

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie
Studijní obor: Chemie v přírodních vědách



Martina Mušutová

STANOVENÍ OLOVA TECHNIKOU SEKVENČNÍ INJEKČNÍ
ANALÝZY SE SPEKTROMETRICKOU DETEKČÍ

Determination of Lead using Sequential Injection Analysis
with Spectrophotometric Detection

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Jakub Hraníček, Ph.D.

Praha 2016

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

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 5. ledna 2016

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému školiteli RNDr. Jakobovi Hraníčkoví, Ph.D., za jeho odbornou pomoc a cenné připomínky při tvorbě této práce. Dále bych ráda podělovala své rodině a blízkým za podporu při mém studiu.

Abstrakt

Tato bakalářská práce je zaměřena na stanovení olova v modelových vodných roztocích pomocí komplexační reakce 4-(2-pyridylazo)-resorcinolu s olovnatým kationtem v prostředí 2-amino-2-hydroxymethyl-propan-1,3-diol hydrochloridového pufru (TRIS pufr). Pro zjištění základních charakteristik stanovení byla zvolena UV/VIS molekulová spektrometrie jako detekční technika ve statickém uspořádání. Následně byla takto technika stanovení aplikována do průtokového módu sekvenční injekční analýzy. Po zjištění optimálních pracovních podmínek byla změřena kalibrační závislost a byly stanoveny základní charakteristiky obou metod. Pro stanovení olova ve statickém uspořádání činila mez detekce $0,026 \text{ mg dm}^{-3}$. Pro průtokové uspořádání činila mez detekce $0,70 \text{ mg dm}^{-3}$. Dále byla provedena interferenční studie. Nejvýznamnějšími interferenty při analýze olova byly především ionty kovů (Cu^{2+} , Zn^{2+} , Sn^{4+}), které také vytvářejí s 4-(2-pyridylazo)-resorcinolem barevný komplex. Naopak téměř nulový či nízký interferující vliv byl pozorován u barya a draslíku. Na závěr práce bylo v průtokovém uspořádání stanoveno olovo v modelovém vzorku odpadní vody. Vlivem interferujících iontů bylo stanovení pomocí kalibrační křivky nevyhovující, a proto bylo olovo stanoveno metodou standardního přídatku, které se ukázalo jako vhodnější.

Klíčová slova

Olovo, 4-(2-pyridylazo)-resorcinol, TRIS pufr, průtoková injekční sekvenční analýza, UV/VIS molekulová spektrometrie, interferenční vlivy.

Abstract

The main objective of the thesis was the determination of lead concentration in model aqueous solutions of 4-(2-Pyridylazo)-resorcinol complexating reaction with lead cation in 2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol hydrochloride buffer (TRIS buffer). The UV/VIS molecular spectrometry in static arrangement was chosen with subsequent application of sequential injection analysis in flow arrangement. Calibration curve was measured and both methods were assessed. Detection threshold was $0,026 \text{ mg dm}^{-3}$ in case of static arrangement and $0,70 \text{ mg dm}^{-3}$ in case of flow arrangement. The interference analysis was performed, with metallic ions (Cu^{2+} , Zn^{2+} , Sn^{4+}) being the most significant interferents, which also create a chromatic complex with 4-(2-Pyridylazo)-resorcinol. The interference effects were weak and almost not present for barium and potassium. Thesis concludes with determination of lead concentration in model specimen using flow arrangement. The determination by calibration curve was insufficient due to interfering ions and thus it had to be determined by standard addition method.

Keywords

Lead, 4-(2-pyridylazo)-resorcinol, TRIS buffer, flow sequential injection analysis, UV/VIS molecular spectrometry, interference effects

Obsah

1	Úvod.....	8
1.1	Cíle práce	8
2	Teoretická část.....	9
2.1	Olovo a jeho vlastnosti	9
2.1.1	Základní charakteristika	9
2.1.2	Výskyt olova v přírodě	9
2.1.3	Průmyslové využití olova	9
2.1.4	Vliv na životní prostředí	10
2.1.5	Toxicita a vliv na lidský organismus	10
2.2	Stanovení olova pomocí komplexační reakce.....	10
2.3	Současné metody pro stanovování olova.....	11
2.4	UV/VIS molekulová spektrometrie	12
2.5	Sekvenční injekční analýza.....	13
3	Experimentální část.....	15
3.1	Použité chemikálie	15
3.2	Používané přístroje a materiál.....	15
3.3	Statické uspořádání s UV/VIS detekcí.....	16
3.4	Sekvenční injekční analýza s UV/VIS detekcí	17
3.5	Schéma aparatury SIA	21
3.6	Statistické vyhodnocení výsledků.....	21
4	Výsledky a diskuze.....	24
4.1	Detekce UV/VIS ve statickém uspořádání	24
4.1.1	Optimalizace koncentrace vybarvovacího činidla.....	25
4.1.2	Optimalizace pH	27
4.1.3	Kalibrační závislost	28
4.1.4	Základní charakteristiky stanovení ve statickém uspořádání	29
4.2	Detekce UV/VIS v průtokovém SIA uspořádání.....	30
4.2.1	Optimalizace koncentrace PAR.....	30
4.2.2	Optimalizace dávkovaného objemu PAR a Pb.....	31
4.2.3	Kalibrační závislost	33
4.2.4	Základní charakteristiky stanovení v průtokovém uspořádání	34
4.2.5	Interferenční vliv vybraných iontů	34
4.2.6	Stanovení olova ve vzorku	36
5	Závěr.....	38
6	Bibliografie.....	40

Seznam použitých zkratek a symbolů

<i>A</i>	absorbance
AAS	atomová absorpční spektrometrie
<i>c</i>	koncentrace [mol dm ⁻³]
<i>c</i> _{inf}	finální koncentrace roztoku zkoumaného interferentu [mg dm ⁻³]
<i>c</i> _{PAR}	koncentrace 4-(2-pyridylazo)-resorcinolu [mmol dm ⁻³]
<i>c</i> _{Pb}	koncentrace olovnatých iontů [mg dm ⁻³]
<i>c</i> _{st.}	koncentrace standardního přídatku olova [mg dm ⁻³]
<i>c</i> _{Tris}	koncentrace Tris HCl pufru [mol dm ⁻³]
FIA	průtoková injekční analýza
ICP-MS	hmotnostní spektrometrie s indukčně vázanou plazmou
<i>k</i> _n	tabelovaný koeficient
<i>K</i> _n	tabelovaný koeficient
<i>L</i> _{1,2}	interval spolehlivosti
<i>LOD</i>	mez detekce [mg dm ⁻³]
<i>LOQ</i>	mez stanovitelnosti [mg dm ⁻³]
<i>O</i>	opakovatelnost [%]
PAR	4-(2-pyridylazo)-resorcinol
ppm	koncentrační jednotka [mg dm ⁻³ , mg kg ⁻³]
<i>R</i>	rozpětí souboru dat
<i>s</i>	směrodatná odchylka
<i>S</i> _A	plocha píku [s ⁻¹]
<i>S</i> _{A,inf}	plocha píku příslušného interferentu [s ⁻¹]
SIA	sekvenční injekční analýza
Tris HCl	2-amino-2-hydroxymethyl-propan-1,3-diol hydrochlorid
<i>V</i>	objem [dm ³]
<i>V</i> _{st.}	objem standardního roztoku analytu [dm ³]
<i>λ</i>	vlnová délka [nm]

1 Úvod

Zvyšování koncentrace olova v životním prostředí je pro člověka závažným zdravotním rizikem. Průmyslové využití olova podléhá mnoha směrnícím a regulacím, které se kvůli toxicitě olova stále zpřísňují. Proto je kladen důraz na vývoj moderních metod pro stanovení olova. V této práci je olovo stanovováno po jeho komplexaci s vybraným činidlem jako barevný produkt metodou molekulové absorpční spektrometrie. Pro rychlé zjištění základních charakteristik byla tato reakce provedena nejprve ve statickém uspořádání. Tato metoda je jednou z nejstarších, ale stále významných analytických metod. Hlavní částí práce bylo převedení reakce užitá ve statickém uspořádání do uspořádání průtokového, které umožňuje větší rychlost, přesnost, reprodukovatelnost a automatizaci celého procesu stanovení.

1.1 Cíle práce

Cílem této bakalářské práce bylo stanovení olova reakcí olovnatého iontu s 4-(2-pyridylazo)-resorcinolem v prostředí Tris HCl pufru metodou molekulové absorpční spektrometrie ve statickém a průtokovém uspořádání a zjištění základních charakteristik obou stanovení.

Prvním cílem bylo ověřit výchozí podmínky ve statickém uspořádání [1] a optimalizovat základní pracovní podmínky metody. Optimalizovanými parametry byly vzhledem k charakteru reakce pH a koncentrace 4-(2-pyridylazo)-resorcinolu, jakožto vybarvovacího činidla.

Dalším úkolem bylo převedení celé reakce do průtokového SIA uspořádání. Pro toto uspořádání byla optimalizována opět koncentrace vybarvovacího činidla a dále dávkované objemy jednotlivých složek reakce.

Při stanovení olova může matrice vzorku často obsahovat ionty, které mohou ovlivnit velikost získaného signálu. Vliv těchto iontů se může projevit zvýšením či naopak snížením výsledného signálu analytu, a to vede ke špatnému určení celkové koncentrace analytu. Pro zjištění vlivu nejběžnějších interferujících iontů bylo posledním cílem provedení interferenční studie a následná analýza reálného vzorku.

2 Teoretická část

2.1 Olovo a jeho vlastnosti

2.1.1 Základní charakteristika

Olovo je modrobílý, na čerstvém řezu lesklý kov. Nacházející se ve 14. skupině (IV. A) periodické soustavy prvků. Je dobře kujný, tažný a odolný proti korozi. Je velice měkký, a to natolik, že je možné jej krájet nožem. Jeho teplota tání je 327,4 °C a teplota varu je 1750 °C. Tepelná a elektrická vodivost olova je poměrně nízká. Olovo vytváří sloučeniny s oxidačním číslem II a IV. Nejstálější jsou sloučeniny s oxidačním číslem II. Olovo se svými vlastnostmi řadí mezi těžké kovy s toxickými účinky [2].

Z historického hlediska olovo patří mezi nejdéle známé kovy. Zmínky o jeho hojném využívání pocházejí již ze starověku, a také z této doby pocházejí i první zmínky o jeho toxicitě [3].

2.1.2 Výskyt olova v přírodě

Olovo je nejrozšířenějším těžkým kovem na zemi. Jeho průměrný výskyt v zemské kůře je 13 ppm. Takto vysoká míra výskytu úzce souvisí se skutečností, že tři ze čtyř přirozených izotopů olova (^{206}Pb , ^{207}Pb , ^{208}Pb) vznikají jako stabilní produkty přirozených rozpadových řad. Čtvrtý izotop (^{204}Pb) radioaktivním rozpadem nevzniká a má také nejmenší zastoupení [4].

V přírodě se olovo vyskytuje ve formě rud a to nejčastěji jako černý minerál galenit PbS . Jako další rudy můžeme jmenovat anglesit PbSO_4 , cerussit PbCO_3 , pyromorfit $\text{Pb}_5(\text{PO}_4)_3\text{Cl}$ a mimetesit $\text{Pb}_5(\text{AsO}_4)_3\text{Cl}$. Známé jsou i další minerály, ale jejich těžba není ekonomicky zajímavá. Výše jmenované minerály mají v mnoha zemích rozsáhlá ložiska [4, 5].

2.1.3 Průmyslové využití olova

Olovo bylo v průmyslu ještě do poloviny 20. století využíváno ve velké míře. V současné době pro prokázané toxické účinky olova se od jeho využívání upouští. Hlavním odvětvím využívajícím olovo jsou výroby elektrických akumulátorů. Ze slitin olova jsou nejvýznamnější pájky (např. slitina olova a cínu) využívané pro pájení elektrických obvodů. Dále se olovo využívá či využívalo jako olovnaté sklo, pro výrobu

nábojů, vodovodního potrubí či pro účinné stínění γ záření na radiologických pracovištích [2].

2.1.4 Vliv na životní prostředí

V souvislosti s průmyslovým využitím olova dochází ke kontaminaci životního prostředí. Mezi zdroje této kontaminace můžeme zařadit zejména dříve používané olovnaté benzíny, kdy se emitované olovo dostalo do půdy a povrchových vod. Jako další zdroje kontaminace životního prostředí můžeme uvést těžbu rud, výrobu a následnou likvidaci akumulátorů či spalování fosilních paliv. Působením těchto vlivů se olovo dostává do půdy, vod a ovzduší [3].

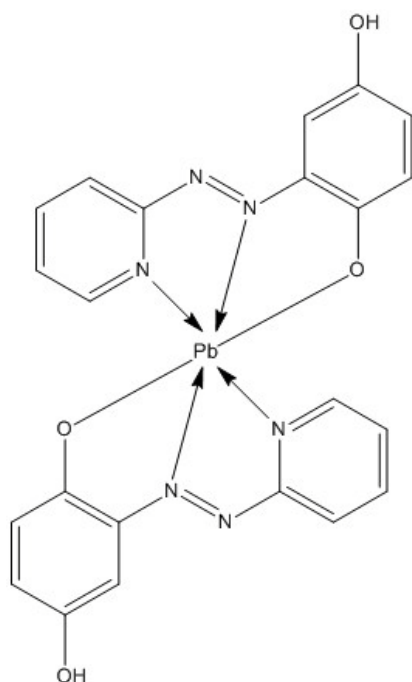
2.1.5 Toxicita a vliv na lidský organismus

Olovo nemá pro lidský organismus žádný esenciální význam. Při expozici organismu olovu dochází k záměně olova za vápník a olovo se akumuluje v kostech, kde negativně ovlivňuje krvetvorbu. Při intoxikaci olovem může dále docházet k poškození ledvin, jater, funkce reprodukčního systému a také negativnímu vlivu na nervový systém [6, 7].

Všechny tyto závažné projevy intoxikace olovnatými ionty způsobují znepokojení ohledně veřejného zdraví a stavu životního prostředí, a proto je kladen důraz na vývoj jednoduchých, rychlých a levných analytických metod, které umožní stanovování stopového množství olovnatých iontů.

2.2 Stanovení olova pomocí komplexační reakce

Z četných metod pro spektrofotometrické stanovení olova byla pro tuto bakalářskou práci vybrána komplexační reakce s 4-(2-pyridylazo)-resorcinolem (PAR) v prostředí Tris HCl pufru za vzniku červenooranžového komplexu. Reakce s 4-(2-pyridylazo)-resorcinolem je silně závislá na hodnotě pH. Pokud je pH kyselé, dochází k protonaci pyridinového dusíku. Naopak v zásaditém prostředí dojde k disociaci o-hydroxylové skupiny [1, 8]. Návrh struktury komplexu vznikajícího při reakci olovnatého kationu s 4-(2-pyridylazo)-resorcinolem zobrazuje obr. 2.1.



Obr. 2.1 Navrhovaná struktura Pb(II)-PAR komplexu

Vznikající komplex se vyznačuje při pH 9,4 absorpčním maximem při vlnové délce 524 nm. Pro dosažení maximálního stupně konverze analytu na komplex je doporučený přibližně desetinásobný molární nadbytek 4-(2-pyridylazo)-resorcinolu (PAR). Problém tohoto stanovení nastává v případě, že se v matrici vzorku objevují běžné interferující ionty, např. ionty zinečnaté či měďnaté. Z tohoto důvodu je před samotným stanovením olova vhodná separace těchto iontů, a to například extrakcí [1].

2.3 Současné metody pro stanovení olova

Pro spektrofotometrické stanovení olova existuje řada dalších metod stanovení. Většina těchto reakcí má však nízkou citlivost, a na rozdíl od reakce 4-(2-pyridylazo)-resorcinolu, který je rozpustný ve vodě, vyžadují přítomnost organických rozpouštědel. Zástupcem těchto metod stanovení jsou např. komplexační reakce s pyridin-2-acetaldehydem [9] nebo s 1,5-difenylthiokarbazonem [10, 11]. Všechny tyto komplexační reakce, včetně té s 4-(2-pyridylazo)-resorcinolem, jsou ovlivněné přítomností interferujících iontů. Stanovení reakcí olovnatého iontu s 4-(2-pyridylazo)-resorcinolem je však výhodné pro svou citlivost, rychlost a pro rozpustnost ve vodě.

Z důvodu významných interferencí řady běžných iontů je žádoucí spojení se selektivním extrakčním krokem, jako je např. extrakce na tuhé fázi [7, 9], která je zároveň i krokem prekoncentračním.

Nejpoužívanější metodou pro stanovení olova, a obecně pro stanovení prvků je atomová absorpční spektrometrie (AAS). Mezi hlavní pozitiva této metody patří nízká mez detekce, velice dobrá citlivost a možnost stanovení stopového množství. Hlavní negativa AAS jsou velmi složitá a drahá instrumentace. Základním krokem AAS je převedení analytu z roztoku do plynného atomárního stavu, tento proces se nazývá atomizace. Atomizace může být různá a podle ní rozlišujeme i různé metody stanovení [12]. Příkladem může být elektrotermická atomová absorpční spektrometrie s extrakčním krokem [13, 14], plamenová atomová absorpční spektrometrie taktéž spojená s extrakčním krokem [15] či atomová absorpční spektrometrie s grafitovou kyvetou jako varianta elektrotermické atomizace [16].

Další využívanou metodou pro stanovení olova je hmotnostní spektrometrie. Hmotnostní spektrometrie se často spojuje s indukčně vázanou plazmou, která slouží jako zdroj iontů [12]. Jako příklad lze uvést sekvenční stanovení olova ICP-MS s prekoncentračním krokem [17].

2.4 UV/VIS molekulová spektrometrie

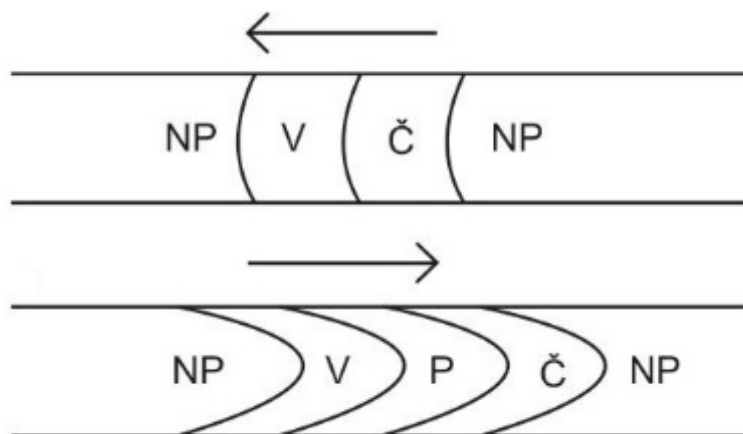
Molekulová spektrometrie v ultrafialové a viditelné oblasti je jednou z analytických metod, která spadá do skupiny spektrometrických metod. Stanovení látek touto metodou probíhá v rozmezí vlnových délek přibližně 200 až 800 nm. Látky, které absorbují záření v rozmezí 200 až 380 nm, absorbují ultrafialové záření a lidskému oku se jeví bezbarvě. Na druhé straně látky absorbující záření v rozmezí 380 až 800 nm jsou pro lidské oko barevné. UV/VIS molekulová spektrometrie je vhodnou metodou pro stanovení mnoha organických látek a anorganických kationtů.

Absorpční spektrometrie ve viditelné oblasti bez složité instrumentace se nazývá kolorimetrie a je jednou z nejstarších fyzikálně chemických metod. Výhodou této analytické metody je bezpochyby její ekonomická nenáročnost, rychlost a přijatelná přesnost i citlivost. Jednou z nevýhod je nemožnost automatizace. Vylepšením jsou moderní metody průtokové analýzy se spektrofotometrickou detekcí, které mimo jiné umožňují například výše zmiňovanou automatizaci [18].

2.5 Sekvenční injekční analýza

Sekvenční injekční analýza je jednou z metod průtokové analýzy. Obecnou výhodou průtokových metod je rychlost a především možnost automatizace pro hromadné chemické analýzy. Sekvenční injekční analýza (SIA) vznikla jako zdokonalení průtokové injekční analýzy (FIA). Zásadním rozdílem těchto metod je geometrie nosného toku. V případě FIA se jedná o konstantní přímý tok [19], zatímco základem SIA metody je kombinace přímého a zpětného toku. Výsledkem zpětného toku je zvýšení stupně konverze analytu na výsledný produkt [20].

Základním principem sekvenční injekční analýzy je postupné dávkování činidel a analytu z jednocestných kanálů s použitím vícecestného selekčního ventilu a pístového čerpadla. Poté pomocí přesně naprogramovaných pohybů pístového čerpadla a přepínání pozic selekčního ventilu dojde k řazení zón činidel a analytu v mísící cívce. Dále dochází k otočení toku a tím k dokonalému promísení jednotlivých složek a ke vzniku produktu, který je následně detekován. Detekce nemusí být striktně spektrofotometrická jako je tomu v této práci, ale je možné využít i například elektrochemické detekce [12].



Obr. 2.2 Zóny vzorku, produktu a činidla v SIA uspořádání před a po obrácení směru toku nosného proudu. (NP – nosný proud, V – vzorek, Č – činidlo, P – produkt reakce)

Sekvenční injekční analýza nám umožňuje snadno měnit pomocí příslušného programu dávkované objemy činidel a vzorku analytu, a to od jednotek až po stovky μl . Díky programovatelné změně dávkovacích objemů lze snadno optimalizovat disperzi zóny vzorku a celkovou citlivost stanovení. Tato snadná a rychlá změna parametrů pomocí počítače umožňuje velkou flexibilitu a je nespornou výhodou SIA stanovení [22].

Další výhodou sekvenční injekční analýzy je nižší spotřeba vzorku a činidel oproti FIA metodě. Toto snížení spotřeby je zapříčiněno využitím zastavení a změny toku zatímco FIA využívá kontinuální čerpání roztoků. Kromě nízké spotřeby roztoků je výhodou SIA rychlost stanovení, kdy jeden cyklus trvá cca 30 s. Jako poslední výhodu tohoto stanovení je třeba uvést možnost kinetických měření při zastaveném toku, např. určení řádu reakce. Tato kinetická měření však umožňuje i FIA [20].

3 Experimentální část

3.1 Použité chemikálie

- 2-amino-2-hydroxymethyl-propan-1,2-diol hydrochlorid, p.a. (Sigma Aldrich, Německo)
- Hydroxid draselný, p.a. (LACHEMA Brno, ČR)
- 4-(2-pyridylazo)-resorcinol, indikátorové čistoty (LACHEMA Brno, ČR)
- Standardní roztoky kovů o koncentraci $1,0 \text{ g dm}^{-3}$ v $0,5 \text{ mol dm}^{-3}$ kyselině dusičné, čistoty CertiPuR[®] (Merck, Německo)
 - Standardní roztok olova ve formě $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$
 - Baryum standardní roztok ve formě $\text{Ba}(\text{NO}_3)_2$
 - Chrom standardní roztok ve formě $\text{Cr}(\text{NO}_3)_3$
 - Zinek standardní roztok ve formě $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$
 - Hliník standardní roztok ve formě $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$
 - Železo standardní roztok ve formě $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$
 - Mangan standardní roztok ve formě $\text{Mn}(\text{NO}_3)_2$
 - Měď standardní roztok ve formě $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$
- Draslík standardní roztok ve formě KNO_3 o koncentraci 1000 mg dm^{-3} v $0,5 \text{ mol dm}^{-3} \text{ HNO}_3$, čistoty CertiPuR[®] (Merck, Německo)
- Nikl standardní roztok ve formě $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$ o koncentraci 1000 mg dm^{-3} v $0,5 \text{ mol dm}^{-3} \text{ HNO}_3$, čistoty CertiPuR[®] (Merck, Německo)
- Cín standardní roztok ve formě SnCl_4 o koncentraci 1000 mg dm^{-3} v $2 \text{ mol dm}^{-3} \text{ HCl}$, čistoty CertiPuR[®] (Merck, Německo)
- Pro přípravu roztoků byla použita deionizovaná voda připravena zařízením MilliQplus (Millipore, USA)

3.2 Používané přístroje a materiál

- Spektrofotometr Agilent 8453 (Agilent Technologies, USA)
- FIALab 3500 (FIALab Instruments, USA) s vlastním ovládacím softwarem
- pH metr Jenway 4330 (UK)
- Zdroj záření Mikropack DT-MINI-2-GS UV/VIS-NIK (OceanOptics, USA)
- Spektrofotometrický detektor OceanOptics HR4000 (USA)
- PTFE spojovací a transportní hadičky

3.3 Statické uspořádání s UV/VIS detekcí

Příprava a ředění roztoků

Tris HCl pufr o koncentraci $0,2 \text{ mol dm}^{-3}$ byl připraven ve 100ml odměrné baňce smícháním 3,125 g pevného Tris HCl s cca 60 ml deionizované vody. Následně bylo upraveno pH pomocí roztoku $1,0 \text{ mol dm}^{-3}$ KOH, který byl připraven do 100ml odměrné baňky smícháním 5,61 g KOH a doplněním H_2O po rysku. Po úpravě pH Tris HCl pufrem na požadovanou hodnotu (optimalizovaná hodnota byla stanovena na 9,5) se baňka doplnila po rysku deionizovanou vodou.

Standardní roztok olova byl k dispozici o koncentraci 1000 mg dm^{-3} . Tento standardní roztok byl naředěn vodou na koncentraci 100 mg dm^{-3} a to tak, že do 100ml odměrné baňky bylo pipetováno 10 ml standardního roztoku olova a objem byl doplněn deionizovanou vodou po rysku. Z takto zředěného roztoku se dále připravovaly potřebné koncentrace olova pro optimalizace a kalibrační závislost.

Vybarvovací činidlo PAR bylo připraveno o koncentraci 10 mmol dm^{-3} a to rozpuštěním 0,2552 g pevného 4-(2-pyridylazo)-resorcinolu ve 100ml odměrné baňce. Z roztoku vybarvovacího činidla o koncentraci 10 mmol dm^{-3} byl ředěním připraven roztok o koncentraci $1,0 \text{ mmol dm}^{-3}$, který byl následně použit pro optimalizace a další měření.

Postup prací

Jako první bylo změřeno absorpční spektrum samotného Tris HCl pufru, slepého vzorku (vzorek bez přídavku olova) a vzniklého komplexu. Pracovní parametry byly voleny na základě literatury [1]. Tris HCl pufr byl použit o koncentraci $0,2 \text{ mol dm}^{-3}$ a pH 9,5. Vybarvovací činidlo o koncentraci $0,05 \text{ mmol dm}^{-3}$. A koncentrace olovnatých iontů byla zvolena $2,0 \text{ mg dm}^{-3}$.

Dále byla provedena optimalizace koncentrace vybarvovacího činidla (PAR) a to tak, že byla připravena sada pěti baněk, ve kterých byla zachována stejná koncentrace olova $c_{\text{Pb}} = 2,0 \text{ mg dm}^{-3}$, Tris HCl pufru $c_{\text{Tris}} = 0,2 \text{ mol dm}^{-3}$ a pH 9,5. Koncentrace vybarvovacího činidla byla zvolena v rozmezí $0,01 - 0,25 \text{ mmol dm}^{-3}$.

Dalším krokem byla optimalizace pH. Stejně jako při předchozí optimalizace bylo jediným proměnným parametrem pH směsi, kdy koncentrace olova byla $2,0 \text{ mg dm}^{-3}$, koncentrace vybarvovacího činidla $0,05 \text{ mmol dm}^{-3}$ a koncentrace Tris HCl pufru $0,2 \text{ mol dm}^{-3}$. Hodnota pH byla měřena v rozmezí 4 – 11.

Po zoptimalizování pracovních parametrů byla za zjištěných optimálních podmínek změřena kalibrační závislost absorbance na koncentraci olova, pro koncentrace olova v rozmezí $0,1 - 10 \text{ mg dm}^{-3}$. Pro statistické vyhodnocení byl za těchto podmínek 10x změřen slepý vzorek, tedy vzorek bez analytu a dále byl 10x změřen vzorek s koncentrací $c_{\text{Pb}} = 2,5 \text{ mg dm}^{-3}$ pro určení opakovatelnosti.

Vyhodnocení

Jednotlivá měření byla statisticky vyhodnocena a zpracována do názorného grafu či tabulky.

3.4 Sekvenční injekční analýza s UV/VIS detekcí

Příprava roztoků

Tris HCl pufr byl připraven stejným způsobem jako pro statické uspořádání. Pro zjednodušení analýzy byl roztok vybarvovacího činidla ředěn Tris HCl puftrem. Roztok olova byl připraven již dříve popsaným postupem ředěním pomocí deionizované vody.

Pro studium interferencí jednotlivých iontů byly připraveny roztoky s koncentrací olova 10 mg dm^{-3} . Roztoky byly připravovány do 10ml odměrných baněk. Do všech baněk bylo napipetováno 0,1 ml standardního roztoku olova o koncentraci 1000 mg dm^{-3} . Stejnou koncentraci jako standardní roztok olova měly i standardní roztoky ostatních použitých iontů. Výsledné koncentrace jednotlivých interferujících iontů v roztocích a jejich pipetované množství ze standardních roztoků zobrazuje tab. 3.1. Roztoky byly na objem 10 ml doplněny deionizovanou vodou. Pro experiment bylo připraveno deset roztoků obsahující vybraný zkoumaný ion a jeden roztok obsahující pouze olovnaté ionty.

Pro stanovení olova metodou standardního přídatku bylo připraveno 100 ml modelového vzorku olova s příměsí vybraných interferentů. Složení a přípravu 100 ml tohoto vzorku zobrazuje tab. 3.2.

Tab. 3.1 Příprava roztoků pro studium interference

Ion	$c_{\text{inf.}} [\text{mg dm}^{-3}]$	$V_{\text{st.}} [\text{ml}]$
Al^{3+}	100	1,0
Ba^{2+}	10	0,1
K^{+}	100	1,0
Mn^{2+}	100	1,0
Cu^{2+}	100	1,0
Ni^{2+}	100	1,0
Cr^{3+}	100	1,0
Sn^{4+}	100	1,0
Zn^{2+}	100	1,0
Fe^{3+}	100	1,0
Pb^{2+}	–	–

Tab. 3.2 Příprava modelového vzorku

Ion	$c [\text{mg dm}^{-3}]$	$V_{\text{st.}} [\text{ml}]$
Pb^{2+}	10	1,0
Al^{3+}	25	2,5
Fe^{3+}	10	5,0
Cr^{3+}	10	1,0
Cu^{2+}	10	1,0
Zn^{2+}	10	1,0
Sn^{4+}	10	1,0

Postup prací

Na základě výsledků optimalizace pro statické uspořádání byly zvoleny parametry pro optimalizaci průtokového uspořádání.

Nejprve byla provedena optimalizace koncentrace vybarvovacího činidla. Byla připravena sada šesti 10ml odměrných baněk, ve kterých byly připraveny pomocí ředění Tris HCl pufru o koncentraci $c_{\text{Tris}} = 0,2 \text{ mol dm}^{-3}$ a pH 9,5 vzorky o koncentraci vybarvovacího činidla v rozmezí od 0,025 do 1,0 mmol dm^{-3} . Jako vzorek obsahující analyt byl připraven roztok olova o koncentraci 5,0 mg dm^{-3} . Sada těchto vzorků byla

změřena v průtokovém SIA uspořádání při vlnové délce 512 nm, kdy dávkovaný objem obou roztoků byl 150 μl . Po změření všech roztoků byl vzorek olova vyměněný za H_2O , a za stejných podmínek byl ke každé koncentraci vybarvovacího činidla změřen signál odpovídající slepému vzorku.

Dalším parametrem vhodným pro optimalizace byl dávkovaný objem vybarvovacího činidla v prostředí Tris HCl pufru a vzorku olova. Pro stanovení byl připraven zásobní roztok olova o koncentraci $5,0 \text{ mg dm}^{-3}$ a zásobní roztok vybarvovacího činidla PAR o koncentraci $0,1 \text{ mmol dm}^{-3}$. Stejně jako v předchozím případě byl roztok olova ředěn deionizovanou vodou a roztok vybarvovacího činidla Tris HCl pufrém o koncentraci $0,2 \text{ mol dm}^{-3}$ a pH 9,5. Následně byly změřeny signály jak slepého vzorku, tak vzorku s olovem, měnicím parametrem byl objem jednotlivých roztoků dávkovaný do mísící cívky. Nejdříve bylo provedeno měření, kdy byl použit stejný objem činidla i vzorku olova (případně vody jako slepý vzorek) a to v rozmezí 50 – 250 μl . Optimalizací byla zjištěna nejvyšší citlivost stanovení pro objem 200 μl . Dále byly změřeny signály pro různé poměry objemů činidla a vzorku olova (voda jako slepý vzorek) pro objemy blízké hodnotě 200 μl . Veškeré měření probíhalo při vlnové délce 512 nm.

Po zjištění optimálních podmínek byla stejně jako ve statickém uspořádání změřena kalibrační závislost a to plochy píku S_A na koncentraci olova, pro koncentrace olova v rozmezí od 2,5 do 30 mg dm^{-3} . Pro statistické vyhodnocení byl za těchto podmínek 10x změřen slepý vzorek, tedy vzorek bez olova a dále byl 10x změřen vzorek s koncentrací $c_{\text{Pb}} = 10 \text{ mg dm}^{-3}$.

Poté co byla metoda zoptimalizována byla pozornost zaměřena na vliv interferentů na komplexační reakci olovnatého kationtu s 4-(2-pyridylazo)-resorcinolem. Byl zkoumán vliv 10 iontů. Postup měření byl takový, že dle tab. 3.1 bylo připraveno 10 roztoků s vybranými interferenty a olovem, a jeden roztok obsahující pouze olovo. Každý vzorek byl změřen za výše uvedených optimalizovaných podmínek. Koncentrace olova v jednotlivých vzorcích byla 10 mg dm^{-3} .

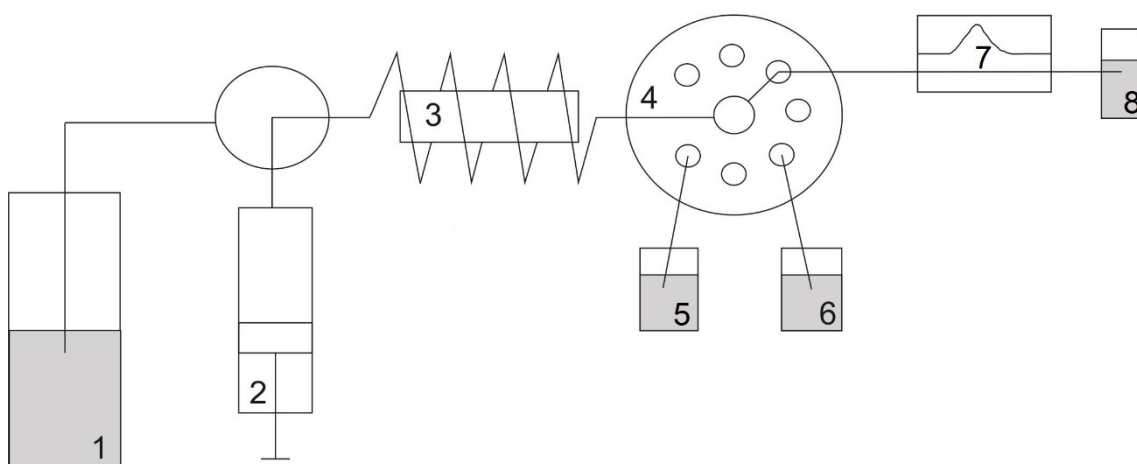
Posledním experimentem bylo stanovení olova průtokovou metodou v modelovém vzorku odpadní vody. Vzorek byl připraven dle tab. 3.2. Měření probíhalo metodou standardního přídatku. Pro stanovení byla připravena sada čtyř 10ml odměrných baněk, kdy každá obsahovala 5,0 ml vzorku a standardní přídatek olova v rozmezí koncentrací 0 až 20 mg dm^{-3} .

Vyhodnocení

Výsledky z jednotlivých optimalizací a z následného měření kalibrační závislosti byly statisticky vyhodnoceny a zpracovány do názorného grafu či tabulky. Vliv interference jednotlivých iontů byl vyhodnocen jako podíl plochy píku interferentu a plochy píku samotného olova. Olovo ve vzorku bylo stanoveno metodou standardního přídávku a to z rovnice přímky pro závislost plochy píku S_A na koncentraci standardního přídávku olova c_{st} .

3.5 Schéma aparatury SIA

Schéma aparatury použité pro měření zobrazuje obr. 3.1. Pomocí pístového čerpadla je nasávána voda (nosné prostředí) z rezervoáru. Následně dojde k dávkování směsi vybarvovacího činidla s Tris HCl puftrem a vzorku olova z jednonábových systémů do mísící cívky. Následně pomocí změn polohy selekčního ventilu a pístového čerpadla dojde k řazení vybarvovacího činidla a vzorku v mísící cívce. Poté je obrácen směr toku čímž dojde k dokonalému promísení zón a následné detekci.



Obr. 3.1 Schéma aparatury pro měření v průtokovém uspořádání. 1 – nosné prostředí (voda), 2 – pístové čerpadlo, 3 – mísící cívka, 4 – selekční ventil, 5 – vybarvovací činidlo, 6 – vzorek (Pb^{2+}), 7 – detektor, 8 – odpad.

3.6 Statistické vyhodnocení výsledků

Výsledky každé chemické analýzy mají vždy určitou nepřesnost. Tato nepřesnost měření se projevuje například tím, že výsledky měření stejného vzorku, stejnou osobou na stejném přístroji se od sebe odchylojí či se odchylojí i od skutečné hodnoty.

Metodika použitého postupu průtokového uspořádání v této práci zahrnovala 3 opakovaná měření vzorku, kdy jako výsledek byla vyhodnocována plocha píku vzniklého průchodem reakční směsi spektrofotometrickou detekční celou. Z výsledků byl následně statistickým zpracováním určen medián \tilde{x} a směrodatná odchylka s . Pro jednotlivé metody stanovení byl vždy 10x změřen signál pro slepý vzorek (bez přidaného analytu) a z výsledků byl určen medián, směrodatná odchylka interval spolehlivosti, mez detekce a mez stanovitelnosti. Analogicky byl změřen 10x vzorek

s určitou koncentrací analytu a z těchto výsledků byla stanovena citlivost a opakovatelnost. Definice jednotlivých statistických hodnot jsou diskutovány níže.

Medián, \tilde{x} je střední hodnota naměřených výsledků. Medián se určí seřazením výsledků měření dle velikosti. Při lichém počtu je mediánem hodnota ležící uprostřed. Při počtu sudém se medián určí jako průměr dvou hodnot ležících uprostřed seznamu.

Směrodatná odchylna, s je hodnota, která charakterizuje šířku intervalu v kterém se mohou vyskytovat výsledky při opakovaném měření. Vypočítáme ji ze vztahu (1),

$$s = k_n R \quad (1)$$

kde k_n je tabelovaný koeficient a R je rozpětí souboru. Rozpětí souboru R se vypočítá jako rozdíl nejvyšší a nejnižší hodnoty v souboru výsledků.

Interval spolehlivosti, $L_{1,2}$ je hodnota která udává, že skutečná hodnota leží uvnitř stanoveného intervalu a to s námi určenou pravděpodobností 95%. Výpočet zobrazuje rovnice (2),

$$L_{1,2} = K_n R \quad (2)$$

kde K_n je tabelovaná hodnota a R je rozpětí souboru.

Mez detekce, c (**LOD**) odpovídá hodnotě koncentrace analytu, jejíž analytický signál ještě lze odlišit od šumu základní linie. Jak ukazuje rovnice (3), lze ji vypočítat jako trojnásobek šumu základní linie podělený koeficientem k , který odpovídá směrnici kalibrační křivky.

$$c_{LOD} = \frac{3 \cdot s (\text{šum})}{k} \quad (3)$$

Mez stanovitelnosti, c (LOQ) odpovídá nejnižší koncentraci analytu kterou lze s přijatelnou správností a přesností stanovit. Výpočet zobrazuje rovnice (4).

$$c_{LOQ} = \frac{10 \cdot s \text{ (šum)}}{k} \quad (4)$$

kde k je směrnice kalibrační křivky.

Opakovatelnost O , měření vyjadřuje míru shody výsledků stejné měřené veličiny měřené za stejných podmínek, to znamená na stejném přístroji, stejnou metodou, stejnou osobou a v krátkém časovém rozpětí. Opakovatelnost O vyjadřuje vztah (5),

$$O = \frac{s}{\tilde{x}} \cdot 100 \quad (5)$$

kde s je směrodatná odchylka a \tilde{x} je medián.

Citlivost analytického stanovení je rovna směrnici kalibrační závislosti. V této práci byla citlivost určována z lineární části kalibrační závislosti jako její směrnice.

Tab. 3.3 Soupis tabelovaných hodnot pro statistické vyhodnocení

Počet měření, n	k_n	K_n
3	0,591	1,3
10	0,325	0,23

4 Výsledky a diskuze

Tato část bakalářské práce interpretuje dosažené výsledky v podobě grafů a tabulek. První oddíl této kapitoly se zabývá prezentací výsledků měření ve statickém uspořádání. V druhém oddílu jsou naopak uvedeny výsledky měření v průtokovém uspořádání. Konec této kapitoly je věnován měření modelového vzorku olova a vlivu interferentů na toto stanovení.

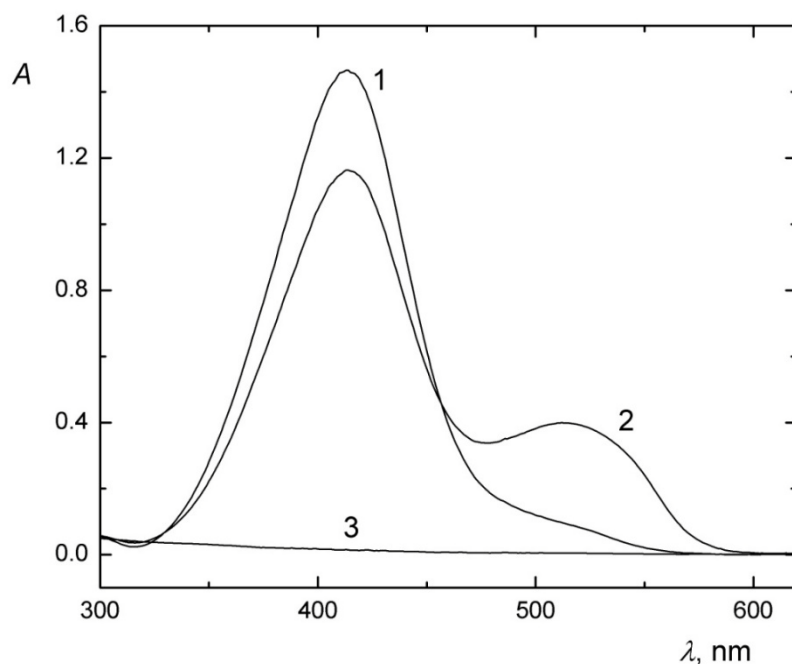
4.1 Detekce UV/VIS ve statickém uspořádání

Pro spektrofotometrické stanovení ve statickém uspořádání byly optimalizovány základní parametry reakce olovnatých iontů s 4-(2-pyridylazo)-resorcinolem (PAR). Pozornost byla věnována zejména závislosti absorbance při vlnové délce 512 nm na koncentraci vybarvovacího činidla a následně závislosti na pH. Výsledné spektrum zobrazuje obr. 4.1. Na tomto obrázku lze spatřit tři křivky:

Křivka 3 zobrazuje spektrum odpovídající samotnému Tris HCl pufru. Jak je patrné, v rozsahu vlnových délek 300 – 600 poskytuje prakticky nulový signál.

Křivka 1 zobrazuje spektrum slepého vzorku, který tvoří roztok Tris HCl pufru a vybarvovacího činidla PAR. Jedná se vlastně o absorpční spektrum vybarvovacího činidla. Maximum křivky 3 odpovídá vlnové délce 410 nm.

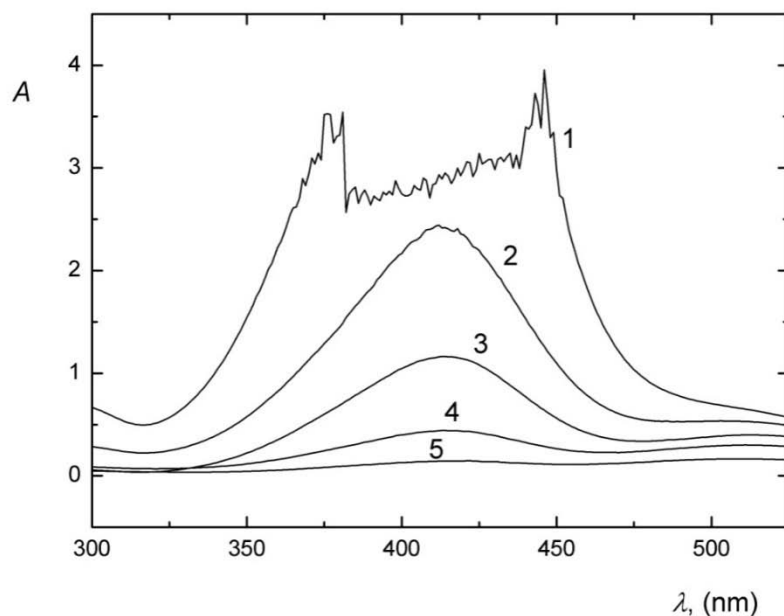
Křivka 2 zobrazuje spektrum komplexu Pb-PAR, signál odpovídající vlnové délce 410 nm odpovídá nezreagovanému podílu vybarvovacího činidla PAR, který je z důvodu kvantitativní komplexace přidáván ve stechiometrickém nadbytku. Absorbční maximum vznikého komplexu bylo pozorováno při 512 nm, přičemž tato hodnota je srovnatelná s hodnotou 525 nm uvedenou v literatuře [1]. Pro všechny následné analytické účely byla využita maximální vlnová délka 512 nm.



Obr. 4.1 Závislost absorbance A na vlnové délce λ [nm]. 1 – Tris HCl, 2 – Vzorek, 3 – Slepý vzorek, $c_{\text{Tris}} = 0,2 \text{ mol dm}^{-3}$, $c_{\text{Pb}} = 2,0 \text{ mg dm}^{-3}$, $c_{\text{PAR}} = 0,05 \text{ mmol dm}^{-3}$, pH 9,5

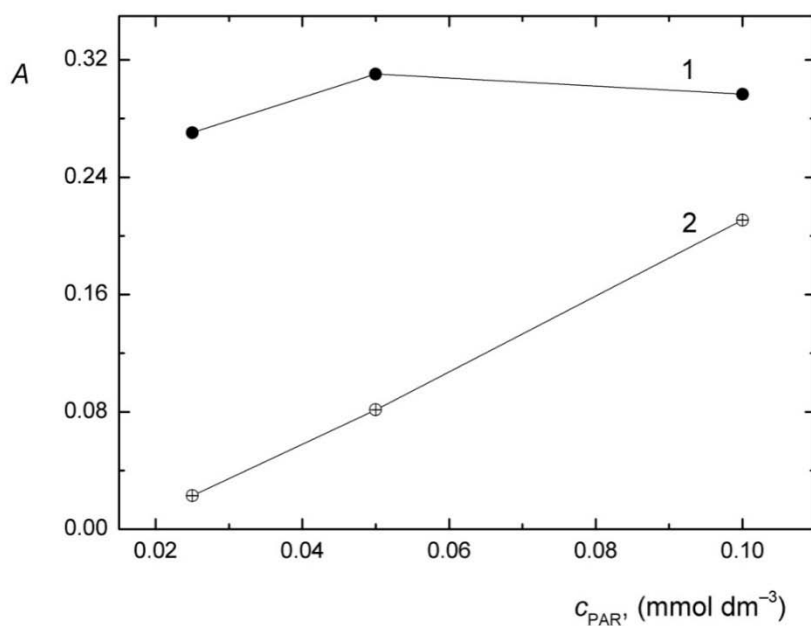
4.1.1 Optimalizace koncentrace vybarvovacího činidla

Při této optimalizaci byla hledána taková koncentrace vybarvovacího činidla PAR, která poskytne vysokou citlivost spektrofotometrického stanovení olova při komplexační reakci 4-(2-pyridylazo)-resorcinolu (PAR) a olovnatého kationtu. Pro optimalizaci bylo použito pět roztoků slepého vzorku o různé koncentraci vybarvovacího činidla v rozmezí od 0,01 do 0,25 mmol dm⁻³. Slepý vzorek se tedy skládal z dané koncentrace vybarvovacího činidla v prostředí Tris HCl pufru o pH 9,5. Závislost absorbance těchto roztoků na vlnové délce zobrazuje obr. 4.2. Absorbční maximum slepého vzorku odpovídá vlnové délce 410 nm z čehož vyplývá, že křivka 1 a 5 při této vlnové délce neposkytují vhodný signál. Přestože analyzovanou oblastí spektra je 512 nm, bylo rozhodnuto dále optimalizovat jen hodnoty koncentrace vybarvovacího činidla náležící křivkám 2, 3 a 4.



Obr. 4.2 Absorpční spektra vybarvovacího činidla (PAR) pro jeho různé koncentrace 0,25 (1); 0,1 (2); 0,05 (3); 0,025 (4); 0,01 (5) mmol dm^{-3} , $c_{\text{Tris}} = 0,2 \text{ mol dm}^{-3}$, pH 9,5

Pro přesné určení citlivosti měření pro koncentrace vybarvovacího činidla PAR 0,025; 0,05 a 0,1 mmol dm^{-3} byl změřen signál vzorků uvedených koncentrací s přidavkem olova o koncentraci 2,0 mg dm^{-3} při vlnové délce 512 nm, která odpovídá absorpčnímu maximu vznikajícího komplexu. Obr. 4.3 zobrazuje hodnoty odpovídající signálu vzniklého komplexu (tedy po odečtení signálu slepého vzorku) a je z něj zřejmé, že vysoké citlivosti stanovení olova bylo získáno při použití koncentrace vybarvovacího činidla PAR 0,05 mmol dm^{-3} (křivka 1). Křivka 2 zároveň na obr. 4.3 zobrazuje logický závěr, že absorbance slepého vzorku vzrůstá lineárně se zvyšující se koncentrací vybarvovacího činidla, neboť jeho absorpční pás, s maximem při 410 nm, výrazně zasahuje i do měřené vlnové délky produktu (512 nm).

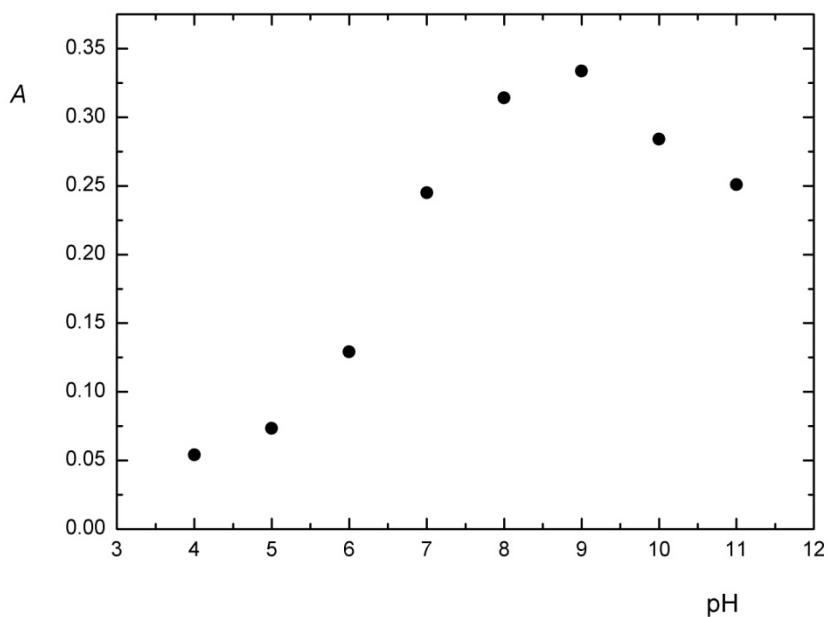


Obr. 4.3 Závislost absorbance A na koncentraci vybarvovacího činidla (PAR)

1 – absorbance vzniklého komplexu, 2 – absorbance slepého vzorku, pH 9,5, $c_{\text{Tris}} = 0,2 \text{ mol dm}^{-3}$, $c_{\text{Pb}} = 2,0 \text{ mg dm}^{-3}$

4.1.2 Optimalizace pH

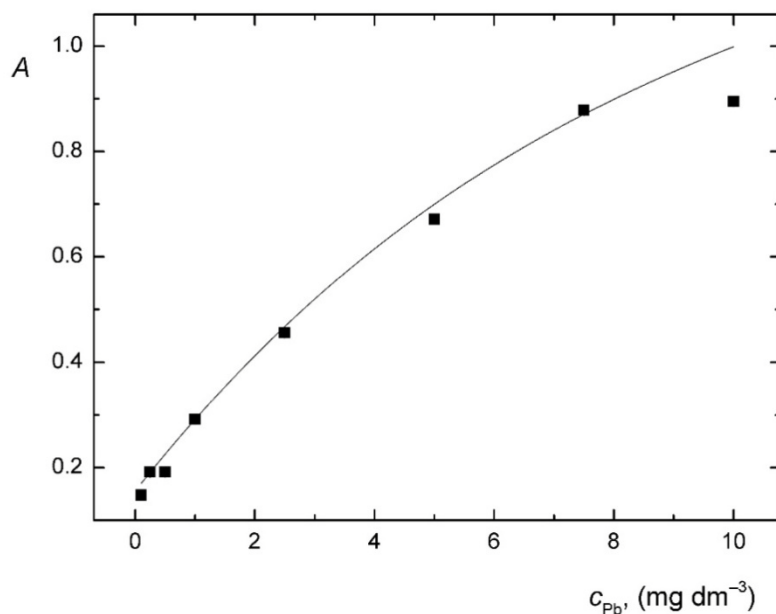
Z dat odpovídajících obr. 4.1 byla stanovena maximální vlnová délka vznikajícího komplexu $\lambda = 512 \text{ nm}$. Při této vlnové délce byla provedena optimalizace pH v rozmezí od 4 do 11. Z výsledků zobrazených na obr. 4.4 lze vyvodit, že hodnota absorbance při maximální vlnové délce je nejvyšší při pH 9, což odpovídá hodnotě 9,4 uvedené v dostupné literatuře [1] a potvrzuje tak správnost použití Tris HCl pufru o pH 9,5 v předchozím měření. Z naměřených dat dále vyplývá, že v zásadité oblasti, v které komplexační reakce 4-(2-pyridylazo)-resorcinolu a olovnatého kationtu probíhá, již hodnota pH nemá na hodnoty absorbance, a tedy i na citlivost měření, zásadní vliv.



Obr. 4.4 Závislost absorbance A na pH , $c_{\text{Tris}} = 0,2 \text{ mol dm}^{-3}$; $c_{\text{Pb}} = 2,0 \text{ mg dm}^{-3}$; $c_{\text{PAR}} = 0,05 \text{ mmol dm}^{-3}$

4.1.3 Kalibrační závislost

V dalším kroku byla za optimálních podmínek změřena kalibrační závislost absorbance na koncentraci olova. Koncentrace olova byla měřena v rozmezí $0,1 - 10 \text{ mg dm}^{-3}$. Citlivost byla vypočítána z lineární části, která ležela v rozmezí hodnot od $1,0$ do $7,5 \text{ mg dm}^{-3}$. Celá kalibrační závislost je zobrazena na obr. 4.5.



Obr. 4.5 Kalibrační závislost pro měření ve statickém uspořádání, $c_{Tris} = 0,2 \text{ mol dm}^{-3}$; $c_{PAR} = 0,05 \text{ mmol dm}^{-3}$, pH 9,5

4.1.4 Základní charakteristiky stanovení ve statickém uspořádání

Z hodnot naměřených v tomto oddíle a z výsledků vypočítaných dle vztahů uvedených v kap. 3.6 byla získána tab. 4.1, která je souhrnem základních charakteristických parametrů stanovení olovnatých kationtů reakcí s 4-(2-pyridylazo)-resorcinolem ve statickém uspořádání.

Tab. 4.1 Základní charakteristiky pro statické uspořádání

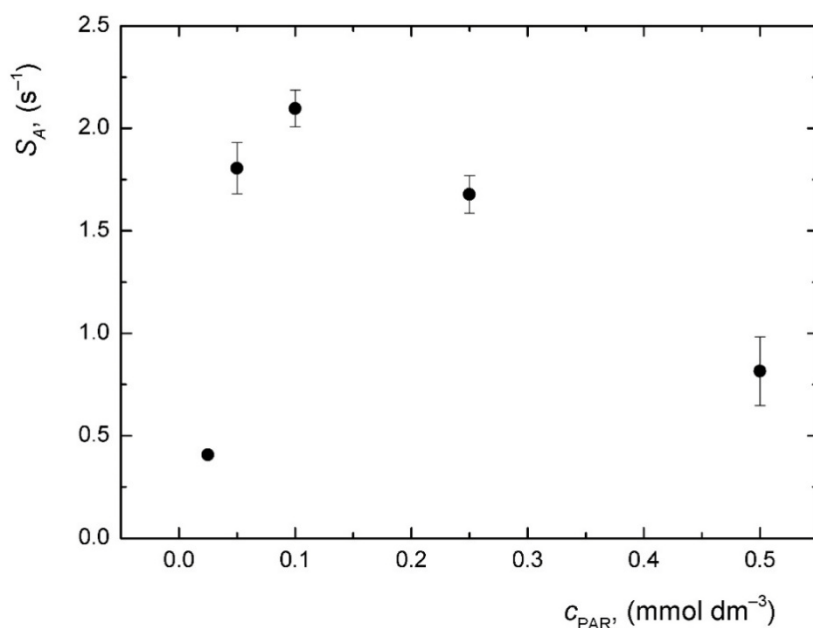
Charakteristika	Hodnota
Mez detekce [mg dm ⁻³]	0,0258
Mez stanovitelnosti [mg dm ⁻³]	0,0859
Citlivost [dm ³ mg ⁻¹]	0,0980
Opakovatelnost [%]	0,739
Korelační koeficient	0,990

4.2 Detekce UV/VIS v průtokovém SIA uspořádání

Průtokové stanovení olova komplexační reakcí probíhalo na aparatuře, kterou zobrazuje obr. 3.1. Po provedení optimalizace pH pro statické uspořádání bylo od této optimalizace v průtokovém uspořádání upuštěno. A to na základě výsledků, které ukazují, že vliv změny hodnot pH v zásadité oblasti se výrazně neprojevuje na probíhající reakci. Pozornost byla věnována zejména optimalizaci koncentrace vybarvovacího činidla a optimalizaci dávkovaného objemu reaktantů. Pro zjednodušení měření byl použit roztok 4-(2-pyridylazo)-resorcinolu v prostředí Tris HCl pufru o pH 9,5 a jako vzorek analytu roztok olovnatých iontů v deionizované vodě.

4.2.1 Optimalizace koncentrace PAR

Stejně jako v kapitole 4.1.1 byl zkoumán i pro průtokové uspořádání vliv změny koncentrace vybarvovacího činidla PAR na intenzitu signálu. Pro měření bylo připraveno pět roztoků o koncentraci vybarvovacího činidla od 0,025 do 0,5 mmol dm⁻³. Z naměřených signálů byly vyhodnoceny plochy píků S_A . Závislost těchto ploch píků na koncentraci vybarvovacího činidla zobrazuje obr. 4.6. Předpokladem bylo, že optimální koncentrace bude stejná či blízká optimální hodnotě koncentrace pro statické uspořádání. Tento předpoklad se potvrdil a jako optimální hodnota pro další měření byla použita koncentrace $c_{PAR} = 0,1 \text{ mmol dm}^{-3}$.

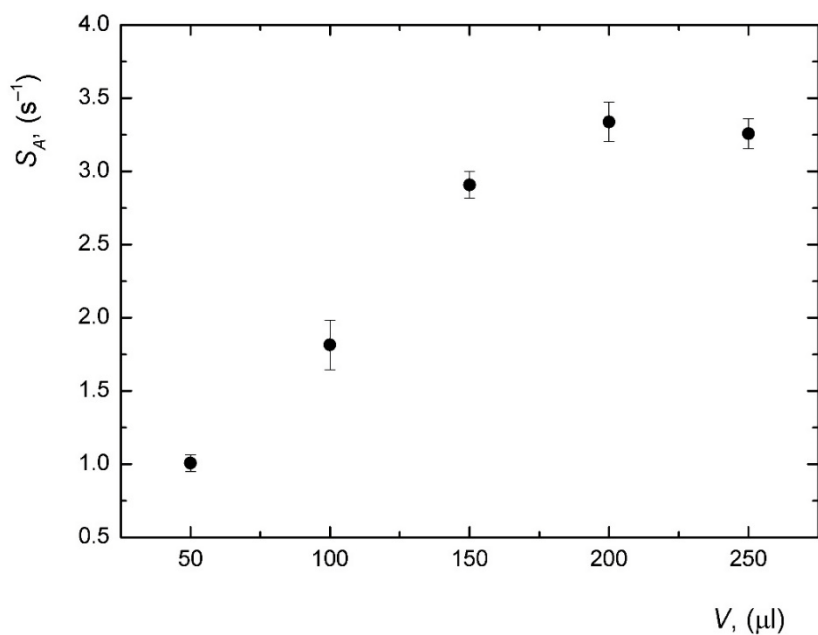


Obr. 4.6 Závislost plochy píku S_A na koncentraci vybarvovacího činidla PAR, $c_{\text{Tris}} = 0,2 \text{ mol dm}^{-3}$; $c_{\text{Pb}} = 5,0 \text{ mg dm}^{-3}$, pH 9,5

4.2.2 Optimalizace dávkovaného objemu PAR a Pb

Jednou z výhod průtokové metody SIA je nepochybně nízká spotřeba reaktantů. V této části bylo cílem hledání optimálního objemu dávkovaného vybarvovacího činidla a vzorku olova.

Nejprve byla provedena série měření, kdy byl dávkován vždy stejný objem vybarvovacího činidla PAR v prostředí Tris HCl pufru o pH 9,5 a vzorku obsahující olovo. Dávkované objemy byly studovány v rozmezí od 50 μl do 250 μl s krokem po 50 μl . I přesto, že je objem reakční cívky 1,0 ml a celkové objemy mohly být ještě vyšší, vyšší objemy už do měření zařazeny nebyly, jelikož bylo usilováno o co nejmenší spotřebu jednotlivých roztoků. Z výsledků, které zobrazuje obr. 4.7 je zřejmé, že vhodný dávkovací objem odpovídá 200 μl .



Obr. 4.7 Závislost plochy píku S_A na koncentraci dávkovaného objemu, $c_{\text{Tris}} = 0,2 \text{ mol dm}^{-3}$; $c_{\text{Pb}} = 5,0 \text{ mg dm}^{-3}$; $c_{\text{PAR}} = 0,1 \text{ mmol dm}^{-3}$; pH 9,5

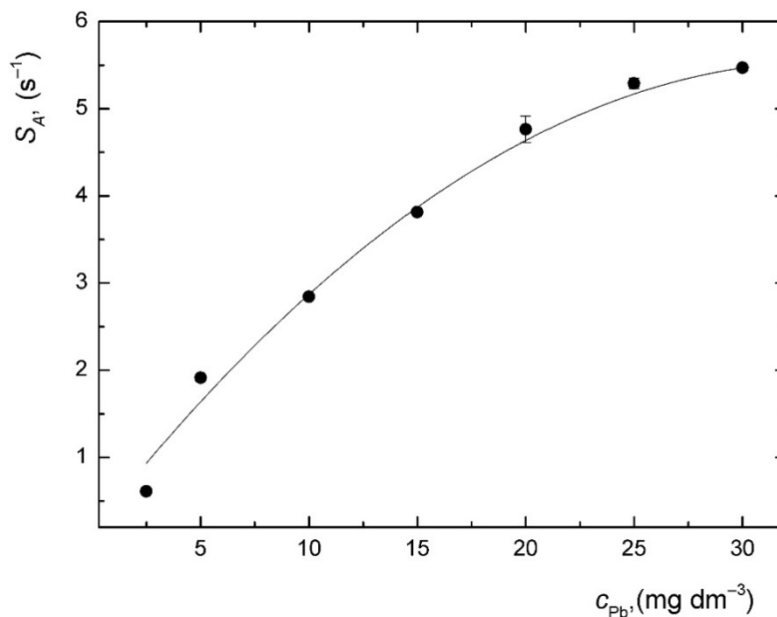
Po zjištění optimálního objemu při dávkování stejného množství vybarvovacího činidla a vzorku olova, byl zkoumán vliv dávkování různých poměrů jednotlivých složek reakce. Zvolené poměry a výsledné hodnoty odpovídající plochám píků S_A zobrazuje tab. 4.2. Z této tabulky vyplývá, že nejvhodnější ze studovaných objemů je zachování dávkování stejného objemu u obou složek, a to již výše zmíněných 200 μl . Z tab. 4.2 lze určit, že dalším vhodným poměrem je 200 μl (Pb) a 250 μl (PAR). V případě tohoto poměru je výsledná hodnota plochy píku S_A sice nižší než pro stejné objemy (hodnota dávkování 200 μl pro obě složky), ale je zatížena menší chybou měření. Jako optimální postup bylo zvoleno dávkování 200 μl analytu olova a 200 μl vybarvovacího činidla PAR v prostředí Tris HCl pufru o pH 9,5.

Tab. 4.2 Výsledky různých poměrů dávkovaného objemu PAR a Pb

$V(\text{Pb})$ [μl]	$V(\text{PAR})$ [μl]	S_A [s^{-1}]
200	200	$3,34 \pm 0,297(4,05\%)$
200	100	$2,30 \pm 0,429(8,48\%)$
100	200	$2,10 \pm 0,590(8,94\%)$
200	150	$2,91 \pm 0,269(4,21\%)$
150	200	$2,43 \pm 0,217(4,06\%)$
200	250	$3,26 \pm 0,0721(1,01\%)$
250	200	$2,89 \pm 0,524(8,24\%)$

4.2.3 Kalibrační závislost

Po zjištění optimálních pracovních podmínek pro stanovení v průtokovém uspořádání byla proměřena kalibrační závislost. Pro určení této závislosti byly změřeny roztoky olova o koncentraci od 0,1 do 30 mg dm^{-3} . Hodnoty ploch píků S_A pro roztoky o koncentracích olova v rozmezí od 0,1 do 1,0 mg dm^{-3} ležely pod hodnotou odpovídající slepému vzorku, z čehož plyne, že takto nízké koncentrace není možné touto metodou detekovat. Citlivost byla určena z lineární části křivky, která leží mezi hodnotami 5,0 až 20 mg dm^{-3} . Celou kalibrační závislost zobrazuje obr. 4.8.



Obr. 4.8 Kalibrační závislost pro průtokové uspořádání, $c_{\text{Tris}} = 0,2 \text{ mol dm}^{-3}$; $c_{\text{PAR}} = 0,1 \text{ mmol dm}^{-3}$; pH 9,5

4.2.4 Základní charakteristiky stanovení v průtokovém uspořádání

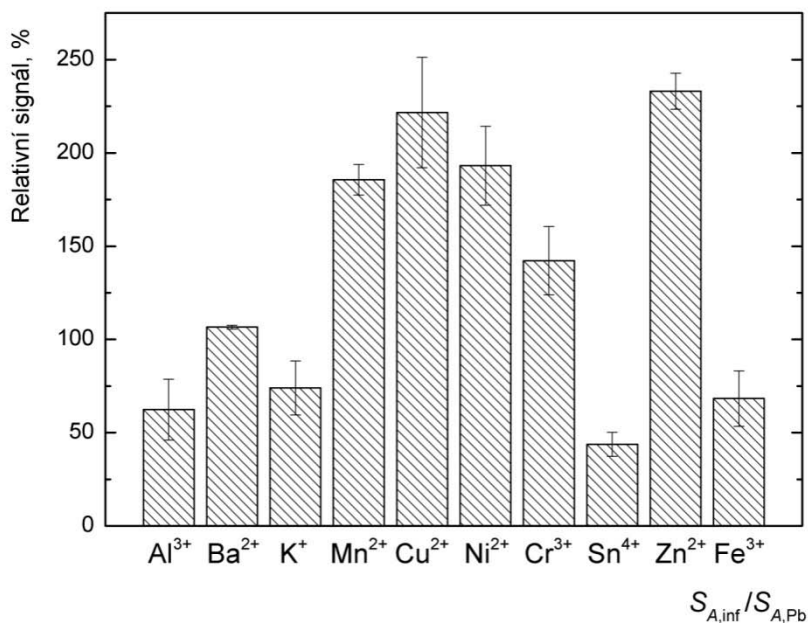
Z dat naměřených pro průtokové uspořádání byly stanoveny základní statistické charakteristiky. Souhrn těchto výsledků zobrazuje tab. 4.3.

Tab. 4.3 Základní charakteristiky pro průtokové SIA uspořádání

Charakteristika	Hodnota
Mez detekce [mg dm^{-3}]	0,700
Mez stanovitelnosti [mg dm^{-3}]	2,33
Citlivost [$\text{dm}^3 \text{mg}^{-1}$]	0,191
Opakovatelnost [%]	3,94
Korelační koeficient	1,00

4.2.5 Interferenční vliv vybraných iontů

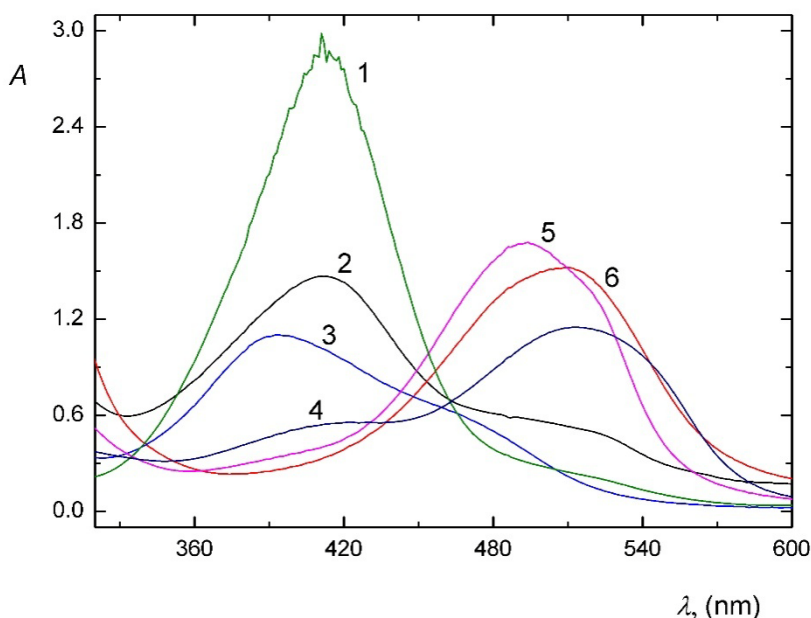
Po zoptimalizování měření olova komplexační reakcí 4-(2-pyridylazo)-resorcinolu a olovnatého kationtu v průtokovém uspořádání se spektrometrickou detekcí byl zkoumán vliv interference vybraných iontů. Příprava jednotlivých vzorků byla popsána v kap. 3.4. Výsledné hodnoty ploch pík S_A byly poděleny hodnotou plochy píku S_A vzorku, který obsahoval jen olovnaté ionty.



Obr. 4.9 Vliv interferentů na stanovení olova průtokovou metodou SIA

Z výsledků, které vyplývají z obr. 4.9, je zřejmé že nejvýraznější interferující vliv mají ionty zinku, mědi a manganu, které signál při 512 nm až dvojnásobně zvyšují oproti hodnotě signálu samotného olova, a naopak ionty hlinité a cíničité, které při 512 nm signál snižují. K zvýšení signálu dochází pravděpodobně následkem vzniku podobného komplexu daných ionů, jako tvoří olovnaté ionty s vybarvovacím činidlem PAR, tento předpoklad potvrzuje i to, že se jedná o dvojmocné ionty stejně jako v případě olova. Navíc množství přítomného vybarvovacího činidla je ve stechiometrickém nadbytku. Na druhé straně ionty hlinité a cíničité dvojmocné nejsou, takže pravděpodobně vytvářejí komplex s jinou strukturou.

Pro přesnější představu o chování jednotlivých interferentů byla ve statickém uspořádání změřena spektra vzorků, které obsahovaly vybarvovací činidlo PAR o koncentraci $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$, Tris HCl pufr o koncentraci $0,2 \text{ mol dm}^{-3}$ a pH 9,5 a příslušný interferující ion. Obr. 4.10 zobrazuje spektra výše diskutovaných nejvýznamnějších interferentů, včetně spektra slepého vzorku a vzorku olova. Koncentrace jednotlivých iontů odpovídají koncentracím použitým pro předchozí měření vlivu interferentův průtokovém uspořádání (tab. 3.1).



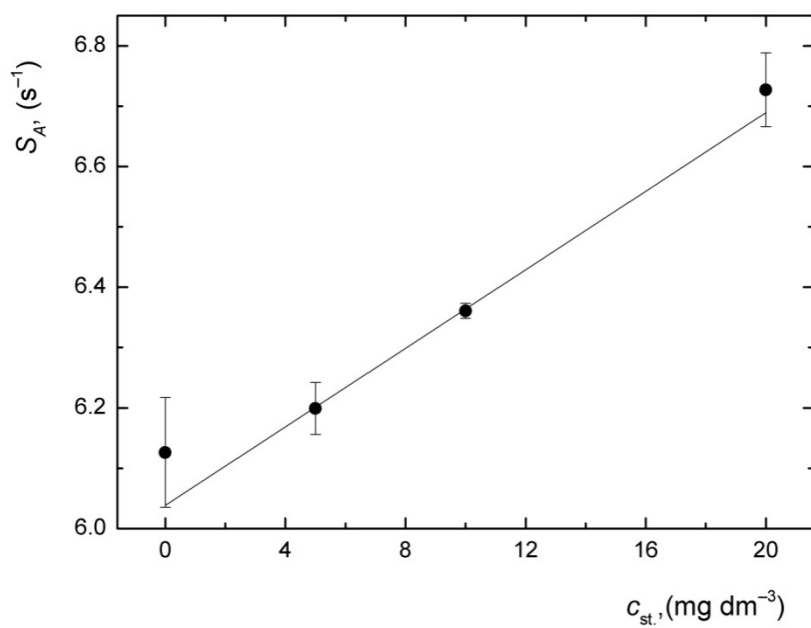
Obr. 4.10 Spektra jednotlivých interferentů měřena ve statickém uspořádání. 1 – Slepý vzorek, 2 – Al^{3+} 100 mg dm^{-3} , 3 – Sn^{4+} 100 mg dm^{-3} , 4 – Pb^{2+} 10 mg dm^{-3} , 5 – Zn^{2+} 100 mg dm^{-3} , 6 – Cu^{2+} 100 mg dm^{-3} , $c_{\text{PAR}} = 0,1 \text{ mmol dm}^{-3}$; pH 9,5 $c_{\text{Tris}} = 0,2 \text{ mol dm}^{-3}$

Z výsledků lze předpokládat, že ionty zinečnaté a měďnaté vytvářejí komplex s absorpčním maximem blízkým vlnové délce 512 nm se stechiometrií 2:1. Ionty cíničité a hlinité komplex s vybarvovacím činidlem také vytvářejí, ale vzhledem ke stechiometrii má tento komplex jinou strukturu. Ionty hlinité nejspíše vytvářejí komplex se třemi molekulami vybarvovacího činidla a ionty cíničité se čtyřmi. Což potvrzuje skutečnost, že množství nezreagovaného vybarvovacího činidla je při stejné koncentraci obou iontů pro ionty cíničité nižší než pro ionty hlinité.

4.2.6 Stanovení olova ve vzorku

Na závěr byl připraven vzorek olova s příměsí různých interferentů jehož přípravu popisuje tab. 3.2. Tento vzorek byl brán jako reálný vzorek odpadní vody, ve kterém byla stanovena koncentrace olova v průtokovém uspořádání. Změřený signál vzorku byl standardně vyhodnocen a koncentrace byla vypočítána z kalibrační křivky zobrazené na obr. 4.8. Takto stanovená hodnota koncentrace olova ve vzorku byla $46,863 \text{ mg dm}^{-3}$. Skutečná koncentrace vzorku činila $10,0 \text{ mg dm}^{-3}$. Vzhledem k tak velkému rozdílu mezi skutečnou a stanovenou hodnotou byla pro určení koncentrace olova ve vzorku využita metoda standardního přídávku.

Pro měření byla připravena sada 4 roztoků s přídávky olova od 0 do 20 mg dm^{-3} . Tyto roztoky byly za optimalizovaných podmínek změřeny a z výsledných ploch jednotlivých píků S_A byla sestavena závislost plochy píku S_A na koncentraci standardního přídávku. Z rovnice přímky byla stanovena hodnota koncentrace olova ve vzorku $13,924 \text{ mg dm}^{-3}$. Rozdíl mezi stanovenou a skutečnou hodnotou koncentrace olova ve vzorku byl nejpravděpodobněji zapříčiněn velkým množstvím interferentů ve vzorku. Z toho vyplývá, že před samotným stanovením je vhodné tyto interferenty z matrice vzorku odseparovat.



Obr. 4.11 Závislost plochy píku S_A na koncentraci standardního přídatku c_{st} ,
 $c_{PAR} = 0,1\ mmol\ dm^{-3}$; $c_{Tris} = 0,2\ mol\ dm^{-3}$; pH 9,5

5 Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo vypracování průtokové metody stanovení olova pomocí reakce olovnatého kationtu s 4-(2-pyridylazo)-resorcinolem v prostředí Tris HCl pufru. Nejdříve bylo stanovení provedeno spektrofotometricky ve statickém uspořádání, a následně byla metoda převedena do průtokového uspořádání sekvenční injekční analýzy. Hlavním cílem obou stanovení byla optimalizace metody, sestavení kalibrační závislosti a stanovení základních charakteristik. Dále byla provedena interferenční studie a měření koncentrace olova v neznámém vzorku.

Jako první bylo provedeno stanovení pomocí molekulové absorpční spektrometrie ve statickém uspořádání. Byly provedeny optimalizace vybarvovacího činidla PAR a pH. Po sestavení závislosti absorbance na koncentraci vybarvovacího činidla byla vypočítána citlivost stanovení, ta odpovídala koncentraci $0,05 \text{ mmol dm}^{-3}$. Jako optimální pH byla určena hodnota 9,5, přestože měření prokázalo, že v zásadité oblasti v které reakce probíhá, již změna pH nemá zásadní vliv na citlivost stanovení. Po optimalizaci byla sestavena kalibrační závislost a byly stanoveny základní charakteristiky stanovení. Mez detekce činila $0,0258 \text{ mg dm}^{-3}$ a citlivost stanovení činila $0,0980 \text{ dm}^3 \text{ mg}^{-1}$.

Dále bylo provedeno stanovení pomocí sekvenční injekční analýzy. Pro toto stanovení byla opět optimalizovaná hodnota koncentrace vybarvovacího činidla, a dále byl optimalizován dávkovací objem vybarvovacího činidla a vzorku. Vzhledem k předchozím výsledkům optimalizace pH, bylo od této optimalizace upuštěno. Jako optimální koncentrace vybarvovacího činidla byla stanovena hodnota $0,1 \text{ mmol dm}^{-3}$ a jako optimální dávkovací objem byla stanovena hodnota $200 \mu\text{l}$ pro oba roztoky reakce. Stejně jako u předcházející metody byla sestavena kalibrační křivka a stanoveny charakteristiky stanovení. Mez detekce činila $0,700 \text{ mg dm}^{-3}$ a citlivost stanovení činila $0,191 \text{ dm}^3 \text{ mg}^{-1}$.

Po optimalizaci obou metod byla provedena interferenční studie. Zkoumán byl vliv běžných interferujících iontů. Nejvýznamnější interferenční vliv byl pozorován hlavně pro ionty kovů (Cu^{2+} , Zn^{2+} , Sn^{4+}), které také vytvářejí s 4-(2-pyridylazo)-resorcinolem barevný komplex. Naopak téměř nulový či nízký interferující vliv byl pozorován u barya a draslíku.

Na závěr bylo provedeno měření koncentrace olova v modelovém vzorku. Skutečná koncentrace olova v tomto vzorku byla 10 mg dm^{-3} . Nejdříve byla pro výpočet použita kalibrační křivka sestavená v předchozím měření (Obr. 4.8). Pomocí této kalibrační závislosti byla koncentrace olova ve vzorku stanovena jako $46,863 \text{ mg dm}^{-3}$. Rozdíl mezi těmito hodnotami byl tak značný, že byla pro stanovení koncentrace olova ve vzorku zvolena metoda standardního přídávku. Hodnota koncentrace olova ve vzorku stanovena touto metodou činila $13,924 \text{ mg dm}^{-3}$. V tomto případě se dá rozdíl mezi stanovenou a skutečnou hodnotou přičíst přítomnosti interferentů, což poukazuje na potřebu separace před stanovením.

6 Bibliografie

- [1] Rahman, I. M. M.; Furusho, Y.; Begum, Z. A.; Sato, R.; Okumura, H.; Honda, H.; Hasegawa, H.: Determination of lead in solution by solid phase extraction, elution and spectrophotometric detection using 4-(2-pyridylazo)-resorcinol. *Central European Journal of Chemistry* **11**:5, 672–678 (2013).
- [2] Remy, H.: *Anorganická chemie I. díl*. Praha, Nakladatelství technické literatury 1972.
- [3] Kafka, Z.; Punčochářová, J.: Těžké kovy v přírodě a jejich toxicita. *Chem. Listy* **96**, 611–617 (2002).
- [4] Greenwood, N. N.; Earnshaw, A.: *Chemistry of the elements*. Oxford, Butterworth Heinemann 1997.
- [5] Lukeš, I.: *Systematická anorganická chemie*. Praha, Nakladatelství Karolinum 2009.
- [6] Doc. MUDr. Milena Černá, DrSc.: *Zátěž populace toxickými látkami z prostředí*. Dostupné z URL: <<http://zdravi.e15.cz/clanek/postgradualni-medicina/zatez-populace-toxickymi-latkami-z-prostredi-144069>> [cit. 12. 9. 2015]
- [7] Gidlow, D. A.: Lead toxicity. *Occupational Medicine* **65**, 348–356 (2015).
- [8] Kubáň, V.; Bulawa, R.: The FIA determination of lead with 4-(2-pyridylazo)-resorcinol after preconcentration on a microcolumn of a chelating sorbet. *Department of Analytical Collect. Czech. Chem. Commun.* **54**, 2674–2682 (1989).
- [9] Bale, N. B.; Dave, D. P.; Sawant, A. D.: Extraction and spectrophotometric determination of lead (II) with pyridine-2-acetaldehyde salicyloylhydrazone. *Talanta* **42**:9, 1291–1296 (1995).
- [10] Ruengsitagoon, W.; Chisvert, A.; Liawtuangrath S.: Flow injection spectrophotometric determination of lead using 1,5-diphenylthiocarbazone in aqueous micellar. *Talanta* **81**, 709–713 (2010).
- [11] Khan, H.; Ahmed, M. J.; Bhangar, M. I.: A rapid spectrophotometric method for the determination of trace level lead using 1,5-diphenylthiocarbazone in aqueous micellar solutions. *Analytical sciences* **23**:2, 193–199 (2007).
- [12] Opekar, F.; Jelínek, I.; Rychlovský, P.; Plzák, Z.: *Základní analytická chemie*. Praha, Nakladatelství Karolinum 2010.

- [13] Amador-Hernández, J.; Velázquez-Manznanares, M.; Rosado, R. E.; Altamirano-Pérez, S. C.: Determination of Lead at Trace Level Through Cloud Point Extraction and Atomic Absorption Spectrometry with Electrothermal Atomization: An Environmentally Benign Methodology. *Analytical Letters* **46**:15, 2421–2429 (2013).
- [14] Acar, O.: Evaluation of cadmium, lead, copper, iron and zinc in Turkish dietary vegetable oils and olives using electrothermal and flame atomic absorption spectrometry. *Grasas y aceites* **63**:4, 383–393 (2012).
- [15] Bakircioglu, D.; Kurtulus, Y. B.; Uçar, G.: Determination of Metal Ions in Water and Tea Samples by Flame AAS after Preconcentration Using Sorghum in Nature Form and Chemically Activated. *Journal of Analytical Chemistry* **69**:5, 420–425 (2014).
- [16] de Souza, A. O.; Pereira, C. C.; Jado, B. M.; Oreste, E. Q.; Vieira, M. A.; Ribeiro, A. S.; Vendruscolo, C. T.; Nunes, A. M.: Determination of Cd and Pb in xanthan gum samples by GF AAS. *Quimica Nova* **38**, 209–213 (2015).
- [17] Trujillo, I. S., Garcia de Torres, A., Vereda Alonso, E. I., Cano Pavon, J. M.: Sequential determination of Pb, Cd and Hg by flow injection-chemical vapor generation-inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **28**:11, 1772–1780 (2013)
- [18] Němcová, I.; Čermáková, L.; Rychlovský, P.: *Spektrometrické analytické metody I*. Praha, Nakladatelství Karolinum 2004
- [19] Růžička, J.; Hasen, E. H.: Flow injection analysis. *Analytical Chemistry* **72**, 212A–217A (2000).
- [20] Paseková, H.; Polášek, M.; Solich, P.: Sekvenční injekční analýza. *Chem. Listy* **93**, 354–359 (1999).
- [21] Economou, A.; Tzanavaras, P. D.; Themelis, D. G.: Sequential-injection analysis: Principles, instrument construction, and demonstration by a simple experiment. *Journal of chemical education* **82**, 1820–1822 (2005).
- [22] Solich, P.; Polášek, M.; Klimundová, J.; Růžička, J.: Sequential injection technique applied to pharmaceutical analysis. *Trac-Trends in Analytical Chemistry* **23**, 116–126 (2004).