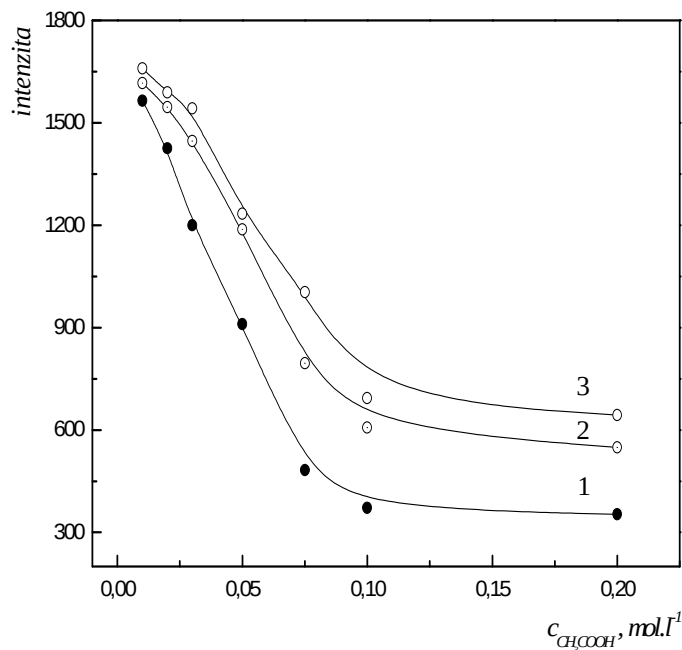
Obr. 4.1 Vliv koncentrace CH_3COOH na signál Cr(III)

1 – 99% CH_3COOH , 2 – 99,8% CH_3COOH , 3 – 99,99+% CH_3COOH

Vzorky: $5 \mu\text{g.ml}^{-1} \text{Cr(III)}$ + $30 \mu\text{g.ml}^{-1} \text{CDTA}$

Podmínky měření: MF – $50 \text{ mmol.l}^{-1} \text{CH}_3\text{COONH}_4$, $10 \text{ mmol.l}^{-1} \text{NaClO}_4$, pH 7,0

$Q_{\text{MF}} = 1,5 \text{ ml.min}^{-1}$, $\lambda = 205,560 \text{ nm}$, dávkováno $200 \mu\text{l}$



Obr. 4.2 Vliv koncentrace CH_3COOH na signál $Cr(VI)$

1 – 99% CH_3COOH , 2 – 99,8% CH_3COOH , 3 – 99,99+% CH_3COOH

Vzorky: $5 \mu g.ml^{-1} Cr(VI)$ + $30 \mu g.ml^{-1} CDTA$

Podmínky měření: $MF - 50 mmol.l^{-1} CH_3COONH_4$, $10 mmol.l^{-1} NaClO_4$, $pH 7,0$

$Q_{MF} = 1,5 ml.min^{-1}$, $\lambda = 205,560 nm$, dávkováno $200 \mu l$

Měření byla provedena ještě s odstupem 48 hodin; situace vypadala obdobně jako v pokusech prováděných ihned po smísení vzorků.

Obecně lze předchozí pokusy shrnout konstatováním, že se nepotvrdily domněnky, že by použití kyselin vyššího stupně čistoty vedlo k získání podstatně lepších výsledků. I nejčistší kyseliny testované výrobcem na přítomnost látek, které mohou být oxidovány totiž nezaručí, že jejich použitím nedochází k částečné redukci $Cr(VI)$ na $Cr(III)$.

Kyselina octová byla definitivně označena za nevhodné vyluhovací činidlo pro dané stanovení, a proto další pokusy s ní už nebyly prováděny.

4.1.2 Hydroxid draselný (KOH)

Použití kyselých vyluhovacích činidel se ukázalo jako nevýhodné, další pozornost proto byla zaměřena již pouze na alkalická vyluhovací činidla. Dalším testovaným extrakčním činidlem byl tedy hydroxid draselný.

Hydroxid (konkrétně NaOH) byl podroben testování již v práci Voldřichové, za nevhodný byl ale označen z důvodu překryvu píků Cr(III) a Cr(VI) při separaci; obě specie měly za daných separačních podmínek přibližně shodný retenční čas a nebyla tedy patrná separace. V této práci byl KOH o koncentraci $0,01 \text{ mol.l}^{-1}$ použit znovu, s cílem pokusit se o rozdělení obou forem. V literatuře [4, 42] byla doporučena (pro v této práci využívanou kolonu) mobilní fáze obsahující kyselinu dusičnou o koncentraci $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ a 0,5% methanol. S průtokem $1,2 \text{ ml.min}^{-1}$ této nově připravené mobilní fáze byly proměřeny jak vzorky samotného Cr(III) nebo Cr(VI), tak i vzorky směsné. Všechny vzorky byly s přidavkem komplexotvorného činidla CDTA i bez něj. Získané chromatogramy potvrdily, že obě formy chromu mají v dané mobilní fázi přibližně stejný retenční čas; Cr(III) asi 87 s a Cr(VI) 100 s. Navíc se ukázalo, že nezáleží na tom, zdali je do vzorku přidána CDTA, k posunu retenčního času Cr(III) v tomto případě nedošlo (vazba do záporně nabitého komplexu). Z toho důvodu už CDTA nadále používána nebyla.

Podobným způsobem byly testovány i vyšší koncentrace hydroxidu jako vyluhovacího činidla - 0,05 a $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$. Dosažené výsledky byly stejně neuspokojivé. Nepomohlo ani, byla-li k vyluhovacímu činidlu přidána určitá koncentrace HNO_3 nebo uhličitanu sodného (Na_2CO_3) (úprava pH).

Stejně pokusy s KOH byly zopakovány ještě dvakrát a to s určitými úpravami mobilní fáze. Nejprve byla volena vyšší koncentrace HNO_3 , konkrétně $0,5 \text{ mol.l}^{-1}$ při zachování přídatku 0,5% CH_3OH . Druhý pokus spočíval v přípravě mobilní fáze bez methanolu. Měření dopadla obdobně; nedošlo k uspokojivé separaci obou forem. S konečnou platností i tato doporučovaná mobilní fáze byla označena za nevhodnou.

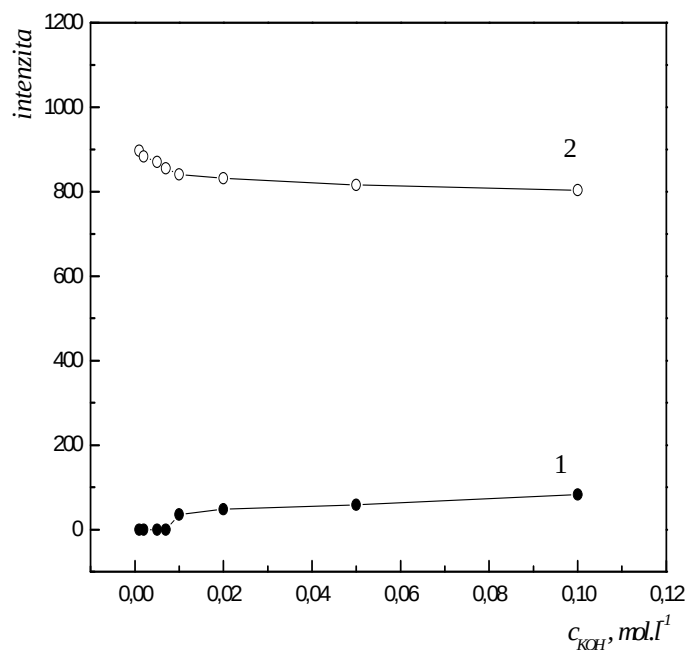
Po neúspěšném hledání nové mobilní fáze pro separaci obou forem chromu při alkalickém vyluhování byla pozornost vrácena k uspořádání s původní mobilní fází (složená z $50 \text{ mmol.l}^{-1} \text{ CH}_3\text{COONH}_4$, $10 \text{ mmol.l}^{-1} \text{ NaClO}_4$, $\text{pH} = 7,0$) [4], kdy docházelo

ke štěpení píku Cr(VI). S touto mobilní fází byl proměřován vliv koncentrace hydroxidu ve vyluhovacím činidle na chování obou forem chromu.

4.1.2.1 Vliv koncentrace KOH na chování obou forem chromu

Nejprve byla změřena závislost intenzity signálu obou specií (samostatně i ve směsi) na koncentraci KOH. Sledován byl koncentrační rozsah KOH 0,001 – 0,1 mol.l⁻¹. Vyšší koncentrace KOH nebyly voleny s ohledem na omezení pH roztoků, které je možné dle výrobce aplikovat na kolonu. Výsledky měření byly následující: signál příslušející Cr(III) nebyl patrný až do koncentrace 0,007 mol.l⁻¹, poté začal postupně růst. Oproti nulové koncentraci KOH ve vzorku, byl ale velmi slabý. Naměřená velmi malá intenzita signálu Cr(III) v alkalické oblasti pH má své pravděpodobné jednoduché vysvětlení: v alkalickém prostředí vytváří Cr(III) již při nízkých koncentracích nerozpustný hydroxid, který při zvětšujícím se pH roztoku přechází v rozpustné hydroxo komplexy. To bylo ověřeno ze součinu rozpustnosti Cr(OH)₃ ($pK_s = 30,20$) [61] a následným výpočtem molární rozpustnosti. Získaná hodnota činila 2.10⁻⁸ mol.l⁻¹ (1.10⁻⁹ g.ml⁻¹). Přičemž výchozí (v práci užívaná) koncentrace Cr(III) byla 5.10⁻⁶ g.ml⁻¹.

Píky Cr(VI) měly v závislosti na koncentraci KOH intenzitu téměř stále stejnou. Celkově byla o něco nižší než když byl Cr(VI) připraven pouze v deionizované vodě. Zmíněný mírný pokles intenzity specie s vyšším oxidačním číslem byl patrně způsoben štěpením na dva píky, ke kterému nepravidelně docházelo s rostoucí koncentrací KOH. Rozhodně však nedocházelo k redukci na Cr(III). Shodných hodnot bylo dosaženo u jednoduchých i směsných vzorků. Vliv koncentrace KOH ve vyluhovacím činidle na separaci obou forem je ilustrován na Obr. 4.3.



Obr. 4.3 Vliv koncentrace KOH na signál Cr(III) a Cr(VI)

1 – Cr(III), 2 – Cr(VI)

Vzorky: $5 \mu\text{g.ml}^{-1}$ Cr(III) + $5 \mu\text{g.ml}^{-1}$ Cr(VI) + $0,001 - 0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ KOH

Podmínky měření: MF – 50 mmol.l^{-1} $\text{CH}_3\text{COONH}_4$, 10 mmol.l^{-1} NaClO_4 , pH 7,0

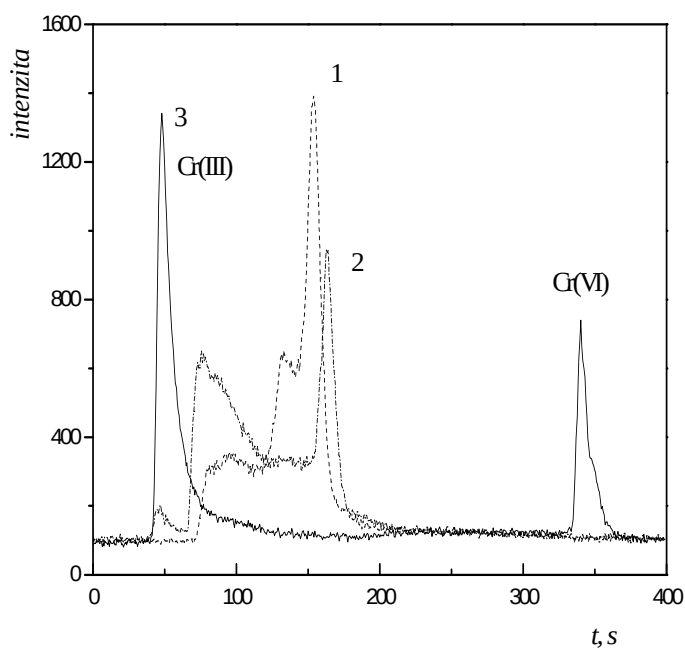
$Q_{MF} = 1,5 \text{ ml.min}^{-1}$, $\lambda = 205,560 \text{ nm}$, dávkováno $200 \mu\text{l}$

Z těchto měření vyplynul podstatný fakt, že při alkalickém loužení je sledovaná forma Cr(VI) stabilní. Problém ale nastal u formy Cr(III), kdy dojde k vysrážení hydroxidu. Práce při vyšších hodnotách pH (loužení i mobilní fáze) však nebylo možné, protože by došlo k překročení maximální hodnoty pH, které může být na daný typ kolony aplikováno. Proto bylo dalším cílem měření zajistit zpětné převedení nerozpustné formy Cr(III) na rozpustnou před nadávkováním vzorku na kolonu. Další měření byla prováděna s koncentrací $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ KOH ve vyluhovacím činidle. Tato koncentrace je v literatuře [42] doporučována jako jedna z optimálních pro alkalické loužení.

4.1.2.2 Vliv přídavku HNO_3 na stanovení

Možnost zpětného převedení nerozpuštěné formy Cr(III) do roztoku byla testována malým přídavkem roztoku HNO_3 . K modelování pokusu byly připraveny roztoky Cr(III) + Cr(VI) v prostředí $0,1 \text{ mol.l}^{-1} \text{ KOH}$ a HNO_3 o koncentraci v intervalu $0,01 - 0,1 \text{ mol.l}^{-1}$. Jak se ukázalo, předpoklad přídavku kyseliny byl správný; přidáním $0,1 \text{ mol.l}^{-1} \text{ HNO}_3$ došlo ke zvýšení intenzity Cr(III) na původní hodnotu a zároveň nedošlo k ovlivnění signálu Cr(VI) . Při nižších koncentracích kyseliny se píky částečně překrývaly; nebyly dokonale rozlišené. Použitím kyseliny se vyřešil i druhý problém, pík Cr(VI) se již neštěpil.

Na Obr. 4.4 jsou uvedeny příklady vlivu přídavku HNO_3 na speciaci chromu pro tři vybrané koncentrace. Za optimální byla nakonec vybrána $0,1 \text{ mol.l}^{-1} \text{ HNO}_3$.



Obr. 4.4 Vliv HNO_3 o různých koncentracích na separaci Cr(III) a Cr(VI)

1 - $0,01 \text{ mol.l}^{-1} \text{ HNO}_3$, 2 - $0,05 \text{ mol.l}^{-1} \text{ HNO}_3$, 3 - $0,1 \text{ mol.l}^{-1} \text{ HNO}_3$

Vzorky: $5 \mu\text{g.ml}^{-1} \text{ Cr(III)}$ + $5 \mu\text{g.ml}^{-1} \text{ Cr(VI)}$ + $0,1 \text{ mol.l}^{-1} \text{ KOH}$ + $0,01 - 0,1 \text{ mol.l}^{-1} \text{ HNO}_3$

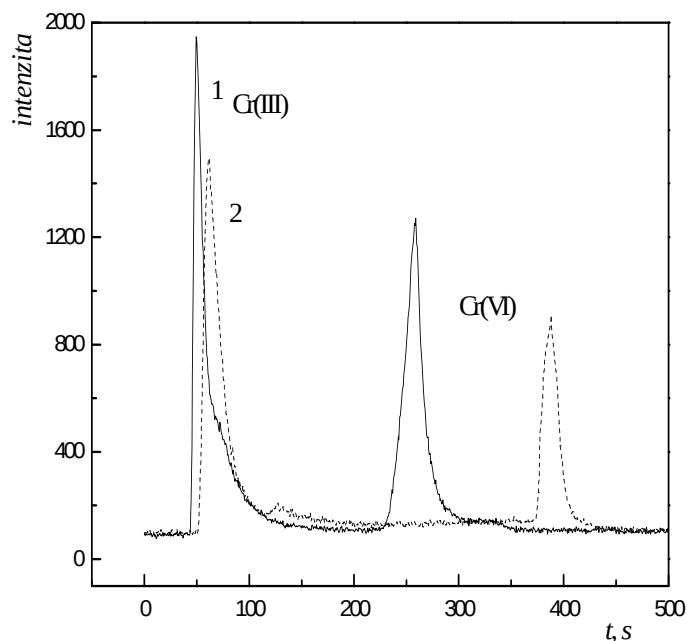
Podmínky měření: $\text{MF} - 50 \text{ mmol.l}^{-1} \text{ CH}_3\text{COONH}_4$, $10 \text{ mmol.l}^{-1} \text{ NaClO}_4$, $\text{pH } 7,0$

$Q_{\text{MF}} = 1,5 \text{ ml.min}^{-1}$, $\lambda = 205,560 \text{ nm}$, dávkováno $200 \mu\text{l}$

Na základě těchto pokusů bylo rozhodnuto, že jedinou možností pro správné provedení speciální analýzy chromu je alkalické loužení vzorku (stabilita Cr(VI) formy), separace s mobilní fází uvedeného složení (oddělení obou forem i bez přídavku komplexotvorného činidla) a úprava vzorku roztokem HNO_3 těsně před nadávkováním (zpětný převod Cr(III) formy do roztoku).

4.1.2.3 Porovnání citlivosti

Pro další experimenty byl tedy jako vyluhovací činidlo používán roztok $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ KOH s následným přídavkem $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ HNO_3 . Za těchto podmínek vzorek dosahuje pro obě formy dostatečného signálu srovnatelné intenzity se vzorkem Cr(III) a Cr(VI) připraveným pouze ve vodě. Použitím navrženého vyluhovacího činidla s přídavkem HNO_3 došlo u Cr(VI) k prodloužení retenčního času zhruba o 130 s, retenční čas Cr(III) se změnil jen málo (asi 10 s). Ukázka získaného chromatogramu je na Obr. 4.5.



Obr. 4.5 Chromatogram směsi Cr(III) a Cr(VI) připravené v různých prostředích

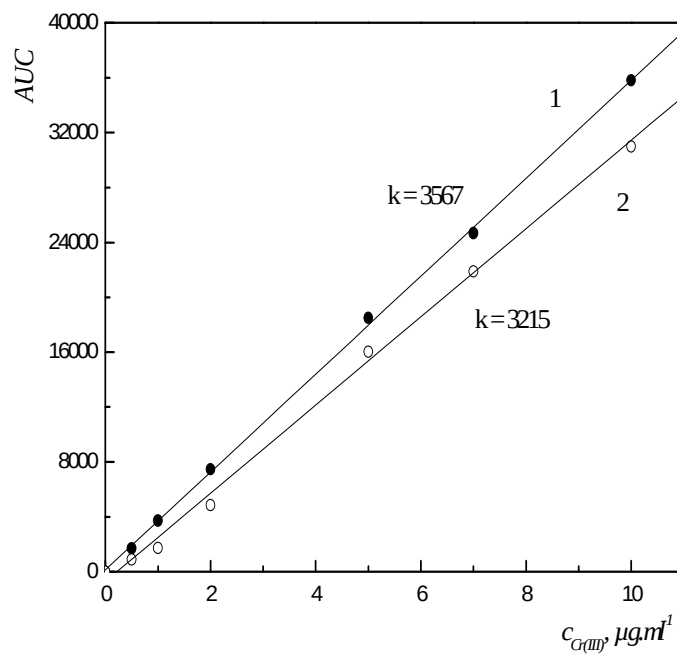
1 – Cr připravený v H_2O , 2 – Cr připravený v $0,1 \text{ mol.l}^{-1} \text{ KOH} + 0,1 \text{ mol.l}^{-1} \text{ HNO}_3$

Vzorky: $5 \mu\text{g.ml}^{-1} \text{ Cr(III)} + 5 \mu\text{g.ml}^{-1} \text{ Cr(VI)}$

Podmínky měření: $\text{MF} - 50 \text{ mmol.l}^{-1} \text{ CH}_3\text{COONH}_4$, $10 \text{ mmol.l}^{-1} \text{ NaClO}_4$, $\text{pH } 7,0$

$Q_{\text{MF}} = 1,5 \text{ ml.min}^{-1}$, $\lambda = 205,560 \text{ nm}$, dávkováno $200 \mu\text{l}$

Citlivost stanovení obou forem Cr připravených buď jen ve vodě nebo v prostředí $\text{KOH} + \text{HNO}_3$ byla porovnávána na základě směrnice kalibračních přímk. Výsledky shrnují grafy (Obr. 4.6 a 4.7). Z proměřených závislostí vyplývá, že v případě kombinace vyluhovacího činidla $0,1 \text{ mol.l}^{-1} \text{ KOH}$ a přídavku $0,1 \text{ mol.l}^{-1} \text{ HNO}_3$ se citlivost pro obě formy snížila. Pro Cr(VI) je pokles směrnice kalibrace větší (20 %); u Cr(III) se směrnice liší zhruba o 10 %. Přesto lze nadále doporučit kombinaci vyluhovacího činidla KOH s přídavkem HNO_3 pro speciální analýzu Cr. Je nutné si uvědomit, že snižování citlivosti Cr(VI) neprobíhalo na úkor růstu citlivosti Cr(III) a nic nenaznačuje tomu, že by použitím činidla docházelo k redukci Cr(VI) jak tomu bylo při testování jiných vyluhovacích činidel (ať už CH_3COOH nebo těch, která byla testována Voldřichovou).



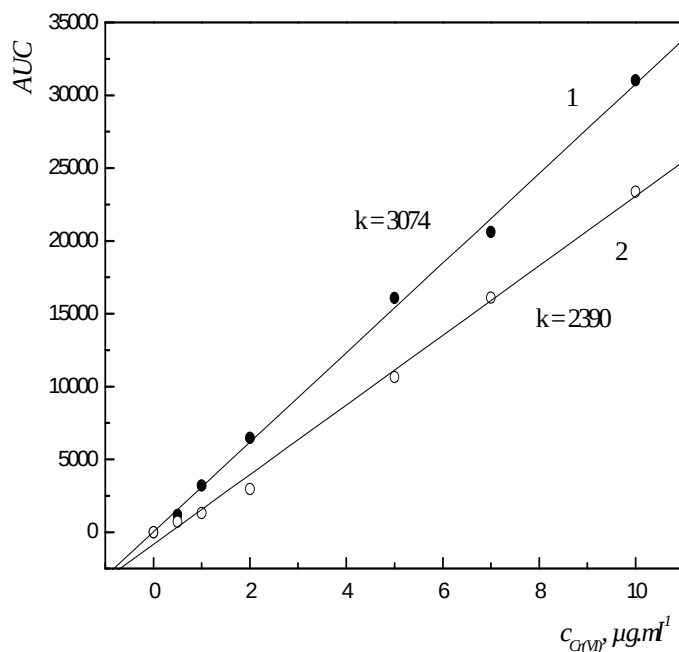
Obr. 4.6 Porovnání směrníc kalibrace Cr(III)

1 – Cr připravený v H_2O , 2 – Cr připravený v $0,1 \text{ mol.l}^{-1} KOH + 0,1 \text{ mol.l}^{-1} HNO_3$

Vzorky: $5 \mu g.ml^{-1} Cr(III)$

Podmínky měření: MF – $50 \text{ mmol.l}^{-1} CH_3COONH_4$, $10 \text{ mmol.l}^{-1} NaClO_4$, pH 7,0

$Q_{MF} = 1,5 \text{ ml.min}^{-1}$, $\lambda = 205,560 \text{ nm}$, dávkováno $200 \mu l$



Obr. 4.7 Porovnání směrnic kalibrace Cr(VI)

1 – Cr připravený v H_2O , 2 – Cr připravený v $0,1 \text{ mol.l}^{-1} KOH + 0,1 \text{ mol.l}^{-1} HNO_3$

Vzorky: $5 \mu\text{g.ml}^{-1} Cr(VI)$

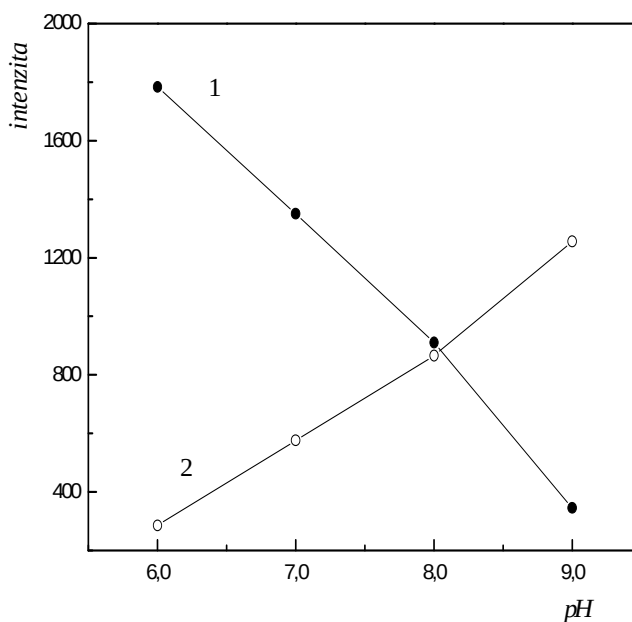
Podmínky měření: $MF - 50 \text{ mmol.l}^{-1} CH_3COONH_4$, $10 \text{ mmol.l}^{-1} NaClO_4$, pH 7,0

$Q_{MF} = 1,5 \text{ ml.min}^{-1}$, $\lambda = 205,560 \text{ nm}$, dávkováno $200 \mu\text{l}$

4.1.2.4 Vliv pH mobilní fáze

Důležitý parametr, který může ovlivnit separační proces a přímo pak také výsledek speciální analýzy, je pH mobilní fáze. Doposud byl používán octanový pufr s hodnotou pH 7,0. Protože však došlo k významné změně vyluhovacího činidla, byl dále sledován vliv změny pH (6,0 – 9,0) mobilní fáze na separační proces. Optimální hodnota byla vybírána s ohledem na shodu poměru intenzit píků, ale i celkové plochy či symetrii píků. Z Obr. 4.8 vyplývá, že odezva Cr(III) se zvyšujícím se pH klesá. U Cr(VI) je tomu naopak; maximální intenzity signál dosahuje při nejvyšším používaném pH. Ze získané závislosti vyplynula jako optimální hodnota pH = 8,0, kdy se křivky protínaly. Přes uvedenou skutečnost byla pro další pokusy zvolena opět hodnota pH 7,0 a to s ohledem

na symetrii píků. Při vyšším pH totiž pík příslušející Cr(III) vykazoval značnou asymetrii.



Obr. 4.8 Vliv pH mobilní fáze na signál Cr(III) a Cr(VI)

1 – Cr(III), 2 – Cr(VI)

Vzorky: $5 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ Cr(III) + $5 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ Cr(VI) + $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ KOH + $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ HNO₃

Podmínky měření: MF – $50 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ CH₃COONH₄, $10 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ NaClO₄, pH 6,0 – 9,0

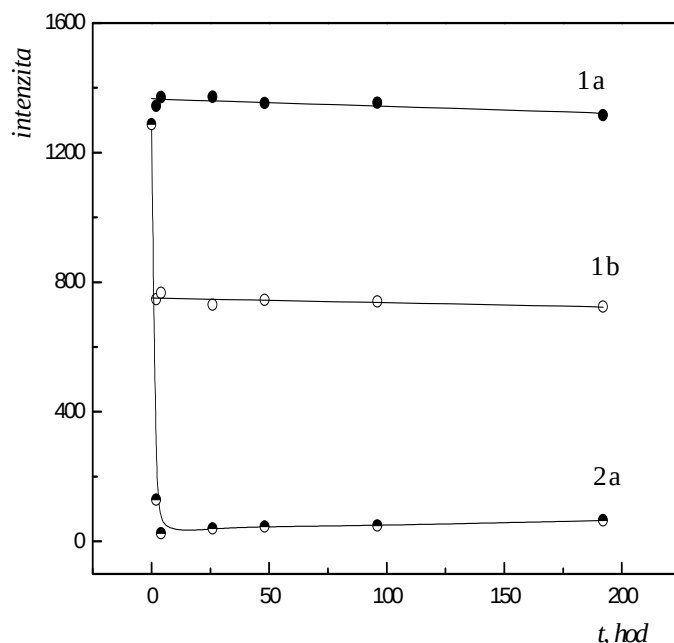
$Q_{MF} = 1,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, $\lambda = 205,560 \text{ nm}$, dávkováno $200 \mu\text{l}$

4.1.2.5 Časová stabilita

Stabilita obou specií chromu ve vyluhovacím činidle byla sledována ve dvou pokusech. Nejprve byly všechny složky modelového roztoku smíchány ihned; vzorek tedy od počátku obsahoval kromě obou forem Cr také $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ KOH a $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ HNO₃. Druhý pokus se odlišoval v tom smyslu, že $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ HNO₃ byla přidána vždy až těsně před nadávkováním na kolonu (snížení pH dávkovaného roztoku na kolonu). V obou případech byla sledována změna signálu Cr v čase po dobu osmi dnů.

Výsledky obou experimentů se lišily. V prvním případě, kdy byla kyselina do vzorku přidána už na počátku pokusu, nedošlo během sledovaného časového úseku ke změnám signálu Cr(III) ani Cr(VI). Takto připravený vzorek může být tedy označen za časově stálý. Ve druhém případě, kdy byla HNO_3 přidána do roztoku vždy až těsně před měřením, se signál Cr(VI) neměnil a jeho intenzita odpovídala intenzitě Cr(VI) z předchozího pokusu. Naproti tomu intenzita Cr(III) již po dvou hodinách klesala téměř k nule. V tomto případě došlo pravděpodobně k vysrážení Cr(III) a jeho sorpci např. na stěny nádoby a tento vysrážený Cr(III) se již nedostal do odebraného alikvotu, ke kterému byla přidána kyselina dusičná a který byl poté dávkován na kolonu. Jiným vysvětlením může být to, že Cr(III) ve formě sraženiny byl sice odebrán a nadávkován na kolonu, ale nedošlo k jeho eluci.

Popsané změny intenzity signálu v čase jsou shrnuty na Obr. 4.9. Chybí v něm křivka odpovídající Cr(VI) z druhého experimentu, která se téměř úplně překrývala s křivkou Cr(VI) z prvního pokusu.



Obr. 4.9 Časová stabilita Cr v modelových roztocích

1 – vyluhovací činidlo: $0,1 \text{ mol.l}^{-1} \text{ KOH} + 0,1 \text{ mol.l}^{-1} \text{ HNO}_3$; 1 a – Cr(III), 1 b – Cr(VI)

2 – vyluhovací činidlo: $0,1 \text{ mol.l}^{-1} \text{ KOH}$; HNO_3 přidána před nástřikem na kolonu;
2 a – Cr(III)

Vzorky: $5 \mu\text{g.ml}^{-1} \text{ Cr(III)} + 5 \mu\text{g.ml}^{-1} \text{ Cr(VI)}$

Podmínky měření: MF – $50 \text{ mmol.l}^{-1} \text{ CH}_3\text{COONH}_4$, $10 \text{ mmol.l}^{-1} \text{ NaClO}_4$, pH 7,0

$Q_{MF} = 1,5 \text{ ml.min}^{-1}$, $\lambda = 205,560 \text{ nm}$, dávkováno $200 \mu\text{l}$

Ze získaných poznatků vyplynulo, že pro modelový systém se jako optimální jeví taková příprava vzorku, kde je HNO_3 součástí vyluhovacího činidla. Na tomto místě nicméně bylo důležité se zamyslet, zda zmíněným způsobem připravené činidlo bude vhodné pro extrakci praktických vzorků. V případě, že by jako činidlo pro vyluhování byla brána směs $\text{KOH} + \text{HNO}_3$, v extraktu by (dle předchozího pokusu) byly pozorovány píky příslušející oběma speciím Cr. Je třeba si ale uvědomit, že praktický vzorek obsahuje mimo Cr velké množství dalších nečistot, které mohou ovlivnit stabilitu Cr(VI). Právě silná kyselina, která se obecně používá ke zvýšení účinnosti extrakce, by pak napomohla redukci Cr(VI) uvolněnými oxidovatelnými organickými i anorganickými nečistotami z matrice vzorku pocházejícího z životního prostředí.

Z uvedeného plyne, že pokud by HNO_3 byla součástí vyluhovacího činidla, došlo by pravděpodobně, stejně jako u kyselých vyluhovacích činidel, k redukci Cr(VI) na Cr(III) . Druhý pokus naproti tomu ukázal, že bude-li HNO_3 sloužit pouze k okyselení vzorku před jeho nadávkováním na kolonu, může nastat situace, že celkové množství vyextrahovaného chromu bude nižší. Pro jistotu byly při další práci aplikovány oba dva přístupy k vyluhovacímu činidlu.

V rámci měření stability byl proveden ještě jeden doplňující pokus, který měl potvrdit, že při použití daných vyluhovacích činidel skutečně nedochází ani k částečné redukci Cr(VI) na formu Cr(III) . K oběma vyluhovacím činidlům ($\text{KOH} + \text{HNO}_3$ i samotný KOH) byla přidána vyšší koncentrace Cr(VI) - $50 \mu\text{g.ml}^{-1}$ a byl sledován signál Cr(VI) po dobu minimálně dvou hodin. V tomto sledovaném časovém úseku nebyla pozorována žádná redukce.

4.1.2.6 Shrnutí dosažených výsledků

Jako vhodné vyluhovací činidlo pro modelový systém obsahující v přírodě zastoupené specie chromu Cr(III) a Cr(VI) byla na základě předchozích pokusů vybrána směs $0,1 \text{ mol.l}^{-1} \text{ KOH} + 0,1 \text{ mol.l}^{-1} \text{ HNO}_3$.

V Tab. 4.1 jsou shrnuty optimální pracovní podmínky, na Obr. 4.10 pak získaný chromatogram odpovídající daným optimálním experimentálním podmínkám.

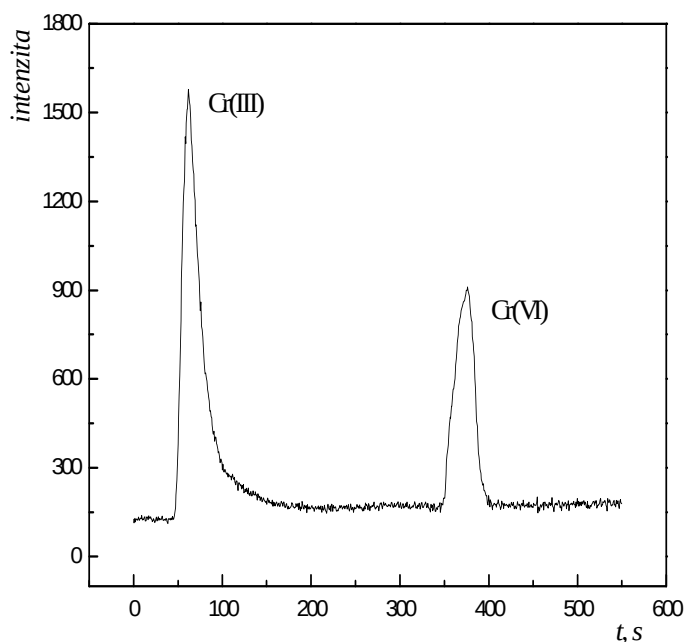
Tab. 4.1 Zjištěné poznatky – aplikace na modelový systém

Parametr	Hodnota; zjištěná skutečnost
Vyluhovací činidlo	$0,1 \text{ mol.l}^{-1} \text{ KOH} + 0,1 \text{ mol.l}^{-1} \text{ HNO}_3$
pH mobilní fáze	7,0
Časová stabilita	Stálý

Nevyřešenou otázkou zůstalo, zda pro praktické využití zvolit pro vyluhování směs $0,1 \text{ mol.l}^{-1} \text{ KOH} + 0,1 \text{ mol.l}^{-1} \text{ HNO}_3$ a nebo HNO_3 použít k okyselení vzorku až po

samotné extrakci. Obě varianty skrývají určitá úskalí; u první lze předpokládat kvantitativně větší množství celkového vyluhovaného chromu a současně redukci toxického Cr(VI); u druhé pak ztrátu Cr(III). Pokud by byla zvolena varianta vyluhovacího činidla bez HNO₃, bylo by vhodné zvýšit hodnotu pH mobilní fáze na 9,0, aby byla po separaci dosažena vyšší odezva Cr(VI). Nakonec bylo pracováno s oběma variantami, protože bylo těžké předem odhadnout chování praktického vzorku.

Zmíněný problém poměru kvality a kvantity bývá bohužel typický pro většinu speciálních analýz, kde se vzorek převádí z pevného materiálu do roztoku [5, 22].



Obr. 4.10 Separace směsi Cr(III) a Cr(VI) na koloně Hamilton PRP X-100

Vzorek: $5 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ Cr(III) + $5 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ Cr(VI) + $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ KOH + $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ HNO₃

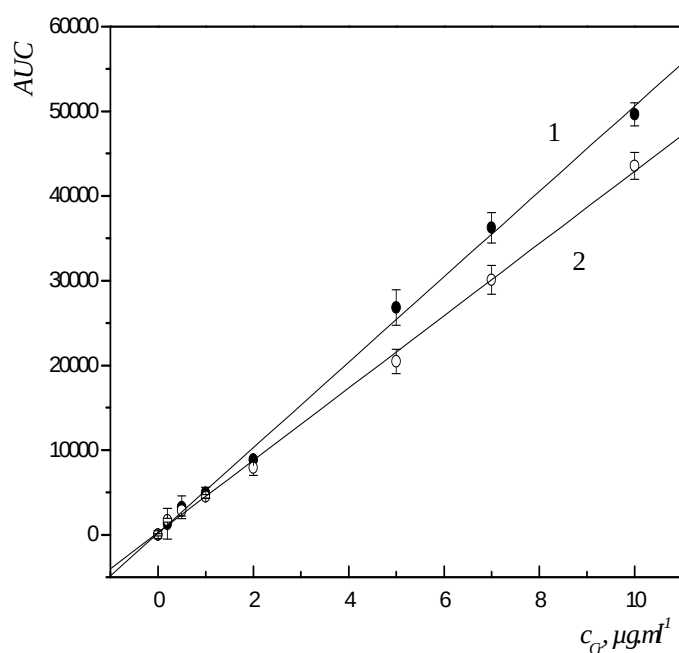
Podmínky měření: MF – $50 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ CH₃COONH₄, $10 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ NaClO₄, pH 7,0

$Q_{\text{MF}} = 1,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, $\lambda = 205,560 \text{ nm}$, dávkováno $200 \mu\text{l}$

4.2 ZÁKLADNÍ CHARAKTERISTIKY KOMBINOVANÉHO STANOVENÍ Cr(III) a Cr(VI)

4.2.1 Kalibrační závislost

Pro proměření kalibračních závislostí byly připraveny série roztoků o stoupající koncentraci Cr (jednotlivě i ve směsi) v intervalu 0 – 10 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$. Byla vyhodnocována výška i plocha píků. Ukázalo se, že za daných experimentálních podmínek je citlivost stanovení obou specií v jednoduchých i směsných vzorcích stejná. Shodovaly se i plochy píků. Z uvedeného vyplývá, že se jednotlivé formy vzájemně neovlivňují. Kalibrační závislost zobrazená na Obr. 4.11 je lineární v celém sledovaném rozsahu.



Obr. 4.11 Kalibrační závislost stanovení Cr(III) a Cr(VI)

1 – Cr(III), 2 – Cr(VI)

Vzorky: 5 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ Cr(III) + 5 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ Cr(VI) + 0,1 $\text{mol}.\text{l}^{-1}$ KOH + 0,1 $\text{mol}.\text{l}^{-1}$ HNO₃

Podmínky měření: MF – 50 $\text{mmol}.\text{l}^{-1}$ CH₃COONH₄, 10 $\text{mmol}.\text{l}^{-1}$ NaClO₄, pH 7,0

$Q_{MF} = 1,5 \text{ ml}.\text{min}^{-1}$, $\lambda = 205,560 \text{ nm}$, dávkováno 200 μl

4.2.2 Mez detekce a mez stanovitelnosti, opakovatelnost

Mez detekce (LOD) a mez stanovitelnosti (LOQ) byly určeny na základě výsledků získaných desetinásobným proměřením vzorku obsahujícího směs chromu o velmi nízké koncentraci ($0,2 \mu\text{g.ml}^{-1}$). Byla sestrojena kalibrační křivka v oboru nízkých hodnot a plochy píků byly pomocí rovnice regrese této kalibrační přímky přepočteny na koncentrace. Ty pak byly statisticky zpracovány; LOD byla určena jako trojnásobek směrodatné odchylky a LOQ jako desetinásobek směrodatné odchylky.

Pro určení opakovatelnosti byl desetkrát, co nejrychleji za sebou, proměřen vzorek obsahující Cr(III) a Cr(VI) o koncentraci $5 \mu\text{g.ml}^{-1}$. Plochy píků byly opět přepočítány na koncentrace. Opakovatelnost (procentuální podíl σ na průměrné koncentraci – RSD) činila 3,6 % pro Cr(III) a 3,7 % pro Cr(VI). Dosažené základní charakteristiky jsou uvedeny v Tab. 4.2.

Tab. 4.2 Základní charakteristiky stanovení směsi Cr(III) a Cr(VI) kombinovanou technikou HPLC-ICP-AES (pH = 7,0)

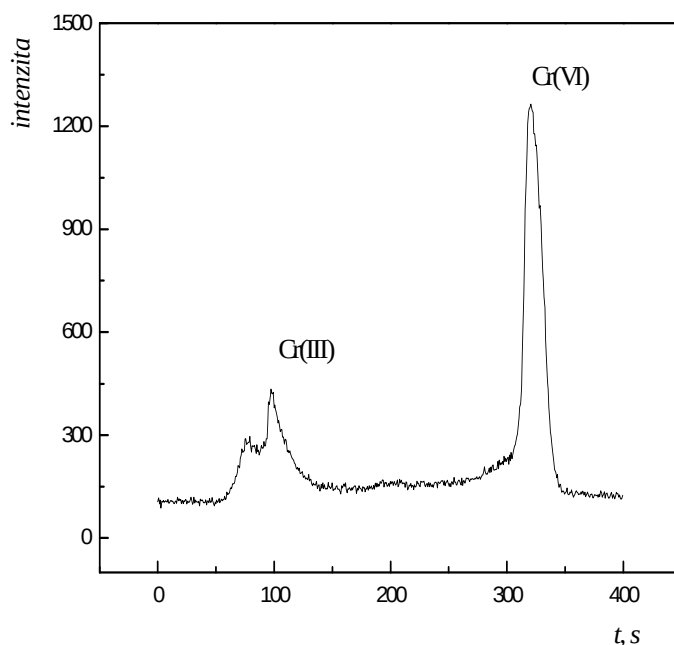
Parametr		Cr(III)	Cr(VI)
LOD	ng.ml^{-1}	108	82
LOQ	ng.ml^{-1}	358	271
Absolutní LOD*	ng	22	16
Absolutní LOQ*	ng	72	54
Opakovatelnost (RSD)	%	3,6	3,7
Citlivost	ng.ml^{-1}	5042	4265
Korelační koeficient		0,999	0,999

* dávkováno 200 μl vzorku

4.2.3 Základní charakteristiky stanovení pro Cr(VI)

Na základě domněnek uvedených v podkapitolách 4.1.2.4 a 4.1.2.5 byly ještě určeny základní charakteristiky pro Cr(VI) s mobilní fází o pH 9,0. Cr(III) do stanovení

zahrnut nebyl, protože (jak ukazuje Obr. 4.12) při takto zvýšeném pH byl příslušný pík značně asymetrický a vykazoval nízkou intenzitu.



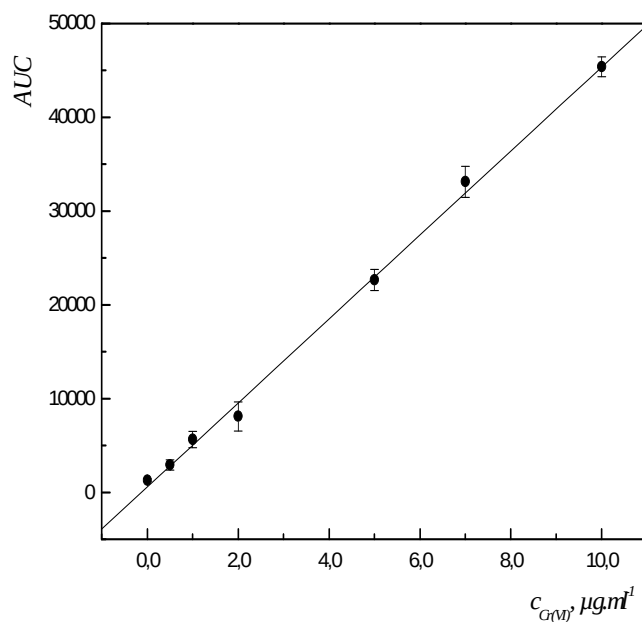
Obr. 4.12 Separace směsi Cr(III) a Cr(VI) na koloně Hamilton PRP X-100

Vzorek: $5 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1} \text{Cr(III)} + 5 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1} \text{Cr(VI)} + 0,1 \text{ mol}.\text{l}^{-1} \text{KOH} + 0,1 \text{ mol}.\text{l}^{-1} \text{HNO}_3$

Podmínky měření: MF – $50 \text{ mmol}.\text{l}^{-1} \text{CH}_3\text{COONH}_4$, $10 \text{ mmol}.\text{l}^{-1} \text{NaClO}_4$, pH 9,0

$Q_{MF} = 1,5 \text{ ml}.\text{min}^{-1}$, $\lambda = 205,560 \text{ nm}$, dávkováno $200 \mu\text{l}$

Kalibrační závislost pro stanovení Cr(VI) je znázorněna na Obr. 4.13, v Tab. 4.3 jsou pak shrnuty základní dosažené charakteristiky. Z uvedené tabulky lze vyčíst, že použitím mobilní fáze o pH 9,0 došlo k výraznému poklesu LOD a LOQ oproti použité mobilní fázi o pH 7,0. Tento fakt svědčí mimo jiné o tom, že pro aplikaci metody na reálné systémy by bylo výhodné zaměřit se spíše na stanovení jedné formy - toxického Cr(VI) a koncentraci Cr(III) určit jako rozdíl celkového obsahu Cr a obsahu Cr(VI).



Obr. 4.13 Kalibrační závislost pro Cr(VI)

Vzorek: 0 - 10 $\mu g.ml^{-1}$ Cr(VI) + 0,1 mol.l⁻¹ KOH + 0,1 mol.l⁻¹ HNO₃

Podmínky měření: MF – 50 mmol.l⁻¹ CH₃COONH₄, 10 mmol.l⁻¹ NaClO₄, pH 9,0

$Q_{MF} = 1,5 ml.min^{-1}$, $\lambda = 205,560 nm$, dávkováno 200 μl

Tab. 4.3 Základní charakteristiky stanovení Cr(VI) kombinovanou technikou HPLC-ICP-AES (pH = 9,0)

Parametr		Cr(VI)
LOD	ng.ml ⁻¹	55
LOQ	ng.ml ⁻¹	182
Absolutní LOD*	ng	11
Absolutní LOQ*	ng	36
Opakovatelnost (RSD)	%	3,8
Citlivost	ng.ml ⁻¹	4480
Korelační koeficient		0,998

* dávkováno 200 μl vzorku

4.3 SPECIACE CHROMU V REÁLNÝCH VZORCÍCH

V další části diplomové práce bylo navržené vyluhovací činidlo využito k extrakci chromu z praktického vzorku, který byl poskytnut Vysokou školou chemicko-technologickou v Praze (VŠCHT). Vzorkem byl polétavý prach odebraný na území hlavního města Prahy (Evropská třída). Celkový obsah chromu byl určen po jeho totálním rozkladu atomovou absorpční spektrometrií s elektrotermickou atomizací (ETA-AAS): $179,7 \pm 2,5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$.

4.3.1 Extrakce praktického vzorku

Jak již bylo uvedeno, nelze předem odhadnout, jaký vliv bude mít na speciální stanovení chromu matrice vzorku. Na základě výsledků dosažených v předešlých částech diplomové práce byla extrakce provedena dvěma způsoby:

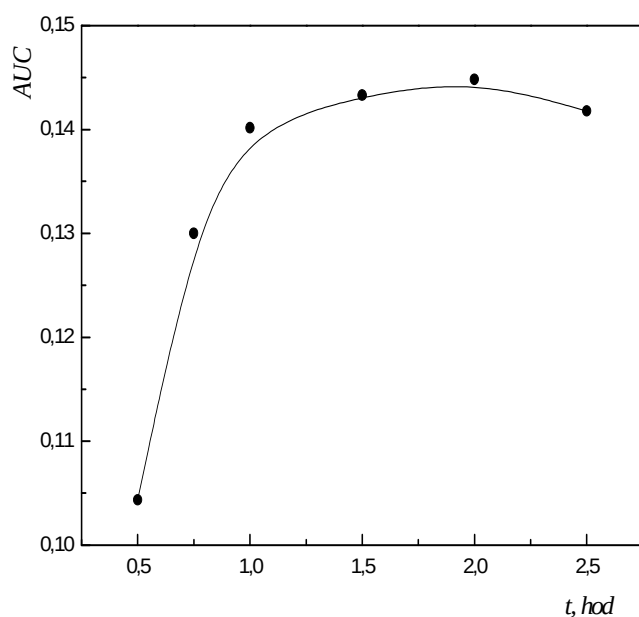
A) Vyluhovací činidlo = směs $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ KOH + $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ HNO₃

B) Vyluhovací činidlo = $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ KOH. $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ HNO₃ byla přidána až těsně před nadávkováním výluhu na kolonu.

Extrakce oběma činidly byla provedena dle následujícího schématu:

- 1.) Navážka vzorku prachu (500 mg), převrstvení vyluhovacím činidlem (50 ml)
- 2.) Extrakce v ultrazvuku po dobu 60 min při 70 °C
- 3.) Centrifugace při 4 000 otáčkách za minutu po dobu 10 min
- 4.) Filtrace vzniklého výluhu přes filtr o velikosti pórů 0,22 μm .

Při přípravě extraktů bylo vycházeno z práce [62]. Oproti citovanému zdroji byla pozměněna délka extrakce vzorku prachu v ultrazvuku; místo doporučených 30 min byla doba prodloužena na 60 min. Podnětem k této úpravě byl výsledek pokusu, ve kterém byl zjišťován vliv délky pobytu vzorku v ultrazvuku na množství vyluhovaného chromu. Získaná závislost je na Obr. 4.14. Další změna oproti zmíněné literatuře spočívala ve snížení počtu otáček při centrifugaci z původních 7000 otáček na 4000 otáček; při 7 000 otáčkách totiž docházelo k praskání centrifugačních kyvet se vzorkem.



Obr. 4.14 Vliv délky extrakce vzorku v ultrazvuku na množství vyluhovaného Cr

Vzorek: výluh polétavého prachu připravený z 500 mg prachu v 50 ml vyluhovacího činidla

Vyluhovací činidlo: $0,1 \text{ mol.l}^{-1} \text{ KOH} + 0,1 \text{ mol.l}^{-1} \text{ HNO}_3$

Podmínky měření: MF – $50 \text{ mmol.l}^{-1} \text{ CH}_3\text{COONH}_4$, $10 \text{ mmol.l}^{-1} \text{ NaClO}_4$, pH 7,0

$Q_{MF} = 1,5 \text{ ml.min}^{-1}$, $\lambda = 205,560 \text{ nm}$, dávkováno $200 \mu\text{l}$

4.3.2 Celkový obsah chromu ve vzorku

Ihned po přípravě výluhů byl metodou ICP-AES (bez předchozí separace) zjištěn celkový obsah Cr. Výluhy byly připraveny v obou výše uvedených činidlech. Změřeny byly také obsahy dalších přítomných prvků. Tab. 4.4 přináší přehled zastoupení jednotlivých prvků v praktickém vzorku. Výluhy v obou činidlech byly připraveny celkem pětikrát, v tabulce jsou uvedeny průměrné hodnoty obsahů. Další tabulka Tab. 4.5 přináší statistické údaje z těchto pěti měření pouze pro Cr, který byl předmětem zájmu.

Tab. 4.4 Zastoupení prvků ve výluhu praktického vzorku**A** - Vyluhovací činidlo = směs 0,1 mol.l⁻¹ KOH + 0,1 mol.l⁻¹ HNO₃**B** - Vyluhovací činidlo = 0,1 mol.l⁻¹ KOH

Analyt	A	B	Analyt	A	B
	Obsah ¹ μg.g ⁻¹	Obsah ¹ μg.g ⁻¹		Obsah ¹ μg.g ⁻¹	Obsah ¹ μg.g ⁻¹
Al	2259	433	Mg	3109	8,5
As	25,7	5,2	Mn	380	14,1
B	112,8	47,6	Mo	17,4	4,6
Ba	130,7	10,8	Ni	16,8	4,6
Ca	9326	7329	P	1135	337
Cd	9,1	0,2	Pb	182	27,5
Co	9,6	0,5	S	24980	23330
Cr	14,1	0,9	Sr	26370	25060
Cu	853	186,4	Ti	7,0	2,5
Fe	4713	48,5	V	19,9	6,5
K	1604	1153	Zn	3486	371

¹ Obsah po odečtu signálu extrakčního činidla a přepočtu na hmotnostní koncentraci, průměrná hodnota z pěti měření

Tab. 4.5 Celkový obsah Cr ve výluhu praktického vzorku

Činidlo	Obsah Cr ¹ ng.ml ⁻¹	Obsah Cr ¹ μg.g ⁻¹	s (n = 5) μg.g ⁻¹	RSD %
0,1 mol.l ⁻¹ KOH + 0,1 mol.l ⁻¹ HNO ₃	141	14,1	1,2	9,2
0,1 mol.l ⁻¹ KOH	8,6	0,9	0,1	10,9

¹ Obsah po odečtu signálu extrakčního činidla

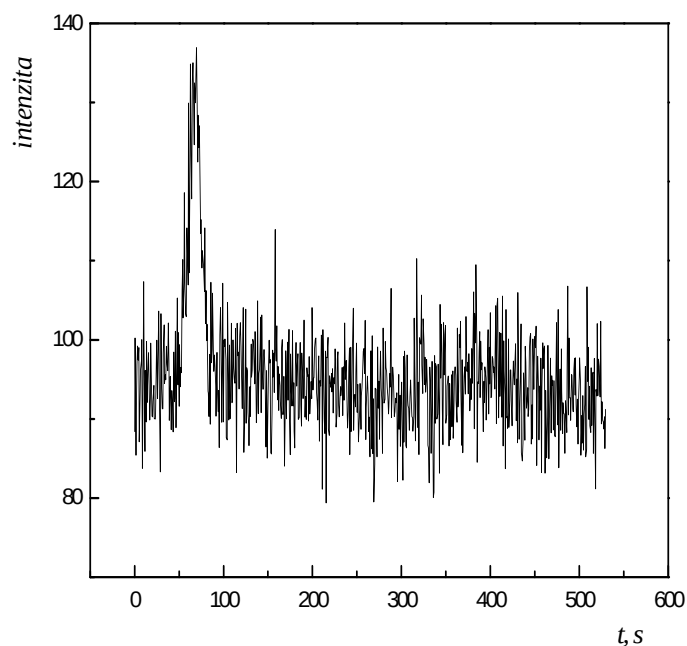
Porovnáním získaných obsahů Cr v obou extraktech je vidět, že použitím vyluhovací směsi KOH + HNO₃ dojde k vyextrahování výrazně vyššího celkového množství chromu než v případě samotného KOH (přibližně 16krát). Také obsah ostatních prvků zaznamenal podstatný nárůst; největší, více jak stonásobný, je pozorován

u Fe. Právě o Fe(II) lze předpokládat, že má velký vliv na případnou redukci Cr(VI) [23, 24].

Použití obou činidel ukazuje, že vyluhované množství Cr představuje jen malý zlomek z celkového množství, které bylo stanoveno metodou ETA-AAS po totálním rozkladu; činidlem **A** se podařilo vyluhovat necelých 8 % a činidlem **B** méně jak 1 %. I za předpokladu, že by byla ve vzorku přítomna pouze jedna forma Cr, nachází se získané hodnoty hluboko pod mezí stanovitelnosti kombinované metody HPLC-ICP-AES. Přes očekávané nízké signály obou forem Cr byly metodou HPLC-ICP-AES proměřeny vzorky obou výluhů. Nejprve byl proměřen vzorek připravený ve vyluhovacím činidle **A**; dále pak vzorek loužený roztokem **B**.

4.3.3 Výluh reálného vzorku připravený ve směsi KOH + HNO₃

Proměřením výluhu byl získán chromatogram (Obr. 4.15), ve kterém je pozorovatelný signál nízké intenzity odpovídající Cr(III), signál Cr(VI) se ztrácí v šumu základní linie. Po zjištění plochy píku a přepočtu na koncentraci bylo zjištěno, že výluh obsahuje **8,4 µg.g⁻¹** resp. **84,1 ng.ml⁻¹** Cr(III). Tato hodnota je více než 1,5krát nižší oproti celkovému obsahu Cr ve výluhu, který byl určen v předchozím experimentu. V daném případě by jistě nebylo správné domnívat se, že množství Cr(VI) lze určit jako rozdíl celkového obsahu Cr a obsahu Cr(III). Získaná koncentrace Cr(III) totiž leží pod hranicí meze detekce použité metody a je tedy značně nespolehlivá. Navíc existuje vysoká pravděpodobnost, že zejména Fe(II), kterého je ve výluhu téměř 350krát více (celkový obsah Fe) než samotného chromu, bude mít, vedle jistě přítomných organických příměsí či např. chloridů (chlor nelze stanovit ICP-AES), za následek redukci Cr(VI) právě na Cr(III).



Obr. 4.15 Chromatogram Cr - výluh praktického vzorku

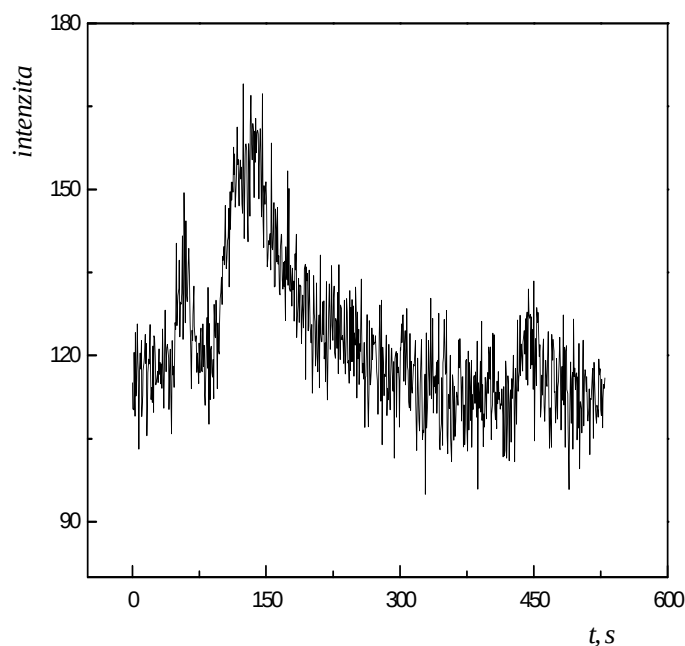
Vzorek: výluh polétavého prachu připravený z 500 mg prachu v 50 ml vyluhovacího činidla

Vyluhovací činidlo: $0,1 \text{ mol.l}^{-1} \text{ KOH} + 0,1 \text{ mol.l}^{-1} \text{ HNO}_3$

Podmínky měření: MF – $50 \text{ mmol.l}^{-1} \text{ CH}_3\text{COONH}_4$, $10 \text{ mmol.l}^{-1} \text{ NaClO}_4$, pH 7,0

$Q_{MF} = 1,5 \text{ ml.min}^{-1}$, $\lambda = 205,560 \text{ nm}$, dávkováno $200 \mu\text{l}$

K výluhu praktického vzorku byl přidán standardní přídavek Cr(VI) o koncentraci $5 \mu\text{g.ml}^{-1}$ a byly sledovány změny v jeho signálu. Získaný chromatogram (Obr. 4.16) ukazuje, že přidáný Cr(VI) se vlivem interferentů v matrici ihned zredukoval; nebyl zaznamenán žádný signál odpovídající přídavku Cr(VI) a naopak rostl signál nesymetrického píku s retenčním časem okolo 130 s.



Obr. 4.16 Standardní přídavek Cr(VI) k výluhu praktického vzorku

Vzorek: $5 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ Cr(VI) + výluh polétavého prachu připravený z 500 mg prachu v 50 ml vyluhovacího činidla

Vyluhovací činidlo: $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ KOH + $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ HNO₃

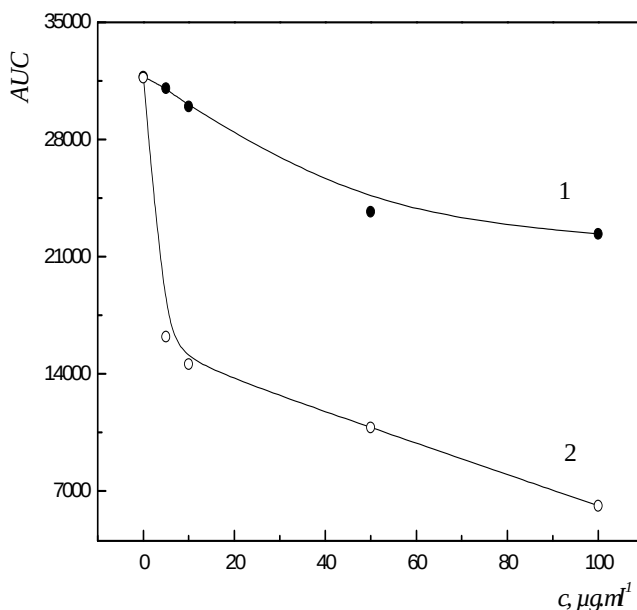
Podmínky měření: MF – $50 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ CH₃COONH₄, $10 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ NaClO₄, pH 7,0

$Q_{MF} = 1,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, $\lambda = 205,560 \text{ nm}$, dávkováno $200 \mu\text{l}$

Pokus byl zopakován ještě s vyššími koncentracemi přídavku Cr(VI). Až při koncentraci $50 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ a vyšší byl patrný signál příslušející Cr(VI) (po přepočtu dle kalibrační křivky odpovídal koncentraci $20 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$). Tento jednoduchý pokus potvrdil úvahy o nezanedbatelném vlivu matrice vzorku na speciální stanovení chromu a také že použitím daného vyluhovacího činidla nelze spolehlivě určit obsah ani jedné specíe Cr.

Dalším experimentem byl pomocí modelových roztoků Cr(VI) prokázán vliv Fe(II) [23, 24] a Cl⁻ [9] na redukci Cr(VI). K roztoku Cr(VI) o koncentraci $5 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ připraveném ve vyluhovacím činidle A, byla postupně přidávána různá množství Fe(II) nebo Cl⁻. Jak ukazuje Obr. 4.17 oba ionty měly dle předpokladů vliv na změnu oxidačního stavu Cr(VI); Fe(II) ve větší míře. Zatímco signál Cr(VI) s přídavkem

interferujících iontů postupně klesal, začal se objevovat signál příslušející Cr(III). Součet ploch píků Cr(III) a Cr(VI) byl přibližně konstantní.



Obr. 4.17 Vliv iontů Fe(II) a Cl^- na signál Cr(VI)

1 – vliv Cl^- na signál Cr(VI), 2 – vliv Fe(II) na signál Cr(VI)

Vzorky: $5 \mu\text{g.ml}^{-1}$ Cr(VI) + $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ KOH + $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ HNO_3 + 0 – $100 \mu\text{g.ml}^{-1}$ Cl^- nebo Fe(II)

Podmínky měření: MF – 50 mmol.l^{-1} $\text{CH}_3\text{COONH}_4$, 10 mmol.l^{-1} NaClO_4 , pH 7,0

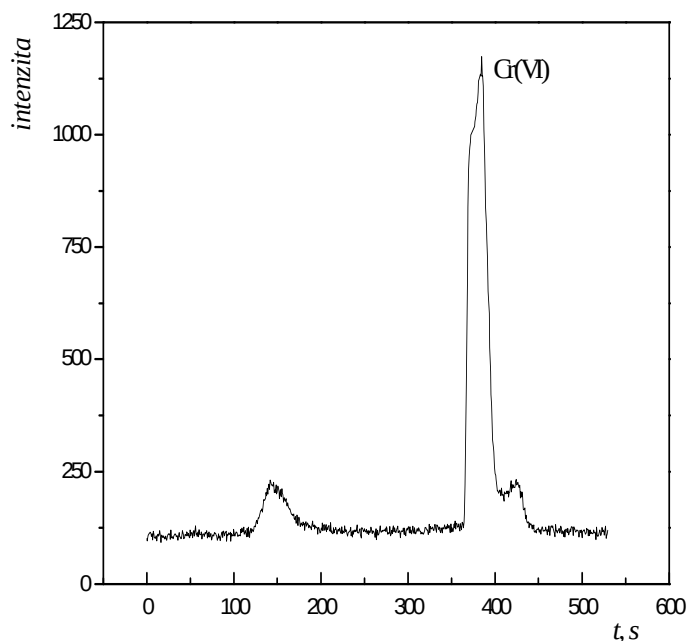
$Q_{\text{MF}} = 1,5 \text{ ml.min}^{-1}$, $\lambda = 205,560 \text{ nm}$, dávkováno $200 \mu\text{l}$

Předchozí experimenty naznačily, že vyluhovací činidlo (směs KOH + HNO_3), které se osvědčilo v modelovém roztoku, není vhodné pro praktické účely. Jeho použitím (vliv kyseliny dusičné) dochází k narušení poměru Cr(III)/Cr(VI) ve vzorku. Z toho důvodu už s ním dále nebyly prováděny další pokusy.

4.3.4 Výluh připravený v KOH

Ve výluhu připraveném druhým způsobem **B**; tedy jen v KOH s přídavkem HNO_3 až těsně před nadávkováním na kolonu, bylo vyextrahováno mnohonásobně nižší množství Cr i ostatních prvků (viz. Tabulka 4.4). Vyextrahované celkové množství Cr s ohledem na mez detekce kombinované metody HPLC-ICP-AES naznačovalo, že v chromatogramu nebude pozorován pík odpovídající Cr(III) ani Cr(VI). Toto se při praktickém provedení potvrdilo.

V tomto okamžiku bylo třeba rozhodnout, jakým směrem se při analýze praktických vzorků dále ubírat. Zvolena byla taková varianta, zaměřující se pouze na speciaci Cr(VI). Jak totiž bylo zjištěno v první části práce, zvýšením pH pufru v mobilní fázi na pH 9,0 dojde ke snížení LOD a LOQ kombinované metody HPLC-ICP-AES. Doposud používaná mobilní fáze o pH 7,0 byla upravena na pH 9,0. Proměřením extraktu praktického vzorku s touto novou mobilní fází byl opět získán chromatogram, na kterém nebyl patrný signál Cr(VI). Metodou standardního přídavku, bylo ověřeno, zda i v tomto případě dochází k redukci Cr(VI). Do vzorku bylo přidáno $5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ Cr(VI). Chromatogram na Obr. 4.18 naznačuje, že k částečné redukci Cr(VI) došlo i v tomto pokusu. Přestože bylo množství redukovaného Cr(VI) nižší než v případě předchozím, ani tento postup není možné použít pro praktické využití.



Obr. 4.18 Standardní přídavek Cr(VI) k výluhu praktického vzorku

Vzorek: $5 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ Cr(VI) + výluh polétavého prachu připravený z 500 mg prachu v 50 ml vyluhovacího činidla

Vyluhovací činidlo: $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ KOH; $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ HNO₃ přidána před nástřikem na kolonu

Podmínky měření: MF – $50 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ CH₃COONH₄, $10 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ NaClO₄, pH 9,0

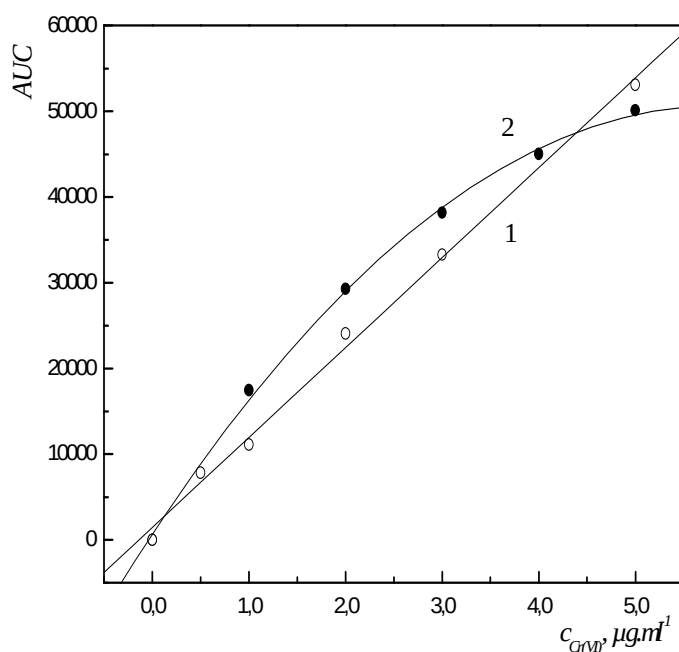
$Q_{MF} = 1,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, $\lambda = 205,560 \text{ nm}$, dávkováno $200 \mu\text{l}$

4.3.4.1 Výluh praktického vzorku připravený pouze v KOH, bez přídavku HNO₃ před separací

Předchozí pokusy naznačily, že k redukci Cr(VI) v praktickém vzorku přispívá přídavek HNO₃ do vzorku. Proto bylo vyzkoušeno proměření výluhu připraveného v $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ KOH bez přídavku kyseliny v jakékoliv fázi pokusu. Pozornost zůstala zaměřena jen na Cr(VI), mobilní fáze měla hodnotu pH 9,0. K výluhu praktického vzorku bylo před nadávkováním na kolonu opět přidáno $5 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ Cr(VI).

Na získaném chromatogramu byl pozorován pouze intenzivní signál Cr(VI); redukce zjištěna nebyla. V dalším kroku byla proměřena kalibrační sada Cr(VI) pro

modelový systém obsahující KOH a rostoucí koncentraci Cr(VI) pro zjištění směrnice kalibrační přímky. Zjištěná směrnice byla následně porovnána se směrnicí přímky standardních přídavek Cr(VI) k výluhu praktického vzorku prachu. Výsledek srovnání je vidět na Obr. 4.19. Při použití metody standardních přídavek nebyla splněna základní podmínka pro použití této metody, a sice lineární závislost odezvy na přídávku standardu. Nelinearita křivky pravděpodobně opět souvisí s vlivem matrice na stanovení. Ani použití samotného KOH jako vyluhovacího činidla tedy není pro praktické provedení speciální analýzy Cr(VI) vhodné.



Obr. 4.19 Odlišné chování Cr(VI) v modelovém roztoku a ve výluhu praktického vzorku

1 – 0 - 5 $\mu g.ml^{-1}$ Cr(VI) + 0,1 mol. l^{-1} KOH; 2 - 0 - 5 $\mu g.ml^{-1}$ Cr(VI) + výluh polétavého prachu připravený z 500 mg prachu v 50 ml vyluhovacího činidla

Vyluhovací činidlo: 0,1 mol. l^{-1} KOH

Podmínky měření: MF – 50 mmol. l^{-1} CH_3COONH_4 , 10 mmol. l^{-1} $NaClO_4$, pH 9,0

$Q_{MF} = 1,5 ml.min^{-1}$, $\lambda = 205,560 nm$, dávkováno 200 μl

4.3.5 Výluh připravený v 2% KOH + 3% Na₂CO₃

Posledním zkoušeným činidlem pro extrakci vzorku byla směs 2% KOH + 3% Na₂CO₃. K této variantě bylo přistoupeno na základě doporučení v literatuře [62, 63]. Výluh stejného praktického vzorku prachu (Evropská) byl připraven celkem pětikrát pro zjištění opakovatelnosti. Tab. 4.6 přináší přehled zastoupení přítomných prvků, Tab. 4.7 základní údaje o zkoumaném Cr. Vyluhované množství Cr je srovnatelné s množstvím, které bylo získáno po extrakci KOH, vyluhovaný obsah dalších prvků se různě liší.

Tab. 4.6 Zastoupení prvků ve výluhu praktického vzorku

Analyt	Obsah ¹ μg.g ⁻¹	Analyt	Obsah ¹ μg.g ⁻¹
Al	1174	Mg	29,9
As	27,2	Mn	8,0
B	107	Mo	17,4
Ba	16,6	Ni	3,9
Ca	428	P	613
Cd	0,4	Pb	82,5
Co	1,6	S	18510
Cr	1,3	Sr	4,2
Cu	280	Ti	13,7
Fe	220	V	17,4
K	1188	Zn	1210

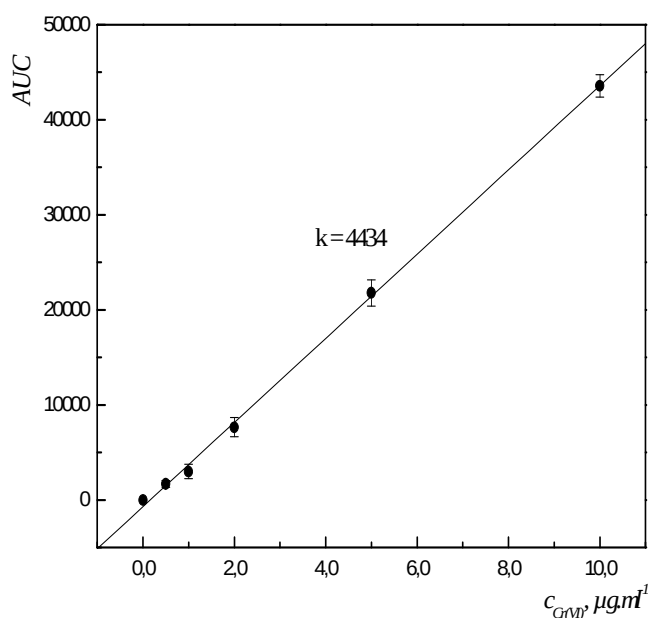
¹ Obsah po odečtu signálu extrakčního činidla a přepočtu na hmotnostní koncentraci, průměrná hodnota z pěti měření

Tab. 4.7 Celkový obsah Cr ve výluhu praktického vzorku

Činidlo	Obsah Cr ¹ ng.ml ⁻¹	Obsah Cr ¹ μg.g ⁻¹	s (n = 5) μg.g ⁻¹	RSD %
2% KOH + 3% Na ₂ CO ₃	12,5	1,3	0,1	8,2

¹ Obsah po odečtu signálu extrakčního činidla

Dále bylo ověřeno, že použitím daného činidla pro extrakci reálných vzorků nedochází k redukci Cr(VI). Na chromatogramu (k výluhu bylo před nadávkováním na kolonu přidáno $5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ Cr(VI)) byl pozorován pouze jeden pík s retenčním časem odpovídajícím Cr(VI). Redukci Cr(VI) nepotvrdil ani pokus s přidavkem iontů Fe(II) a Cl^- ke standardnímu roztoku Cr(VI). Následně byla použitím kombinované metody HPLC-ICP-AES provedena kalibrace s modelovým roztokem a získaná směrnice byla porovnána se směrnicí získanou metodou standardních přidavků k výluhu reálného prachu. Obě závislosti byly ve sledovaném koncentračním rozmezí lineární (Obr. 4.20 a Obr. 4.21). Citlivost stanovení vyjádřená směrnici obou přímk se lišila o 2,3 %. Totéž bylo provedeno také proměřením celkového obsahu Cr na ICP-AES. I zde bylo dosaženo přijatelného výsledku, rozdíl mezi směrnici kalibrací činil 4,1 %.

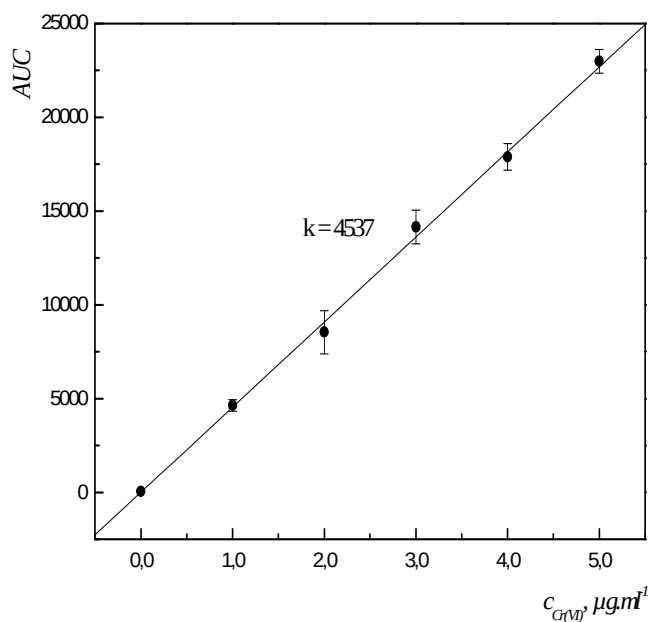


Obr. 4.20 Kalibrační závislost pro Cr(VI)

Vzorek: $0 - 10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ Cr(VI) + 2% KOH + 3% Na_2CO_3

Podmínky měření: MF – $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ $\text{CH}_3\text{COONH}_4$, $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaClO_4 , pH 9,0

$Q_{\text{MF}} = 1,5 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, $\lambda = 205,560 \text{ nm}$, dávkováno $200 \mu\text{l}$



Obr. 4.21 Standardní přídávky Cr(VI) k výluhu polétavého prachu

Vzorek: 0 - 5 $\mu g \cdot ml^{-1}$ Cr(VI) + výluh polétavého prachu připravený z 500 mg prachu v 50 ml vyluhovacího činidla

Vyluhovací činidlo: 2% KOH + 3% Na_2CO_3

Podmínky měření: MF – 50 $mmol \cdot l^{-1}$ CH_3COONH_4 , 10 $mmol \cdot l^{-1}$ $NaClO_4$, pH 9,0

$Q_{MF} = 1,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, $\lambda = 205,560 \text{ nm}$, dávkováno 200 μl

Tab. 4.8 shrnuje základní dosažené charakteristiky pro modelový systém obsahující Cr(VI) o různých koncentracích připravený ve zkoumaném činidle. Hodnoty v tabulce naznačují, že použitím tohoto činidla došlo oproti stanovení ve směsi KOH + HNO_3 (Tab. 4.3) k dalšímu zlepšení LOD a LOQ. Výluh byl stabilní minimálně po dobu sledovaných tří dnů.

Tab. 4.8 Základní charakteristiky stanovení Cr(VI) kombinovanou technikou HPLC-ICP-AES

Parametr		Cr(VI)
LOD	ng.ml ⁻¹	12,3
LOQ	ng.ml ⁻¹	41,1
Absolutní LOD*	ng	2,5
Absolutní LOQ*	ng	8,2
Opakovatelnost (RSD)	%	8,3
Citlivost	ng.ml ⁻¹	4434
Korelační koeficient		0,998

* dávkováno 200 µl vzorku

Bohužel obsah Cr(VI) v praktickém vzorku prachu byl tak malý, že na chromatogramu po separaci nebyl pozorován žádný signál Cr(VI) a jeho obsah tak nemohl být s detekcí ICP-AES zjištěn. Pro praktické vzorky bude proto potřeba použít citlivější detekční metodu ICP-MS, která však při měření této diplomové práce nebyla k dispozici.

4.3.5.1 Praktický vzorek - Strahov

Činidlo složené ze směsi KOH + Na₂CO₃ bylo aplikováno na analýzu dalšího praktického vzorku, který poskytla VŠCHT. Polétavý prach byl odebrán ve Strahovském tunelu a celkový obsah Cr v něm byl stanoven metodou ETA-AAS: **155,1 ± 5,8 µg.g⁻¹**. O vzorku daného prachu bylo známo, že obsahuje hodně stavebního prachu, takže se dalo předpokládat, že jeho součástí bude větší množství Cr(VI) (zdrojem Cr(VI) je např. cement). Toto se prakticky potvrdilo; po extrakci daným vyluhovacím činidlem byl s ICP-AES zjištěn obsah celkového chromu odpovídající **11,6 µg.g⁻¹**. Přehled obsahu ostatních analytů ve výluhu přináší Tab 4.9. Tabulka 4.10 pak shrnuje bližší údaje o chromu.

Tab. 4.9 Zastoupení prvků ve výluhu praktického vzorku ze Strahovského tunelu

Analyt	Obsah ¹ μg.g ⁻¹	Analyt	Obsah ¹ μg.g ⁻¹
Al	2738	Mg	7,9
As	2,1	Mn	2,7
B	28,1	Mo	2,1
Ba	11,8	Ni	0
Ca	357	P	217
Cd	0,1	Pb	61,2
Co	1,6	S	17370
Cr	11,6	Sr	3,5
Cu	76,4	Ti	10,3
Fe	121	V	4,5
K	880	Zn	5454

¹ Obsah po odečtu signálu extrakčního činidla a přepočtu na hmotnostní koncentraci, průměrná hodnota z pěti měření

Tab. 4.10 Celkový obsah Cr ve výluhu praktického vzorku ze Strahovského tunelu

Činidlo	Obsah Cr ¹ ng.ml ⁻¹	Obsah Cr ¹ μg.g ⁻¹	s (n = 5) μg.g ⁻¹	RSD %
2% KOH + 3% Na ₂ CO ₃	116,1	11,6	0,5	8,1

¹ Obsah po odečtu signálu extrakčního činidla

Po separaci metodou HPLC byl v chromatogramu pozorovatelný pík příslušející Cr(VI). Přestože byla jeho intenzita resp. plocha velmi malá, dala se pomocí softwaru Origin odečíst a následně z kalibrační křivky určit koncentraci Cr(VI). Metodou standardního přídatku byla určeno, že výluh obsahuje **3,9 ± 0,1 μg.g⁻¹** (RSD = 4,20 %) Cr(VI). Koncentrace (**38,9 ng.ml⁻¹**) se však nachází pod mezí stanovitelnosti touto kombinovanou metodou a nemůže být tedy zajištěno, že je hodnota stanovena s dostatečnou přesností. Obsah Cr(III) byl určen jako rozdíl celkového Cr – Cr(VI). Ve výluhu se tak nacházelo přibližně **7,7 ± 0,3 μg.g⁻¹** Cr(III). Poměr Cr(III)/Cr(VI) činil **2:1**.

Pro přehlednost jsou dosažené hodnoty obsahu jednotlivých forem Cr shrnuty v Tab. 4.11.

Tab. 4.11 Obsah chromu ve výluhu praktického vzorku

	Obsah ¹ μg.g ⁻¹	s (n = 5) μg.g ⁻¹	RSD %
Cr(total)	11,6	0,5	8,1
Cr(III)	7,7	0,3	4,2
Cr(VI)	3,9	0,1	4,2

¹ Obsah po odečtu signálu extrakčního činidla a přepočtu na hmotnostní koncentraci

4.4 REFERENČNÍ MATERIÁL

Na závěr diplomové práce byla navržená metoda speciace chromu v polétavém prachu ověřena analýzou certifikovaného referenčního materiálu BCR reference material CRM 545, B6-57. Šlo o svářečský prach zachycený na filtru a bylo o něm známo, že obsahuje **40,16 ± 0,60 μg.g⁻¹** Cr(VI). Pro extrakci Cr bylo využito v praxi osvědčené činidlo, směs 2% KOH + 3% Na₂CO₃. Následně byl metodou ICP-AES zjištěn celkový obsah Cr a kombinovanou metodou HPLC-ICP-AES za navržených optimálních experimentálních podmínek obsah Cr(VI). Tab. 4.12 ukazuje analýzu celkového obsahu vybraných prvků ve výluhu referenčního materiálu a Tab. 4.13 pak množství celkového Cr a množství Cr(VI) získaného po separaci na koloně (příslušný chromatogram je na Obr. 4.22). Danou metodou se podle dosažených výsledků podařilo vyluhovat 94,2 % Cr(VI). Teoreticky by množství Cr(VI) získané po separaci na koloně mělo být ve shodě s množstvím určeným metodou ICP-AES. Experimentálně se lišilo přibližně o 4,5 %.

Tab. 4.12 Obsahy vybraných prvků ve výluhu certifikovaného referenčního materiálu

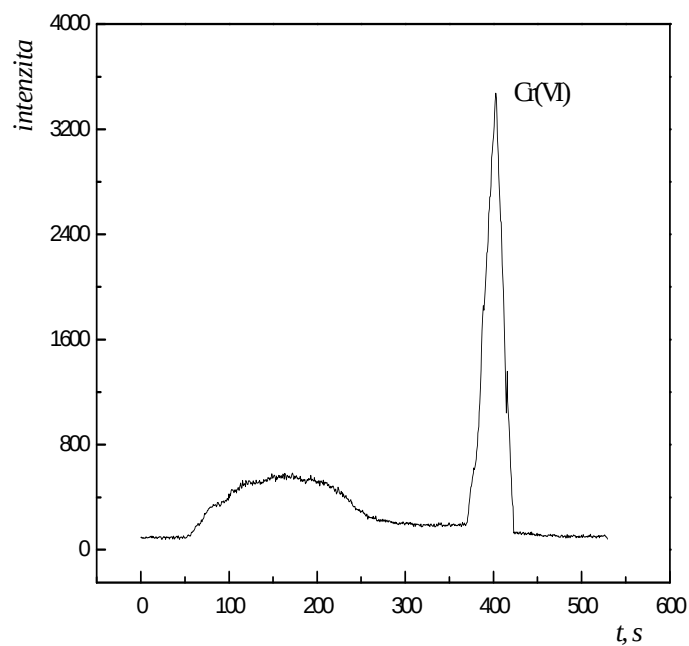
Analyt	Obsah ¹ μg.g ⁻¹	Analyt	Obsah ¹ μg.g ⁻¹
Al	2129	Mg	0
As	0	Mn	3,8
B	3140	Mo	289
Ba	598	Ni	0
Ca	371	P	43,1
Cd	0,1	Pb	0,7
Co	1,3	S	220
Cr	39,6	Sr	6,6
Cu	5,8	Ti	0,3
Fe	192	V	0
K	58198	Zn	1391

¹ Obsah po odečtu signálu extrakčního činidla a přepočtu na hmotnostní koncentraci, průměrná hodnota z pěti měření

Tab. 4.13 Celkový obsah Cr ve výluhu praktického vzorku

Metoda		Obsah ¹ μg.ml ⁻¹	s (n = 5) μg.ml ⁻¹	Obsah ¹ μg.g ⁻¹	s (n = 5) μg.g ⁻¹	RSD %
Cr(total)	ICP-AES	11,75	0,29	39,64	1,01	2,5
Cr(VI)	HPLC-ICP-AES	11,41	0,34	37,83	1,14	3,0

¹ Obsah po odečtu signálu extrakčního činidla



Obr. 4.22 Chromatogram získaný z výluhu z certifikovaného referenčního materiálu

Vzorek: výluh certifikovaného referenčního materiálu připravený z 2,963 mg materiálu v 10 ml vyluhovacího činidla

Vyluhovací činidlo: 2% KOH + 3% Na₂CO₃

Podmínky měření: MF – 50 mmol.l⁻¹ CH₃COONH₄, 10 mmol.l⁻¹ NaClO₄, pH 9,0

Q_{MF} = 1,5 ml.min⁻¹, λ = 205,560 nm, dávkováno 200 μl

5 ZÁVĚR

Předkládaná diplomová práce byla zaměřena na speciální analýzu chromu (Cr(III) a Cr(VI)) v prachových částicích. Pro speciální analýzu byla využita kombinovaná technika HPLC-ICP-AES.

V první části práce byla pozornost věnována volbě vhodného vyluhovacího činidla, které se používá k frakcionaci prvků v praktických vzorcích ze životního prostředí. Výběr byl uskutečněn prostřednictvím modelového systému; standardních roztoků chromu. Testování byla podrobena CH_3COOH různých stupňů čistoty. Bylo zjištěno, že kyselina octová je pro speciální analýzu chromu nepoužitelná; podobně jako jiná kyselá činidla používaná při frakcionaci. Nebyl prokázán podstatný vliv čistoty kyseliny octové na dosažené výsledky.

Druhým testovaným extrakčním činidlem byl zástupce alkalických vyluhovacích činidel KOH. Nejdříve byl testován $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ roztok KOH s přídavkem $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ HNO_3 , který byl za daných podmínek vybrán jako optimální. Při aplikaci zmíněného extrakčního činidla nebyla pozorována vzájemná přeměna specií chromu (především redukce Cr(VI) na Cr(III)). Experimentálně bylo také prokázáno, že obě formy Cr připravené v uvedeném činidle jsou časově stálé a že separace na HPLC koloně probíhá optimálně s mobilní fází o pH 7,0. Následně byly proměřeny kalibrační závislosti a určeny základní charakteristiky stanovení obou forem Cr ve vybraném činidle. Mez detekce dosahovala hodnoty 108 ng.ml^{-1} pro Cr(III) a 82 ng.ml^{-1} pro Cr(VI), mez stanovitelnosti pak byla pro Cr(III) 358 ng.ml^{-1} a pro Cr(VI) 271 ng.ml^{-1} .

V další části práce bylo vybrané vyluhovací činidlo aplikováno při speciální analýze vzorku polétavého prachu „Evropská“. Bohužel se ukázalo, že toto činidlo pro reálné vzorky není výhodné, protože vlivem určitých složek matrice v kombinaci s kyselinou dusičnou dojde opět ke změně poměru Cr(III)/Cr(VI). Vliv interferujících iontů Fe(II) a Cl^- byl ověřen experimentálně. Redukce byla pozorována i v případě, byl-li pro extrakci volen samotný KOH a HNO_3 sloužila pouze jako činidlo pro okyselení před nadávkováním na kolonu (ochrana kolony před dávkováním roztoku s vysokou hodnotou pH). KOH se neosvědčil ani bez přídavku kyseliny v jakékoliv fázi pokusu.

Na základě literatury bylo dále aplikováno činidlo složené z 2% KOH + 3% Na₂CO₃. Speciace byla omezena pouze na stanovení Cr(VI) a pH mobilní fáze bylo upraveno na hodnotu 9,0, kdy Cr(VI) poskytoval výrazně vyšší odezvu. Použitím tohoto činidla již redukce Cr(VI) nebyla pozorována ani u praktických vzorků. Testovány byly celkem dva vzorky polétavého prachu. U prvního (vzorek Evropská) nebyl určen obsah Cr(VI) z důvodu jeho velmi nízkého obsahu (hluboko pod hodnotou meze detekce), druhý vzorek (vzorek ze Strahovského tunelu) obsahoval po přepočtu na hmotnostní koncentraci $3,9 \pm 0,1 \text{ } \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ Cr(VI) (RSD = 4,2 %). Množství Cr(III) ($7,7 \pm 0,3 \text{ } \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) bylo určeno jako rozdíl celkového obsahu Cr určeného metodou ICP-AES a obsahu Cr(VI). I když použitím vyluhovacího činidla 2% KOH a 3% Na₂CO₃ došlo k výraznému snížení mezí detekce oproti činidlu složenému z KOH a HNO₃, bylo i tak množství Cr(VI) pod mezí stanovitelnosti (LOQ pro Cr(VI) bylo $41 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$, po separaci na koloně bylo v roztoku praktického vzorku nalezeno pouze $38,9 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$).

Závěrem lze říci, že vhodné vyluhovací činidlo pro speciální analýzu chromu bylo nalezeno, ale pro analýzu praktických vzorků bude potřeba aplikovat kombinovanou metodu s citlivější metodou detekce např. ICP-MS. Je třeba zdůraznit, že použitím všech jmenovaných alkalických činidel došlo k vyluhování výrazně menšího množství chromu z praktických vzorků ve srovnání s množstvím vyluhovaným kyselými vyluhovacími činidly.

V poslední fázi diplomové práce byla navržená kombinovaná metoda pro speciaci chromu testována na certifikovaném referenčním materiálu svářečského prachu zachyceného na filtru. Vyluhovat se podařilo přes 94 % celkového obsahu Cr a zjištěný obsah Cr(VI) byl ve velmi dobré shodě s certifikovanou hodnotou.

6 SOUPIS BIBLIOGRFICKÝCH CITACÍ

- [1] Dědina, J.: *Atomové absorpční a fluorescenční detektory pro speciální analýzu založenou na generování těkavých sloučenin*. Praha, PACI 2007.
- [2] Komárek, J.: *Úvod do speciální analýzy*. Dostupné z URL: <<http://www.vscht.cz/anl/paci/PAC/prezentace.htm>> [cit. 9.3.2010].
- [3] Rychlovský, P.: *Použití přístrojů pro atomovou spektrometrii jako prvkově selektivních detektorů při speciální analýze*. Praha, PACI 2008.
- [4] Voldřichová, P.: *Speciace anorganických forem chromu kombinovanou metodou HPLC-ICP AES* [diplomová práce]. Praha, 2009.
- [5] Kotás, J.; Stasicka, Z.: Chromium occurrence in the enviroment and methods of its speciation. *Enviromental Pollution* **107**, 263-283 (2000).
- [6] Sysalová, J.; Száková, J.: *Chemická frakcionace prvků a její aplikace na půdy a životní prostředí*. Dostupné z URL: <<http://www.vscht.cz/anl/paci/PAC/prezentace.htm>> [cit. 7.3.2010].
- [7] Gómez, V.; Larrechi, M. S.; Callao, M. P.: Chromium speciation using sequential injection analysis and multivariate curve resolution. *Analytica Chimica Acta* **571**, 129-135 (2006).
- [8] Wang, L.; Bian, G.; Dong, L.; Xia, T.; Hong, S.; Chen, H.: Selective fluorescence determination of chromium (VI) in water samples with terbium composite nanoparticles. *Spectrochimica Acta Part A* **65**, 123-126 (2006).
- [9] Séby, F.; Charles, S.; Gagean, M.; Garraud, H.; Donard, O. F. X.: Chromium speciation by hyphenation of high-performance liquid chromatography to inductively coupled plasma-mass spectrometry – study of influence of interfering ions. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **18**, 1386-1390 (2003).
- [10] Gómez, V.; Callao, M. P.: Chromium determination and speciation since 2000. *Trends in Analytical Chemistry* **25**, 1006-1015 (2006).
- [11] Hagendorfer, H.; Goessler, W.: Separation of chromium(III) and chromium(VI) by ion chromatography and an inductively coupled plasma mass spectrometer as element-selective detector. *Talanta* **76**, 656-661 (2008).

- [12] Rychlovsky, P.; Krenzelok, M.; Volhejnova, R.: On-line simultaneous sorption preconcentration and determination of chromium(III) and chromium(VI) with AAS detection. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **63**, 2015-2026 (1998).
- [13] Cefalu, W. T.; Hu, F. B.: Role of Chromium in Human Health and Diabetes. *Diabetes Care* **27**, 2741-2751 (2004).
- [14] Vincent, J. B.: The bioinorganic chemistry of chromium(III). *Polyhedron* **20**, 1-26 (2001).
- [15] Mertz, W.; Roginski, E. E.; Schwarz, K.: Effect of Trivalent Chromium Complexes on Glucose Uptake by Epididymal Fat Tissue of Rats. *The Journal of Biological Chemistry* **236**, 318-322 (1961).
- [16] Kim, H.; Lee, S.; Jang, B.: Subchronic inhalation toxicity of soluble hexavalent chromium trioxide in rats. *Arch Toxicol* **78**, 363-368 (2004).
- [17] Flora, S.; Iltcheva, M.; Balansky, R. M.: Oral chromium(VI) does not effect the frequency of micronuclei in hematopoietic cells of adult mice and of transplacentally exposed fetuses. *Mutation Research* **610**, 38-47 (2006).
- [18] Paleček, J.; Palatý, J.: *Toxikologie, hygiena a bezpečnost práce v chemii*. 2. vyd. Praha, VŠCHT 1991.
- [19] Tichý, M.: *Toxikologie pro chemiky*. Karolinum, Praha 2004.
- [20] Goldoni, M.; Caglieri, A.; Poli, D.; Vettori, M.; Corradi, M.; Apostoli, P.; Mutti, A.: Determination of hexavalent chromium in exhaled breath condensate and environmental air among chrome plating workers. *Analytica Chimica Acta* **562**, 229-235 (2006).
- [21] Ministerstvo životního prostředí: *Integrovaný registr znečišťování*. Dostupné z URL: <http://www.irz.cz/obsah/latky/chrom_a_jeho_sl> [cit. 10.3.2010].
- [22] Janoš, P.; Kuráň, P.; Řídká, M.: Stanovení Cr(III) a Cr(VI) metodou iontové chromatografie. *Chem. Listy*. **101**, 406-410 (2007).
- [23] Borai, E. H.; El-Sofany, E. A.; Abdel-Halim, A. S.: Speciation of hexavalent chromium in atmospheric particulate samples by selective extraction and ion chromatographic determination. *Trends in analytical chemistry* **21**, 741-745 (2002).
- [24] Prokisch, J.; Kovács, B.; Györi, Z.; Loch, J.: Interfacing ion chromatography with inductively coupled plasma atomic emission spectrometry for determination of

- chromium(III) and chromium(VI). *Journal of chromatography A* **683**, 253-260 (1994).
- [25] Marqués, M. J.; Salvador, A.; Morales-Rubio, A.; Guardia, M.: Analytical methodologies for chromium speciation in solid matrices: a survey of literature. *Fresenius J Anal Chem* **362**, 239-248 (1998).
- [26] Marqués, M. J.; Salvador, A.; Morales-Rubio, A.; Guardia, M.: Chromium speciation in liquid matrices: a survey of the literature. *Fresenius J Anal Chem* **367**, 601-613 (2000).
- [27] Prochácková, T.; Foltin, M.: Stanovenie Cr(VI) a Cr(III) metódou prietokovej injekčnej analýzy (FIA) po oxidácii Cr(III) jodistanom draselným. *Chemické listy* **91**, 585-589 (1997).
- [28] Paleologos, E. K.; Lafis, S. Y.; Tzourowa-Karayanni, S. M.; Karayannis, M. I.: Speciation analysis of Cr^{III}-Cr^{VI} using flow injection analysis with fluorimetric detection. *Analyst* **123**, 1005-1009 (1998).
- [29] Milačič, R.; Ščančar, J.; Tušek, J.: Determination of Cr(VI) in welding fumes by anion-exchange fast protein liquid chromatography with electrothermal atomic absorption spectrometric detection. *Anal Bioanal Chem* **372**, 549-553 (2002).
- [30] Chen, Z. L.; Megharaj, M.; Naidu, R.: Speciation of chromium in waste water using ion chromatography inductively coupled plasma mass spectrometry. *Talanta* **72**, 394-400 (2006).
- [31] Barnowski, C.; Jakubowski, N.; Stuewer, D.; Broekaert, J. A. C.: Speciation of Chromium by Direct Coupling of Ion Exchange Chromatography With Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **12**, 1155-1161 (1997).
- [32] Pantsar-Kallio, M.; Manninen, K.G.: Speciation of chromium in aquatic samples by coupled column ion chromatography-inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* **318**, 335-343 (1995).
- [33] Gammelgaard, B.; Liao, Y.; Jøns, O.: Improvement on simultaneous determination of chromium species in aqueous solution by ion chromatography and chemiluminescence detection. *Analytica Chimica Acta* **354**, 107-113 (1997).
- [34] Sperling, M.; Xu, S.; Welz, B.: Determination of Chromium(III) and Chromium(VI) in Water Using Flow Injection On-line Preconcentration with

- Selective Adsorption on Activated Alumina and Flame Atomic Absorption Spectrometric Detection. *Anal. Chem.* **64**, 3101-3108 (1992).
- [35] Balarama Krishna, M. V.; Chandrasekaran, K.; Rao, S. V.; Karunasagar, D.; Arunachalam, J.: Speciation of Cr(III) and Cr(VI) in waters using immobilized moss and determination by ICP-MS and FAAS. *Talanta* **65**, 135-143 (2005).
- [36] Sysalová, J.; Száková, J.: Mobility of Important Toxic Analytes in Urban Dust and Simulated Air Filters Determined by Sequential Extraction and GFAAS/ICP-OES Methods. *Chem. Pap.* **61**, 271-275 (2007).
- [37] Usda, J.; Satoh, H.; Kagaya, S.: Determination of Chromium(III) and Chromium(VI) by Graphite-Furnace Atomic Absorption Spectrometry after Coprecipitation with Hafnium Hydroxide. *Analytical Sciences* **13**, 613-617 (1997).
- [38] Chwastowska, J.; Skwara, W.; Sterlińska, E.; Pszonicki, L.: Speciation of chromium in mineral waters and Salina by solid-phase extraction and graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Talanta* **66**, 1345-1349 (2005).
- [39] Sysalova, J.; Szakova, J.: Mobility assessment and validation of toxic elements in tunnel dust samples-Subway and road using sequential chemical extraction and ICP-OES/GF AAS measurements. *Environmental Research* **101**, 287-293 (2006).
- [40] Horváth, Z.; Lászity, A.; Varga, I.; Mészáros, E.; Molnár, A.: Determination of trace metals and speciation of chromium ions in atmospheric precipitation by ICP-AES and GFAAS. *Talanta* **41**, 1165-1168 (1994).
- [41] Gil, R. A.; Cerutti, S.; Gásquez, J. A.; Olsina, R. A.; Martinez, L. D.: Preconcentration and speciation of chromium in drinking water samples by coupling of on-line sorption on activated carbon to ETAAS determination. *Talanta* **68**, 1065-1070 (2006).
- [42] Narukawa, T.; Riley, K. W.; French, D. H.; Chiba, K.: Speciation of chromium in Australian fly ash. *Talanta* **73**, 178-184 (2007).
- [43] Sumida, T.; Ikenoue, T.; Hamada, K.; Sabarudin, A.; Oshima, M.; Motomizu, S.: On-line preconcentration using dual mini-columns for the speciation of chromium(III) and chromium(VI) and its application to water samples as studied by inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry. *Talanta* **68**, 388-393 (2005).

- [44] Korn, M.; Korn, M. G. A.; Reis, B. F.; Oliveira, E.: An direct method for the detemination of chromium species in water samples by sequential inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry. *Talanta* **41**, 2043-2047 (1994).
- [45] Boevski, I.; Daskalova, N.; Havezov, I.; Determination of barium, chromium, kadmium, manganese, lead and zinc in atmospheric particulate matter by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICP-AES). *Spectrochimica Acta Part B* **55**, 1643-1657 (2000).
- [46] Byrdy, F. A.; Olson, L. K.; Vela, N. P.; Causo, J. A.: Chromium speciation by anion-exchange high-performance liquid chromatography with both inductively coupled plasma atomic emission spectroscopic and inductively coupled plasma mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A* **712**, 311-320 (1995).
- [47] Inoue, Y.; Sakai, T.; Kumagai, H.: Simultaneous determination of chromium(III) and chromium(VI) by ion chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of chromatography A* **706**, 127-136 (1995).
- [48] Pantsar-Kallio, M.; Manninen, K. G.: Speciation of chromium in aquatic samples by coupled column ion chromatography-inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* **318**, 335-343 (1995).
- [49] Li, Y.; Pradhan, N. K.; Foley, R.; Low, G. K. C.: Selective determination of airborne hexavalent chromim using inductively coupled plasma mass spectrometry. *Talanta* **57**, 1143-1153 (2002).
- [50] Krystek, P.; Ritsema, R.: Monitoring of chromium species and 11 selected metals in emission and immission of airborne enviroment. *International Journal of Mass Spectrometry* **265**, 23-29 (2007).
- [51] Yi, Z.; Gang, H.: Rapid spectrophotometric determination of chromium(III). *Talanta* **41**, 1247-1250 (1994).
- [52] Zaitoun, M.: Spectrophotometric determination of Chromium(VI) using cyclam as a reagent. *Intrnational journal of enviromental analytical chemistry* **85**, 399-407 (2005).
- [53] Som-Aum, W.; Threeprom, J.; Li, H.; Lin, J-M.: Determination of chromium(III) and total chromium using dual channels on glass chip with chemiluminiscence detection. *Talanta* **71**, 2062-2068 (2007).

- [54] Štulík, K. a kol.: *Analytické separační metody*. Praha, Nakladatelství Karolinum 2005.
- [55] Peroutková, E.: *Speciace anorganických forem chromu ve výluzích polétavého prachu* [diplomová práce]. Praha, 2008.
- [56] Plška, E. a kol.: *Optická emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem*. Český Těšín, 2 THETA 1994.
- [57] Němcová, I.; Čermáková, L.; Rychlovský, P.: *Spektrometrické analytické metody I*. Praha, 2.vyd. Nakladatelství Karolinum 2004.
- [58] Barek, J. a kol.: Nomenklatura a terminologie. Metrologická terminologie v chemii. *Chem. Listy*. **94**, 439-444 (2000).
- [59] Eckschlager, K.: *Chemometrie II*. Praha, Univerzita Karlova 1994.
- [60] Ševčík, J. G. K.: *Metodologie měření v analytické chemii*. Praha, Karolinum 1999.
- [61] Vohlídal, J.; Julák, A.; Štulík, K.: *Chemické a analytické tabulky*. Praha, Grada 1999.
- [62] Vercoutere, K.; Cornelis, R.; Christensen, J. M.; Byrjalsen, K.; Quevauviller, P.H.: *BCR information (reference materials) - The certification of the contents of Cr(VI) and total leachable Cr in welding dust loaded on a filter (CRM 545)*. Brussels, European Commission 1997. [certifikát k referenčnímu materiálu CRM 545, B6-57].
- [63] Wang J, Ashley K, Marlow D, England EC, Carlton G: Field method for the determination of hexavalent chromium by ultrasonication and strong anion exchange solid phase extraction, *Anal. Chem.* **71**, 1027–1032 (1999).