

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

**Katedra analytické chemie**

---

OPTIMALIZACE EXPERIMENTÁLNÍCH PODMÍNEK  
SPEKTROFOTOMETRICKÉHO STANOVENÍ  
OBSAHU Cr(VI) a Cr(III)

Bakalářská práce  
studijního programu Klinická a toxikologická analýza

Praha 2008

Marcela Rybínová

Tato bakalářská práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MSM0021620857.

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou 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 25. května 2008.

## Poděkování

Na tomto místě bych velice ráda poděkovala školiteli Doc. RNDr. Petru Rychlovskému, CSc. a Mgr. Václavu Červenému za odborné vedení, rady, připomínky a v neposlední řadě za jejich ochotu a trpělivost.

## Seznam zkratk a symbolů

|                                  |   |
|----------------------------------|---|
| A                                | absorbance  |
| CAS                              | chromazurol S   |
| Cr(III)-CAS                      | binární komplex Cr(III) a CAS   |
| Cr(VI)-DFK                       | binární komplex Cr(VI) a DFK  |
| c                                | molární koncentrace [ $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ]   |
| $c'$                             | rychlost světla ve vakuu [ $3\cdot 10^{10} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ ]                                    |
| cm                               | centimetr   |
| DFK                              | difenylkarbazid   |
| $E_0$                            | energie základního elektronového stavu [J]  |
| $E_1$                            | energie excitovaného stavu [J]  |
| $\Delta E$                       | absorbovaná energie [J]   |
| $E_e$                            | základní elektronová energie [J]  |
| $E_r$                            | rotační energie [J]   |
| $E_v$                            | vibrační energie [J]  |
| g                                | gram  |
| h                                | Planckova konstanta [ $6,62607\cdot 10^{-34} \text{ J}\cdot\text{s}$ ]  |
| J                                | Joule   |
| l                                | tloušťka absorpční vrstvy [cm]  |
| mm                               | milimetr  |
| mol                              | mol   |
| $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  | moly na decimetr krychlový  |
| $\text{mg}\cdot\text{m}^{-3}$    | mikrogramy na metr krychlový  |
| min                              | minuta  |
| ml                               | mililitr  |
| Mr                               | relativní molekulová hmotnost   |
| NPK-P                            | Nejvyšší přípustná koncentrace [ $\text{mg}\cdot\text{m}^{-3}$ ]  |
| nm                               | nanometr  |
| PEL                              | Přípustný expoziční limit [ $\text{mg}\cdot\text{m}^{-3}$ ]   |
| ppm                              | parts per million; 1 ppm = 1 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$   |
| s                                | sekunda   |
| t                                | čas [min]   |
| T                                | teplota [ $^{\circ}\text{C}$ ]  |
| $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ | mikrogramy na mililitr  |
| $\nu$                            | frekvence záření [Hz]   |
| $\lambda$                        | vlnová délka [nm]   |
| $\tau$                           | propustnost (transmittance)   |
| $^{\circ}\text{C}$               | stupeň Celsia   |
| $\sigma$                         | směrodatná odchylka   |
| $\epsilon_{\lambda}$             | molární absorpční koeficient při vlnové délce $\lambda$ [ $\text{l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ] |
| $\Phi$                           | zářivý tok vystupující  |
| $\Phi_A$                         | absorbovaný zářivý tok  |
| $\Phi_0$                         | vstupující tok záření   |

# OBSAH

|  |    |
|--|----|
| 1 ÚVOD.....  | 6  |
| 2 TEORETICKÁ ČÁST.....   | 7  |
| 2.1 Chrom.....   | 7  |
| 2.1.1 Základní charakteristika.....                                    | 7  |
| 2.1.2 Dopady na zdraví člověka.....                                    | 7  |
| 2.1.3 Zdroje emisí.....  | 8  |
| 2.1.4 Dopady na životní prostředí.....                                 | 8  |
| 2.1.5 Způsoby stanovení.....   | 9  |
| 2.2 Molekulová absorpční spektrometrie ve viditelné oblasti.....       | 9  |
| 2.3 Spektrofotometrické stanovení Cr(III) a Cr(VI).....                | 12 |
| 2.3.1 Stanovení s chromazurolem S (CAS).....                           | 13 |
| 2.3.2 Stanovení s difenylkarbazidem (DFK).....                         | 13 |
| 2.4 Hodnocení výsledků měření.....                                     | 14 |
| 2.4.1 Kalibrace a lineární regrese.....                                | 14 |
| 2.4.2 Mez detekce a mez stanovitelnosti, opakovatelnost.....           | 15 |
| 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....   | 16 |
| 3.1 Přístroje.....   | 16 |
| 3.2 Použité chemikálie.....  | 16 |
| 3.3 Postup měření.....   | 17 |
| 4 VÝSLEDKY MĚŘENÍ A DISKUZE.....                                       | 18 |
| 4.1 Optimalizace podmínek spektrofotometrického stanovení Cr(III)..... | 18 |
| 4.1.1 Proměření spekter roztoků samotného Cr(III) a CAS.....           | 18 |
| 4.1.2 Vliv pH.....   | 20 |
| 4.1.3 Vliv nadbytku činidla CAS.....                                   | 20 |
| 4.1.4 Vliv teploty a času.....   | 21 |
| 4.1.5 Kalibrační závislost.....  | 24 |
| 4.1.6 Mez detekce a mez stanovitelnosti, opakovatelnost.....           | 25 |
| 4.1.7 Vliv Cr(VI) na stanovení Cr(III).....                            | 26 |
| 4.2 Optimalizace podmínek spektrofotometrického stanovení Cr(VI).....  | 27 |
| 4.2.1 Proměření spekter roztoků samotného Cr(VI) a DFK.....            | 27 |
| 4.2.2 Výběr vhodné kyseliny.....                                       | 28 |
| 4.2.3 Vliv koncentrace HCl.....  | 28 |
| 4.2.4 Vliv nadbytku činidla DFK.....                                   | 29 |
| 4.2.5 Kalibrační závislost.....  | 30 |
| 4.2.6 Mez detekce, mez stanovitelnosti a opakovatelnost.....           | 33 |
| 4.2.7 Vliv Cr(III) na stanovení Cr(VI).....                            | 33 |
| 5 ZÁVĚR.....   | 35 |
| 6 SOUPIS BIBLIOGRAFICKÝCH CITACÍ.....                                  | 36 |

# 1 ÚVOD

Cílem bakalářské práce bylo optimalizovat experimentální podmínky pro spektrofotometrické stanovení obsahu Cr(III) a Cr(VI) ve vzorcích výluhů polétavého prachu.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Chrom

#### 2.1.1 Základní charakteristika

Chrom se vyskytuje v několika chemických podobách s oxidačními čísly pohybujícími se od nuly (volný chrom) do šesti (chromany a dichromany). Pouze jeho trojmocné (Cr(III)) a šestimocné (Cr(VI)) formy jsou dostatečně stálé, aby bylo možné nalézt je ve složkách životního prostředí [1]. Toxicita obou forem se značně liší. Cr(VI) je asi 100 - 1000krát toxičtější než Cr(III) [2]. Cr(III) v malých koncentracích patří mezi esenciální stopové prvky zúčastněné v metabolismu savců. Jako součást GTF (glucose tolerance factor) zvyšuje účinnost inzulínu a reguluje tak metabolismus glukózy, cholesterolu a tuků. Nedostatek chromu může vyvolat únavu, stres, úbytek váhy, snížení schopnosti těla odstraňovat glukózu z krve [3].

#### 2.1.2 Dopady na zdraví člověka

Sloučeniny Cr(III) vyvolávají pouze u velmi citlivých osob místní podráždění kůže. Rozpustné sloučeniny Cr(VI) jsou svým místním účinkem daleko nebezpečnější, důležitou úlohu přitom hraje pravděpodobně jejich účinek oxidační [4].

Inhalace prachů obsahujících Cr(VI) sloučeniny vyvolává astmatické potíže; po požití působí na počátku leptavě na gastrointestinální trakt, následovat může šok nebo až smrt. Dochází současně k poškození ledvin (nephrotoxicita) a jater (hepatotoxicita). Dlouhodobé profesionální působení Cr(VI) se projevuje leptavým účinkem na kůži a sliznici (proděravění nosní přepážky), tvorbou vředů a nádorů (dutiny nosní, plic a zažívacího traktu).

Významným antidotem je kyselina askorbová (vitamin C, který sloučeniny Cr(VI) redukcí převádí na netoxické sloučeniny Cr(II) a Cr(III)) [5].

### 2.1.3 Zdroje emisí

Chrom se dostává do ovzduší ve velkém množství v prachových částicích při spalování fosilních paliv (ve stavu Cr(III)). Dalšími zdroji chromu jsou cementárny (cement obsahuje chrom), spalovny komunálních odpadů, výfukové plyny z automobilů s katalyzátorem, emise z klimatizačních chladících věží používajících sloučeniny chromu jako inhibitory koroze a polétavý azbest z opotřebovaných brzdových obložení automobilů (azbest obsahuje chrom). Atmosférickou depozicí se chrom dostává do ostatních složek životního prostředí.

Antropogenním zdrojem chromu ve vodách jsou odpadní vody z barvené metalurgie, povrchové úpravy kovů, kožedělného a textilního průmyslu, kde jsou součástí některých barvicích lázní. Dalším zdrojem jsou některé inhibitory koroze používané v chladicích okruzích, při rozvodu teplé vody nebo při čištění koltů. Značné koncentrace lze nalézt ve vodách z hydraulické dopravy popílků.

Chrom může unikat do půdy či podzemní vody i ze špatně zabezpečených skládek. Může se také uvolňovat do prostředí při nakládání s odpady s obsahem chromu (komunální odpad, odpadní kaly, odpady z pokovování a zpracování chromu).

### 2.1.4 Dopady na životní prostředí

Chrom je v nízké koncentraci přítomen ve všech typech půd a dále v sopečném prachu a plynech. Všechny chrom přírodního původu je ve stavu Cr(III). Cr(III) se silně váže na záporně nabitě půdní částice, 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 přítomno pouze 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, proto se nesorbuje na půdní částice a je mnohem mobilnější. Cr(VI) je však zároveň velmi silné oxidační činidlo, 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 Cr(VI) redukuje velmi rychle. Chrom se nehromadí v potravních řetězcích.

V ovzduší je chrom vázán na prachové částice. Průměrná doba setrvání v atmosféře je deset dní, poté suchou nebo mokrou depozicí přechází do vody nebo půdy [6].

Expoziční limity pro Cr v ovzduší pracovišť dle nařízení vlády č. 178/2001 Sb. jsou:

pro sloučeniny Cr(VI): PEL = 0,05 mg.m<sup>-3</sup>, NPK-P = 0,1 mg.m<sup>-3</sup>

pro ostatní sloučeniny Cr: PEL = 0,5 mg.m<sup>-3</sup>, NPK-P = 1,5 mg.m<sup>-3</sup> [7].

### 2.1.5 Způsoby stanovení

Koncentrace chromu ve vodných roztocích se nejčastěji stanovuje pomocí atomové absorpční spektrometrie [8]. Jinou možností je spektrofotometrické stanovení [9], na které je zaměřena i tato práce. Dalšími metodami jsou např. kapalinová chromatografie [10], spektrofluorimetrie [11], sekvenční injekční analýza [1], průtoková injekční analýza [12] a jiné.

## 2.2 Molekulová absorpční spektrometrie ve viditelné oblasti

Spektrofotometrie v ultrafialové a viditelné oblasti spektra navazuje vývojově na klasickou kolorimetrii a je tudíž nejstarší fyzikálně chemickou metodou, a to nejen ve skupině optických metod. Své pevné postavení v systému analytických instrumentálních metod si udržuje především díky své jednoduchosti jak v přípravě vzorků, tak v konečném měření absorpce [13].

Absorpční spektrofotometrie spočívá v interakci měřeného vzorku s elektromagnetickým zářením o vhodné vlnové délce. U spektrofotometrie ve viditelné oblasti se využívá záření v rozsahu vlnových délek 380 až 770 nm.

Za normálních podmínek se molekula látky nachází v základním elektronovém stavu  $E_0$  a její energie je rovna součtu základní elektronové  $E_e$ , vibrační  $E_v$  a rotační  $E_r$  energii:

$$E_0 = E_e + E_v + E_r \quad (1)$$

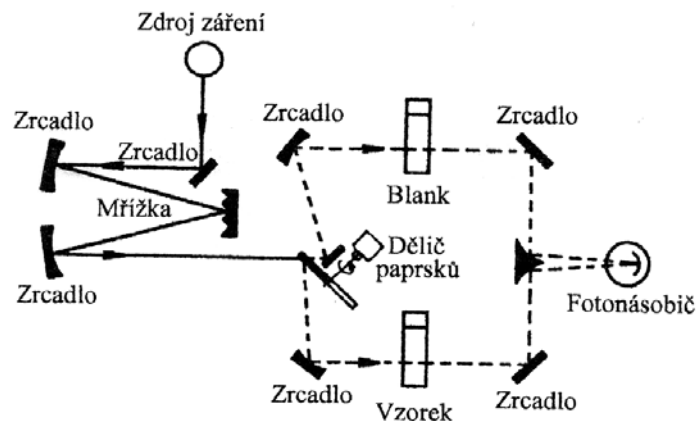
Pohlcením kvanta fotonů záření z viditelné oblasti elektromagnetického spektra přechází molekula do excitovaného stavu. Její setrvání v tomto energeticky bohatším stavu je krátké (řádově  $10^{-9}$  s) a přechází různými neexcitačními přechody (zářivými i nezářivými) za předání energie zpět do základního stavu. Tím je v absorbujícím systému udržována rovnováha odpovídající přebytku molekul v základním energetickém stavu.

Absorbovaná energie, která je rovna rozdílu energie stavu excitovaného  $E_1$  a energie stavu základního  $E_0$ ,  $\Delta E$ , musí být rovna přijatému kvantu záření v soulase s rovnicí:

$$\Delta E = E_1 - E_0 = h\nu = h \frac{c'}{\lambda} = \Delta E_e + \Delta E_v + \Delta E_r \quad (2)$$

kde  $h$  je Planckova konstanta [ $6,62607 \cdot 10^{-34}$  J.s],  $\nu$  je frekvence záření [Hz],  $\lambda$  je vlnová délka záření [nm] a  $c'$  je rychlost světla ve vakuu [ $3 \cdot 10^{10}$  cm.s<sup>-1</sup>].

Absorpci záření lze měřit na přístrojích, které se nazývají absorpční spektrofotometry. Základní prvky spektrofotometrů mohou být uspořádány způsobem jednopaprskovým nebo dvoupaprskovým. V této práci byl používán spektrofotometr dvoupaprskový (Obr. 2.1). U dvoupaprskových spektrofotometrů je paprsek po výstupu z monochromátoru směřován rotujícím půlkruhovým zrcadlem střídavě do měrné a srovnávací kyvety (u jednopaprskových spektrofotometrů prochází záření ze zdroje nejprve kyvetou obsahující srovnávací vzorek, která je po změření fotoelektrického proudu nahrazena kyvetou se vzorkem). Po výstupu z kyvet jsou oba paprsky pomocí zrcadel spojeny do paprsku společného, který dopadá na detektor s dostatečně rychlou odezvou. Vzniká střídavý proud, odpovídající poměru toků  $\Phi/\Phi_0$  [14].



**Obr. 2.1** Schéma dvoupráskového spektrofotometru

Při absorpčním měření je tedy ze vstupujícího toku záření  $\Phi_0$  část absorbována vzorkem (absorbovaný zářivý tok  $\Phi_A$ ) a v ideálním případě zbytek projde a je zaznamenán jako vystupující zářivý tok  $\Phi$ . Podíl zářivých toků se nazývá propustnost neboli transmittance. Na většině spektrofotometrů lze také odečíst hodnotu absorbance  $A$ , tj. záporně vzatý logaritmus propustnosti:

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

kde  $\tau$  je transmittance,  $\Phi_0$  je zářivý tok vstupující,  $\Phi$  je zářivý tok vystupující.

Těžiště aplikací absorpční spektrofotometre ve viditelné oblasti světla je v kvantitativní analýze, která je založena na *Lambertově-Beerově zákoně* [15]:

$$A = \epsilon_\lambda c l \quad (4)$$

kde  $\epsilon_\lambda$  je molární absorpční koeficient při dané vlnové délce  $\lambda$  [ $\text{l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ],  $c$  molární koncentrace [ $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3} = \text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ] a  $l$  tloušťka absorpční vrstvy [cm].

## 2.3 Spektrofotometrické stanovení Cr(III) a Cr(VI)

Molekulová absorpční spektrometrie ve viditelné oblasti spektra je využívána ke stanovení kovů, kationů či anionů. Absorpce většiny kationů je příliš slabá, proto jsou kationy převáděny komplexotvornými reakcemi na barevné komplexy, které jsou lépe spektrofotometricky stanovovány. Obzvláště významné jsou chelátové komplexy, jelikož mají vysoké konstanty stability a vysoké hodnoty molárních absorpčních koeficientů [16].

V komplexech kovů dochází k elektronovým přechodům v rámci centrálního iontu kovu (d-d, f-f přechody) a tudíž ke štěpení d a f podhladin centrálního atomu v komplexu vlivem elektrostatického pole ligandu a následné excitaci. Mohou také nastat přechody v rámci ligandu vázaného do komplexu, při nichž vznikají velmi intenzivní absorpční pásy v důsledku přechodů  $\pi-\pi^*$  a  $n-\pi^*$  v rámci ligandu. Posledním přechodem může být Charge-transfer přechod, kde dochází k excitaci elektronu z orbitalu atomu s velkou elektronovou hustotou do orbitalu jiného atomu s menší elektronovou hustotou (L-M nebo M-L) [17].

V případě iontů Cr(III) je jako komplexotvorné činidlo nejčastěji využíván chelaton 3; dosud nejcitlivější je metoda s chromazurolem S (CAS) [18, 19]. Reakce s CAS byla pro svou citlivost využívána i v této práci. Obdobně jako s chelatonem 3 a s CAS probíhá reakce iontů chromitých s eriochromcyaninem R, xylenovou oranží a thorinem [20]. Vypracovány byly i další postupy, mezi které patří např. reakce s 2-(5-bromo-2-pyridylazo)-5-dimethylaminofenolem urychlená použitím dodecyl sulfátu sodného (SDS) [21], reakce s kyselinou pyridin-2,6-dikarbonovou, kyselinou pyridin-2,4,6-trikarbonovou, s azidem, kyselinou malonovou, s rhodanidy a s kyanoželezitany, poměrně nejcitlivější stanovení ještě představuje reakce s alizarinem S [18].

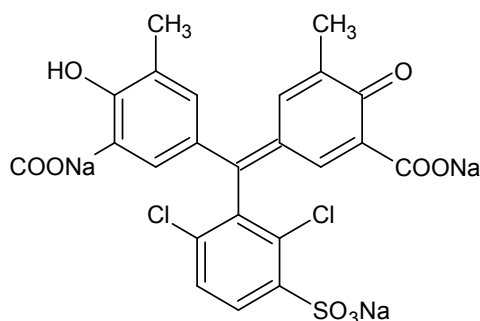
Nejpoužívanějším a také nejcitlivějším postupem na stanovení Cr(VI) je reakce  $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$  s difenylkarbazidem (DFK). Díky své citlivosti je zmíněné činidlo používáno i v této práci. K dalším metodám stanovení Cr(VI) je možno zařadit reakce s 1,4,8,11-tetraazacyclotetradecanem [22], s o-nitrophenylfluoronem (NPF) [23] a další.

### 2.3.1 Stanovení s chromazuolem S (CAS)

Reakce Cr(III) s vysoce barevným činidlem CAS (Obr.2.2) probíhá při laboratorní teplotě 2 – 4 dny, zatímco ve vroucí vodní lázni se červenofialové zabarvení tvoří během třiceti minut. Tato skutečnost je způsobena značnou hydratací chromitých iontů ve vodném prostředí, takže k reakci s chelátotvorným činidlem dochází po uvolnění vázaných molekul vody. Toho lze dosáhnout dodáním energie ve formě tepla [20].

Činidlo samo je zabarveno červeně a je proto výhodné provádět vlastní měření v maximu diferenční křivky při 570 – 590 nm. Stanovení se provádí v prostředí acetátového pufru při pH 3,6. Roztoky již vybarveného chalu, právě tak jako samotného činidla, jsou značně stálé, jejich extinkce se nemění po několik dnů. Metodou je možno stanovit 0,004 – 0,4 ppm ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) Cr(III) [18]. Jiný zdroj [24] uvádí možnost stanovení Cr(III) do 1 ppm.

Stanovení lze uskutečnit za přítomnosti některých prvků (2 000 násobku: K, Na, Li, Mg, Ca, Sr, Ba, Cd,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ; 1 500 násobku: As(III),  $\text{Br}^-$ ; 500 násobku: Ni,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{I}^-$ ; 250 násobku: Pb, Mn, Co; 50 násobku: Zn, Ag), jiné prvky (Cu, Hg(II), Al, Sn(IV), Sb(III), Bi, Fe(III), As(V),  $\text{MoO}_4^{2-}$ ) ruší [18].



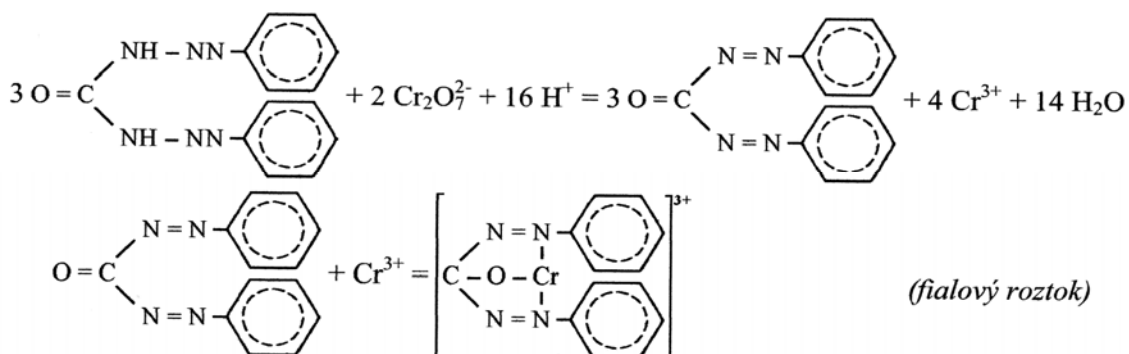
**Obr. 2.2** Chromazurol S

(CAS = trojsodná sůl kyseliny 3''-sulfo-2'',6''-dichloro-3,3'-dimethyl-4-hydroxy-fuchson-5,5'-dikarboxylové)

### 2.3.2 Stanovení s difenylkarbazidem (DFK)

Selektivní a citlivé stanovení Cr(VI) umožňuje postup založený na reakci Cr(VI) s difenylkarbazidem (DFK) a následnou fotometrickou detekcí. DFK tvoří s chromany

v kyselém prostředí fialově zbarvený komplex. V průběhu reakce chroman nejprve reaguje s DFK za vzniku Cr(III) a difenylkarbazonu. Následně oba reakční produkty poskytují barevný komplex (Obr. 2.3) [25]:



**Obr. 2.3** Princip tvorby barevného komplexu iontů Cr(VI) s DFK

Reakce probíhá v prostředí minerální kyseliny s maximem absorpce při 540 nm nebo při velice blízkých hodnotách, pH roztoku nemá přesáhnout hodnotu 2,0. Maximálního vybarvení reakce se dosahuje asi během jedné minuty, a to i při značném až stonásobném nadbytku činidla; při laboratorní teplotě je pak zabarvení nejméně třicet minut stálé. Metodou je možno stanovit 0,5 – 1,5 ppm Cr i méně.

Zabarvení rozrušují všechna oxidační činidla, k nimž se dále řadí  $\text{H}_2\text{O}_2$  i další peroxidy,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{Br}_2$ ,  $\text{Fe(III)}$ ,  $\text{VO}_3^-$  apod. Stanovení je dále rušeno barevnými ionty (Cu, Co, platinové kovy); v přítomnosti  $\text{H}_3\text{PO}_4$  pak i kovy tvořícími nerozpustné fosforečnany (Zr, Pb, Bi, Au, Bi). Vliv  $\text{Fe(III)}$  se odstraňuje přísadou  $\text{H}_3\text{PO}_4$  nebo redukcí kyselinou askorbovou. Řada kovů (např. U, Th, Ni, Al, W, Mo, Ti, Ag, Hg) stanovení neruší [18].

## 2.4 Hodnocení výsledků měření

### 2.4.1 Kalibrace a lineární regrese

Kalibrační závislost (kalibrační křivka) je nejvhodnější a univerzální způsob určení koncentrace analytu. Kalibrace se provádí pomocí standardů se známým

obsahem analytu nebo pomocí referenčních materiálů se známým celkovým složením. Výsledky měření signálů (odezvy) standardů jsou zpracovány buď graficky jako závislost  $y = f(c)$ , nebo lineární regresi s použitím metody nejmenších čtverců, která umožňuje určení parametrů rovnice

$$y = a \cdot c + b \quad (5)$$

kde  $a$  je absorpční koeficient - konstanta charakteristická pro analyzovanou látku, konstanta  $b$  představuje signál slepého pokusu (blanku). Abychom dostali kalibrační křivku procházející počátkem, je měření nutno provádět proti slepému vzorku.

#### 2.4.2 Mez detekce a mez stanovitelnosti, opakovatelnost

*Mez detekce* je nejmenší koncentrace analytu ve vzorku, kterou můžeme danou analytickou metodou detegovat. Podle definice IUPAC je mez detekce koncentrace analytu, které odpovídá signál rovný trojnásobku směrodatné odchylky ( $3\sigma$ ) signálu nulového vzorku.

*Mez stanovitelnosti* je nejmenší koncentrace analytu ve vzorku, kterou můžeme danou analytickou metodou ještě stanovit s přijatelnou přesností. Podle definice IUPAC je mez stanovitelnosti koncentrace analytu, které odpovídá signál rovný desetinásobku směrodatné odchylky ( $10\sigma$ ) signálu nulového vzorku [18].

*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 [26].

## 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1 Přístroje

- Spektrofotometr Pye-Unicam PU 8800 (Philips-Unicam, UK) připojený k řídicímu počítači a ovládaný vytvořeným software (Labview, National Instruments, USA)
- Laboratorní pH metr pHM 82 (Radiometr, Dánsko) s kombinovanou skleněnou elektrodou, nakalibrovaný standardními kalibračními roztoky o pH 7 a 4
- Křemenné kyvety s tloušťkou absorpční vrstvy 10 mm
- Deionizátor vody Mili Q<sub>Plus</sub> (Milipore, USA)

### 3.2 Použité chemikálie

- Dichroman draselný ( $K_2Cr_2O_7$ ;  $M_r = 294,18$ ; Lachema, Brno)
  - Zásobní roztok o koncentraci  $1000 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  - 1,41433 g rozpuštěno v deionizované vodě a doplněno po rysku na celkový objem 500 ml.
- Standardní roztok Cr(III) o koncentraci  $1000 \pm 0,002 \text{ g}$  (Solution for atomic spectrometry; Aldrich, USA)
- Difenylkarbazid ( $C_{13}H_{14}N_4O$ ;  $M_r = 242,29$ ; Lachema, Brno)
  - Zásobní roztok o koncentraci  $1 \cdot 10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  - 0,6057 g rozpuštěno v methanolu a doplněno po rysku na celkový objem 250 ml. Roztok byl skladován v chladu a chráněn před světlem.
- Chromazurol S ( $C_{23}H_{13}Cl_2Na_3O_9S$ ;  $M_r = 605,29$ ; Standard Fluka, Švýcarsko)
  - Zásobní roztok o koncentraci  $1 \cdot 10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  - 1,5132 g rozpuštěno v deionizované vodě a doplněno po rysku na celkový objem 250 ml
- Pufr o pH = 3,6 připravený smísením kyselé a zásadité složky
  - Kyselá složka: standardní Britton-Robinson pufr ( $4 \cdot 10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3} H_3PO_4$ ,  $4 \cdot 10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3} CH_3OOH$  a  $4 \cdot 10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3} H_3BO_3$ ), pH = 1,81
  - Zásaditá složka ( $2 \cdot 10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3} NaOH$ )



- Kyselina chlorovodíková 37% (HCl;  $M_r = 36,46$ ; Merck, Německo)
- Kyselina sírová 96% (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>;  $M_r = 98,08$ ; Merck, Německo)
- Kyselina dusičná 65% (HNO<sub>3</sub>;  $M_r = 63,01$ ; Merck, Německo)
- Methanol (CH<sub>3</sub>OH;  $M_r = 32,04$ ; Lachema, Brno)
- Deionizovaná voda

### 3.3 Postup měření

Roztoky pro měření připravené rozředěním zásobních roztoků na požadované koncentrace byly vždy připravovány do odměrných baněk o objemu 25 ml. U Cr(VI) se dle jednotlivých pokusů pipetovalo různé množství Cr(VI), komplexotvorného činidla DFK a HCl a roztoky byly po smísení složek doplněny deionizovanou vodou na celkový objem 25 ml. V případě stanovení Cr(III) byla ze zásobních roztoků pipetována příslušná množství Cr(III), činidla CAS a odměrné baňky poté byly doplněny po rysku pufrům o pH 3,6. Roztoky pro stanovení Cr(III) byly zahřívány. K postupům týkajících se konkrétních pokusů více v kapitole Výsledky měření a diskuze (od str. 18).

Samotná měření na spektrofotometru byla prováděna v křemenných kvetách s tloušťkou absorpční vrstvy 10 mm. Měření byla většinou uskutečněna proti slepým vzorkům (měřením tedy byly získány diferenční křivky). Nastavení parametrů přístroje je zobrazeno v Tab. 3.1.

**Tab. 3.1** Nastavené parametry spektrofotometru pro snímání spekter

|                                   |                                |
|-----------------------------------|--------------------------------|
| Nastavení spektrometru            | ANO                            |
| Vlnová délka [nm]                 | počáteční: 700<br>konečná: 400 |
| Rychlost snímání spektra [nm/s]   | 2                              |
| Šířka spektrálního intervalu [nm] | 1                              |
| Krok digitalizace spektra [nm]    | 2                              |
| Vynulování spektrometru           | ANO                            |
| Měření spekter                    | ANO                            |

## 4 VÝSLEDKY MĚŘENÍ A DISKUZE

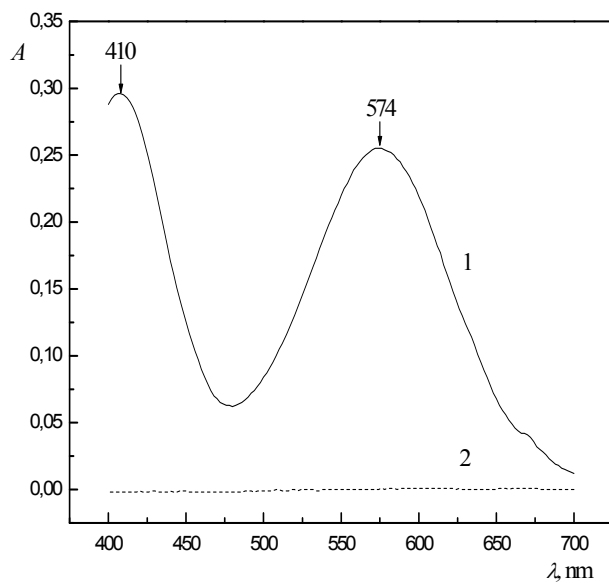
První část práce byla věnována optimalizaci podmínek spektrofotometrického stanovení Cr(III). Vybrána byla reakce s chromazurolem S (CAS). Druhá část byla zaměřena na výběr vhodných pracovních podmínek pro stanovení Cr(VI) reakcí s DFK. V obou případech byla hodnocena dosažená citlivost (velikost signálu absorbance) jako kritérium optimálních pracovních podmínek stanovení.

### 4.1 Optimalizace podmínek spektrofotometrického stanovení Cr(III)

#### 4.1.1 Proměření spekter roztoků samotného Cr(III) a CAS

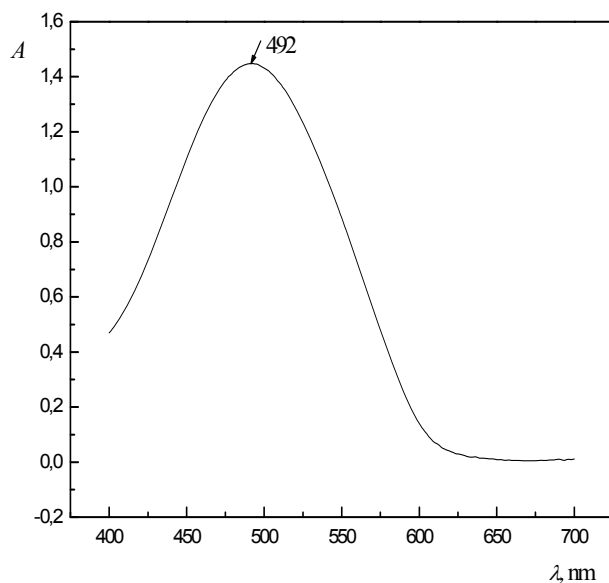
Při ověřování optimálních pracovních podmínek posloužila jako výchozí monografie M. Maláta: Absorpční anorganická fotometrie.

Byla proměřena absorpční spektra roztoku samotného Cr(III) o koncentraci  $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  a  $1000 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Ze spekter znázorněných na Obr. 4.1, je patrné, že Cr(III) o koncentraci  $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , oproti stokrát koncentrovanějšímu fialovému roztoku Cr(III), vykazoval nulovou absorbanci ve viditelné oblasti spektra. Dále byla měřeno spektrum chromazurolu S (CAS) o koncentraci  $1\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  v prostředí pufru o pH 3,6 (Obr. 4.2). Maximální absorpce červeně zbarveného činidla byla zjištěna při vlnové délce 492 nm.



**Obr. 4.1** Absorpční spektra Cr(III)

Podmínky měření: 1 -  $c_{Cr(III)} = 1000 \mu\text{g}\cdot\text{m}^{-1}$ ; 2 -  $c_{Cr(III)} = 10 \mu\text{g}\cdot\text{m}^{-1}$ ; měřeno proti deionizované vodě;  $l = 10 \text{ mm}$



**Obr. 4.2** Absorpční spektrum CAS

Podmínky měření:  $c_{CAS} = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ; prostředí pufru o pH 3,6; měřeno proti deionizované vodě;  $l = 10 \text{ mm}$

#### 4.1.2 Vliv pH

Reakce Cr(III) s CAS má probíhat při optimální hodnotě pH 3,6. Bylo tedy připraveno několik roztoků obsahujících Cr(III) o koncentraci  $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  a CAS o koncentraci  $1\cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  v prostředí pufru. pH pufru se při měření pohybovalo v rozmezí 2 – 6 odstupňovaném po jednotce; navíc byla zařazena doporučená hodnota 3,6. Roztoky byly před proměřováním spekter zahřívány ve vroucí lázni po dobu třiceti minut. Samotné měření bylo prováděno proti slepému vzorku obsahujícímu všechny složky kromě analytu (Cr(III)). Měřeny tedy byly diferenční absorpční křivky. Znalost diferenčních křivek je velmi důležitá, protože měření při vlnové délce jejich maxima je většinou výhodnější než měření v maximu vlastního komplexu. Maximum diferenční křivky totiž udává vlnovou délku, při které je rozdíl zbarvení komplexu a samotného činidla největší.

Z naměřených spekter vyplynulo, že pouze v rozmezí pH 3 – 4 nabývá absorbance maximálních a přibližně konstantních hodnot. Za optimální byl označen pufr o pH 3,6.

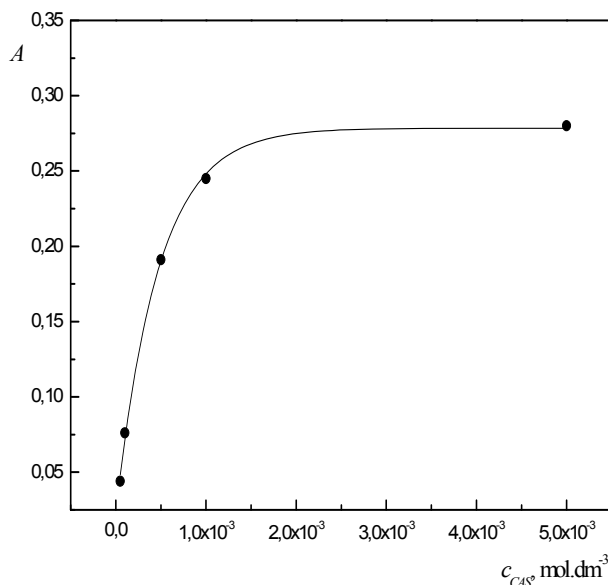
#### 4.1.3 Vliv nadbytku činidla CAS

Dokonalé vybarvení komplexu je ve velké míře ovlivněno množstvím přidaného chelátotvorného činidla, tj. CAS. Aby toto vybarvení bylo maximální, je třeba převést veškerý stanovený kov do komplexu nadbytečným množstvím činidla. Takto se rovnováha zcela posunuje ve prospěch tvorby komplexu. Prakticky se pak volí takové nejmenší množství činidla, při kterém je dosaženo za daných podmínek maximální absorbance [20].

Pro vyšetření závislosti byla postupně proměřena sada roztoků o rostoucí koncentraci činidla; koncentrace kovu zůstala nezměněna ( $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ). Koncentrace CAS se pohybovala v rozmezí od  $1\cdot 10^{-5}$  do  $5\cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ; reakce probíhala v pufru o pH 3,6.

Ze změřených spekter byla sestrojena závislost maximální absorbance na koncentraci CAS. Z grafu (Obr. 4.3) je patrné, že absorbance komplexu prudce rostla do hodnoty koncentrace CAS  $1\cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ , při vyšší koncentraci už byl růst jen

nepatrný. Za optimální tedy byla vybrána koncentrace  $1.10^{-3} \text{ mol.dm}^{-3}$ , se kterou byla prováděna veškerá další měření.

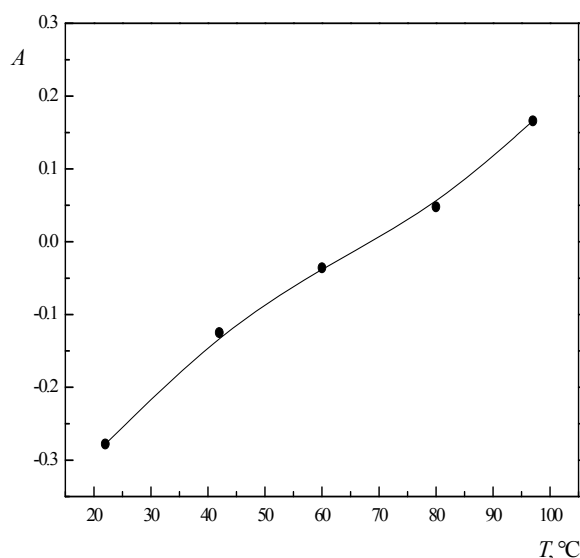


**Obr. 4.3** Závislost absorbance na koncentraci CAS

*Podmínky měření:  $c_{Cr(III)} = 0,5 \text{ } \mu\text{g.ml}^{-1}$ ;  $c_{CAS} = 1.10^{-5} - 5.10^{-3} \text{ mol.dm}^{-3}$ ; prostředí pufru o pH 3,6; zahříváno po dobu 30 minut; měřeno proti slepým vzorkům obsahujícím stejné složky jako samotný vzorek, ale bez Cr(III) – roztoky zahřívány;  $l = 10 \text{ mm}$*

#### 4.1.4 Vliv teploty a času

Nejprve byl uskutečněn pokus, při němž bylo zjišťováno, jaký vliv má na reakci Cr(III) s CAS teplota zahřívací lázně. Připravena byla sada stejných roztoků (dle předešlých optimálních podmínek), lišících se pouze tím, že byly před proměřením spekter zahřívány v lázních různých teplot. Roztoky byly zahřívány po dobu třiceti minut, pouze první roztok nebyl zahříván vůbec; byla tedy měřena jeho absorbance po třiceti minutách stání za laboratorní teploty. Obr. 4.4 jasně ukazuje, že až při teplotách 80 a 100 °C došlo v dané době k vytvoření komplexu. Za pokojové teploty, při 40 °C a 60 °C roztok vykazoval pouze nízkou, dokonce zápornou absorbanci. Bylo tedy ověřeno, že teplota má vliv na vznik komplexu Cr(III)-CAS. Jako optimální byla zvolena teplota 100 °C.



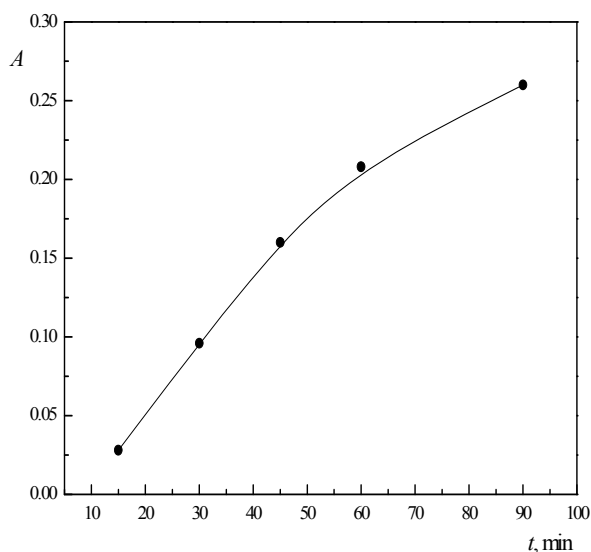
**Obr. 4.4** Závislost absorbance na teplotě roztoku

*Podmínky měření:  $c_{Cr(III)} = 0,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ;  $c_{CAS} = 1\cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ; prostředí pufru o pH 3,6; zahříváno po dobu 30 minut (první hodnota – měření bez zahřívání) při  $T = 40 - 100 \text{ }^\circ\text{C}$ ; měřeno proti slepému vzorku obsahujícímu stejné složky jako samotný vzorek, ale bez Cr(III) – roztok nezahříván;  $l = 10 \text{ mm}$*

Dále bylo zjišťováno, za jakou dobu by se binární komplex Cr(III)-CAS vytvořil za laboratorní teploty bez zahřívání. Měření spekter bylo provedeno po jednom, třech a pěti dnech stání. Z naměřených spekter bylo patrné, že už po třech dnech došlo k vytvoření komplexu Cr(III)-CAS, ale ani po pěti dnech stání nedosáhly roztoky hodnoty odpovídající maximálnímu zbarvení dosaženému třiceti minutovým zahříváním při  $100 \text{ }^\circ\text{C}$  (absorbance byla přibližně dvakrát nižší). Byla tedy dokázána skutečnost, že hydratace Cr(III) iontů je značná a z toho důvodu je reakce s komplexotvornými činidly velmi pomalá.

Vedle uvedených teplotních vlivů bylo dále sledováno, jaký vliv na změnu absorbance má doba zahřívání. Byla proměřena časová závislost po dobu 90 minut (krok 15 minut). Z maximálních absorbancí odečtených z diferenčních spekter byla sestrojena závislost absorbance na délce zahřívání (Obr. 4.5). Ukázalo se, že doba zahřívání 30 minut, která byla doposud volena při pokusech, by měla být prodloužena; absorbance s časem totiž i nadále rostla. Za dostačující byla ale nakonec stejně zvolena doba zahřívání 30 – 45 minut (časové důvody), optimální by ovšem bylo zahřívat roztok

déle, 60 – 90 minut. Získaný poznatek byl dále využit.



**Obr. 4.5** Závislost absorbance na délce zahřívání

*Podmínky měření:  $c_{Cr(III)} = 0,5 \mu\text{g.ml}^{-1}$ ;  $c_{CAS} = 1.10^{-3} \text{ mol.dm}^{-3}$ ; prostředí pufru o pH 3,6; zahříváno po dobu 15 - 90 minut při  $T = 100 \text{ }^\circ\text{C}$ ; měřeno proti slepému vzorku obsahujícímu stejné složky jako samotný vzorek, ale bez Cr(III) – roztok nezahříván;  $l = 10 \text{ mm}$*

Poslední pokus týkající se vlivu reakční teploty a času spočíval ve sledování stálosti již vytvořeného komplexu. Bylo zjištěno, že komplex Cr(III)-CAS je časově stabilní nejméně po dobu deseti dnů (delší časový úsek již nebyl zkoumán).

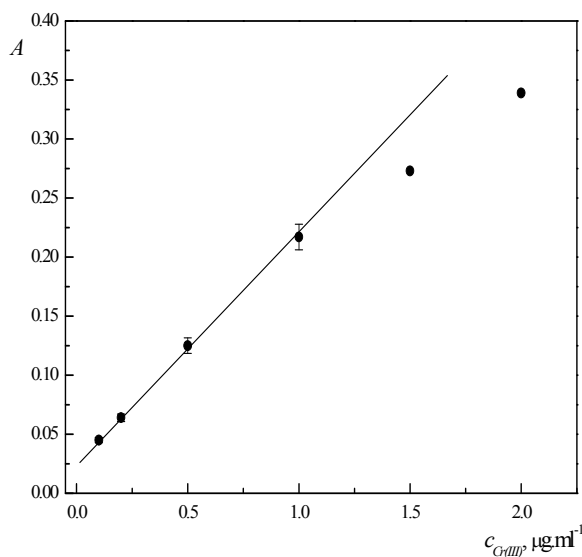
Jak se v předchozích několika pokusech ukázalo teplota a délka zahřívání má na vznik komplexu Cr(III)-CAS značný vliv. Z Obr. 4.3 a Obr. 4.4 je možno vyčíst, že ačkoliv byly roztoky před měřením zahřívány stejnou dobu (30 minut) na stejnou teplotu ( $100 \text{ }^\circ\text{C}$ ), jejich maximální absorbance (pro stejné koncentrace činidla i Cr(III)) se značně lišily. Hodnoty se též neshodují se závislostí na Obr. 4.5. Možným vysvětlením je ne úplně přesné dodržování doby zahřívání nebo např. skutečnost, že odměrné baňky s roztoky byly pro některá měření (pro série měření) ihned po vyjmutí z vroucí lázně chlazeny pod proudem studené vody a některé byly chlazeny pouze stáním za laboratorní teploty (vysoká teplota se v baňkách s roztoky udržela po delší dobu). Proto byl při dalších pokusech přísně dodržován jednotný postup.

#### 4.1.5 Kalibrační závislost

Pro určení kalibrační závislosti byla změřena série roztoků o stoupající koncentraci Cr(III) při zachování všech ostatních podmínek stanovení, které byly zjištěny v předchozích pokusech. Provedeno bylo šest měření v koncentračním rozmezí 0,1 – 2,0  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Při vlnové délce 600 nm byly odečteny hodnoty absorbance a sestrojena závislost absorbance na koncentraci Cr(III). Kalibrační závislost zobrazená na Obr. 4.6 je lineární v rozsahu 0,1 – 1,0  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ .

Získanou závislost je možno popsat rovnicí  $A = 0,02799 + 0,19224c$  (hodnota spolehlivosti  $R^2 = 0,99907$ ). Citlivost vyjádřená jako směrnice kalibrace činí 0,19224  $\text{ml}\cdot\mu\text{g}^{-1}$ .

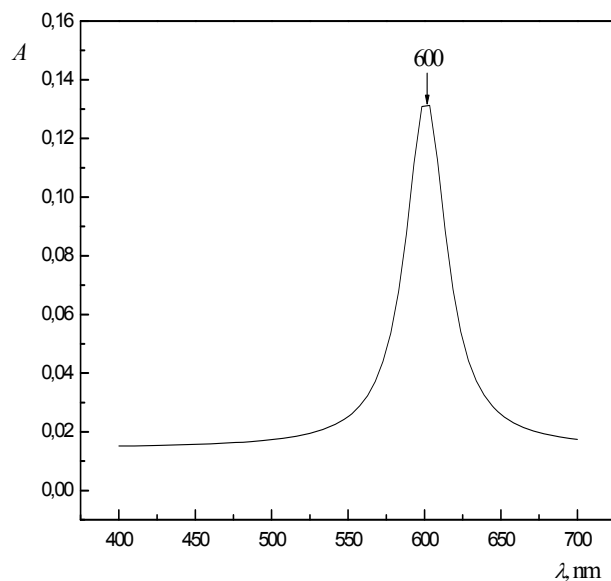
Na Obr. 4.7 je pro ilustraci zobrazena diferenční křivka komplexu Cr(III)-CAS, jejíž absorpční maximum bylo použito k vytvoření výše uvedené kalibrační křivky – odpovídá koncentraci 0,5  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ .



**Obr. 4.6** Kalibrační křivka

*Podmínky měření:  $c_{\text{Cr(III)}} = 0,1 - 2,0 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ;  $c_{\text{CAS}} = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ; prostředí pufru o pH 3,6; zahříváno po dobu 45 minut při  $T = 100 \text{ }^\circ\text{C}$ ; měřeno proti slepému vzorku obsahujícímu stejné složky jako samotný vzorek, ale bez Cr(III) – roztok zahříván;  $l = 10 \text{ mm}$*





**Obr. 4.7** Diferenční křivka komplexu Cr(III)-CAS

*Podmínky měření:  $c_{Cr(III)} = 0,5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ;  $c_{CAS} = 1\cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ; prostředí pufru o pH 3,6; zahříváno po dobu 45 minut při  $T = 100 \text{ }^\circ\text{C}$ ; měřeno proti slepému vzorku obsahujícímu stejné složky jako samotný vzorek, ale bez Cr(III) - roztok zahříván;  $l = 10 \text{ mm}$*

#### 4.1.6 Mez detekce a mez stanovitelnosti, opakovatelnost

Mez detekce a mez stanovitelnosti byly určeny na základě desetinasobného proměření roztoku Cr(III)-CAS o koncentraci Cr(III)  $0,1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Hodnoty absorbance byly pomocí rovnice kalibrační přímky přepočteny na koncentrace a ty byly statisticky zpracovány. Mez detekce byla určena jako trojnásobek směrodatné odchylky a mez stanovitelnosti jako desetinasobek směrodatné odchylky.

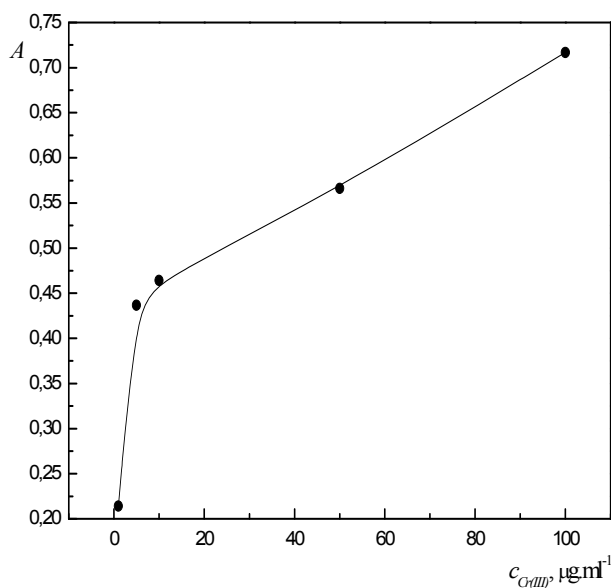
Pro určení opakovatelnosti byla desetkrát změřena absorbance roztoku o koncentraci Cr(VI)  $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Získané hodnoty byly pomocí rovnice regrese přepočteny na koncentrace. Opakovatelnost (procentuální podíl  $\sigma$  na průměrné koncentraci – RSD) činila 0,361 %. Dosažené základní charakteristiky jsou uvedeny v Tab. 4.1.

**Tab. 4.1** Základní charakteristiky spektrofotometrického stanovení Cr(III) pomocí CAS

| Parametr            |                                  | Hodnota             |
|---------------------|----------------------------------|---------------------|
| Mez detekce         | $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ | $5,85\cdot 10^{-3}$ |
| Mez stanovitelnosti | $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ | $1,95\cdot 10^{-2}$ |
| Opakovatelnost      | %                                | 0,361               |

#### 4.1.7 Vliv Cr(VI) na stanovení Cr(III)

Posledním úkolem bylo určit, zda má přídavek Cr(VI) vliv na stanovení Cr(III). Měření bylo prováděno s koncentrací Cr(III)  $1\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  a koncentrace Cr(VI) byla postupně měněna na hodnoty 1, 5, 10, 50 a  $100\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Přidán byl opět CAS a reakce probíhala v pufru. Výsledek měření je na Obr. 4.8. Z grafu vyplývá, že přítomnost a nadbytek Cr(VI) mají vliv na stanovení Cr(III); což pravděpodobně souvisí se současnou redukcí Cr(VI) v roztoku na Cr(III) během zahřívání reakční směsi.



**Obr. 4.8** Vliv Cr(VI) na stanovení Cr(III)

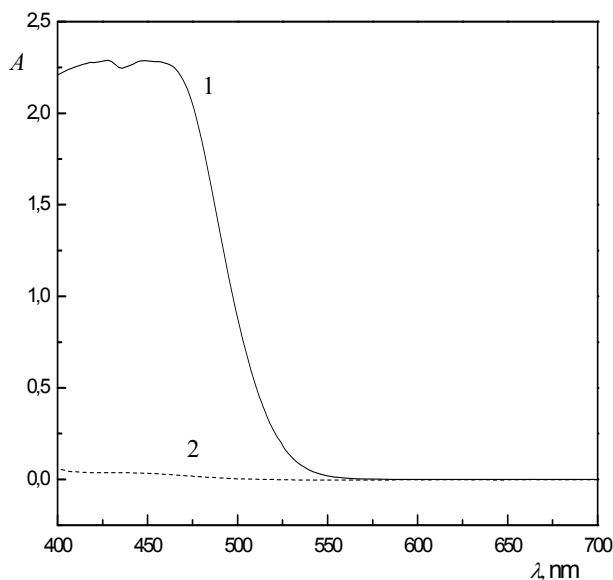
*Podmínky měření:  $c_{\text{Cr(III)}} = 1,0\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ;  $c_{\text{Cr(VI)}} = 1,0 - 50\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ;  $c_{\text{CAS}} = 1\cdot 10^{-3}\ \text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ; prostředí pufru o pH 3,6; zahříváno po dobu 30 minut při  $T = 100\ ^\circ\text{C}$ ; měřeno proti slepému vzorku obsahujícímu stejné složky jako samotný vzorek, ale bez Cr(III) a Cr(VI) - nezahříván;  $l = 10\ \text{mm}$*

## 4.2 Optimalizace podmínek spektrofotometrického stanovení Cr(VI)

### 4.2.1 Proměření spekter roztoků samotného Cr(VI) a DFK

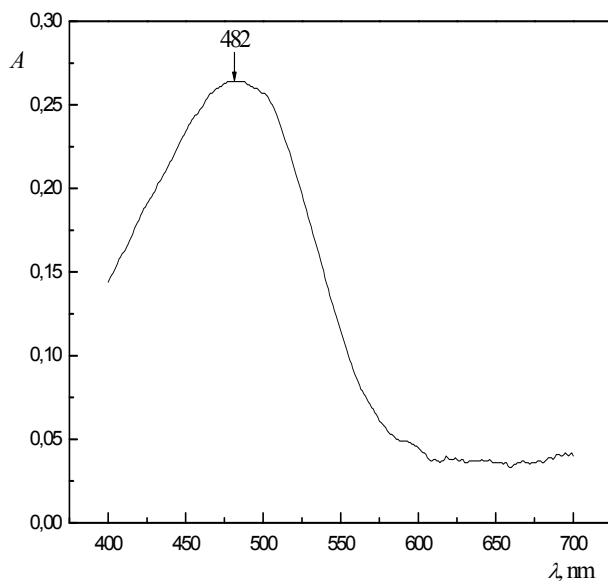
Jako podklad pro spektrofotometrické stanovení Cr(VI) nám opět sloužila monografie M. Maláta: Absorpční anorganická fotometrie.

Bylo změřeno absorpční spektrum samotného roztoku Cr(VI) o koncentraci  $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  a  $1000 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Dále bylo proměřeno spektrum samotného činidla difenylkarbazidu (DFK). Zásobní roztok Cr(VI) je žlutý a tudíž ve viditelné oblasti absorbuje, zatímco stokrát zředěnější (bezbarvý) roztok vykazoval jen nepatrnou absorpenci. Spektra Cr(VI) jsou zachycena na Obr. 4.9, spektrum DFK s maximální absorpencí při 482 nm na Obr. 4.10.



**Obr. 4.9** Absorpční spektra Cr(VI)

*Podmínky měření: 1 -  $c_{\text{Cr(VI)}} = 1000 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ; 2 -  $c_{\text{Cr(VI)}} = 10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ; měřeno proti deionizované vodě;  $l = 10 \text{ mm}$*



**Obr. 4.10** Absorpční spektrum DFK

Podmínky měření:  $c_{DFK} = 2,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol.dm}^{-3}$ ; měřeno proti deionzované vodě;  $l = 10 \text{ mm}$

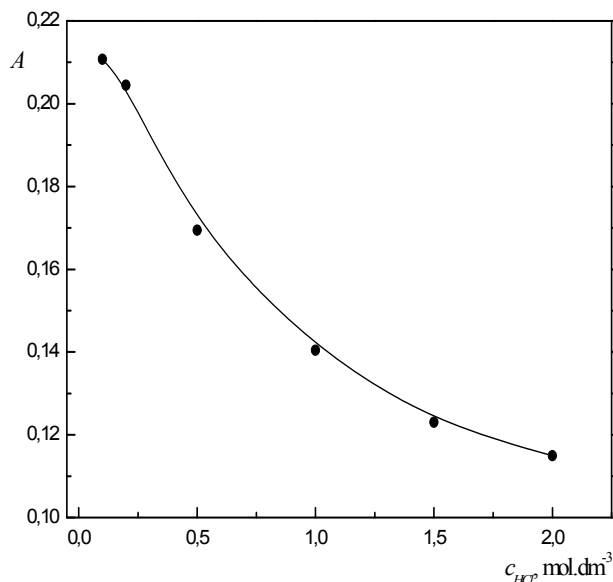
#### 4.2.2 Výběr vhodné kyseliny

Stanovení Cr(VI) s DFK probíhá v prostředí silné minerální kyseliny. Vedle doporučené  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , bylo zkoušeno též stanovení v prostředí HCl a  $\text{HNO}_3$ . Připraveny byly roztoky o koncentraci Cr(VI)  $0,5 \text{ } \mu\text{g.ml}^{-1}$ , koncentrace DFK byla zvolena  $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.dm}^{-3}$  a koncentrace jednotlivých kyselin  $0,1 \text{ mol.dm}^{-3}$ . Největší hodnota absorbance byla zaznamenána při použití HCl, která byla nakonec používána pro další měření.

#### 4.2.3 Vliv koncentrace HCl

V literatuře se uvádí, že koncentrace kyseliny ve výsledném roztoku musí být taková, aby pH roztoku nepřekročilo hodnotu 2,0. Byl tedy sledován vliv HCl v koncentračním rozsahu  $0,1 \text{ mol.dm}^{-3}$  až  $2,0 \text{ mol.dm}^{-3}$ . Z hodnot absorbance odečtených v maximech spekter byla sestrojena závislost na koncentraci HCl komplexu

Cr(VI)-DFK. Nejvyšší hodnoty absorbance a tedy nejvyšší citlivosti bylo dosaženo při použití  $0,1 \text{ mol.dm}^{-3}$  HCl; použití vyšší koncentrace vedlo ke snížení citlivosti. Pro další stanovení bylo pracováno s koncentrací HCl  $0,1 \text{ mol.dm}^{-3}$ , která byla určena jako optimální.



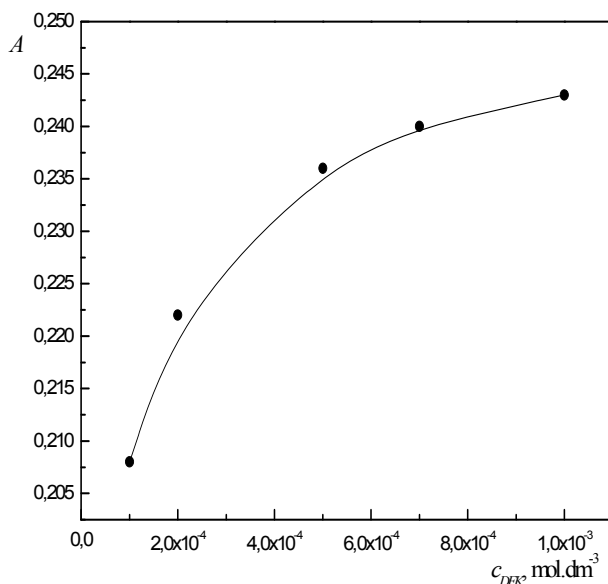
**Obr. 4.11** Závislost absorbance na koncentraci HCl

*Podmínky stanovení:  $c_{\text{Cr(VI)}} = 0,5 \text{ } \mu\text{g.ml}^{-1}$ ;  $c_{\text{DFK}} = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.dm}^{-3}$ ;  $c_{\text{HCl}} = 0,1 - 2,0 \text{ mol.dm}^{-3}$ ; měřeno proti deionizované vodě;  $l = 10 \text{ mm}$*

#### 4.2.4 Vliv nadbytku činidla DFK

Ze zásobního roztoku DFK byly připraveny roztoky v koncentračním rozmezí  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.dm}^{-3}$  až  $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol.dm}^{-3}$ . Byla změřena spektra roztoků o koncentraci Cr(VI)  $0,5 \text{ } \mu\text{g.ml}^{-1}$ , přidána byla  $0,1 \text{ mol.dm}^{-3}$  HCl a stoupající množství DFK. Z absorpčních spekter byly odečteny maximální absorbance a získané hodnoty byly vyneseny do grafu jako závislost absorbance na koncentraci DFK – Obr. 4.12. Z grafu plyne, že absorbance se zvyšující se koncentrací prudce rostla až do hodnoty  $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.dm}^{-3}$ , další zvyšování bylo jen mírné. V ideálním případě by se absorbance komplexu po úplném vysycení stanovovaného iontu neměla již měnit. Tento případ by však nastal pouze tehdy, kdyby mělo komplexotvorné činidlo při vlnové délce maxima kovového

chalátu nulovou absorbancí [20]. DFK ale při zmíněné vlnové délce také absorboval (velmi malá hodnota), proto i po vysycení kovu docházelo k mírnému vzrůstu absorbance. Jako optimální byla vybrána koncentrace DFK  $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ .



**Obr. 4.12** Závislost absorbance na koncentraci DFK

*Podmínky měření:  $c_{Cr(VI)} = 0,5 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ;  $c_{DFK} = 1 \cdot 10^{-4} - 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ;  $c_{HCl} = 0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ; měřeno proti deionizované vodě;  $l = 10 \text{ mm}$*

#### 4.2.5 Kalibrační závislost

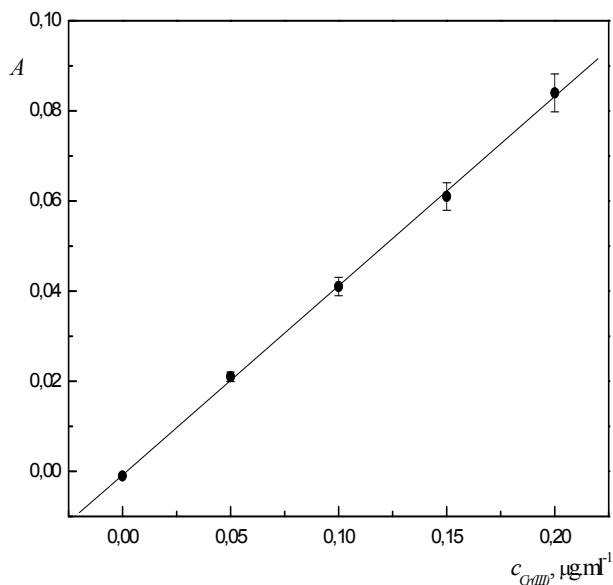
Zjištěné optimální koncentrace DFK a HCl byly využity při proměrování kalibrační závislosti. (Oproti stanovení Cr(III) odpadlo při určování optimálních podmínek zjišťování vlivu teploty a délky zahřívání – maximální zabarvení se objevilo během jedné minuty, roztok nebylo třeba zahřívát.) Nejprve byla měřena absorbance komplexů obsahujících Cr(VI) v koncentračním rozmezí 0 –  $0,2 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ , následně v roztocích o koncentraci Cr(VI)  $0,1 - 2,0 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ . Tentokrát byla jednotlivá měření uskutečněna nikoliv proti deionizované vodě (jak tomu bylo doposud); jako srovnávací vzorek byl použit roztok sestávající ze stejných složek jako vzorek, ale bez analytu. Měřeními tedy byly získány diferenční křivky.

Maximální hodnoty absorbancí použité k sestavení kalibračních křivek byly ze

spekter odečteny při vlnové délce 542 nm. Kalibrační křivka pro koncentrační rozmezí Cr(VI) 0 – 0,2  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  je znázorněna na Obr. 4.13. Kalibrace je ve stanovovaném rozsahu koncentrací lineární. Závislost absorbance na koncentraci Cr(VI) lze popsat rovnicí  $A = 0,41579c$  (hodnota spolehlivosti  $R^2 = 0,99908$ ). Citlivost vyjádřená jako směrnice kalibrace činí 0,41579  $\text{ml}\cdot\mu\text{g}^{-1}$ .

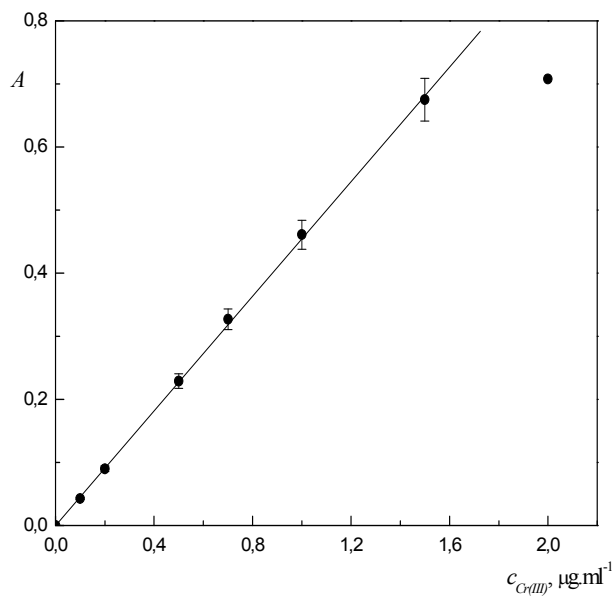
Kalibrační křivka koncentracemi Cr(VI) 0,1 – 2,0  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  je znázorněna na Obr. 4.14. Závislost je lineární do hodnoty koncentrace Cr(VI) 1,5  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  (při vyšších koncentracích by na přímce nastal ohyb) a lze ji popsat rovnicí  $A = 0,45411c$  ( $R^2 = 0,99908$ ). Citlivost vyjádřená jako směrnice kalibrace činí 0,45411  $\text{ml}\cdot\mu\text{g}^{-1}$ .

Na Obr. 4.15 je pro představu znázorněna diferenční křivka komplexu Cr(VI)-DFK, jejíž absorpční maximum bylo použito k vytvoření výše uvedené kalibrační křivky – odpovídá koncentraci 0,5  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ .



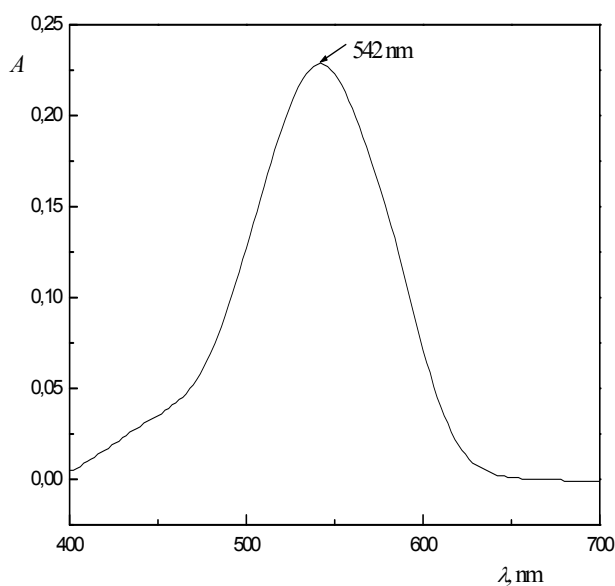
**Obr. 4.13** Kalibrační křivka v rozmezí koncentrací 0 – 0,2  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$

*Podmínky měření:  $c_{Cr(VI)} = 0 - 0,2 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ;  $c_{DFK} = 5\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ;  $c_{HCl} = 0,1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ; měřeno proti slepému vzorku obsahujícímu stejné složky jako samotný vzorek, ale bez Cr(VI);  $l = 10 \text{ mm}$*



**Obr. 4.14** Kalibrační křivka v rozmezí koncentrací 0,1 – 2,0  $\mu\text{g.ml}^{-1}$

Podmínky měření:  $c_{Cr(VI)} = 0,1 - 2, \mu\text{g.ml}^{-1}$ ;  $c_{DFK} = 5.10^{-4} \text{ mol.dm}^{-3}$ ;  $c_{HCl} = 0,1 \text{ mol.dm}^{-3}$ ; měřeno proti slepému vzorku obsahujícímu stejné složky jako samotný vzorek, ale bez  $Cr(VI)$ ;  $l = 10 \text{ mm}$



**Obr. 4.15** Diferenční křivka komplexu  $Cr(VI)$ -DFK

Podmínky měření:  $c_{Cr(VI)} = 0,5 \mu\text{g.ml}^{-1}$ ;  $c_{DFK} = 5.10^{-4} \text{ mol.dm}^{-3}$ ;  $c_{HCl} = 0,1 \text{ mol.dm}^{-3}$ ; měřeno proti slepému vzorku obsahujícímu stejné složky jako samotný vzorek, ale bez  $Cr(VI)$ ;  $l = 10 \text{ mm}$



#### 4.2.6 Mez detekce, mez stanovitelnosti a opakovatelnost

Mez detekce a mez stanovitelnosti byly určeny na základě desetinasobného proměření komplexu Cr(VI)-DFK o koncentraci Cr(VI)  $0,05 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Hodnoty absorbance byly pomocí rovnice kalibrační přímky ( $A = 0,41579c$ ) přepočteny na koncentrace a ty byly statisticky zpracovány. Určena byla mez detekce a mez stanovitelnosti (ze směrodatné odchylky).

Pro určení opakovatelnosti byla desetkrát změřena absorbance roztoku o koncentraci Cr(VI)  $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Získané hodnoty byly pomocí rovnice regrese opět přepočteny na koncentrace. Na rozdíl od určení meze detekce a stanovitelnosti bylo při určování opakovatelnosti pracováno s rovnicí kalibrační přímky získané z kalibrační křivky v koncentračním rozsahu  $0,1 - 2,0 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ .

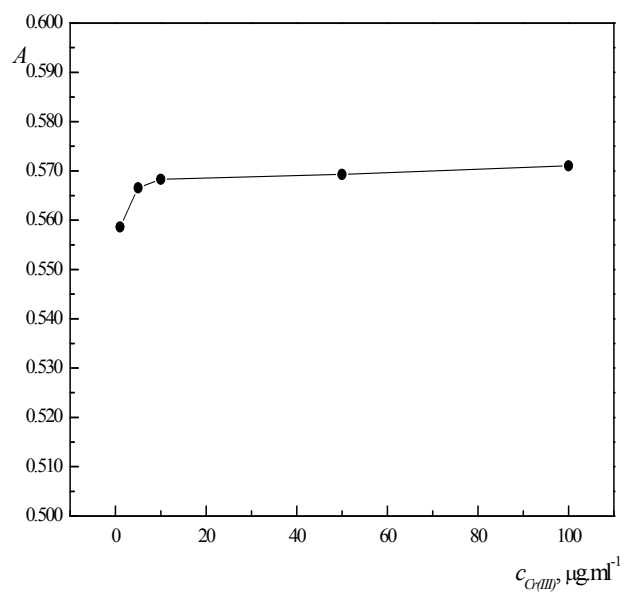
Dosažené základní charakteristiky jsou shrnuty v Tab. 4.2.

**Tab. 4.2** Základní charakteristiky spektrofotometrického stanovení Cr(VI) pomocí DFK

| Parametr            |                                  | Hodnota             |
|---------------------|----------------------------------|---------------------|
| Mez detekce         | $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ | $4,29\cdot 10^{-3}$ |
| Mez stanovitelnosti | $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ | $1,43\cdot 10^{-2}$ |
| Opakovatelnost      | %                                | 0,147               |

#### 4.2.7 Vliv Cr(III) na stanovení Cr(VI)

Pro zjištění případného vlivu Cr(III) na stanovení Cr(VI) byla proměřena spektra roztoků tvořených stejným způsobem jako v předchozích měřeních, tentokrát byl ještě navíc přidán Cr(III) o různých koncentracích. Měření bylo prováděno s koncentrací Cr(VI)  $1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  a koncentrace Cr(III) byla postupně navyšována od  $1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  až do  $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Jak je vidět z grafu (Obr. 4.16), přídavek a dokonce ani velký (stonásobný) nadbytek Cr(III) vliv na stanovení neměl. Vysvětlením může být fakt, že ionty Cr(III) sice reagují s DFK přímo, ale barevný produkt se vytvoří až po několika dnech. Důvodem pro takto pomalou reakci je kinetická inertnost hydratovaného iontu Cr(III).



**Obr. 4.16** Vliv Cr(III) na stanovení Cr(VI)

*Podmínky měření:  $c_{Cr(VI)} = 1 \mu\text{g.ml}^{-1}$ ;  $c_{Cr(III)} = 1 - 100 \mu\text{g.ml}^{-1}$ ;  $c_{DFK} = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.dm}^{-3}$ ;  $c_{HCl} = 0,1 \text{ mol.dm}^{-3}$ ; měřeno proti slepému vzorku obsahujícímu stejné složky jako samotný vzorek, ale bez Cr(VI);  $l = 10 \text{ mm}$*

## 5 ZÁVĚR

První část bakalářské práce byla zaměřena na stanovení vhodných experimentálních podmínek pro spektrofotometrické stanovení Cr(III). Vybrána k tomu byla nejcitlivější reakce s činidlem chromazurol CAS v prostředí pufru. Při určování optimálních podmínek byla pozornost věnována výběru vhodného pH pufru (zvoleno  $\text{pH} = 3,6$ ), výběru vhodné koncentrace CAS pro stanovení ( $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ), vlivu teploty a času na průběh reakce (roztok je třeba zahřívat při  $100 \text{ }^\circ\text{C}$  po dobu nejméně třiceti minut). Zjištěné optimální hodnoty byly využity při sestrojení kalibrační závislosti, která dále posloužila jako podklad pro určení meze detekce a stanovitelnosti. Bylo tak určeno, že nejmenší koncentrace analytu ve vzorku, kterou je možno danou analytickou metodou za zjištěných optimálních podmínek ještě stanovit s přijatelnou přesností (mez stanovitelnosti) je  $1,95 \cdot 10^{-2} \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ . Detekovat lze dle dosažených výsledků koncentraci Cr(III)  $5,85 \cdot 10^{-3} \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ .

Druhá část práce byla věnována hledání vhodných experimentálních podmínek pro spektrofotometrické stanovení Cr(VI) reakcí s DFK v kyselém prostředí. Bylo přitom třeba vybrat vhodnou kyselinu (zvolena HCl), určit její koncentraci ( $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ), stejně jako koncentraci činidla DFK ( $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ). Byla určena mez detekce  $4,29 \cdot 10^{-3} \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  a mez stanovitelnosti  $1,43 \cdot 10^{-2} \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ .

Cíl bakalářské práce byl splněn, podařilo se optimalizovat experimentální podmínky pro spektrofotometrické stanovení obsahu Cr(III) a Cr(VI).

## 6 SOUPIS BIBLIOGRAFICKÝCH CITACÍ

- [1] 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).
- [2] 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).
- [3] Piskač, P.; Čermák, V.: *Ekotoxikologická databáze*. Dostupné z URL: <<http://www.piskac.cz/Etd/>> [cit. 29.4.2008]
- [4] Marhold, J.: *Přehled průmyslové toxikologie - Anorganické látky*. Praha, Avicenum 1980.
- [5] Paleček, J.; Palatý, J.: *Toxikologie, hygiena a bezpečnost práce v chemii*. 2. vyd. Praha, VŠCHT 1991.
- [6] Ministerstvo životního prostředí: *Integrovaný registr znečišťování*. Dostupné z URL: <[http://www.irz.cz/repository/latky/chrom\\_a\\_jeho\\_slouceniny.pdf](http://www.irz.cz/repository/latky/chrom_a_jeho_slouceniny.pdf)> [cit. 4.4.2008]
- [7] Sdružení ARNIKA: *Budoucnost bez jedů*. Dostupné z URL: <<http://bezjedu.arnika.org/chemicka-latka.shtml?x=596561>> [cit. 29.4.2008]
- [8] Rychlovsky, P.; Krenzelok, M.; Volhejnova, R.: On-line simultaneous sorption preconcentration and determination of chromium(III) and chromium(VI) with AAS detection. *Collect. Czech. Commun.* **63**, 2015-2026 (1998).
- [9] Narayana, B.; Cherian, T.: Rapid spectrophotometric determination of trace amounts of chromium using variamine blue as a chromogenic reagent. *Journal of the Brazilian chemical society* **16**, 197-201 (2005).
- [10] Powell, M. J.; Boomer, D. W.: Determination of Chromium Species in Environmental Samples Using High-Pressure Liquid Chromatography Direct Injection Nebulization and Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *Analytical chemistry* **67**, 2474-2478 (1995).
- [11] Xiang, Y.; Mei, L.; Li, N.; Tong, A.: Sensitive and selective spectrofluorimetric determination of chromium(VI) in water by fluorescence enhancement. *Analytica Chimica Acta* **581**, 132-136 (2007).

- [12] Procháčková, 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).
- [13] Zýka, J.: *Analytická příručka, díl II. 4.* přeprac. vyd. Praha, SNTL/ALFA 1988.
- [14] Němcová, I.; Čermáková, L.; Rychlovský, P.: *Spektrometrické analytické metody I.* Praha, Univerzita Karlova v Praze – Nakladatelství Karolinum 2004.
- [15] Ústav analytické chemie VŠCHT Praha: *Laboratorní cvičení z analytické chemie I.* Dostupné z URL: <[http://www.vscht.cz/anl/lach1/5\\_Foto.pdf](http://www.vscht.cz/anl/lach1/5_Foto.pdf)> [cit. 13.3.2008]
- [16] Volka, K.: *Analytická chemie II.* Praha, VŠCHT 1997.
- [17] Šíma, J.: *Spektrometrické analytické metody – část II.* Dostupné z URL: <[http://tomcat.bf.jcu.cz/sima/analyticka\\_chemie/spektrab.htm](http://tomcat.bf.jcu.cz/sima/analyticka_chemie/spektrab.htm)> [cit. 13.3.2008]
- [18] Malát, M.: *Absorpční anorganická fotometrie.* Praha, Academia 1983.
- [19] Nishida, H.; Nishida, T.: Spectrophotometric determination of chromium (III) with Chromazurol S. *The Japan Society for Analytical Chemistry* **33**, 333-336 (1984).
- [20] Valchová, D.: *Spektrofotometrické stanovení trojmocného chromu chromazurolem S za přítomnosti cetylpyridiniumbromidu* [diplomová práce], Praha 1974.
- [21] Yi, Z.; Gang, H.: Rapid spectrophotometric determination of chromium(III). *Talanta* **41**, 1247-1250 (1994).
- [22] Zaitoun, M.: Spectrophotometric determination of Chromium(VI) using cyclam as a reagent. *International journal of environmental analytical chemistry* **85**, 399-407 (2005).
- [23] Qi, W-B.; Zhu, L-Z.: Spectrophotometric determination of Chromium in waste Water and Soil. *Talanta* **33**, 694-696 (1986).
- [24] Holzbecher, Z.: *Organická činidla v anorganické analýze.* Praha, SNTL 1975.
- [25] Bartoš, M.; Švancara, I.; Šrámková, J.: *Laboratorní cvičení z Analytické chemie I.* Dostupné z URL: <<http://www.upce.cz/priloha/kalch-analchem1lab>> [cit. 13.3.2008]
- [26] Frýdecký, B.; Koruna, I.; Kratochvíla, J.; Plzák, Z.: *Metrologická terminologie v analytické laboratoři.* Dostupné z URL: <<http://www.eqa.cz/terminologie/Index.htm>> [cit. 4.4.2008]