

ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI

FAKULTA PEDAGOGICKÁ

KATEDRA CHEMIE

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

**STANOVENÍ ŽELEZA VE VODĚ  
SPEKTROFOTOMETRICKY**

**Adéla Turčová**

*Přírodovědná studia, obor Chemie se zaměřením na vzdělávání*

Vedoucí práce: Ing. Jan Hrdlička, Ph.D.

**Plzeň, 2014**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně s použitím uvedené literatury a zdrojů informací.

V Plzni, 30. června 2014

.....

vlastnoruční podpis

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala svému vedoucímu práce Ing. Janu Hrdličkovi, Ph.D. za vedení mé bakalářské práce, za jeho čas, rady, připomínky a trpělivost při konzultacích. Zároveň děkuji katedře chemie FPE ZČU v Plzni za možnost využití laboratoří, laboratorních pomůcek a chemikálií. Ve všem mi bylo ze strany katedry vyhověno. Dále bych chtěla poděkovat svým přátelům a příbuzným, kteří mi poskytli vzorky vod ze svých studní. Na závěr děkuji svým nejbližším, kteří mě podporují a věří v mé schopnosti.

## OBSAH

<b>1</b>	<b>ÚVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>TEORETICKÁ ČÁST.....</b>	<b>3</b>
2.1	OPTICKÉ ANALYTICKÉ METODY .....	3
2.1.1	<i>Vlastnosti elektromagnetického záření .....</i>	4
2.1.2	<i>Základní veličiny charakterizující elektromagnetické záření .....</i>	5
2.2	KLASIFIKACE SPEKTROMETRICKÝCH METOD .....	6
2.2.1	<i>Povaha výměny energie mezi hmotou a zářením .....</i>	6
2.2.2	<i>Absorpce a emise záření .....</i>	7
2.2.3	<i>Atomová a molekulová spektra .....</i>	10
2.2.4	<i>Rozsahy vlnových délek elektromagnetického záření .....</i>	11
2.3	OPTICKÉ PŘÍSTROJE A JEJICH SOUČÁSTI .....	12
2.3.1	<i>Zdroje záření.....</i>	12
2.3.2	<i>Zařízení pro umístění vzorku .....</i>	14
2.3.3	<i>Disperzní systém a pomocná optika.....</i>	14
2.3.4	<i>Detektory záření.....</i>	17
2.3.5	<i>Vyhodnocovací zařízení .....</i>	17
2.3.6	<i>Uspořádání přístrojů .....</i>	17
2.4	MOLEKULOVÁ ABSORPČNÍ SPEKTROMETRIE V UV A VIS OBLASTI .....	18
2.5	SPEKTROFOTOMETRICKÉ STANOVENÍ.....	20
2.5.1	<i>Spektrofotometr.....</i>	20
2.5.2	<i>Praktické využití.....</i>	21
2.5.3	<i>Konkrétní využití spektrofotometrie.....</i>	22
2.5.4	<i>Stanovení kovů .....</i>	22
2.5.5	<i>Metody stanovení koncentrace analytu.....</i>	23
2.5.6	<i>Hodnocení a chyby spektrometrických měření .....</i>	24
<b>3</b>	<b>PRAKTICKÁ ČÁST .....</b>	<b>26</b>
3.1	POUŽITÉ METODY: .....	26
3.2	SEZNAM POUŽITÝCH CHEMIKÁLÍ.....	26
3.3	PRÁCE S ROZTOKY .....	27
3.3.1	<i>Metoda1 .....</i>	27
3.3.2	<i>Metoda2 .....</i>	27
3.3.3	<i>Metoda 3 .....</i>	29
3.4	PŘÍSTROJE A POMŮCKY .....	29
3.5	SPEKTROFOTOMETR HITACHI U-2001 .....	29
3.5.1	<i>Práce a měření na spektrofotometru Hitachi U-2001 .....</i>	30
3.6	VOLBA METODY.....	32
3.6.1	<i>Postup práce u metody 1.....</i>	32
3.6.2	<i>Postup práce u metody 2.....</i>	35
3.6.3	<i>Postup práce u metody 3.....</i>	39
3.6.4	<i>Porovnání metod.....</i>	43
3.7	KOMPLEXNÍ POSTUP PRO VLASTNÍ MĚŘENÍ VZORKŮ .....	45
3.7.1	<i>Odběr vzorků.....</i>	45
3.7.2	<i>Konzervace vzorků.....</i>	45
3.7.3	<i>Měření vzorků – nastavení metody „Photometry scan“ .....</i>	46
3.7.4	<i>Naměřené hodnoty .....</i>	48
3.8	VÝSLEDKY A DISKUZE .....	49

---

3.8.1	<i>Hodnocení naměřených hodnot</i> .....	49
3.8.2	<i>Diskuze – volba metody</i> .....	51
3.8.3	<i>Odebrané vzorky</i> .....	53
3.8.4	<i>Hodnocení výsledků</i> .....	53
<b>4</b>	<b>ZÁVĚR</b> .....	<b>61</b>
<b>5</b>	<b>RESUMÉ</b> .....	<b>63</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY A ZDROJŮ</b> .....	<b>64</b>
	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ, TABULEK, GRAFŮ A DIAGRAMŮ</b> .....	<b>66</b>
	<b>PŘÍLOHY</b> .....	<b>I</b>

# 1 ÚVOD

Železo je nejrozšířenější přechodný kovový prvek na Zemi, v hojné míře se vyskytuje v zemské kůře, je součástí zemského jádra a jeho přítomnost je prokázána i ve vesmíru a na Měsíci. Pro člověka se železo zdá být jedním z nejdůležitějších prvků vůbec. Železo je pro nás neškodné a pro správnou funkci organismu nezbytné. Na základě jeho důležitosti se množství železa kontroluje, a to v lidském séru a dále se věnuje pozornost obsahu železa v pitné vodě.

V této bakalářské práci se budu věnovat problematice týkající se stanovení železa ve vodě. Jak již bylo zmíněno, železo nám neubližuje, ale přesto jej v našich vodovodech nechceme. Důvodem je nepříjemná svíravá chuť, zákal a usazování sloučenin železa v trubkách, kotlích, bojlerch a dalších domácích spotřebičích, kde způsobují korozi, což zkracuje životnost zařízení. Přítomnost železitých iontů je přísně kontrolována, neboť hodnota obsahu železa je jedním z nejdůležitějších ukazatelů kvality pitné vody. Na základě stanovení železa ve vodě jsme schopni říci, zda je voda pitná a zda splňuje normy ČSN. Normy pro koncentraci železa jsou vztaheny na vody pitné, balené, pramenité, kojenecké a studniční. Stanovení železa ve vodě lze provést několika způsoby, metodami a přístroji. Já jsem ve své práci využila fotometrických metod, založených na reakci železa s komplexotvornou sloučeninou. Pro stanovení železa ve vodě jsem si vybrala tři metody, které se staly náplní pro experimentální část.

Cílem této práce je porozumění podstaty spektrálních metod a osvětlení zákonitostí, podle kterých jednotlivá stanovení probíhají. Prostudovat spektrální metody a dostupné návody, které by přicházely v úvahu pro stanovení železa ve vodě. Seznámit se s přístrojem HITACHI U-2001, na kterém bude uskutečněno vlastní měření vzorků. Vybrat vhodnou metodu, dle které bude měření probíhat. Připravit pracovní postup pro stanovení obsahu železa pomocí spektrofotometrie.

Bakalářská práce je rozdělena na dvě základní části, část teoretickou a část experimentální. Teoretická část pojednává o optických analytických metodách obecně. Zabývá se vlastnostmi elektromagnetického záření, dělením spektrometrických metod, uspořádáním optických přístrojů a podrobněji se pak věnuje spektrofotometrii – principy a využitím. Po seznámení se s problematikou spektrálních metod následuje část experimentální (praktická).

Praktická část představuje seznam použitých chemikálií, postupy pro přípravu pracovních, zásobních a kalibračních roztoků. Dále je věnována pozornost nastavení spektrofotometru, na kterém se uskutečnila kalibrace tří metod určených pro stanovení železa. Tyto metody jsou pak na základě kalibrace a pomocí dalších kritérií porovnávány. Výsledkem porovnání je zvolení jedné metody, dle které je realizováno vlastní měření odebraných vzorků. Naměřené hodnoty odebraných vzorků jsou zaznamenány do tabulek a grafů. Posléze pomocí naměřených hodnot proběhlo vyhodnocení výsledků, jež je součástí diskuze.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 OPTICKÉ ANALYTICKÉ METODY

Pojem optické metody představuje soubor fyzikálně-chemických metod, jejichž podstatou je interakce elektromagnetického záření se zkoumaným vzorkem – analytem. Tento mechanismus, založený na interakci hmoty a elektromagnetického záření, je typický pro všechny známé optické metody, které lze celkem jednoduše rozdělit na tzv. metody spektrometrické a nespektrometrické.

Pro metody spektrometrické platí, že při nich dochází k výměně energie mezi zářením a zkoumanou látkou. Principem reakce je excitace či deaktivace atomů, molekul, iontů, popřípadě radikálů. Můžeme tak říci, že dochází buď k absorpci, nebo k emisi záření. Mechanismus interakcí mezi elektromagnetickým zářením a hmotou je pro většinu spektrometrických metod dobře znám. U nespektrometrických metod nedochází k výměně energie, jedná se zde pouze o ovlivnění určitých vlastností procházejícího záření. Mezi tyto vlastnosti patří např. rychlost, rovina polarizace či rozptyl. <sup>(1,2)</sup>

Dnes již pojmenování optické metody považujeme spíše za historické a termín nahrazujeme označením spektrální metody, ačkoli to není jedno a to samé. Jednoduše řečeno, metody, při kterých dochází k výměně energie mezi vzorkem a zářením, souhrnně označujeme jako metody spektrální (spektrometrické). Dochází při nich k emisi nebo absorpci záření. Spektrometrické metody představují majoritní složku optických metod. Spektrometrické metody jsme schopni dělit na metody emisní a absorpční, a ty dále na metody spektrometrické molekulové a spektrometrické atomové.

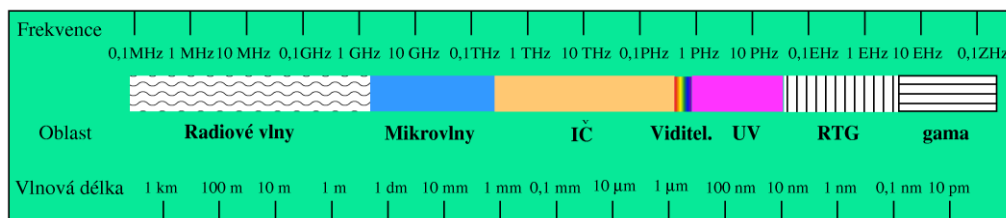


Obr. 1 Schematické rozdělení spektrálních metod



Minoritní složku optických metod představují metody, při nichž nedochází k výměně energie. Do této skupiny patří metody, které využívají indexu lomu (refraktometrie a interferometrie), otáčení roviny polarizovaného záření (polarimetrie, příp. spektropolarimetrie) a rozptylu a interference záření (difrakční metody).<sup>(3)</sup>

V každé odborné literatuře se setkáme s pojmem optické metody. Musíme si ale dávat pozor, jak tento termín chápe daná literatura. Ve svých počátcích se optické metody zabývaly pouze ději ve viditelné oblasti na stupnici elektromagnetického záření. Toto pojetí se vlivem vývoje a potřeb změnilo. Bylo zapotřebí, aby optické metody zahrnovaly celou stupnici elektromagnetického záření, a to od záření gama až po rádiové mikrovlny.<sup>(1, 2)</sup>



Obr. 2 Elektromagnetické spektrum<sup>(3)</sup>

### 2.1.1 VLASTNOSTI ELEKTROMAGNETICKÉHO ZÁŘENÍ

Elektromagnetické záření má současně vlnový a korpuskulární charakter. Jedná se o duální koncepci záření, na základě které popisujeme vlastnosti elektromagnetického záření. Podle této teorie duálního charakteru záření můžeme tvrdit, že záření má vlnové vlastnosti, tj. láme se, odráží se, ohýbá se, atd. a zároveň se může chovat jako proud elementárních kvant energie, fotonů, jež se pohybují jako částice.

Duální podstatu záření spojují dvě významné rovnice Planckova a de Broglieova. První rovnice definuje vztah mezi energií fotonu ( $E$ ) a frekvencí záření ( $\nu$ ) a říká, že elektromagnetické záření je formou (nositelem) energie:

$$E = h \cdot \nu$$

kde  $h$  je Planckova konstanta,  $h = 6,625 \cdot 10^{-34} \text{ J} \cdot \text{s}$  (Joule·sekunda).

De Broglieova rovnice přiřazuje pohybující se částici určitou vlnovou délku ( $\lambda$ ):

$$\lambda = \frac{h}{mv}$$

kde  $h$  je Planckova konstanta,  $m$  je hmotnost částice a  $v$  je její rychlost. <sup>(4, 5)</sup>

### 2.1.2 ZÁKLADNÍ VELIČINY CHARAKTERIZUJÍCÍ ELEKTROMAGNETICKÉ ZÁŘENÍ

*Frekvence* (kmitočet)  $\nu$  – udává počet kmitů za sekundu. Základní jednotkou je 1 hertz (Hz), jež odpovídá 1 kmitu za sekundu. V praxi se často setkáváme s násobky této jednotky, nejčastěji s kHz, MHz.

*Vlnová délka*  $\lambda$  – je vzdálenost, o kterou postoupí vlna za dobu jednoho kmitu. Základní jednotkou je 1 m, ale mnohem častěji se používají mikrometry ( $10^{-6}$  m) a nanometry ( $10^{-9}$  m).

*Vlnočet*  $\tilde{\nu}$  – odpovídá převrácené hodnotě vlnové délky ( $\tilde{\nu} = 1/\lambda$ ), která označuje počet vln připadajících na dráhu 1 cm. Jednotkou vlnočtu je  $\text{cm}^{-1}$ .

*Rychlost záření*  $v$  – vzdálenost, o kterou postoupí vlna za sekundu. Je dána vztahem  $v = \nu \cdot \lambda$ . Ve vakuu má elektromagnetické záření nejvyšší rychlost  $c$  ( $2,9979 \cdot 10^8 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$ ). V ostatních prostředí je rychlost  $c$  menší. Pro zjednodušení předpokládáme  $v = c$ . <sup>(2, 5)</sup>

Kmitočet, vlnová délka (popř. vlnočet) a rychlost záření spolu souvisí vztahem:

$$v = \frac{c}{\lambda} = c \cdot \tilde{\nu}$$

Z uvedených informací vyplývá, že elektromagnetické záření je charakterizováno kmitočtem, vlnovou délkou, rychlostí a energií záření. Tyto veličiny spolu souvisejí a jsou dány vztahem:

$$E = h \frac{c}{\lambda} = h \cdot c \cdot \tilde{\nu}$$

Můžeme tedy říci, že frekvence a vlnočet jsou přímo úměrné energii záření a naopak, že vlnová délka je energii nepřímo úměrná. <sup>(5)</sup>

## 2.2 KLASIFIKACE SPEKTROMETRICKÝCH METOD

Existuje několik kritérií, podle kterých jsme schopni rozdělit spektrometrické metody. Prvním kritériem je interakce mezi hmotou a zářením, kdy k výměně energie buď dochází, nebo ne. Dalším kritériem je povaha vyměňované energie. Při interakci dochází buď k vyzáření, uvolnění energie v podobě elektromagnetického záření, nebo je energie látkou pohlcena. Energetické změny se můžou týkat atomů nebo celých molekul. V neposlední řadě jsou spektrální metody klasifikovány podle jednotlivých elektromagnetických spekter.

### 2.2.1 POVAHA VÝMĚNY ENERGIE MEZI HMOTOU A ZÁŘENÍM

Atomy a molekuly jsou schopny pohlcovat nebo vyzařovat energii a měnit tak svůj energetický stav z nižšího stupně na vyšší a naopak. Energie přijatá i vyzářená může nabývat pouze určitých diskrétních hodnot. Vyměněná energie se v jednotlivých případech liší velikostí rozdílu  $\Delta E$  mezi počátečním  $E_{poč}$  a konečným stavem  $E_{kon}$ :

$$\Delta E = E_{kon} - E_{poč} = h \cdot \nu$$

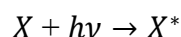
Pro atomy platí, že energii přijímají nebo vyzařují pouze elektrony. Tato energie odpovídá přechodům mezi energetickými hladinami a značí se  $\Delta E_{el}$ .

Pro molekuly platí, že se skládají z atomů a že energie molekul je ovlivňována právě atomy, které neustále vibrují kolem svých rovnovážných poloh. Tyto polohy jsou dány chemickou vazbou. Jednotlivým vibračním stavům odpovídá určitá energetická hladina, energie je zde kvantována. Důsledkem vibračního pohybu atomů je vznik tzv. vibračních energetických podhladin. Rozdíl energie mezi jednotlivými podhladinami značíme  $\Delta E_{vibr}$ . Dále vykonává pohyb sama molekula. Tento pohyb nazýváme rotačním. Také energie těchto pohybů je kvantována. Důsledkem rotačního pohybu molekul je vznik tzv. rotačních energetických podhladin. Rozdíl mezi jednotlivými rotačními stavy označujeme jako  $\Delta E_{rot}$ , platí:

$$\Delta E_{rot} \ll \Delta E_{vibr} \ll \Delta E_{el}^{(2)}$$

### 2.2.2 ABSORPCE A EMISE ZÁŘENÍ

**Absorpce** záření je interakce látky  $X$  se zářením o hodnotě energie, která odpovídá výrazu  $h\nu$  za vzniku excitované formy (látka energii přijímá):



Říkáme, že při absorpci dochází k pohlcení energie za vzniku excitovaného stavu. Látka absorbuje záření o určité vlnové délce. Uspořádaný soubor těchto vlnových délek, které látka absorbuje, představuje absorpční spektrum. Toto spektrum je charakteristické pro určitou látku, kterou tak lze podle absorpčního spektra identifikovat, popřípadě odvozovat její strukturu. Absorbované vlnové délky jsou kvantitativním ukazatelem. <sup>(2, 5)</sup>

#### Při měření absorptance se setkáváme s několika veličinami

*Transmittance* neboli *propustnost*  $T$  je definována jako poměr toku monochromatického záření propuštěného látkou po absorpci  $\Phi$  k toku vstupujícího záření  $\Phi_0$ :

$$T = \frac{\Phi}{\Phi_0}$$

*Absorptance*  $\alpha$  je charakterizována jako podíl toku monochromatického absorbovaného záření k toku vystupujícího záření:

$$\alpha = \frac{\Phi_0 - \Phi}{\Phi} = 1 - T$$

U propustnosti a absorptance je zvykem uvádět výsledné hodnoty v %.

*Absorbance* neboli *extinkce*  $A$  udává, kolik světla bylo pohlceno danou látkou. Jedná se o bezrozměrnou veličinu a lze ji definovat na základě propustnosti vztahem:

$$A = -\log T = -\log \frac{\Phi}{\Phi_0}$$

Absorbance záření je popsána několika výše uvedenými vztahy, které v integrální podobě vedou k **Lambert-Beerovu zákonu**. Podle Lamberta je úbytek intenzity světla přímo úměrný tloušťce absorbující vrstvy. Beer ukázal, že v transparentních rozpouštědlech je absorpční koeficient lineární funkcí koncentrace

rozpuštěné látky. Z těchto poznatků pak vyplývá formulace Lambert-Beerova zákona ve tvaru:

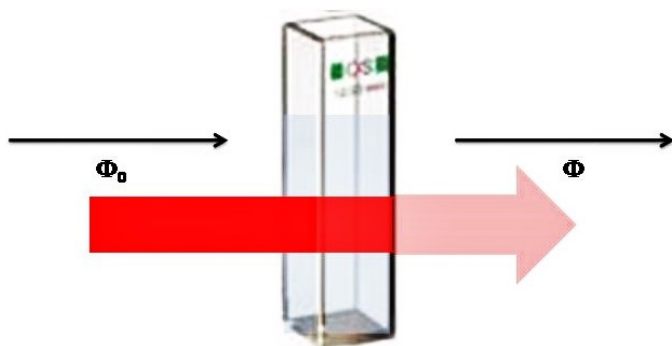
$$A = \varepsilon_{\lambda} \cdot c \cdot l$$

kde:

$\varepsilon_{\lambda}$  je molární absorpční koeficient (konstanta pro danou látku za daných podmínek při určité vlnové délce) v  $\text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ,

$c$  je koncentrace absorbující látky v  $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ,

$l$  je tloušťka absorbující vrstvy v cm.



Obr. 3 Lambert-Beerův zákon

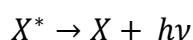
Absorpce záření při průchodu květou

Z uvedeného Lambert-Beerova vztahu lze vyčíst, že nulovou absorbancí má vzorek, který nepohltní žádné světlo. Pokud by se absorbance rovnala jedné, znamenalo by to, že vzorkem prošla právě jedna desetina světla. V případě, že by absorbance byla záporná, vzorkem by procházelo více světla než nulovým vzorkem (blankem). Záporná absorbance je naměřena z pravidla v důsledku hrubé chyby a nesprávného měření.<sup>(6, 7)</sup>

Platnost zákona má určitá omezení. Zákon platí pouze pro zředěné roztoky s koncentrací nižší než  $10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Další podmínka pro jeho platnost je, aby veškerá energie absorbovaná látkou přecházela v energii tepelnou. Z toho vyplývá, že nesmí docházet k fluorescenci nebo rozptylu záření. Platnost Lambert-Beerova zákona je nutným předpokladem pro jakákoli spektrofotometrická nebo fotometrická stanovení. Platnost se nejčastěji ověřuje vynesemím funkční závislosti  $A = f(c)$  při konstantní tloušťce pohlcující vrstvy.

Molární absorpční koeficient ( $\varepsilon_\lambda$ ) charakterizuje studovanou látku. Jeho hodnota se zjišťuje při maximální absorpci, tedy při vlnové délce odpovídající maximální absorpanci ( $A_{max}$ ). Při jejím použití k výpočtu je důležité si uvědomit, že tato hodnota  $\varepsilon_\lambda$  byla zjištěna v určitém systému a nelze ji tedy používat za obecnou konstantu. <sup>(1, 5, 8)</sup>

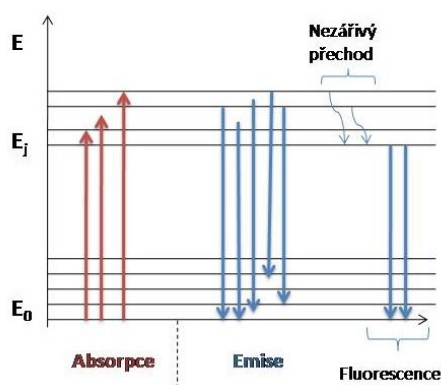
**Emise** záření je děj k absorpci opačný. Látka, která byla převedena do vyššího excitačního stavu, přechází uvolněním energie ve formě záření do excitačního stavu nižšího nebo až do stavu základního. Jedná se o tzv. deexcitaci, hmota uvolňuje energii, která odpovídá výrazu  $h\nu$ :



Uspořádaný soubor vlnových délek, které daná látka vyzařuje, se označuje jako emisní spektrum. Toto spektrum je pro určitou látku charakteristické, tak jako jsme se s tím setkali u absorpčního spektra. Množství emitovaného záření je charakterizováno Scheibe-Lomakinovo rovnicí v logaritmické podobě:

$$\log \Phi = b \log c + \log a$$

kde **a** a **b** jsou konstanty charakteristické pro určitou čáru ve spektru a **c** odpovídá koncentraci látky ve vzorku. <sup>(2)</sup>



Obr. 4 Schéma absorpce, emise a fluorescence záření <sup>(5)</sup>

Znázornění energetických podhladin ( $E_0, E_j$ ) vynesných v podobě zvyšující se energie na ose y

### 2.2.3 ATOMOVÁ A MOLEKULOVÁ SPEKTRA

V tomto případě nás bude zajímat, zda dochází ke změně energie atomů nebo celých molekul. Máme na mysli metody atomové a molekulové spektrometrie. Důležitým faktem je, že spektra atomů se liší od spekter molekul. Spektra atomů jsou čárová (emisní nebo absorpční) a spektra molekul jsou pásová.

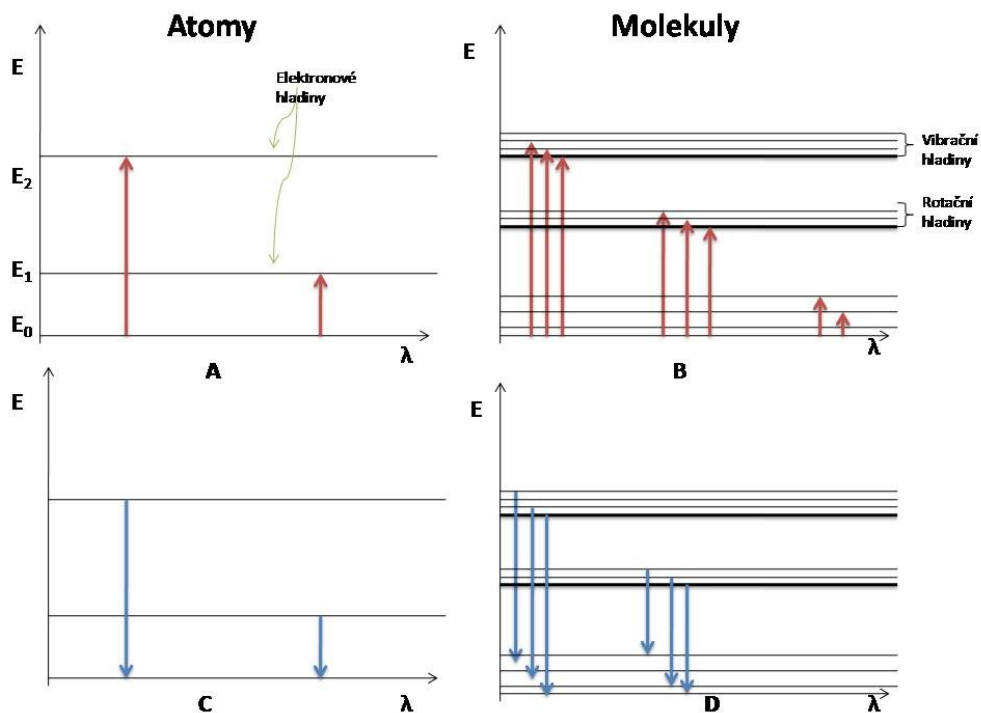
Čárová spektra jsou reprezentována úzkými liniemi, které vznikají v důsledku přechodu mezi jednotlivými stavy atomů. V molekulách dochází k početným energetickým přechodům, není to tak jasné jako v případě atomů. Přechody v molekule se liší velice malým energetickým rozdílem. Nejsme je schopni rozlišit, a proto nám splývají do tzv. pásů. Spektra pásová jsou tedy tvořena různě širokými pásy, které vznikají současnou změnou elektronového, vibračního a rotačního stavu molekuly nebo pouze rotačního a vibračního stavu. <sup>(2, 5)</sup>

#### **Příklady spekter:**

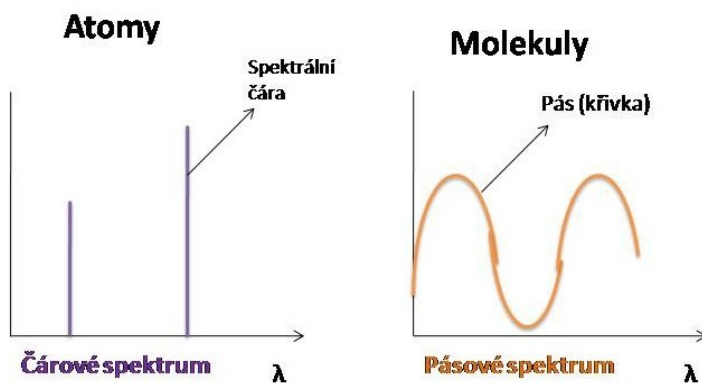
*Spojitě spektrum* je takové spektrum, které obsahuje vlnové délky o určitém rozsahu. Příkladem spojitěho spektra je disperze bílého světla. Získáme tak souvislý pás spektrálních barev. Spojité spektrum je typické pro pevné látky. Dále se setkáváme se spektry *emisními* a *absorpčními*. Ty lze dělit na spektra *čárová* charakterizující atomy látek a spektra *pásová* charakteristická pro molekuly.

*Čárové spektrum*, obsahuje pouze řadu ostrých čar, mezi kterými se nachází neosvětlené tmavé pásy. Jednotlivé ostré čáry označujeme jako spektrální čáry (Obr. 6).

*Pásově spektrum*, pro které jsou typické sady širších pruhů – pásů. Tyto pásy jsou tvořeny překrývajícími se spektrálními čarami, které nejsme schopni rozlišit, proto se nám toto spektrum jeví jako pásově (Obr. 6). <sup>(2, 9)</sup>



Obr. 5 Schematické znázornění absorpce a emise pro atomy a molekuly látek <sup>(2)</sup>  
 U atomů dochází k absorpci (A) a emisi (C) záření pouze mezi elektronovými energetickými hladinami. V případě molekul je absorbováno (B) nebo emitováno (D) záření o mnohem větším počtu vlnových délek, z důvodu mnoho vibračních a rotačních hladin.



Obr. 6 Příslušná spektra pro atomy (čárová) a molekuly (pásová) <sup>(2)</sup>

## 2.2.4 ROZSAHY VLNOVÝCH DÉLEK ELEKTROMAGNETICKÉHO ZÁŘENÍ

Dalším kritériem pro klasifikaci spektrometrických metod je oblast vlnových délek studovaného elektromagnetického záření. Tento způsob je hojně využíván. Často se odráží do názvů samotných metod – rentgenová, ultrafialová, viditelná a infračervená spektrometrie. Rozsah vlnových délek využívaného elektromagnetického záření je značný a nabývá hodnoty od pm ( $10^{-12}$  m) až po desítky metrů, tj. v hodnotách energie



od  $10^6$  do  $10^{-8}$  elektronvoltů. Tento způsob dělení je velice praktický a názorný (Tabulka 1). Záření může být dále charakterizováno pomocí frekvence a vlnočty. <sup>(5)</sup>

Tabulka 1 **Elektromagnetické záření využívané v chemické analýze** <sup>(2)</sup>

Délka vlny (řádově)	Druh záření	Spektrální metoda
m	rádiové vlny	nukleární magnetická rezonance
cm	mikrovlny	elektronová paramagnetická rezonanční spektrometrie
mm	infračervené záření (IČ)	IČ spektrometrie
nm	viditelné, ultrafialové záření (VIS, UV)	UV a VIS spektrometrie
< 1 nm	rentgenové záření (RTG)	RTG spektrometrie

## 2.3 OPTICKÉ PŘÍSTROJE A JEJICH SOUČÁSTI

Ačkoli se v optických metodách setkáváme s různými experimenty, možnostmi a formami stanovení, tak přístroje pro spektrální analýzu jsou ve směr podobné a mají své charakteristické části, jež jsou pro všechny metody společné. Jedná se o tyto části: zdroje záření, zařízení pro umístění vzorku (např. různé kyvety v absorpčních metodách), dále disperzní systém a pomocná optika (filtry a monochromátory usměřující tok záření), detektory záření (sloužící k měření intenzity záření) a v neposlední řadě vyhodnocovací a zobrazovací zařízení.

### 2.3.1 ZDROJE ZÁŘENÍ

Jedná se o tu část přístroje, která umožňuje buď excitaci vzorku, jež poté emituje charakteristické záření (toho se využívá v emisních metodách). Další možností je, že se emituje primární záření, které je vzorkem absorbováno, anebo pozorujeme fluorescenci. Absorbanci pal lze měřit a sledovat pomocí absorpčních metod.

Pro metody atomové emisní spektrometrie platí, že zdrojem záření je vlastní vzorek převedený do atomárního stavu, který podstupuje excitaci v důsledku dodání energie. Existuje mnoho různých fyzikálních principů a procesů, které umožňují vyzařování záření. energii můžeme dodat několika způsoby: termicky (ohřevem v plameni), pomocí energie v plazmatu výbojů elektrických zdrojů, předáním energie fotonů (laserem) nebo urychlenými částicemi. V těchto případech je záření emitováno z ultrafialové a viditelné oblasti.

V metodách absorpčních a fluorescenčních, u kterých nedochází k výměně energie, sledujeme průchod záření vzorkem. Toto záření může mít několik zdrojů, které jsou poté charakteristické pro jednotlivé metody. Zdrojem záření mohou být rozžhavené tuhé látky, výbojky (elektrické výboje v plynech a párách kovů), dále laserové zdroje, rentgenová lampa a radiofrekvenční cívky. <sup>(2, 5)</sup>

Zdroje záření můžeme dělit pomocí vysílaného spektra na spojitě, čárové, popřípadě pásové zdroje záření. Dalším kritériem dělení je oblast vlnových délek vydávaného záření, která je charakteristická pro určité spektrometrické metody.

V oblasti UV záření (200-400 nm) u metod molekulové absorpční spektrometrie se nejčastěji využívá jako zdroj záření spojitého spektra vodíková a deuteriová výbojka ( $H_2$  a  $D_2$  výbojka) a dále xenonová výbojka, které je také zdrojem spojitého spektra (v rozmezí 250-1000 nm) a setkáváme se s ní v metodách molekulové fluorescence.

Pro oblast UV a VIS záření se využívají spektrální lampy, např. rtuťová výbojka, jež je zdrojem čárového spektra u metod atomové absorpční spektrometrie a atomové fluorescence. Rtuťovou výbojku bychom mohli nahradit výbojkou s dutou katodou, která je v současné době nejčastějším zdrojem záření pro metody atomové absorpční spektrometrie.

Pro oblast UV, VIS a IČ je zdrojem čárového spektra laser, využívaný v metodách molekulové absorpční spektrometrie a molekulové fluorescence. Laser má několik výhod, např. vysoká monochromaticnost záření, jeho frekvenční stabilita, velká intenzita záření, úzký paralelní paprsek, malá divergence (rozbíhavost) světelného paprsku, který z laseru vystupuje.

Pro oblast VIS a IČ (v rozmezí 360-3000 nm) používáme wolframovou žárovku s rozžhavenou spirálou, která je naplněna inertním plynem. V tomto případě se jedná o zdroj spojitého spektra u metod molekulové absorpční spektrometrie.

Pro rentgenové záření je charakteristické využití rentgenové lampy, která poskytuje spojitě spektrum přeložené spektrem čárovým. Rentgenová lampa je typická pro RTG spektrometrii.

Pro ucelení je ještě uvedeno záření dlouhovlnné v rozsahu mikrovln a radiových vln, kde jsou využívány radiofrekvenční cívky a klystrony (speciální elektrody). <sup>(5, 10)</sup>

### 2.3.2 ZAŘÍZENÍ PRO UMÍSTĚNÍ VZORKU

U metod atomové spektrometrie není vzorek nijak ukotven a uzavřen ve speciálním zařízení. Vyskytuje se ve formě oblaku atomů, které absorbují nebo emitují záření.

U metod molekulové spektrometrie jsou vzorky umístěny do speciálních nádobek, které nazýváme kyvety. Jednou z nejdůležitějších vlastností kyvet je to, že její stěny jsou schopny propouštět světlo o určité vlnové délce. Běžně jsou vyráběny ze skla nebo z plastu (pro jednorázové použití). Jestliže ale chceme analýzu provádět v UV oblasti záření, je zapotřebí použít kyvety z křemenného skla a pro IČ pracovat s kyvetami z halogenidů některých kovů, nejčastěji z chloridu sodného a bromid thalného. Kyvety mohou být planparalelní – vymezené plochými rovnoběžnými stěnami nebo válcovité kruhového průřezu. Speciálním typem kyvet jsou kyvety průtokové, které jsou pevně zabudovány v přístroji (fotometru). Urychlují měření, jelikož s nimi nemusíme složitě manipulovat.<sup>(5, 10)</sup>

### 2.3.3 DISPERZNÍ SYSTÉM A POMOCNÁ OPTIKA

Disperzní systém tvoří základní část optických přístrojů. Slouží k vymezení záření o určitém spektrálním intervalu vlnových délek. Základní část optických přístrojů tvoří monochromátory a filtry, díky kterým si můžeme zvolit určitou vlnovou délku. U jednodušších aplikací se využívá filtrů, které vymezují jeden nebo dva rozsahy vlnových délek. Pokud ale chceme vymezovat více rozsahů vlnových délek nebo měřit v širokém rozsahu spektra, používáme monochromátory. U kvalitních přístrojů považujeme záření procházející vzorkem za monochromatické. Za jednotlivé optické vlastnosti přístrojů odpovídá hlavně disperzní systém, který přístroj charakterizuje. Není divu, že právě na disperzní prvky je kladen velký důraz a že se pro jednotlivé spektrometrické metody tyto prvky liší.<sup>(7)</sup>

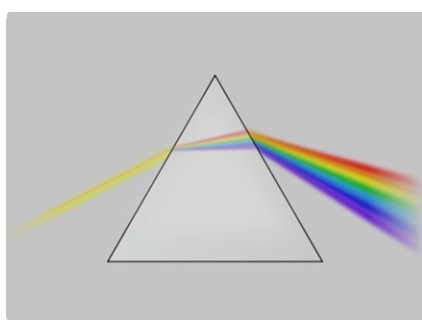
#### **Monochromátory**

Jedná se o optická zařízení, která umožňují izolovat pouze určitý pás požadovaných vlnových délek a propouštět tak pouze malou část spektra. Vstupující záření je rozděleno na řadu monochromatických paprsků, z nichž je vybírána pouze požadovaná vlnová délka. Díky monochromátoru jsme schopni měnit vlnovou délku podle potřeby. Monochromátor je složen ze vstupní a výstupní štěrbiny, pomocné

optiky (soustava čoček a zrcadel) a nejdůležitější část tvoří vlastní disperzní prvek (disperzní mřížka nebo hranol). Hlavní funkcí disperzních prvků je rozklad spojitého spektra na jednotlivé vlnové délky.

- **Hranoly**

U lámavého hranolu dochází k disperzi polychromatického svazku rovnoběžných paprsků (v důsledku odlišného indexu lomu záření o různých vlnových délkách). Index lomu je odlišný pro různé vlnové délky. Záření s menší vlnovou délkou se láme více než záření s větší vlnovou délkou. Tento disperzní prvek bychom našli spíše u starších přístrojů. V moderní spektrometrii se s ním setkáváme výjimečně. <sup>(7)</sup>



Obr. 7 Rozklad světla hranolem <sup>(11)</sup>

- **Mřížky**

Principem mřížky používané ve spektrálních přístrojích je rozklad záření. Disperze záření je v tomto případě důsledkem odrazu nebo ohybu (difrakce) záření a interference odražených či ohnutých paprsků. Mřížka je plocha z transparentního (průhledného) materiálu, jež je opatřená řadou rovnoběžných čar neboli vrypů. Mřížky mohou mít úzkou štěrbinu, kudy prochází svazek rovnoběžných paprsků. Štěrbinu mohou být nahrazeny ryskami vrytými do materiálu dobře odrážejících záření (např. zlato na skle), jedná se o tzv. difrakční odrazové mřížky. Dané mřížky jsou použitelné pouze pro určitou spektrální oblast a často je charakterizujeme pomocí hustoty vrypů (počet vrypů na 1 mm). <sup>(2, 7, 10)</sup>

## Filtry

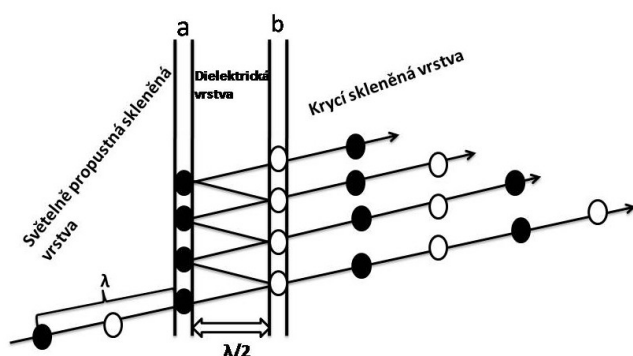
Optická zařízení, která na rozdíl od monochromátorů vymezují z polychromatického svazku paprsků určitý pás vlnových délek (10nm až 100nm pásy) nebo mohou vymezit pouze jednu čáru z čárového spektra. Zatímco ostatní záření odlišných vlnových délek je absorbováno. Jejich spektrální propustnost je založena na selektivní absorpci záření. Filtry se často využívají tam, kde není kladen velký důraz na monochromaticnost záření a kde měření probíhá při jedné vlnové délce. <sup>(2,5)</sup>

- **Barevný absorpční filtr**

Jedná se o barevnou vrstvu z různého materiálu např. z propustného skla (vybarveného oxidy některých kovů), skla pokrytého želatinou (vybarvenou organickými barvivy) nebo z kyvety naplněné zabarveným roztokem. Dochází k propouštění pouze požadované vlnové délky elektromagnetického záření, ostatní se absorbuje. Využití těchto filtrů najdeme nejčastěji ve viditelné oblasti spektra u metod molekulové absorpční spektrometrie. <sup>(5, 7)</sup>

- **Interferenční filtr**

Jedná se o filtr z tenké destičky, např. z  $\text{SiO}_2$ , která je pokryta z obou stran reflexním často stříbrným filmem. Využívá se zde mnohonásobné interference záření a vícenásobného odrazu světelných paprsků mezi vrstvami filmů (Obr. 8). Tyto interferenční filtry vymezují mnohem užší rozsah záření, než tomu bylo u filtrů barevných. <sup>(7)</sup>



Obr. 8 Schéma interferenčního filtru <sup>(5)</sup>  
a, b – polopropustné odrážející stříbrné filmy

### 2.3.4 DETEKTORY ZÁŘENÍ

Detektory (čidla, receptory) slouží k indikaci záření. Převádějí (transformují) zářivou energii v jinou měřitelnou veličinu, nejčastěji energii, kterou lze pak jednoduchým způsobem měřit. Nejčastěji je používána přeměna energie na energii elektrickou (fotoelektrické články), dále na tepelnou a elektrickou (termodynamické články, pyroelektrické detektory, polovodičové detektory) nebo tepelnou a mechanickou (pneumatické články). Dále využíváme ionizačních účinků (proporcionální počítače) nebo fotochemické reakce (fotografické detekce, lidské oko).

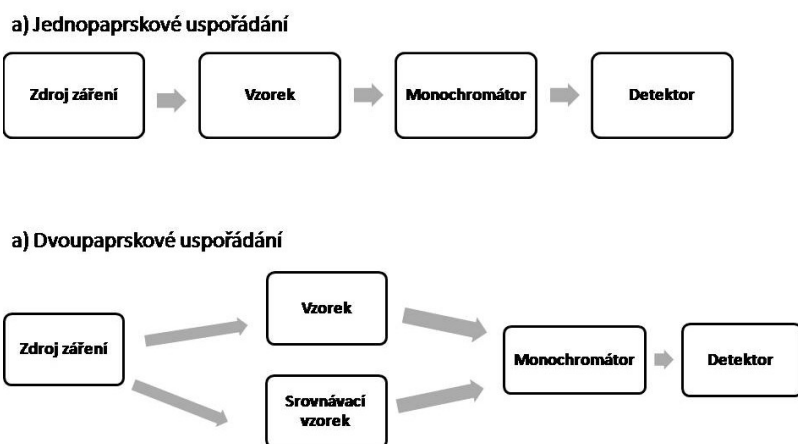
Při detekci v UV a VIS oblasti nejčastěji používáme fotoelektrické články, které jsou založené na vnějším a vnitřním fotoelektrickém efektu. Pro detekci v UV a RTG oblasti se využívá speciálních citlivých detektorů (termočlánky, polovodičové detektory, ionizační detektory). Pod emisní fotoelektrické články zahrnujeme fotonky a fotonásobiče. Polovodičovým fotoelektrickým článkem může být křemíková fotodioda. Seskupením několika set až tisíc fotodiod vzniká tzv. diodové pole (diode array), tento systém detekce se stále více prosazuje u moderních optických spektrometrů. <sup>(1, 7)</sup>

### 2.3.5 VYHODNOCOVACÍ ZAŘÍZENÍ

V dnešní době jsou moderní spektrometrické přístroje napojené na počítače, které vyhodnocují výsledky měření pomocí speciálních počítačových programů. Dnes si již vyhodnocování a zobrazování komplexních výsledků analýzy bez moderní techniky nedokážeme ani představit. Na druhou stranu se v praxi můžeme setkat s poměrně starými a historickými přístroji, které stále plní svoji funkci na výbornou. <sup>(5)</sup>

### 2.3.6 USPOŘÁDÁNÍ PŘÍSTROJŮ

Uvedené části spektrometrických přístrojů mohou být uspořádány dvěma způsoby, buď v jednopaprskovém, nebo dvoupaprskovém uspořádání (Obr. 9). Jednopaprskové uspořádání se využívá u všech emisních metod a můžeme ho najít i u některých absorpčních metod. Dvoupaprskové uspořádání se vyskytuje převážně u absorpčních metod, kde je potřeba eliminovat vliv nestability zdroje záření. Toto uspořádání se využívá u dražších spektrometrů, na kterých lze měřit v UV, VIS i IČ oblasti. <sup>(2, 5)</sup>



Obr. 9 Schéma uspořádání základních částí spektrometrických přístrojů <sup>(5)</sup>

## 2.4 MOLEKULOVÁ ABSORPČNÍ SPEKTROMETRIE V ULTRAFIALOVÉ A VIDITELNÉ OBLASTI

Molekulovou spektrální absorpční analýzu (spektrofotometrii, kolorimetrii, popřípadě fotometrii) považujeme v dnešní době za jednu z nejvyužívanějších analytických metod pro stanovení látek v roztoku vůbec. Důvodem je rychlost, experimentální nenáročnost i přesnost a citlivost těchto metod.

Molekulová absorpční spektrometrie v UV a VIS oblasti se zabývá měřením absorbance elektromagnetického záření v rozsahu vlnových délek 200 až 800 nm. Dále věnuje pozornost interpretaci elektronových spekter látek, které absorbují elektromagnetické záření. Pokud látka absorbuje záření o vlnové délce nižší než 380 nm, jeví se našemu oku jako bezbarvá. Látky, absorbující bílé sluneční záření v rozsahu vlnových délek 380 až 770 nm, jsou naším okem vnímané jako barevné. Oblast záření v rozsahu 10-200 nm je označována jako vzdálená ultrafialová oblast, též nazývána jako oblast vakuová. V této oblasti při sledování absorbance musíme používat speciální evakuované aparatury, neboť záření je zde absorbováno vzduchem. <sup>(1, 2, 5)</sup>

Jak již bylo uvedeno v kapitole č. 2.2.2, v molekulách existují elektronové energetické hladiny, které jsou vlivem vibračního pohybu atomů a rotačního pohybu samotné molekuly rozštěpeny na rotační a vibrační energetické podhladiny. Za normálních podmínek se molekula nachází v základním elektronovém stavu a její energie je rovna součtu energie elektronové, vibrační a rotační. Molekula je schopna

přechodu do excitovaného stavu při pohlcení fotonů záření z UV či VIS oblasti. Tyto fotony jsou dostatečně energetické, aby excitovaly i elektronové stavy molekuly.

Výsledné absorpční spektrum látky je pásové, protože při jeho zaznamenávání jednotlivé energetické přechody mezi vibračními a rotačními hladinami splývají. Toto výsledné spektrum nepředstavuje soubor několika ostrých čar, ale soubor pasů vznikajících v důsledku elektronických přechodů. Jeden pás pak ve spektru představuje jeden typ přechodu elektronů v molekule. Výjimkou je měření v plynné fázi za nízké teploty, kdy jsme schopni v absorpčním spektru rozlišit jemnou vibrační i rotační strukturu. Mezi jednotlivými energetickými hladinami molekuly jsou vzniklé elektronové přechody charakteristické pro anorganické nebo organické látky. <sup>(5, 8)</sup>

Měření absorbance v UV a VIS oblasti je uskutečněno pomocí různých typů přístrojů, na základě kterých odvozujeme názvy pro jednotlivé absorpční spektrální metody – kolorimetrie, fotometrie, spektrofotometrie.

### Kolorimetrie

Historicky nejstarší a nejjednodušší metoda, kdy látka absorbuje pouze záření ve viditelné oblasti, tzn., že látka je barevná. Jako detekční nástroj zde funguje lidské oko, pomocí kterého se určuje propustnost (absorbance). Pokud roztok absorbuje nejvíce např. fialovou barvu, která odpovídá vlnové délce od 400-435 nm, roztok se oku jeví jako žlutozelený (Tabulka 2). Samozřejmě oko není schopné měřit absolutní hodnoty intenzity záření, může pouze relativně porovnávat intenzitu zabarvení různých roztoků vzorků.

Tabulka 2 **Barvy absorbovaného viditelného záření a příslušné barvy doplňkové**

<b>Barva absorbovaného záření</b>	<b>Barva doplňková (barva roztoku)</b>
fialová	žlutozelená
modrá	žlutá
zelenomodrá	oranžová
modrozelená	červenooranžová
zelená	purpurová
zelenožlutá	fialová
žlutooranžová	modrá
červenooranžová	zelenomodrá
červená	modrozelená



## **Fotometrie**

Metoda, která také využívá pouze viditelné oblasti spektra. Pro tuto metodu je typické dvouparpsovské uspořádání přístrojů a použití barevného filtru, který funguje jako náhrada monochromátoru. Filtry vymezují různě široký pás záření. Měření je prováděno pomocí jedné nebo několika konkrétních vlnových délek.

## **Spektrofotometrie**

Metoda, pomocí které jsme schopni získat spektra ve viditelné i ultrafialové oblasti. Nutným předpokladem pro tuto metodu je využití monochromátorů. <sup>(5)</sup>

## **2.5 SPEKTROFOTOMETRICKÉ STANOVENÍ**

Spektrofotometrie v ultrafialové a viditelné oblasti spektra je pokračovatelem klasické kolorimetrie. Princip všech spektrometrických metod je založen na měření absorpce záření látkou. Tyto metody jsou stále na vysokém postavení mezi ostatními analytickými instrumentálními metodami. Využití spektrofotometrických metod je hojné, a to především díky poměrné jednoduchosti provedení měření absorbance. Další výhodou je nenáročnost na laboratorní podmínky a možnost automatizace měření, která je v dnešní době samozřejmostí. <sup>(1, 5)</sup>

### **2.5.1 SPEKTROFOTOMETR**

Přístroj, který se využívá při měření absorbance a transmitance neznámého vzorku. Spektrofotometr je schopen měřit pouze část absorpčního spektra v určitém úseku vlnových délek a vlnové délky zde můžeme nastavit na konkrétní hodnoty. Spektrofotometr je složen ze čtyř částí: zdroje světla, monochromátoru, zařízení pro umístění vzorku (kyvety) a detektoru.

Zdrojem spojitého primárního záření může být vodíková, deuteriová nebo xenonová výbojka (pro ultrafialovou oblast) a wolframová nebo halogenová žárovka (pro viditelnou oblast). Dále zde najdeme monochromátor, který slouží k volbě vlnové délky. K disperzi záření používáme difrakční mřížky ve spojení s vstupní a výstupní štěrbinou. Absorbující prostředí je tvořeno kyvetami (křemenné pro UV oblast, skleněné nebo plastové pro viditelnou oblast s konstantní tloušťkou nejčastěji 1 cm). Při měření používáme minimálně dvě kyvety, kdy jedna obsahuje roztok vzorku (analytu) a

druhá je naplněna roztokem srovnávacím tzv. blankem – vzorek bez obsahu analytu zpracovaný shodným postupem jako vzorek.

Detektor zde převádí zářivý tok na elektrický signál. Pro VIS oblast se používají fotonky a fotonásobiče. U starších přístrojů se setkáváme se selenovými hradlovými fotočlánky, fotoodpory. Dále se využívají objektivní fotoelektrické detektory – polovodičové fotoelektrické články, křemíkové fotodiody, diodová pole. Signál, který vychází z detektoru, se ještě může zpracovávat v zesilovači. Zesilovač zesiluje slabý elektrický signál vycházející z detektoru na hodnotu, kterou můžeme měřit. Koncová část je tvořena vyhodnocovacím zařízením – počítačovým programem.

Spektrofotometry můžeme dělit podle toho, pracuje-li se s jedním nebo se dvěma světelnými toky, na přístroje jednopaprskové nebo dvoupaprskové (Obr. 9) a dále na přístroje výchylkové, kompenzační, substituční apod. <sup>(5, 8, 11)</sup>

### 2.5.2 PRAKTICKÉ VYUŽITÍ

Analytické využití absorpce v UV a VIS oblasti je možné aplikovat jak v organické, tak i anorganické analýze. V kvalitativní analýze můžeme vyhodnocovat spektra organických látek a získat tak informace o přítomnosti typických funkčních skupin v molekule, tzv. kvantitativní posouzení struktury látek. Identifikace látky pomocí získaného absorpčního spektra není tak jednoznačná. Nicméně se tento postup využívá např. k posuzování čistoty jednotlivých organických látek a setkáme se s ním i při identifikaci látek v biochemii a farmacii. Nejčastější využití absorpční spektrometrie najdeme v kvantitativní analýze, která je založena na platnosti Lambert-Beerova zákona. Jeho platnost je ale omezena, a to na zředěné čiré roztoky absorbujících látek s menší koncentrací než 0,01 mol/l.

Pro zjištění hodnot absorpance využíváme nejčastěji kalibračních grafů, kde je vynesena závislost absorpance na koncentraci stanovované látky. Z pravidla měříme při maximální konstantní vlnové délce, při které látka (roztok) absorbuje nejvíce záření. Látky, které v UV a VIS oblasti nejsou schopné absorpce záření, převádíme na vhodné barevné sloučeniny pomocí tzv. spektrofotometrických reakcí. Nejčastěji se využívá komplexotvorných reakcí. Toto platí pro stanovení většiny anorganických látek, které se reakcí převedou na vhodný komplex. Příkladem může být reakce železitých iontů s thiokyanatem, kdy vzniká červeně zbarvený komplex. Existuje několik druhů

organických i anorganických činidel, které s ionty kovů vytváří stabilní barevné komplexy.<sup>(2, 5)</sup>

### 2.5.3 KONKRÉTNÍ VYUŽITÍ SPEKTROFOTOMETRIE

Pomocí fotometrických metod jsme schopni stanovit více než 85 prvků. Praktické využití neplatí pouze pro anorganické látky, ale existuje nespočet látek organických, které jsou stanovovány díky těmto metodám. Časté je stanovení organických látek v biochemii např. stanovení proteinů. Dále tyto metody našly uplatnění v analýze potravin, léčiv a při stanovení koncentrace aniontů a kationtů vyskytujících se především ve vodě.<sup>(1)</sup>

### 2.5.4 STANOVENÍ KOVŮ

KOVY – Kovové prvky společně s jejich sloučeninami nalezneme nejčastěji v půdě (v horninách), odkud se vyluhováním dostávají do podzemních a povrchových vod. Některé kovy jsou pro správnou funkci organismu nezbytné, je třeba je přijímat v potravě, např. železo, které je důležitou složkou krevního barviva (hemoglobinu). Na druhou stranu některé mohou být pro člověka toxické a nebezpečné. Tyto látky se mohou postupně hromadit v organismu a škodit. Proto existují různé normy ČSN, které uvádějí maximální přípustné koncentrace jednotlivých kovů, především v pitné vodě. Pro stanovení kovů se nejčastěji využívá reakce mezi vzorkem a anorganickým nebo organickým činidlem.<sup>(1, 13)</sup>

#### Stanovení železa

Železo se v přírodě vyskytuje nejčastěji ve sloučeninách jako dvou nebo trojmocné. Ve vodě železo najdeme nejčastěji v rozpuštěné podobě jako trojmocné ve formě hydroxokomplexů. Existuje několik možných způsobů jak jednotlivé formy železa ve vodě stanovit. Můžeme stanovit celkové železo (rozpuštěné i nerozpuštěné), celkové rozpuštěné železo (dvojmocné i trojmocné) nebo rozpuštěné železo v oxidačním stupni II. Pro stanovení železa existuje několik metod: jedná se o atomovou absorpční spektrometrii, emisní spektrometrii s indukčně vázanou plazmou a molekulovou absorpční spektrometrii.<sup>(14)</sup>

Největší uplatnění pro stanovení železa našla molekulová absorpční spektrofotometrie, kdy pravděpodobně nejvíce fotometrických metod bylo popsáno

právě pro stanovení železa. Základem je reakce iontu železa s anorganickým či organickým činidlem za vzniku barevného komplexu, u kterého jsme schopni měřit absorbanci. Jsou to např. metody: stanovení s rhodanidem (thiokyanatanem) – červeně zbarvený komplex, s 1,10-fenantrolinem – oranžově červený komplex, s bathofenantrolinem – červeně zbarvený komplex, s 2,2'-bipyridylem – červeně zbarvený komplex, s feronem (k.7-jod-8-hydroxychinolin-5sulfonová) – tmavozelený chelát a s kyselinou sulfosalicylovou – v kyselém prostředí se tvoří červeně zbarvený roztok, zatímco v alkalickém prostředí vzniká intenzivní žluté zbarvení. <sup>(12)</sup>

Železo v pitné vodě nepatří mezi látky, které by byly našemu zdraví škodlivé, ale i přesto je koncentrace železa hlídána. Vyšší koncentrace může ovlivňovat organoleptické vlastnosti pitné vody – chuť a vzhled. Dále se pak můžeme setkat při vyšších koncentracích se vznikem sloučenin železa, které se ve formě povlaků usazují v potrubí a zhoršují tak jeho průchodnost. Tyto povlaky jsou často živnou půdou pro určité druhy bakterií, které mohou způsobovat i nepříjemná průjmová onemocnění. Z těchto důvodů je maximální přípustná koncentrace železa v pitné vodě 0,2 mg/l. Existují ale i výjimky, jež se nejčastěji týkají studničních vod, u kterých předpokládáme vliv geologického podloží. Maximální hranice koncentrace je v tomto případě zvýšena na 0,5 mg/l. <sup>(10, 15)</sup>

### 2.5.5 METODY STANOVENÍ KONCENTRACE ANALYTU

U analytických stanovení využívajících spektrofotometrických metod, používáme tzv. metody nepřímé, kdy koncentraci (obsah) analytu zjišťujeme porovnáváním se standardy.

#### **Metoda kalibrační křivky**

Pro tento způsob využíváme kalibrační závislosti absorbance na koncentraci, kdy předpokládáme platnost Lambert – Beerova zákona. Je to jeden z nejpoužívanějších způsobů určování koncentrace analytu, i když je poměrně časově náročný na přípravu standardů. Celkově je ale vlastní měření vzorků podstatně rychlejší než třeba titrace při stejném množství vzorků. Nutná je příprava roztoků standardů o různých koncentracích ( $c$ ) za definovaných optimálních podmínek. U standardů obsahujících různé vhodně zvolené koncentrace stanovované látky provedeme měření absorbance. Zaznamenané hodnoty vyneseme do grafu jako závislost ve tvaru  $A = f(c)$ . Pak změříme absorbanci u vzorku a z velikosti naměřené hodnoty snadno určíme koncentraci složky ve vzorku.

Závislost absorbance na koncentraci by měla být lineární, tj. vynesené body lze spojit přímkou – kalibrační křivkou. Pro tuto křivku platí určitá směrnice, podle které zjišťujeme citlivost dané spektrofotometrické metody. <sup>(5, 7)</sup>

### Metoda standardního přídatku

Tuto metodu používáme v případě, kdy vzorek obsahuje látky ovlivňující signál analytu. Princip metody spočívá v tom, že k odměřenému množství vzorku přidáme známé množství standardu o přesně známé koncentraci. Analyzujeme vzorek a vzorek se standardem, kdy oba roztoky jsou doplněny na stejný objem. Po poměření určíme zvýšení hodnoty signálu (měřené veličiny), který je přímo úměrný přidanému objemu roztoku standardu. Z této úměry pak lze vypočítat koncentraci složky ve vzorku. <sup>(7, 14)</sup>

### 2.5.6 HODNOCENÍ A CHYBY SPEKTROMETRICKÝCH MĚŘENÍ

Citlivost metody se posuzuje dle směrnice kalibrační přímky a dále podle hodnoty meze detekce a meze stanovitelnosti.

Mez detekce (*limit of detection*) je definována jako nejnižší možná koncentrace analytu ve vzorku, kterou můžeme danou metodou detekovat. Stanovení meze detekce (*LD*) se dle IUPAC určí jako trojnásobek směrodatné odchylky slepého pokusu – blanku. <sup>(16)</sup>

Mez stanovitelnosti (*limit of determination*) je definována jako nejnižší koncentrace analytu ve vzorku, kterou ještě můžeme danou metodou stanovit jako exaktní hodnotu s přijatelnou přesností. Mez stanovitelnosti (*LQ*) se dle IUPAC určí jako desetinásobek směrodatné odchylky slepého pokusu – blanku. <sup>(16)</sup>

Experimentálně se mez detekce a mez stanovitelnosti určuje pomocí několika po sobě jdoucích měření slepého vzorku (blanku) za odpovídajících konkrétních podmínek. Ze slepých pokusů se vypočte směrodatná odchylka  $\sigma$  a současně se sestrojí kalibrační přímkou pro uvažované vzorky. Mez detekce pak odpovídá trojnásobku směrodatné odchylky a mez stanovitelnosti desetinásobku. <sup>(5, 16)</sup>

Výsledky spektrální analýzy jsou zatíženy chybami – náhodnými, soustavnými (systematickými) nebo hrubými. Náhodná (statistická) chyba měření se vyskytuje nepravidelně a je způsobena náhodnými rušivými vlivy. Tyto chyby bývají malé a významně nezkrslují výsledky oproti skutečnosti. Chyby soustavné mají pravidelný charakter, zkrslují výsledky vždy v určitém směru. Vznikají na základě nepřesnosti

technického přístroje nebo z důvodu nesprávného používání přesného přístroje. Chyby hrubé (nadměrné) vznikají jako důsledek nedopatření, v tomto případě je nutné měření opakovat.

Za správné výsledky analýzy považujeme hodnoty, které jsou zatíženy pouze náhodnými chybami. Jako přesné výsledky analýzy uvádíme ty hodnoty, které se vzájemně dobře shodují, ale mohou se lišit soustavnou chybou od skutečné hodnoty. <sup>(5)</sup>

### 3 PRAKTICKÁ ČÁST

#### 3.1 POUŽITÉ METODY:

- 1) Fotometrické stanovení železa s thiokyanatanem draselným (dále jen „metoda 1“) <sup>(10)</sup>
- 2) Fotometrické stanovení železa s 1,10-fenantrolinem (dále jen „metoda 2“) <sup>(14)</sup>
- 3) Fotometrické stanovení železa s kyselinou sulfosalicylovou (dále jen „metoda 3“) <sup>(12)</sup>

#### 3.2 SEZNAM POUŽITÝCH CHEMIKÁLIÍ

##### Metoda 1

1. Kyselina chlorovodíková ( $\rho = 1,19 \text{ g/ml}$ ) p.a.
2. Síran železitý nonahydrát p.a.
3. Thiokyanatan draselný p.a.

##### Metoda 2

4. 1,10-fenantrolin monohydrát p.a.
5. Bromfenolová modř, indikátor
6. Ethanol (96%)
7. Hydroxylamin-hydrochlorid p.a.
8. Kyselina chlorovodíková ( $\rho = 1,19 \text{ g/ml}$ ) p.a.
9. Kyselina octová ( $\rho = 1,05 \text{ g/ml}$ ) p.a.
10. Kyselina sírová ( $\rho = 1,83 \text{ g/ml}$ ) p.a.
11. Octan amonný p.a.
12. Peroxodisíran draselný p.a.
13. Síran diamonno-železnatý hexahydrát p.a. (Mohrova sůl)

##### Metoda 3

14. Hydroxid sodný p.a.
15. Kyselina sulfosalicylová p.a.
16. Síran železitý nonahydrát p.a.

K ředění roztoků byla použita destilovaná voda a k okyselení vzorků kyselina chlorovodíková naředěná v poměru 1:1.

### 3.3 PRÁCE S ROZTOKY

#### 3.3.1 METODA 1

##### a) Příprava činidel

Příprava 20% roztoku thiokyanatanu draselného. Bylo naváženo 20,0 g thiokyanatanu, který byl kvantitativně převeden do 100ml odměrné baňky doplněné vodou po rysku.

##### b) Příprava zásobního roztoku síranu železitého

Ve 100ml odměrné baňce bylo rozpuštěno 0,050 g síranu železitého pomocí 10 ml koncentrované kyseliny chlorovodíkové. Následně byl roztok doplněn destilovanou vodou po rysku. Zásobní roztok pak obsahoval v 1 ml 0,1 mg železa, tj. hmotnostní koncentrace železa v roztoku odpovídala 100 mg/l.

##### c) Příprava kalibračních roztoků

Nejprve bylo provedeno zředění zásobního roztoku (ZR) síranu železitého na hmotnostní koncentraci 50 mg/l. Do 100ml odměrné baňky bylo odpipetováno 50 ml ZR doplněného destilovanou vodou po rysku. K dalším úkonům byl používán tento pracovní roztok standardu (PR) sloužící ke kalibraci, která byla provedena dle tabulky 3. Do šesti 50ml odměrných baněk byly postupně napipetovány různé objemy PR doplněných po rysku.

Tabulka 3 Kalibrační roztoky pro metodu 1

Odpipetovaný objem (ml)	Destilovaná voda	Koncentrace KR (mg/l)
0,5	Doplnit po rysku	0,5
1,5	Doplnit po rysku	1,5
2,5	Doplnit po rysku	2,5
3,5	Doplnit po rysku	3,5
4,5	Doplnit po rysku	4,5
5,5	Doplnit po rysku	5,5

#### 3.3.2 METODA 2

##### a) Příprava činidel

Příprava vybarvovacího roztoku. Bylo rozpouštěno 0,28 g monohydrátu 1,10-fenantrolinu s 2 kapkami koncentrované kyseliny chlorovodíkové ve 100ml



odměrné baňce. Po rozpuštění fenantrolinu byla odměrná baňka doplněna po rysku destilovanou vodou. Vzniklý roztok byl uchován v tmavé zásobní lahvi.

Příprava indikátoru pH. Ve 100 ml ethanolu bylo rozpouštěno 0,05 g bromfenolové modři.

Roztok hydroxylamin-hydrochloridu byl připraven ve 100ml odměrné baňce, ve které bylo pomocí destilované vody rozpouštěno 10 g hydroxylamin-hydrochloridu. (pozn. Jedná se o toxickou látku, kterou je třeba uchovávat v tmavé lahvi. Trvanlivost roztoku je asi tak jeden týden.)

Octanový tlumivý roztok byl připraven v 250ml odměrné baňce, ve které bylo rozpuštěno 100 g octanu amonného společně se 125 ml kyseliny octové. Vzniklý roztok byl doplněn destilovanou vodou po rysku.

#### b) Příprava zásobního roztoku standardu

Roztok síranu diamonno-železnatého byl připravován v kádince, která obsahovala asi 5 ml destilované vody, 1 ml koncentrované kyseliny sírové a 0,3511 g hexahydrátu síranu diamonno-železnatého, který byl rozpouštěn. Vzniklý roztok byl následně kvantitativně převeden do 250ml odměrné baňky a doplněn destilovanou vodou po rysku. V tomto zásobní roztoku pak 1 ml obsahoval 0,2 g Fe, tj. hmotnostní koncentrace se rovnala 200 mg/l.

#### c) Příprava kalibračních roztoků

Nejprve bylo opět zapotřebí naředit zásobní roztok na vhodnou koncentraci. Do 100ml odměrné baňky bylo ze zásobního roztoku odpipetováno 25 ml a zbytek byl doplněn destilovanou vodou po rysku. Hmotnostní koncentrace železa v nově vzniklém pracovním roztoku standardu (PR) sloužícího ke kalibraci činila 50 mg/l. Kalibrační roztoky byly poté připraveny dle tabulky 4. Do šesti 50 ml odměrných baněk byly postupně napipetovány různé objemy PR doplněných po rysku.

Tabulka 4 Kalibrační roztoky pro metodu 2

Odpipetovaný objem (ml)	Destilovaná voda	Koncentrace KR (mg/l)
0,5	Doplnit po rysku	0,5
1,0	Doplnit po rysku	1,0
2,0	Doplnit po rysku	2,0
3,0	Doplnit po rysku	3,0
4,0	Doplnit po rysku	4,0
5,0	Doplnit po rysku	5,0

### 3.3.3 METODA 3

#### a) Příprava činidel

Příprava alkalického roztoku 20% kyseliny sulfosalicylové. K roztoku kyseliny byl přidáván hydroxid sodný, dokud se pH roztoku nerovnálo deseti.

#### b) Příprava zásobního roztoku síranu železitého

Byl použit stejný zásobní roztok jako u metody 1.

#### c) Příprava kalibračních roztoků

Příprava kalibračních roztoků byla provedena shodně jako u metody 1.

## 3.4 PŘÍSTROJE A POMŮCKY<sup>1</sup>

### Chemické sklo

Odměrné baňky (50, 100, 250 ml), pipety dělené (1, 2, 5, 10 ml), kádinky (100, 150, 250, 500 ml), zábrusové lahve z hnědého skla, lodička, tyčinky, zkumavky.

### Laboratorní pomůcky

Kyvety (plexisklo = polymethylmethakrylát = PMMA; křemenné sklo), stříčka, gumové zátky, stojan na zkumavky, plastová lžička, filtrační papír.

### Přístroje

- elektrický vaříč
- digestoř
- pH metr
- Elektronická analytická váha – 240 A – Precisa – Švýcarsko
- Spektrofotometr HITACHI U-2001

## 3.5 SPEKTROFOTOMETR HITACHI U-2001

Jedná se o dvoupraskový UV/VIS spektrofotometr určený pro měření v rozsahu 190-1100 nm. Zdrojem záření je wolframová žárovka a deuteriová výbojka.

---

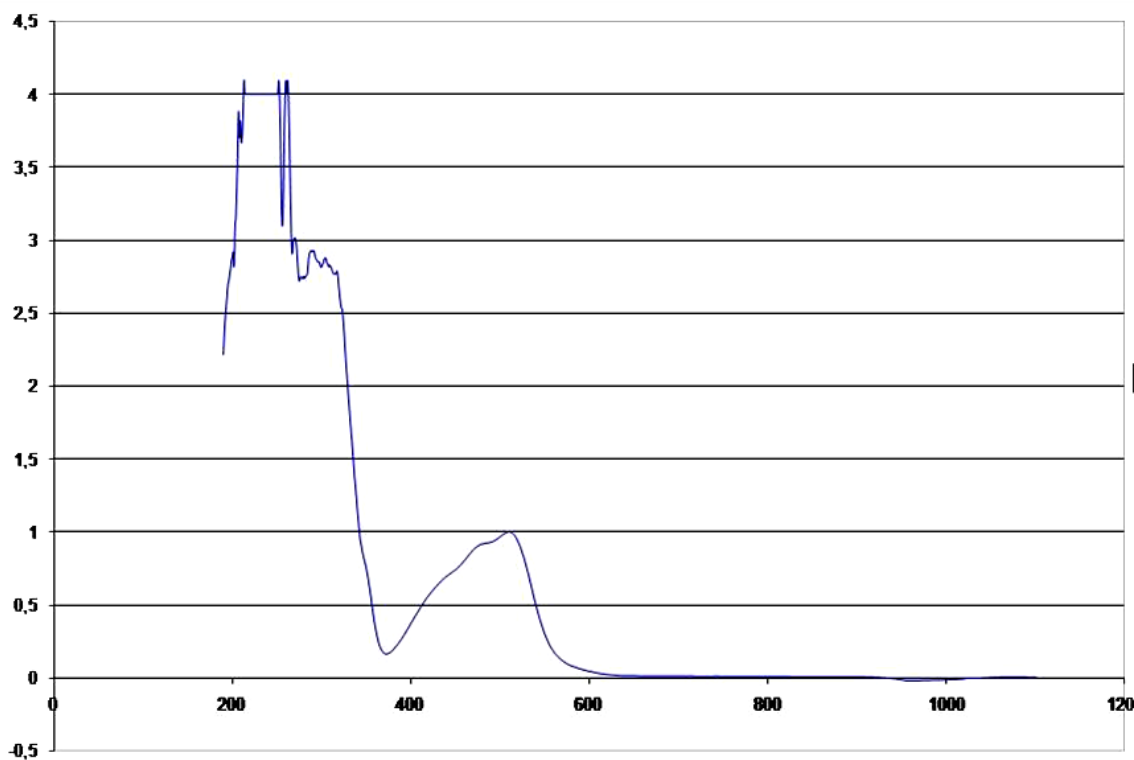
<sup>1</sup> Shodné pro všechny tři metody

Wolframová žárovka pro zdroj spojitého spektra záření o vlnové délce 320-1100 nm a deuteriová výbojka pro zdroj spojitého spektra o vlnové délce 190-380 nm (změna zdrojů záření je programovatelná). Nejčastěji dochází ke změně lamp při vlnové délce 340 nm. Disperzní systém představuje monochromátor s konkávní difrakční mřížkou. Po průchodu paprsku monochromátorem se paprsek dělí na paprsek referenční a srovnávací. V dráze srovnávacího paprsku se vyskytuje kyveta se srovnávacím roztokem nejčastěji s destilovanou vodou. V dráze referenčního paprsku se nalézají kyvety s měřeným vzorkem umístěných v manuálně posuvném držáku. Pro měření v UV oblasti byly využívány kyvety z křemenného skla a pro měření ve VIS oblasti postačily kyvety plastové. Za prostorem s kyvetami se nachází detektor, který představuje křemíková fotodioda. Vyhodnocovacím zařízením je počítač připojený konektorem ke spektrofotometru, lze připojit i tiskárnu. V počítači jako vyhodnocovací program slouží software UV-Solutions. <sup>(17)</sup>

### 3.5.1 PRÁCE A MĚŘENÍ NA SPEKTROFOTOMETRU HITACHI U-2001

Práce se spektrometrem souvisí s programem UV-Solutions, který umožňuje nastavení a volbu parametrů pro samotné měření. Po manuálním zapnutí spektrometru připojeného k počítači proběhne automatická vnitřní kontrola, která prověřuje oblasti paměti ROM a RAM, mechanismus monochromátoru a dále oblast wolframové a deuteriové lampy. Poté je nutné spustit samotný program UV-Solutions nainstalovaný v počítači. Po jeho otevření je důležité nastavení parametrů měření, které je charakteristické pro danou analytickou metodu. Lze si vybrat ze tří možností nastavení měření – skenování spekter („Wavelength scan“), měření kinetiky („Time scan“) nebo fotometrie („Photometry scan“). <sup>(17)</sup>

Před samotným měřením neznámých vzorků bylo zapotřebí učinit kalibraci daných metod. V této práci byly pro kalibraci a stanovení látek využity dva typy měření – „Wavelength scan“ a „Photometry scan“. Pro kalibraci byl zvolen první typ měření, který umožňuje grafické zobrazení absorbance v určitém předem zvoleném rozsahu vlnových délek od 190-1100 nm. Z výsledného grafu – záznamu spektra lze vlnovou délku ručně odečíst jako maximální hodnotu v bodě (vrcholu) píku. Tento typ měření využíváme v případě, kdy nás zajímá průběh absorpční křivky, jež nám umožňuje si představit průběh závislosti absorbance na vlnové délce. Můžeme si tak prohlédnout komplexní křivku s jedním nebo s řadou vrcholů (píků) Obr. 10.



Obr. 10 Záznam průběhu absorpční křivky

Druhý typ měření „Photometry scan“ se od prvního typu liší tím, že vlnová délka se zde nezadá v rozmezí, ale zapisuje se jako konkrétní hodnota. Jedná se o konkrétní hodnotu vlnové délky, při které měřený roztok zaznamenává absorpční maximum. Hodnoty vlnových délek, při kterých lze měřit maximální absorbanci, jsou většinou součástí pracovního návodu. Např. pro stanovení s thiokyanatanem se absorbance roztoku měří při vlnové délce 500 nm. V tomto typu měření je automaticky odečtena hodnota absorbance a dle předem provedené kalibrace je automaticky vypočtena koncentrace stanovované látky.

### 3.6 VOLBA METODY

Po přípravě sady kalibračních roztoků, pro tři různé metody, bylo možné začít se samotným měřením absorbance.

#### 3.6.1 POSTUP PRÁCE U METODY 1

##### *Princip*

Stanovení trojmocného železa u metody 1 odpovídá reakci v kyselém prostředí s thiokyanatanem za vzniku řady komplexů, které způsobují červené zbarvení. Vzniklé komplexy je poměrně obtížné blíže specifikovat. Komplexy jsou často nestálé. Nejčastěji se setkáváme se vznikem thiokyanatoželezitanů.

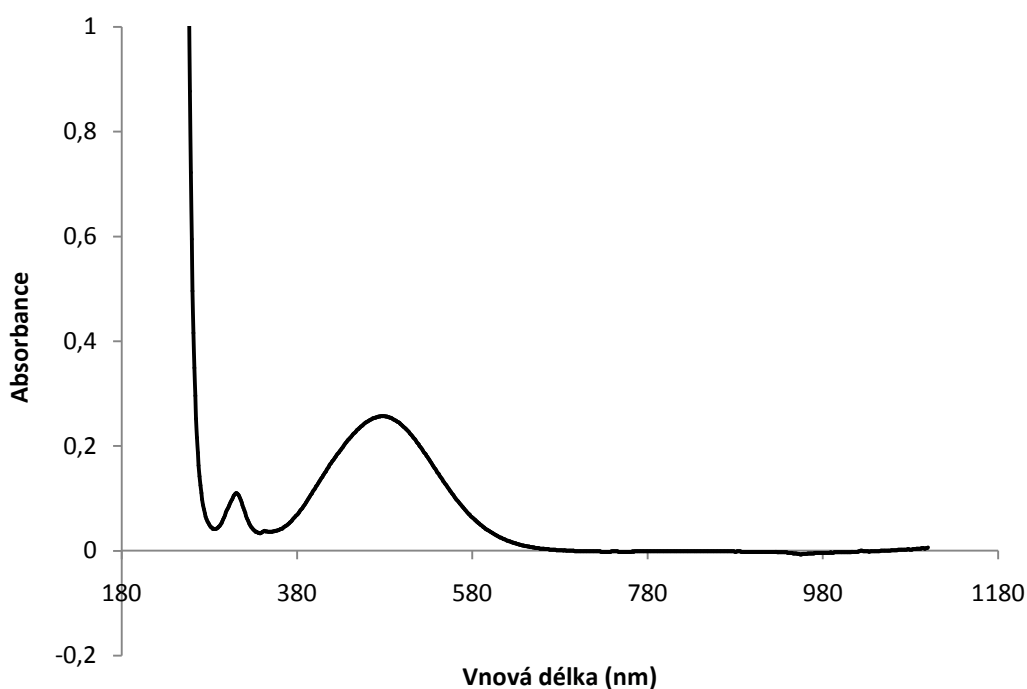
##### *Postup*

Kalibrační roztoky o různých koncentracích byly kvantitativně převedeny do šesti 100ml kádinek a postupně byly zpracovány dále uvedeným způsobem. K 50 ml kalibračního roztoku bylo přidáno 2,5 ml kyseliny chlorovodíkové (1:1) a po promíchání bylo do roztoku přidáno 5 ml 20% roztoku thiokyanatanu draselného a opět bylo nutné vzniklý, již vybarvený roztok promíchat a nechat odstát cca deset minut. Po uplynutí deseti minut bylo možné změřit absorbanci roztoku a to při vlnové délce 500 nm. Stejným způsobem bylo zpracováno i slepé stanovení s destilovanou vodou.

##### *Sestrojení kalibrační křivky*

Na základě skenování spekter („Wavelength scan“) proběhlo manuální odečtení hodnot maximálních absorbancí. Tyto hodnoty byly využity pro sestavení kalibračního grafu o lineární závislosti maximální absorbance na koncentraci kalibračních roztoků. Na grafu č. 1 je názorně prezentován průběh závislosti absorbance na vlnové délce pro kalibrační roztok o koncentraci 2,5 mg/l.

Graf 1 Absorpční křivka pro kalibrační roztok o koncentraci 2,5 mg/l



Tabulka 5 Maximální hodnoty absorbance kalibračních roztoků pro metodu 1

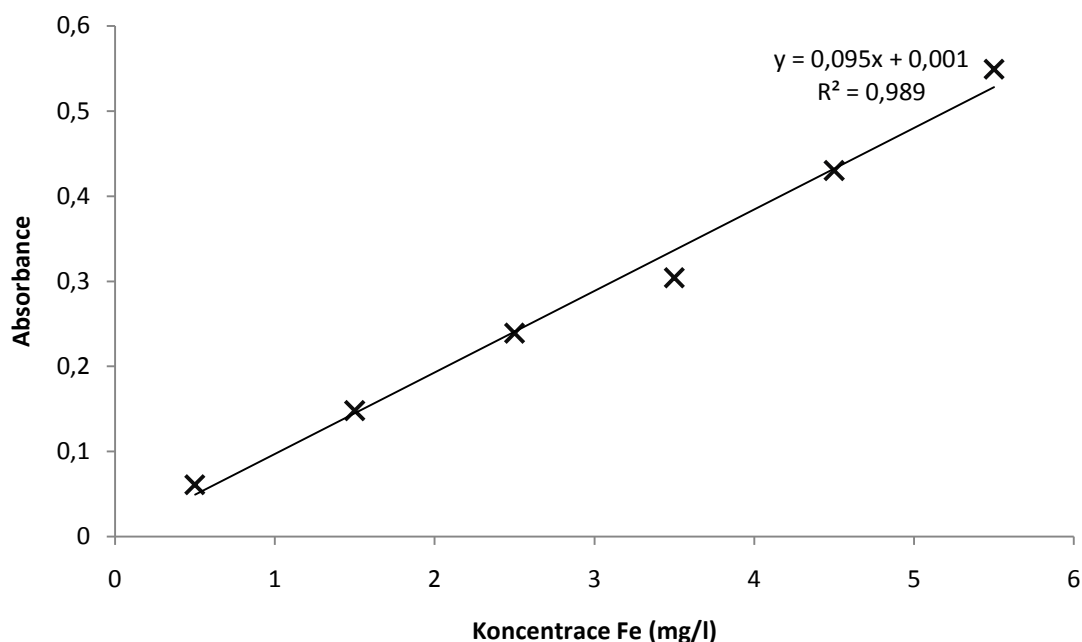
Koncentrace (mg/l)	Nejvyšší absorbance
0,5	0,066
1,5	0,159
2,5	0,257
3,5	0,330
4,5	0,461
5,5	0,589

V dalším kroku měření prostřednictvím metody „Wavelength scan“ byla absorbance roztoku odečtena z absorpční křivky při vlnové délce 500 nm. Hodnoty absorbance pěti kalibračních roztoků a jednoho slepého stanovení byly použity ke kalibraci a tvorbě grafu v závislosti absorbance na koncentraci. Slepé stanovení tzv. blank může i nemusí být do kalibrační křivky zahrnut. Jeho naměřená hodnota absorbance byla u metody 1 tak malá, že bylo vhodné tuto hodnotu zanedbat. A v tomto případě ji považovat za nulovou a poměrně nedůležitou.

Tabulka 6 Kalibrace metoda 1

Koncentrace Fe mg/l	Absorbance
0,5	0,061
1,5	0,148
2,5	0,239
3,5	0,304
4,5	0,430
5,5	0,549

Graf 2 Kalibrační křivka pro metodu 1 s regresní rovnicí



### Detekční schopnost metody 1

Nezbytnou součástí zpracování výsledku měření je určení meze stanovitelnosti (MS) a meze detekce (MD). Jejich hodnoty byly získány z pěti po sobě následujících měření slepých vzorků.

Tabulka 7 Absorbance slepých vzorků metoda 1

Slepý vzorek	Absorbance
1	0,0003
2	-0,0003
3	-0,0081
4	-0,0096
5	-0,0070

Z hodnot absorbancí slepých vzorků (Tabulka 7) byla vypočtena pomocí funkce v aplikaci Microsoft Excel směrodatná odchylka výběrová. Ze směrodatné odchylky pak lze snadno dopočítat hodnotu pro mez detekce a mez stanovitelnosti. Mez detekce je definována jako trojnásobek směrodatné odchylky a mez stanovitelnosti je její desetinásobek. V rámci fotometrických metod je nejvhodnější vyjádření meze detekce a stanovitelnosti v jednotkách koncentrace mg/l. Tento přepočít vychází ze směrnice kalibrační přímky ve tvaru rovnice  $y = 0,095x + 0,001$  (Graf 2). Trojnásobek směrodatné odchylky dělený směrnicí kalibrační přímky odpovídá koncentraci meze

detekce a desetinásobek směrodatné odchylky dělený směrnici kalibrační přímky odpovídá koncentraci meze stanovitelnosti. <sup>(18)</sup>

Tabulka 8 **Mez detekce a mez stanovitelnosti metoda 1**

Směrodatná odchylka	0,0046
Mez detekce	0,0138
<b>Mez detekce (mg/l)</b>	<b>0,15</b>
Mez stanovitelnosti	0,0461
<b>Mez stanovitelnosti (mg/l)</b>	<b>0,49</b>

### 3.6.2 POSTUP PRÁCE U METODY 2

#### *Princip*

Obsah celkového rozpuštěného železa byl převeden po reakci s kyselinou chlorovodíkovou a peroxidisíranem draselným na rozpustnou trojmocnou formu. Trojmocné železo se redukuje hydroxylaminchloridem na železo dvojmocné, které pak v přítomnosti 1,10-fenantrolinu tvoří červenooranžový komplex. Závislost intenzity zbarvení roztoku je přímo úměrná hmotnostní koncentraci, odpovídá tak Lambert-Beerovu zákonu.

#### *Postup*

Předem připravené kalibrační roztoky byly kvantitativně převedeny do 100ml kádinek a postupně zpracovány. K 50 ml roztoku bylo přidáno 0,2 g peroxidisíranu draselného a 1 ml koncentrované kyseliny chlorovodíkové. Poté byly roztoky zahřívány na elektrickém vařiči po dobu 40 minut tak, aby objem neklesl pod 20 ml. Po ochlazení na laboratorní teplotu byly roztoky kvantitativně přelity do 50ml odměrných baněk. Déle k nim bylo postupně přidáno 2 ml hydroxylaminhydrochloridu, kapka indikátoru bromfenolové modři a 10 ml octanového tlumivého roztoku. Vzniklá směs byla důkladně promíchána. Následně po promíchání se ke směsi přidaly 4 ml vybarvovacího činidla (kap. 3.3.2.) a zbytek byl doplněn destilovanou vodou po rysku. Po 15 minutách byly roztoky připraveny k měření absorbance při vlnové délce 510 nm. Stejným způsobem bylo zpracováno i slepé stanovení s destilovanou vodou.

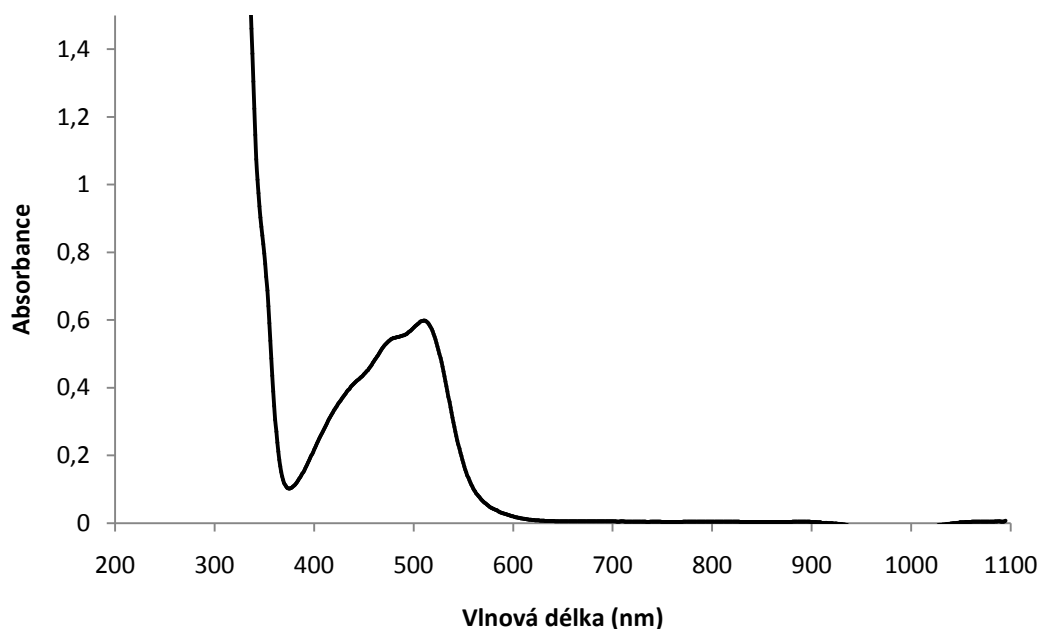
#### *Sestrojení kalibrační křivky*

Při tvorbě kalibrační křivky byl zvolen stejný postup jako u metody 1, opět bylo podstatné naměření absorbancí kalibračních roztoků. Odečtené hodnoty absorbancí ze záznamu absorpční křivky byly zpracovány do grafu v závislosti absorbance na



koncentraci. Pro představu uvádím záznam spektra pro kalibrační roztok o koncentraci 3 mg/l. Při sestřování kalibrační křivky byly využity hodnoty absorbance odečtené ze záznamu spektra při vlnové délce nejprve 510 nm a poté při 460 nm.

Graf 3 Absorpční křivka pro kalibrační roztok o koncentraci 3 mg/l



Tabulka 9 Maximální hodnoty absorbance kalibračních roztoků pro metodu 2

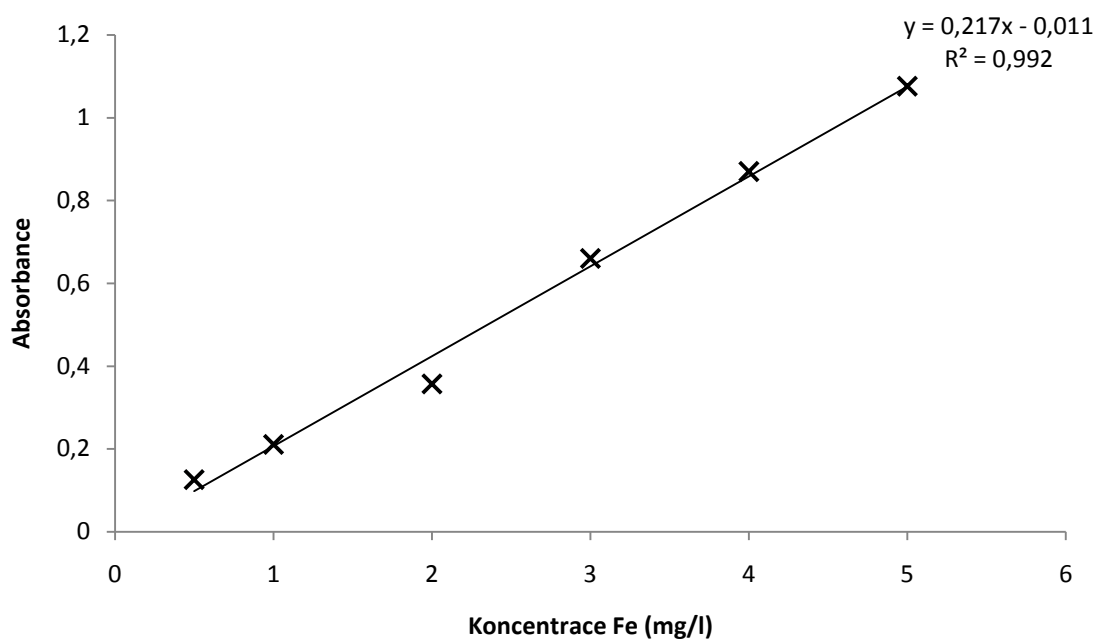
Koncentrace Fe (mg/l)	Nejvyšší absorbance
0,5	0,093
1	0,166
2	0,347
3	0,598
4	0,786
5	1,024

Tabulka 10 Kalibrace metoda 2

Absorbance kalibračních roztoků při vlnové délce 510 nm

Koncentrace Fe (mg/l)	Absorbance
0,5	0,126
1	0,211
2	0,357
3	0,660
4	0,870
5	1,076

Graf 4 Kalibrační křivka pro metodu 2 s regresní rovnicí (při 510 nm)



Z uvedeného záznamu spektra (graf č. 3) lze vyvodit, že pík není zcela ideální, vytváří se více vrcholů. Z toho důvodu bylo měření pro kalibrační roztoky v rozmezí 0,5 – 4 mg/l zopakováno, ale tentokrát ne při vlnové délce 510 nm, ale při 460 nm.

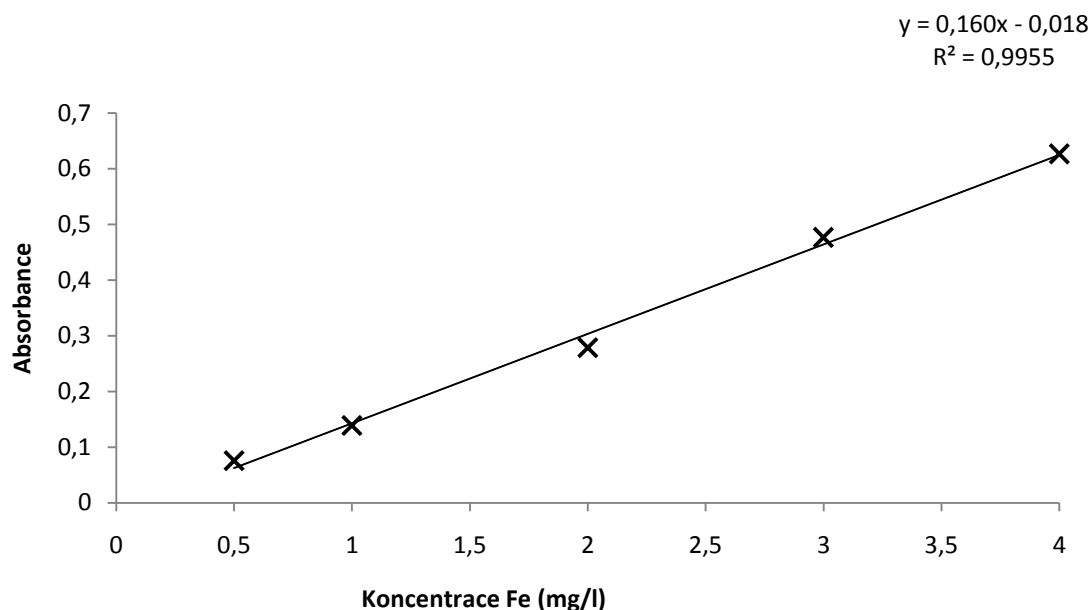
Tabulka 11 Kalibrace 2 metoda 2

Absorbance kalibračních roztoků při vlnové délce 460 nm

Koncentrace Fe (mg/l)	Absorbance
0,5	0,076
1	0,139
2	0,279
3	0,477
4	0,627

**Graf 5 Kalibrační křivka pro metodu 2 s regresní rovnicí při vlnové délce 460 nm**

Tento graf byl pro další zpracování výsledků stěžejní, dále z něj vychází mez detekce a mez stanovitelnosti.

**Detekční schopnost metody 2**

Tak jako u metody 1 i v tomto případě bylo nutné stanovit mez detekce a mez stanovitelnosti pomocí pěti slepých stanovení.

**Tabulka 12 Absorbance slepých vzorků metoda 2 (při 460 nm)**

Slepý vzorek	Absorbance
1	0,023
2	0,029
3	0,042
4	0,043
5	0,030

Z uvedených absorbancí slepých vzorků byla vypočtena směrodatná odchylka výběrová, z jejíž hodnoty vycházejí mez detekce a mez stanovitelnosti. A pomocí lineární rovnice kalibrační přímky ve tvaru  $y = 0,160x - 0,018$  (graf č. 5) a její směrnice byly detekční hodnoty vyjádřeny v jednotkách mg/l.

**Tabulka 13 Mez detekce a mez stanovitelnosti pro metodu 2**

Směrodatná odchylka	0,0087
Mez detekce	0,0262
<b>Mez detekce (mg/l)</b>	<b>0,16</b>
Mez stanovitelnosti	0,0873
<b>Mez stanovitelnosti (mg/l)</b>	<b>0,55</b>

### 3.6.3 POSTUP PRÁCE U METODY 3

#### *Princip*

Kyselina sulfosalicylová reaguje s ionty železa v kyselém prostředí za tvorby červeného zbarvení, zatímco v alkalickém prostředí se vytváří intenzivně žluté. Právě alkalické prostředí a žlutě vybarvený roztok byly využity v této práci. Optimální hodnota pH pro stanovení v alkalické prostředí se pohybuje okolo 9-10.

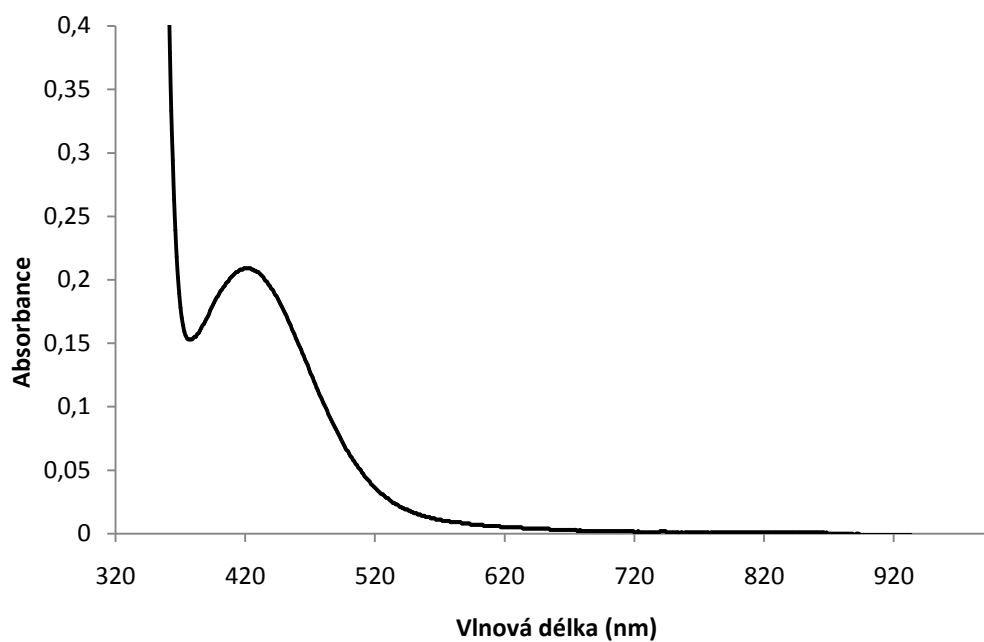
#### *Postup*

Nejprve bylo nutné zpracovat připravený roztok kyseliny sulfosalicylové pomocí hydroxidu sodného. Roztok kyseliny bylo třeba zalkalizovat až na pH okolo devíti. K tomuto úkonu byl využit pH metr. K roztoku kyseliny byl postupně přidáván hydroxid, dokud pH metr neukazoval hodnotu lehce nad devět. Ze zajímavosti byl připraven ještě jeden zalkalizovaný roztok tentokrát s pH okolo jedenácti. K 1 ml zalkalizovaného roztoku byl přidán 1 ml kalibračního roztoku. Směs byla ve zkumavce promíchána a převedena do kyvety, kde byla měřena absorbance při vlnové délce 420 nm. Shodně byly zpracovány i ostatní kalibrační roztoky a slepé stanovení s destilovanou vodou.

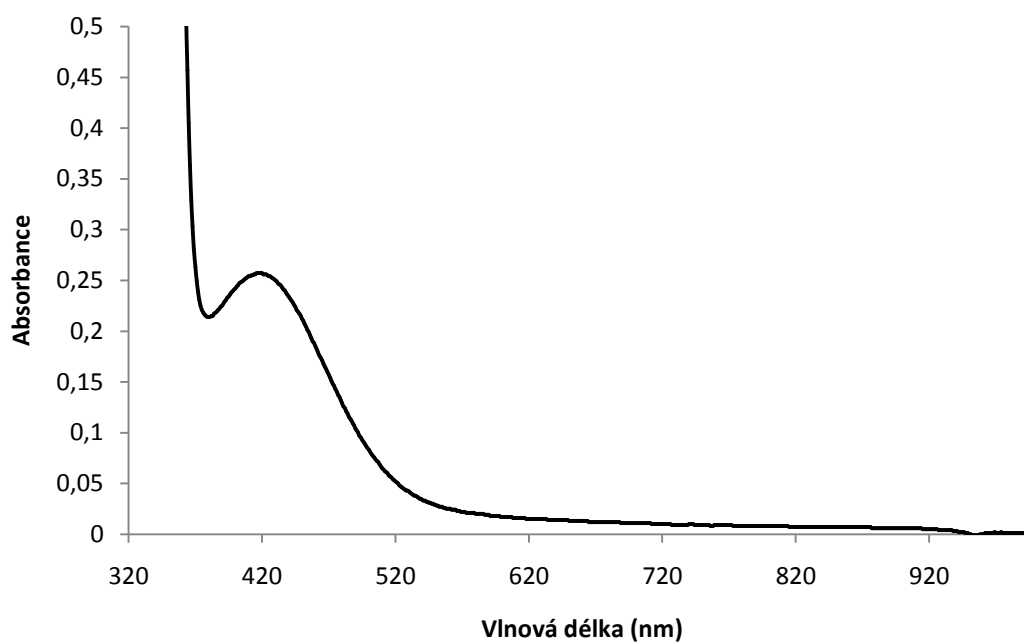
#### *Sestrojení kalibrační křivky*

Stále vycházím z postupu uvedeného u metody 1. Pro představu uvádím průběh naměřeného spektra pro kalibrační roztok o koncentraci 3 mg/l zpracovaný s vybarvovacím roztokem o nižším pH (9).

Graf 6 Absorpční křivka pro kalibrační roztok o koncentraci 3 mg/l (při pH = 9)



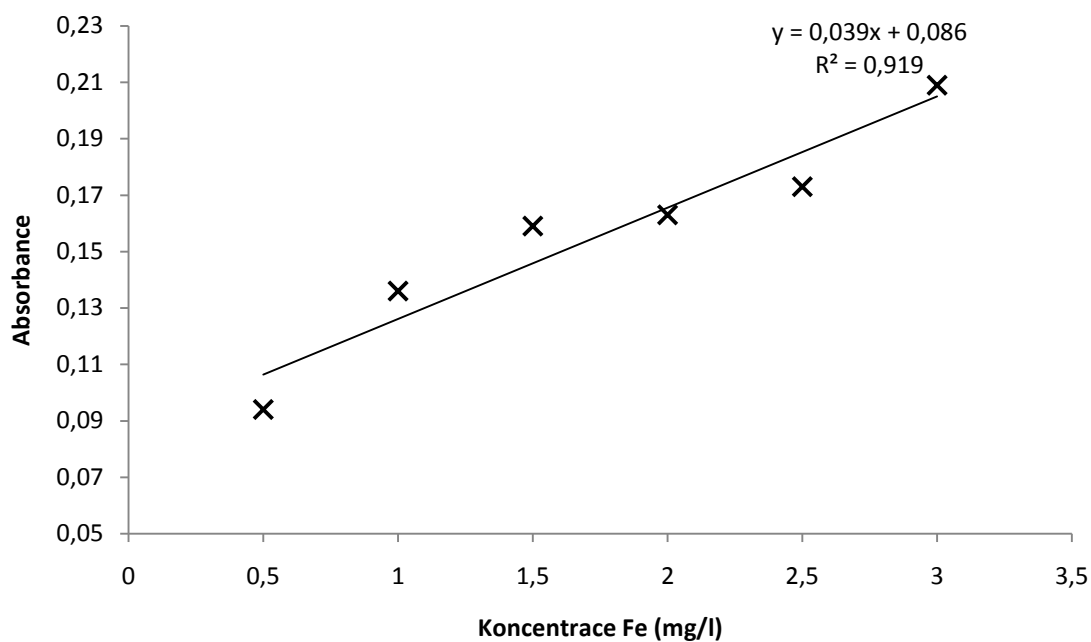
Graf 7 Absorpční křivka pro kalibrační roztok o koncentraci 3 mg/l (při pH = 11)



Tabulka 14 Maximální hodnoty absorbance kalibračních roztoků pro metodu 3

Koncentrace Fe (mg/l)	Nejvyšší absorbance
0,5	0,094
1	0,136
1,5	0,159
2	0,163
2,5	0,173
3	0,209

Graf 8 Kalibrační křivka pro metodu 3 s regresní rovnicí

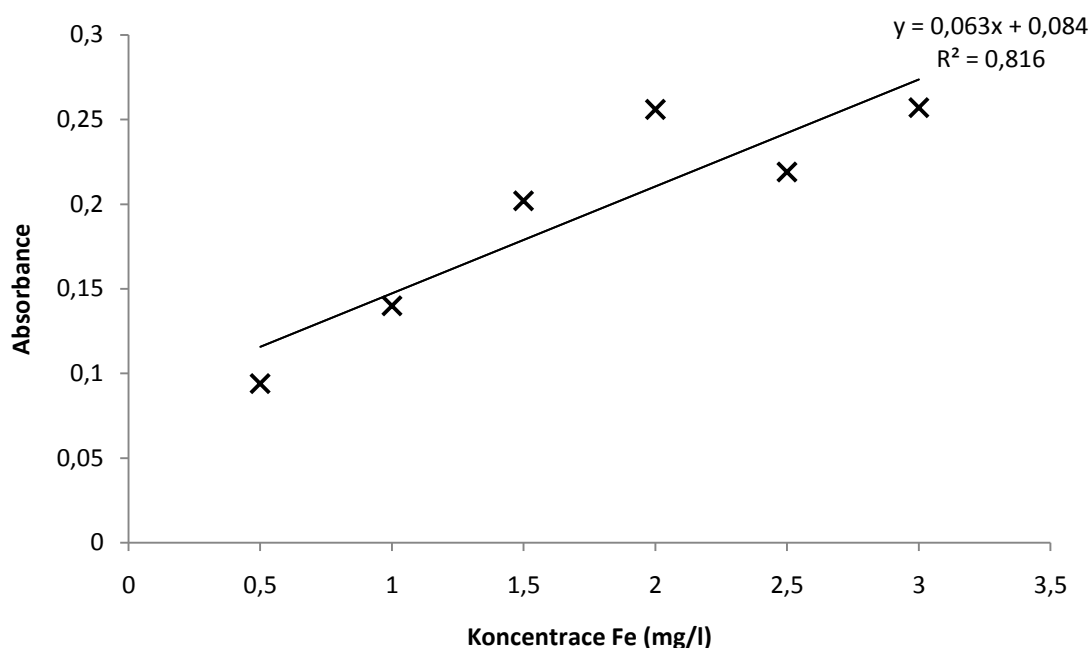


Absorbance měřená při zvolené vlnové délce 420 nm, byla naprosto shodná s nejvyšší naměřenou absorpční hodnotou roztoku, proto i kalibrační přímka je shodná pro dané kalibrační roztoky.

Tabulka 15 Hodnoty absorbance pro kalibrační roztoky zpracované při pH = 11

Koncentrace Fe (mg/l)	Absorbance
0,5	0,094
1	0,140
1,5	0,202
2	0,256
2,5	0,219
3	0,257

Graf 9 Kalibrační křivka pro metodu 3 s regresní rovnicí při pH = 11



Z grafů č. 8 a 9 je patrné, že absorbance se zvyšovala s vyšší hodnotou pH. Ale ani v jednom případě nebylo dosaženo uspokojivých výsledků, které by předurčovali metodu 3 k dalšímu využití.

### Detekční schopnost metody 3

Tak jako u metody 1 a 2 i v případě metody 3 bylo nutné stanovit mez detekce a mez stanovitelnosti pomocí pěti slepých stanovení zpracovaných při pH 9.

Tabulka 16 Absorbance slepých vzorků metoda 3

Slepý vzorek	Absorbance
1	0,023
2	0,029
3	0,042
4	0,043
5	0,030

Z hodnot slepých stanovení byla vypočtena směrodatná odchylka výběrová, z té pak byla vyjádřena mez detekce a mez stanovitelnosti. Poté tyto mezní hodnoty byly pomocí lineárního koeficientu z kalibrační přímky ve tvaru  $y = 0,0394x + 0,0867$  (graf č. 8) přepočteny na hmotnostní koncentrace.

Tabulka 17 **Meze detekce a stanovitelnosti metoda 3**

Směrodatná odchylka	0,0055
Mez detekce	0,0166
<b>Mez detekce (mg/l)</b>	<b>0,42</b>
Mez stanovitelnosti	0,0554
<b>Mez stanovitelnosti (mg/l)</b>	<b>1,41</b>

### 3.6.4 POROVNÁNÍ METOD

#### 1) Z hlediska ekonomické náročnosti

Porovnání metod bylo provedeno pomocí třech různých dodavatelů: „Lach-Ner“, „Merci“ a „Termofisher“. Ceny byly vyhledány pomocí online katalogů volně přístupných na internetu. Ceny za celá balení byly přepočteny na hodnoty odpovídající čisté spotřebě chemikálií. Ceny jsou pouze orientační a slouží ke srovnání metod.

Tabulka 18 **Náklady na metodu 1**

<b>Chemikálie na přípravu roztoků</b>	<b>Lach-Ner</b>	<b>Merci</b>	<b>Termofisher</b>
50 ml kyseliny chlorovodíkové	5 Kč	5 Kč	5 Kč
20 g thiokyanatanu draselného	26 Kč	24 Kč	24 Kč
<b>Součet nákladů</b>	<b>31 Kč</b>	<b>29 Kč</b>	<b>29 Kč</b>

Z uvedené tabulky č. 18 je patrné, že čisté náklady na spotřebu chemikálií jsou poměrně nízké. Co se týče dodavatelů, tak jsou náklady téměř shodné.

Tabulka 19 **Náklady na metodu 2**

<b>Chemikálie na přípravu roztoků</b>	<b>Lach-Ner</b>	<b>Merci</b>	<b>Termofisher</b>
0,28 g 1,10-fenantrolinu	14 Kč	11 Kč	11 Kč
10 g hydroxylaminhydrichloridu	10 Kč	12 Kč	12 Kč
100 g octanu amonného	34 Kč	29 Kč	194 Kč
125 ml kyseliny octové	14 Kč	17 Kč	17 Kč
4 g peroxidisíranu draselného	3 Kč	3 Kč	3 Kč
0,05g bromfenol. modří	4 Kč	5 Kč	4 Kč
100 ml ethanolu	48 Kč	85 Kč	97 Kč
<b>Součet nákladů</b>	<b>132 Kč</b>	<b>162 Kč</b>	<b>338 Kč</b>

V tomto srovnání jsou patrné větší rozdíly mezi dodavateli, záleží samozřejmě i na velikosti balení a aktuální nabídce, toto srovnání je pouze orientační. Důležité pro tuto práci je srovnání v rámci použitých metod.



Tabulka 20 **Náklady na metodu 3**

<b>Chemikálie na přípravu roztoků</b>	<b>Lach-Ner</b>	<b>Merci</b>	<b>Termofisher</b>
20 g kyseliny sulfosalicylové	30 Kč	nenalezeno	nenalezeno
30 g hydroxidu sodného (pecičky)	3 Kč	3 Kč	3 Kč
<b>Součet nákladů</b>	<b>33 Kč</b>	<b>neuveďeno</b>	<b>neuveďeno</b>

Z tabulky č. 20 je vidět, že problém se vyskytuje s nákupem kyseliny sulfosalicylové, většina dodavatelů ji běžně nenabízí. Je třeba si tuto chemikálii objednat.

Tabulka 21 **Shrnuté náklady**

<b>Metody</b>	<b>Průměrné náklady</b>
<b>Metoda1</b>	30 Kč
<b>Metoda2</b>	211 Kč
<b>Metoda3</b>	33 Kč

## 2) *Z hlediska časové náročnosti*

V tomto případě byla zohledněna i jednoduchost provedení a náročnost na laboratorní podmínky.

Tabulka 22 **Časová náročnost**

	<b>Metoda1</b>	<b>Metoda2</b>	<b>Metoda3</b>
Příprava činidel (min)	5	20	10
Příprava pracovních roztoků (min)	15	60	30
Zpracování neznámého vzorku (min)	15	70	10
<b>Součet (min)</b>	<b>35</b>	<b>160</b>	<b>50</b>

## 3) *Z hlediska detekčních vlastností*

V tomto případě je porovnávána mez detekce a mez stanovitelnosti v rámci třech použitých metod.

Tabulka 23 **Porovnání mezí detekce a mezí stanovitelnosti**

	<b>Metoda1</b>	<b>Metoda2</b>	<b>Metoda3</b>
<b>Mez detekce (mg/l)</b>	0,15	0,16	0,42
<b>Mez stanovitelnosti (mg/l)</b>	0,49	0,55	1,41

Po srovnání tří výše uvedených metod byla pro stanovení železa ve vodě zvolena (vybrána) metoda1.

### 3.7 KOMPLEXNÍ POSTUP PRO VLASTNÍ MĚŘENÍ VZORKŮ

#### 3.7.1 ODBĚR VZORKŮ

Část vzorků pro analýzu byla odebrána ze studniční vody pitné i nepitné, další vzorky byly odebrány z pramenů, studánek v okolí Plzně. Oblast odběru nebyla předem nijak určena a ani specifikována, proto mezi odebíranými vzorky není významná souvislost. Vzorky byly odebrány v okolí Plzně, Rybnice, Plas, Dolní Bělé, Starých Hamrů a dále pak vzorky z Tachova, Ledec, Starého Plzeňce, Vlčejna a Chotěšova. Vzorky byly odebírány do plastových nádobek cca o objemu 250 ml. Bylo zvoleno několik způsobu odběru v závislosti na druhu odebírané vody. Část vzorků byla odebírána manuálně z povrchu hladiny nebo přímo z vyvěrajících pramenů. Nejjednodušším způsobem odběru byl odběr z potrubí, respektive z vodovodních kohoutků či ventilů.

#### 3.7.2 KONZERVACE VZORKŮ

Odebrané vzorky bylo třeba co nejrychleji dopravit do laboratoře k dalšímu zpracování. Pokud nebylo možné v krátkém časovém úseku po odebrání stanovovat koncentraci železa, muselo dojít ke konzervaci vzorku. Pro kationty železa platí, že jsou v alkalickém prostředí velice nestabilní, a proto je třeba je převést do prostředí kyselého pomocí vhodné kyseliny. V této práci došlo ke konzervaci vzorků prostřednictvím kyseliny chlorovodíkové (1:1). Takto upravené vzorky bylo možné uchovávat po dobu jednoho týdne. Samozřejmě nejlepší by bylo, kdyby vzorky byly zpracovány okamžitě po odebrání, ne vždy to bylo ale možné.

#### **Příprava vzorků**

Vzorky byly konzervovány přidávkem cca 2 ml kyseliny chlorovodíkové (1:1), tak aby pH vzorku bylo kyselé. U odebraných vzorků bylo provedeno orientační měření pH (pomocí pH papírku) nejprve bez přidané kyseliny, kdy naměřené pH bylo ve všech případech podle očekávání neutrální. Poté bylo pro kontrolu měřeno pH u okyseleného roztoku vzorku.

### 3.7.3 MĚŘENÍ VZORKŮ – NASTAVENÍ METODY „PHOTOMETRY SCAN“

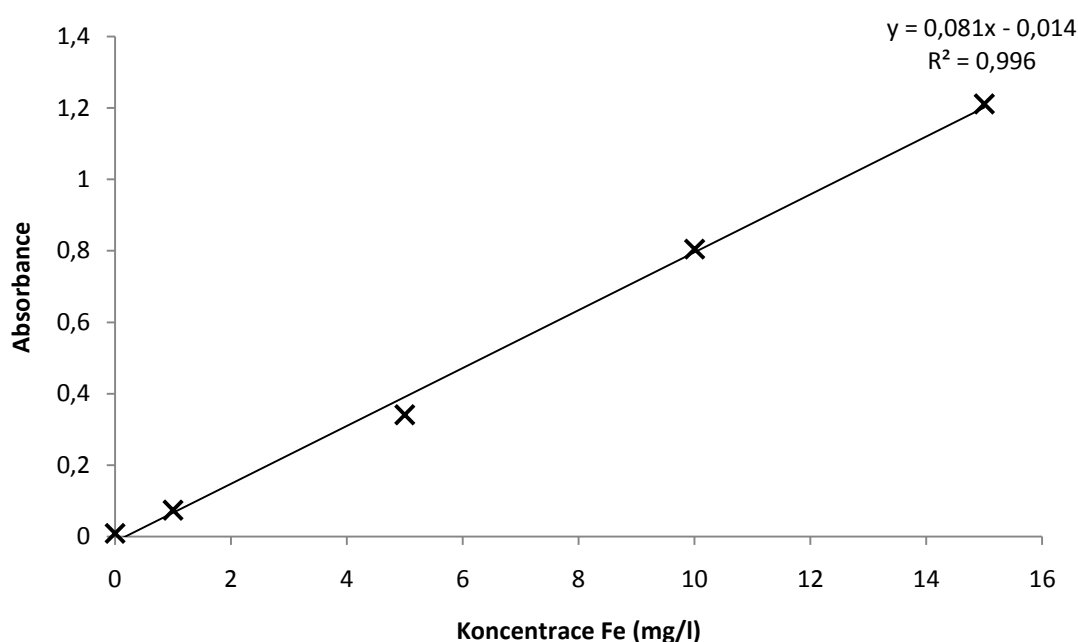
V nabídce programu UV-Solutions byl zvolen typ měření „Photometry scan“. Měření probíhalo při navolené vlnové délce 500 nm. Zvoleným typem kalibrace byla závislost prvního řadu, tedy lineární závislost, jelikož výsledná kalibrační křivka vykazuje lineární průběh. Před vlastním měřením vzorků došlo k přípravě tzv. standardních roztoků určených pro kalibraci v rozmezí 0 – 15 mg/l. Kalibrační roztoky byly připraveny shodným způsobem jako v kap. 3.3.1. K měření absorbance standardů bylo nutné manuálně vyplnit tabulku pro standardy v programu UV-Solutions (Tabulka č. 24). Dále byl navolen typ kalibrace – „derivace 1. řádu“ s použitím lineární kalibrační křivky ve tvaru  $y = A_1x + A_0$ . Parametry přímky  $A_0$  a  $A_1$  bylo možné využít pro další měření v případě, že nebylo nutné opakovat kalibrace (Tabulka č. 25). Stačilo pouze tyto parametry vložit do tabulky pro manuální kalibraci.

Tabulka 24 Tabulka standardů

Standard No.	Koncentrace Fe (mg/l)
1 Std	0
2 Std	1
3 Std	5
4 Std	10
5 Std	15

Po změření absorbance standardů byla programem automaticky vygenerována kalibrační křivka (graf č. 10).

Graf 10 Kalibrační přímka pro metodu 1 i se slepým stanovením a regresní rovnicí



Z lineární závislosti grafu č. 10 dle rovnice  $y = 0,081x - 0,0143$  byla vypočtena hodnota meze detekce (mg/l) a meze stanovitelnosti (mg/l). Mez detekce odpovídá hodnotě **0,17 mg/l** a mez stanovitelnosti **0,57 mg/l**. Pro výpočet byly použity hodnoty ze slepých stanovení (Tabulka č. 7.). Ačkoli hodnoty koncentrace železa neznámých vzorků byly vypočteny pomocí hodnoty vygenerované programem UV-Solutions (Tabulka č. 25), vycházející z rovnice ve tvaru  $y = 12,302x + 0,195$ .

Tabulka 25 Parametry lineární závislosti

$y = A_1x + A_0$	
$A_0$ :	0,194
$A_1$ :	12,302

Následně po proběhnutí kalibrace bylo postupně zpracováno všech 35 odebraných vzorků. Do 100ml kádinky bylo odpipetováno 50 ml vzorku. Dále bylo k roztoku vzorku přidáno 2,5 ml kyseliny chlorovodíkové (1:1) a 5 ml 20%roztoku thiokyanatanu draselného. Po promíchání bylo za deset minut možné měřit absorbanci při vlnové délce 500 nm. Spektrofotometr byl nastaven na typ měření „Photometry scan“.

### 3.7.4 NAMĚŘENÉ HODNOTY

Hodnoty absorpance a koncentrace naměřené pro veškeré odebrané vzorky

Tabulka 26 Naměřené hodnoty absorpance a koncentrace u studánek pitných  
**Studánky, prameny pitné**

	Absorpance	Koncentrace Fe (mg/l)
Studánka Rybnice	0,014	0,364
Studánka Bukovec	0,016	0,396
Studánka Bolevecká náves	0,010	0,313
Studánka Na Roudné	0,003	0,237
Studánka Čížice	0,011	0,323
Studánka Prelátka Plasy	0,014	0,364
Studánka Tachov	0,060	0,931
Studánka Staré Hamry	0,009	0,305
Bílá, studánka Smradlavka	0,006	0,263
Staré Hamry, přehrada	0,009	0,305

Tabulka 27 Naměřené hodnoty absorpance a koncentrace u studánek nepitných  
**Studánky, prameny nepitné**

	Absorpance	Koncentrace Fe (mg/l)
Studánka České údolí	0,011	0,329
Studánka Bolevec. rybník	0,038	0,664
Bělá, Spankov	0,242	3,167
Babiná vrt 1	0,064	0,981
Babiná vrt 2	0,311	4,019

Tabulka 28 Naměřené hodnoty absorpance a koncentrace pro studny pitné  
**Studniční voda pitná**

	Absorpance	Koncentrace Fe (mg/l)
Rybnice2	0,019	0,427
Rybnice3	0,015	0,381
Rybnice5	0,004	0,244
Kaznějov	0,012	0,344
Rybnice6	0,018	0,415
Stod	0,021	0,454
Vlčtejn	0,007	0,280
Chotěšov	0,009	0,308
Dolní Bělá	0,018	0,411
Studna Spankov	0,040	0,681
Plasy, Hutní	0,015	0,377

Tabulka 29 Naměřené hodnoty absorpance a koncentrace pro studny nepitné  
Studniční voda nepitná

	Absorbance	Koncentrace Fe (mg/l)
Rybnice1	0,014	0,370
Rybnice4	0,017	0,399
Čížice náves	0,404	41,34
Hřbitov Plasy	0,014	0,366
Kaznějov	0,023	0,476
Lipnice	0,104	1,470
Vejprnická, Plzeň	0,012	0,338
Starý Plzenec	0,422	10,764
Ledce	0,035	0,627

### 3.8 VÝSLEDKY A DISKUZE

#### 3.8.1 HODNOCENÍ NAMĚŘENÝCH HODNOT

Aby bylo možné výsledky správně prezentovat, je třeba uvědomit si přesnost metody 1. V jakém případě naměřené hodnoty dávají smysl, kdy lze uvádět konkrétní hodnoty pro koncentraci železa ve vzorku. To, jak budou výsledky vyjádřeny, záleží na hodnotě meze detekce a meze stanovitelnosti. Tyto hodnoty byly vypočteny v kap. 3.7.3., pro mez detekce odpovídá koncentrace železa **0,17 mg/l** a pro mez stanovitelnosti **0,57 mg/l** železa ve vzorku. Přítomnost železa byla prokázána u vzorků, ve kterých byla naměřená hodnota vyšší než mez detekce. Jestliže se hodnota pohybovala v oblasti mezi mezí detekce a mezí stanovitelnosti, bylo možné předpokládat, že železo se ve vzorku nacházelo, ale nebylo možné exaktně určit kolik. Lze tvrdit, že železo se ve vzorku vyskytovalo, ale pouze ve stopovém množství. Koncentrace železa byla nejpřesněji naměřena v případech, kdy byly hodnoty vyšší než mez stanovitelnosti. Pokud by naměřené hodnoty byly nižší než limit detekce, nebylo by možné prokázat přítomnost železa. Koncentrace železa by pak odpovídala téměř nule.

Tabulka 30 Seznam naměřených hodnot pro koncentraci železa ve vzorku<sup>2</sup>

Vzorek	Koncentrace (mg/l)	Mez stanovitelnosti
Studánka Na Roudné	0,237	<mez stanovitelnosti
Rybnice5	0,244	<mez stanovitelnosti
Bílá, studánka Smradlavka	0,263	<mez stanovitelnosti
Vlčejn	0,280	<mez stanovitelnosti
Studánka Staré Hamry	0,305	<mez stanovitelnosti
Staré Hamry, přehrada	0,305	<mez stanovitelnosti
Chotěšov	0,308	<mez stanovitelnosti
Studánka Bolevecká náves	0,313	<mez stanovitelnosti
Studánka Čižice	0,323	<mez stanovitelnosti
Studánka České údolí	0,329	<mez stanovitelnosti
Vejpnická, Plzeň	0,338	<mez stanovitelnosti
Kaznějov	0,344	<mez stanovitelnosti
Studánka Rybnice	0,364	<mez stanovitelnosti
Studánka Prelátka Plasy	0,364	<mez stanovitelnosti
Hřbitov Plasy	0,366	<mez stanovitelnosti
Rybnice1	0,370	<mez stanovitelnosti
Plasy, Hutní	0,377	<mez stanovitelnosti
Rybnice3	0,381	<mez stanovitelnosti
Studánka Bukovec	0,396	<mez stanovitelnosti
Rybnice4	0,399	<mez stanovitelnosti
Dolní Bělá	0,411	<mez stanovitelnosti
Rybnice6	0,415	<mez stanovitelnosti
Rybnice2	0,427	<mez stanovitelnosti
Stod	0,454	<mez stanovitelnosti
Kaznějov	0,476	<mez stanovitelnosti
Ledce	0,627	>mez stanovitelnosti
Studánka Bolevec. rybník	0,664	> mez stanovitelnosti
Studna Spankov	0,681	> mez stanovitelnosti
Studánka Tachov	0,931	> mez stanovitelnosti
Babiná vrt 1	0,981	> mez stanovitelnosti
Lipnice	1,470	> mez stanovitelnosti
Bělá, Spankov	3,167	> mez stanovitelnosti
Babiná vrt 2	4,019	> mez stanovitelnosti
Starý Plzenec	10,764	> mez stanovitelnosti
Čižice náves	41,34	> mez stanovitelnosti

<sup>2</sup> Zeleně vyznačeny hodnoty vyšší než mez detekce, ale nižší než mez stanovitelnosti a červeně vyznačeny hodnoty vyšší než mez stanovitelnosti

### 3.8.2 DISKUZE – VOLBA METODY

Základ této práce spočívá ve výběru metody pro stanovení železa ve vodě pomocí spektrofotometrie. K úspěšné aplikaci fotometrické metody bylo nejprve zapotřebí porozumět problematice optických metod. Pochopit zákonitosti elektromagnetického záření, uvědomit si princip spektrometrických metod a seznámit se s prací na spektrofotometru, na kterém probíhalo samotné měření.

Porovnání tří metod proběhlo na základě zpracování uměle připravených vzorků. K těmto metodám byly vyhledány dostupné postupy, podle kterých byla připravena veškerá potřebná činidla. Již při přípravě činidel byly metody hodnoceny a porovnávány, zvláště co se týče náročnosti na přípravu. U metody 3 by mohl být problém s obstaráním kyseliny sulfosalicylové, která nepatří mezi běžně používané chemikálie. Dále bylo zapotřebí si dát pozor na životnost roztoků, např. roztok hydroxylaminhydrochloridu, jehož životnost je omezena na čtyři dny.

Uměle připravené vzorky o známých koncentracích železa byly využity ke kalibraci metody. Již po přidání vybarvovacích činidel do roztoku, bylo patrné, který roztok obsahuje více či méně železa (Obr. 11). Závislost intenzity vybarvení na hmotnostní koncentraci železa v uměle připraveném nebo odebraném vzorku splňuje podmínky Lambert-Beerova zákona. Čím větší intenzita zbarvení roztoku, tím větší koncentrace i absorbance.



Obr. 11 Intenzita zbarvení kalibračních roztoků

Měření absorpce uměle připravených vzorků se uskutečnilo prostřednictvím programu UV-Solutions, kde byl zvolen typ měření „Wavelength scan“. Toto měření poskytlo záznam několika absorpčních křivek. Ze zaznamenaných spekter bylo možné vyčíst, při jaké vlnové délce dochází k absorpčnímu maximu kalibračního roztoku. Jako testovací vzorky posloužily kalibrační roztoky. Z jejich maximálních hodnot absorbancí



pak byly v programu Microsoft Excel vytvořeny grafy v závislosti maximální absorbance na koncentraci.

Ze samotných absorpčních křivek lze usoudit, že metoda 2 nebude úplně ideální pro tuto práci. Z uvedeného grafu (č. 3) je patrné, že průběh křivky je kostrbatý a že pík má více vrcholů vedle sebe. Předpokládaný vrchol píku by se měl pohybovat v okolí vlnové délky 510 nm. Při této vlnové délce byla odečítána hodnota absorbance pro sestavení kalibrační křivky, která nebyla zcela lineární. Z tohoto důvodu bylo měření opakováno s tím rozdílem, že hodnota absorbance byla odečítána při vlnové délce 460 nm. Ani v tomto případě však nebyla výsledná kalibrační křivka zcela lineární. Ačkoli podle norem ČSN je metoda s 1,10-fenantrolinem klasickou základní běžně používanou metodou pro stanovení železa ve vodě. Pro tuto práci ale nejvhodnější nebyla, další důvody budou v následujícím textu ještě popsány.

Po srovnání několika kalibračních přímek bylo usouzeno, že nejlepší průběh představuje kalibrační přímka pro metodu 1 (Graf č. 2). U metody 3 sehrálo důležitou roli pH roztoku kyseliny sulfosalicylové. Nejprve bylo pracováno s roztokem, u kterého se hodnota pH pohybovala lehce přes devět. Výsledná absorpční křivka vykazovala průběh podle předpokladu. Absorpční maximum v tomto případě odpovídalo vlnové délce 420 nm. (Graf č. 6). Při přípravě roztoku kyseliny sulfosalicylové byl nachystán ještě roztok o hodnotě pH 11. Záměrem bylo porovnat výsledné křivky pro dvě odlišné hodnoty pH. Absorpční křivka pro vyšší pH vykazovala podobný průběh jako u pH nižšího. Nejvyšší absorbance kalibračních roztoků byla v obou případech naměřena při vlnové délce 420 nm. Rozdíl byl zaznamenán v odečtené hodnotě maximální absorbance, která se lišila v řádech několika setin. Tyto změny se samozřejmě projevíly při konstrukci kalibračních křivek. Kdy odečítané hodnoty absorbancí se významně lišily, ačkoli použité kalibrační roztoky byly totožné. Po vynesení hodnot absorbance a koncentrace do grafu bylo zjevné, že roztok kyseliny sulfosalicylové o vyšším pH je nevhodný (Graf č. 9). Ani v případě nižšího pH roztoku kyseliny sulfosalicylové nebylo dosaženo uspokojivých výsledků, proto metoda 3 byla považována za nevhodnou. Problémem této metody je nežádoucí vliv řady látek vyskytujících se v roztoku, které ovlivňují nastavení pH a následně pak i hodnoty absorbance. Pokud by tato metoda byla zvolena pro stanovení koncentrace železa v odebraných vzorcích, bylo by třeba nejprve vyzkoušet a ověřit vliv pH.

Další hodnocení metod bylo uskutečněno z hlediska ekonomické náročnosti. Pro srovnání byly použity ceny nalezené na stránkách tří chemických distributorů. Ceny za jednotlivá balení pak byly přepočteny na čisté spotřeby chemikálií. Jak již bylo uvedeno v tabulce č. 21, nejvýhodnější metodou z hlediska ekonomické náročnosti je metoda 1 a metoda 3. U metody 1 není problém ani s dostupností chemikálií, jedná se o běžné chemikálie, se kterými lze pracovat za normálních laboratorních podmínek. Po komplexním porovnání metod je pochopitelné, že za nejvhodnější metodu byla zvolena metoda 1.

### 3.8.3 ODEBRANÉ VZORKY

Vzorky byly odebírány v rozmezí cca jednoho měsíce z různých oblastí – oblast Plzeň-město, Plzeň-jih, Plzeň-sever a pro zajímavost byl odebrán ještě vzorek z tachovské „Minerálky“ a tři vzorky z oblasti Frýdku-Místku. Oblasti nebyly nijak cíleně vybírány a ani blíže specifikovány. Nejvíce vzorků bylo odebráno z Plzně-severu, v této oblasti byly předpokládány vyšší koncentrace železa v souvislosti s geologickým podložím. Vzorky byly odebírány ze studniční pitné i nepitné vody a pro porovnání byly odebrány i vzorky z přírodních pramenů (studánek).

### 3.8.4 HODNOCENÍ VÝSLEDKŮ

V této kapitole byly výsledné hodnoty koncentrace porovnány a seřazeny do tabulek. Důležitou úlohu v porovnání sehrály oblasti, ze kterých byly vzorky odebírány, dále typy vod a na závěr srovnání výsledků pomocí platných norem ČSN. Normy uvádějí mezní hodnoty pro koncentraci železa v pitné vodě. Standardně platí, že maximální hodnota koncentrace železa v pitné vodě je 0,2 mg/l a ve výjimečných případech, kdy je voda částečně ovlivněna geologickým podložím je hodnota upravena na 0,5 mg/l.

Zvýšená koncentrace železa ve vodě není pro člověka nijak škodlivá, ba naopak, ale i přesto vyšší hodnoty železa majitelé studní nevidí rádi. O tom jsem se mohla přesvědčit na vlastní kůži a to při odběru vzorku ze studny ve Spankově. Železo jako takové neškodí nám, ale zařízením (kotle, bojler), které se s železitou vodou dostávají do kontaktu. Oxidy železa se usazují ve formě povlaků a poškozují tak domácí spotřebiče. Dále tyto povlaky mohou být živnou půdou pro železité bakterie, které mohou mít negativní vliv na lidský organismus. Naopak ale v minerálních vodách tzv.

„kyselkách“, je zvýšená hodnota železa žádána a to z důvodu léčivých účinků. V této práci se pozitivní zvýšená koncentrace železa vyskytovala v odebraném vzorku z pitné tachovské „Minerálky“.

#### Rozdělení výsledků do několika skupin:

- 1) Koncentraci železa ve vzorku není možné přesně specifikovat. Lze předpokládat, že železo se ve vzorku vyskytovalo pouze ve stopovém množství. (hodnota ležící pod limitem stanovitelnosti, tzn.  $< 0,57$  mg/l)
- 2) Koncentrace železa ve vzorku byla specifikována konkrétní naměřenou hodnotou. (hodnota ležící nad limitem stanovitelnosti, tzn.  $> 0,57$ )

Většina výsledků se pohybovala v rozmezí meze detekce (MD) a meze stanovitelnosti (MS), železo bylo v těchto vzorcích prokázáno.

#### Srovnání výsledných hodnoty v rámci jednotlivých oblastí odběru

- 1) Koncentrace železa pro vzorky Plzeň-město
- 2) Koncentrace železa pro vzorky Plzeň-sever
- 3) Koncentrace železa pro vzorky Plzeň-jih
- 4) Koncentrace pro vzorky Frýdek-Místek

Tabulka 31 Koncentrace železa pro vzorky Plzeň-město

Plzeň město	Koncentrace Fe (mg/l)	
Studánka Na Roudné	stopové množství železa	<mez stanovitelnosti
Studánka Bolevec. náves	stopové množství železa	<mez stanovitelnosti
Studánka České údolí	stopové množství železa	<mez stanovitelnosti
Vejprnická, Plzeň	stopové množství železa	<mez stanovitelnosti
Studánka Bukovec	stopové množství železa	< mez stanovitelnosti
Studánka Bolevec. rybník	0,66	> mez stanovitelnosti
Starý Plzenec	10,76	> mez stanovitelnosti



Obr. 12 Zobrazení míst odebraných vzorků (19)

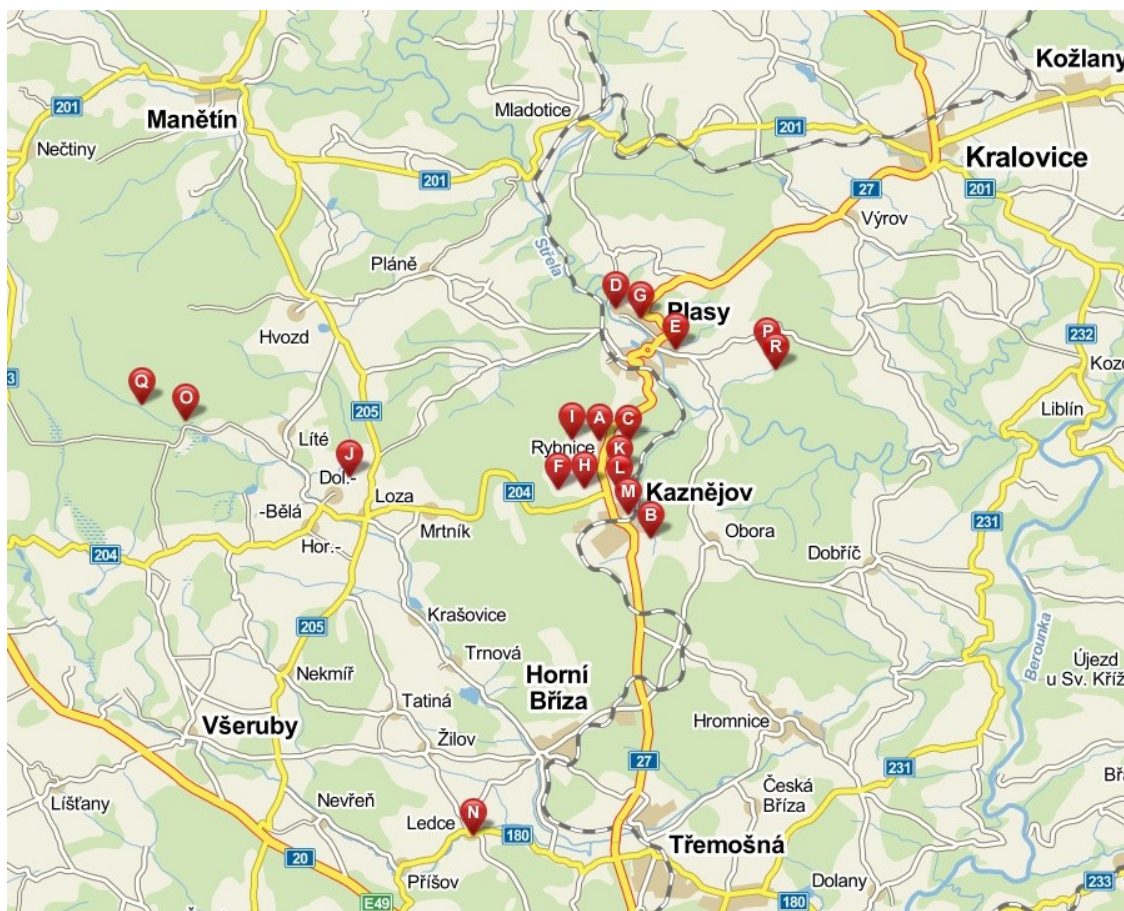
Body na mapě (A – G) odpovídají seřazeným vzorkům z tabulky č. 31.

Pro oblast Plzeň-město byly zaznamenány dva případy, kdy hodnota koncentrace přesahovala limit stanovitelnosti. V těchto případech byla překročena i mezní hodnota platná pro koncentraci železa v pitné vodě. Jednalo se za prvé o vzorek ze studánky u Boleveckého rybníka a za druhé o vzorek studniční nepitné vody ze Starého Plzeňce. Voda ze studny ve Starém Plzenci neslouží jako pitná, ale jako užitková tzv. voda na zalévání. Zvýšená hodnota může být dána několika faktory, ale nejpravděpodobnější příčina bude v malém používání studny. Předpokládám, že studna následně i čerpací zařízení (pumpa) je znečištěná a železo může být usazeno ve formě oxidů a hydroxidů uvnitř studny. Dále v této oblasti nebyly zaznamenány další významně vyšší koncentrace.



Tabulka 32 **Koncentrace železa pro oblast Plzeň-sever**  
**Plzeň sever**

	Koncentrace Fe (mg/l)	
Rybnice5	stopové množství železa	<mez stanovitelnosti
Kaznějov	stopové množství železa	< mez stanovitelnosti
Studánka Rybnice	stopové množství železa	< mez stanovitelnosti
Studánka Prelátka Plasy	stopové množství železa	< mez stanovitelnosti
Hřbitov Plasy	stopové množství železa	< mez stanovitelnosti
Rybnice1	stopové množství železa	< mez stanovitelnosti
Plasy, Hutní	stopové množství železa	< mez stanovitelnosti
Rybnice3	stopové množství železa	< mez stanovitelnosti
Rybnice4	stopové množství železa	< mez stanovitelnosti
Dolní Bělá	stopové množství železa	< mez stanovitelnosti
Rybnice6	stopové množství železa	< mez stanovitelnosti
Rybnice2	stopové množství železa	< mez stanovitelnosti
Kaznějov, Sportovní	stopové množství železa	< mez stanovitelnosti
Ledce	0,63	>mez stanovitelnosti
Studna Spankov	0,68	> mez stanovitelnosti
Babiná vrt 1	0,98	> mez stanovitelnosti
Bělá, Spankov	3,17	> mez stanovitelnosti
Babiná vrt 2	4,02	> mez stanovitelnosti



Obr. 13 Zobrazení míst odebraných vzorků (49)

Body na mapě (A – S) odpovídají seřazeným vzorkům z tabulky č. 32

V oblasti Plzeň-sever (Obr. 13) bylo odebráno nejvíce vzorků. V pěti případech byla naměřena vyšší koncentrace železa, která zároveň překročila mezní hodnotu pro koncentraci železa v pitné vodě. Nejvyšší koncentrace vykazovaly vzorky z vrtu mezi Babinou a Nebřezinama (Obr. 14). Již při odběru bylo zřejmé, že voda bude obsahovat více množství železa. Ačkoli vyvěrající voda je průzračně čistá, dno Nebřezinského potoka vypadá jako by bylo zlaté. Zlatou barvu způsobuje zoxidované železo, které se zde usazuje ve formě oxidů železa. Významnou roli v zabarvení mají i železité bakterie vytvářející červenooranžové povlaky. Prakticky to samé platí u vzorku odebraného z potoka Bělá, který pramení nedaleko Spankova. Zvýšené koncentrace železa jsou typické pro bezkyslíkaté a kyselé podzemní vody.

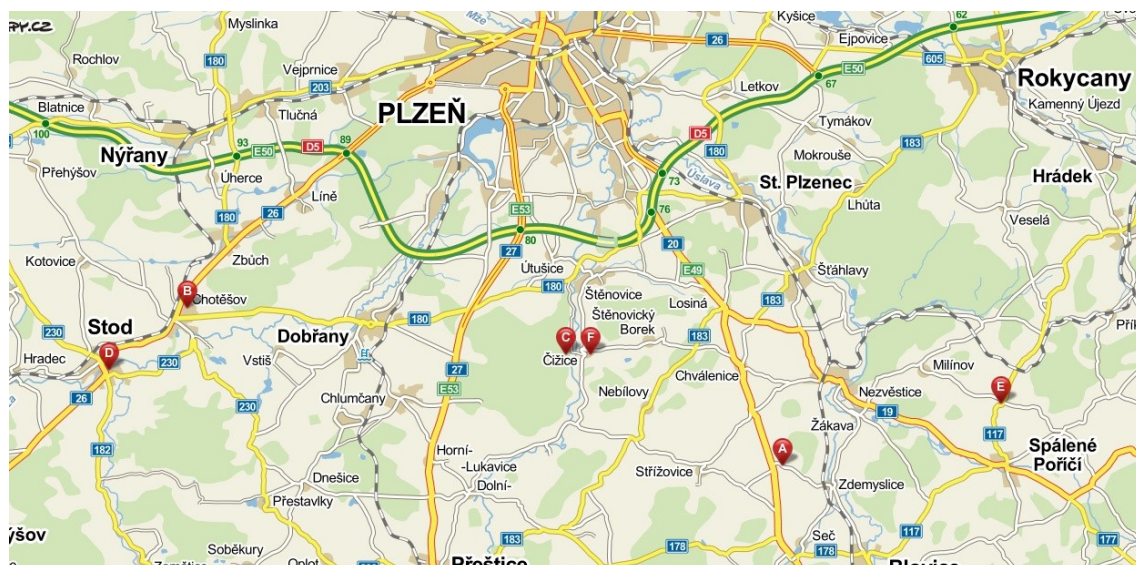


Obr. 14 Vrt mezi Babinou a Nebřezinama

Tabulka 33 Koncentrace železa pro oblast Plzeň-jih  
Plzeň jih Koncentrace Fe (mg/l)

Vlčejn	stopové množství železa	<mez stanovitelnosti
Chotěšov	stopové množství železa	<mez stanovitelnosti
Studánka Čížice	stopové množství železa	<mez stanovitelnosti
Stod	stopové množství železa	<mez stanovitelnosti
Lipnice 8	1,47	>mez stanovitelnosti
Čížice náves	41,34	>mez stanovitelnosti





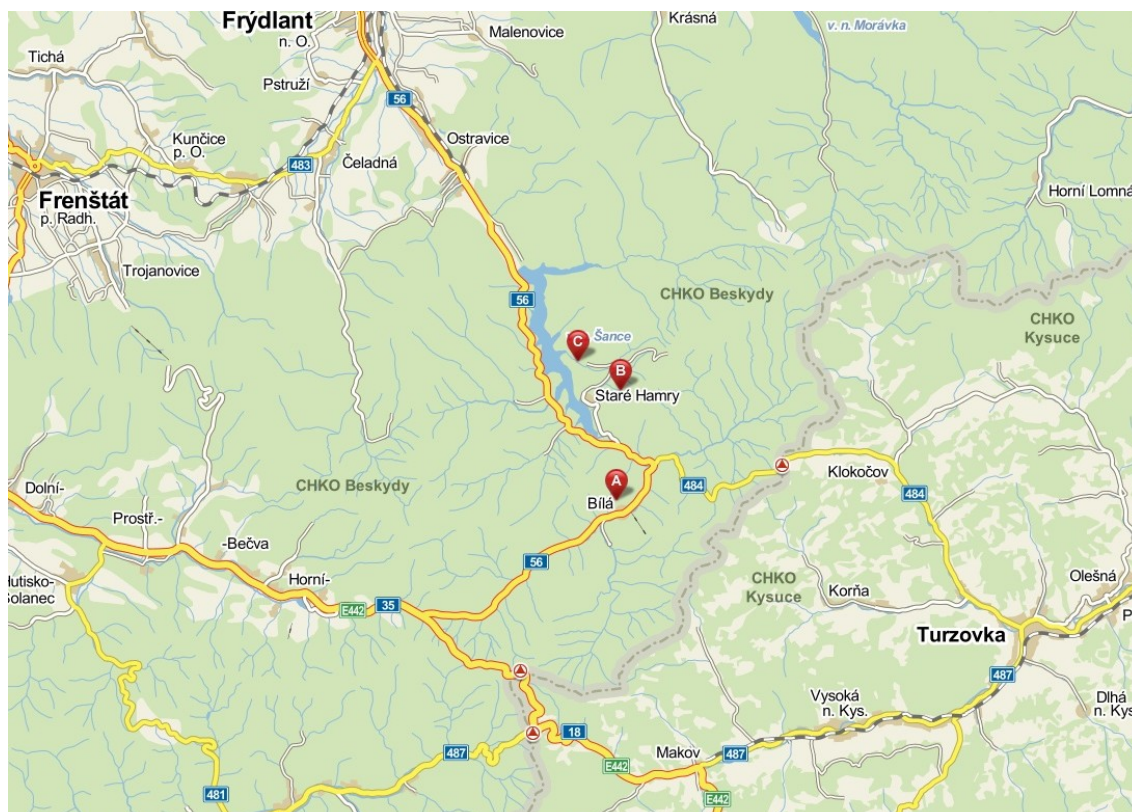
Obr. 15 Zobrazení míst odebraných vzorků (19)

Body na mapě (A – F) odpovídají seřazeným vzorkům z tabulky č. 33

V oblasti jižního Plzeňska bylo odebráno šest vzorků, z nichž u dvou byla naměřena zvýšená koncentrace železa. U vzorku ze studny v Čižicích hodnota koncentrace několikanásobně překročila mezní hodnotu stanovitelnosti, tím pádem i limit pro koncentraci železa v pitné vodě. To, že byla koncentrace tak vysoká, mě ani nepřekvapilo, již po odebrání vzorku byl pozorován hnědo oranžový zákal a zápach. Studna není využívána a pumpa je zrezavělá (oxidem železitým, popř. hydroxidem železitým). V případě druhé zvýšené koncentrace v obci Lipnice, byla také příčina v znečištění studny.

Tabulka 34 Koncentrace železa pro oblast Frýdek - Místek  
Frýdek - Místek

	Koncentrace Fe (mg/l)
Studánka Smradlavka	stopové množství železa <mez stanovitelnosti
Studánka Staré Hamry	stopové množství železa <mez stanovitelnosti
Staré Hamry, přehrada	stopové množství železa <mez stanovitelnosti



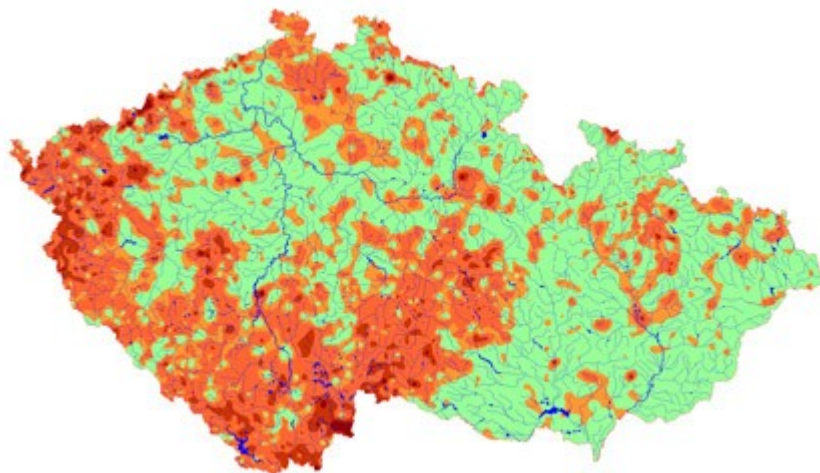
**Obr. 16** Zobrazení míst odebraných vzorků <sup>(19)</sup>

Body na mapě (A – C) odpovídají seřazeným vzorkům z tabulky č. 34

V pořadí čtvrtá oblast byla uvedena pouze pro zajímavost. V této oblasti byly provedeny pouze tři odběry a ani u jednoho nebyla zaznamenána vyšší koncentrace železa.



Pro ucelení informací o oblastech s výskytem železa uvádím mapu s názorným zakreslením výskytu železa. Nejtmavší oblasti představují nejvyšší koncentrace železa.



Obr. 17 **Mapa s názorně vyznačenými oblastmi výskytu železa** <sup>(20)</sup>

Kdybychom chtěli porovnávat uvedené oblasti komplexněji, bylo by zapotřebí odebrat mnohem více vzorků, aby srovnání výsledků bylo relevantní. V této práci se pouze domníváme a předpokládáme, v jakých oblastech může být problém s vyšší koncentrací železa. Předpoklady o zvýšené koncentraci železa na Plzni severu potvrzuje i koncentrační mapa. Je patrné, že vyšší koncentrace železa lemují oblasti spojené s důlní těžbou na západě Čech.

## 4 ZÁVĚR

V bakalářské práci bylo dosaženo stanovených cílů. Dle tří metod vhodných pro stanovení železa ve vodě proběhlo měření na spektrofotometru HITACHI U-2001. Metody byly na základě uměle připravených vzorků otestovány a následně porovnány. V porovnání sehrála důležitou roli kalibrace, která posloužila jako hlavní srovnávací kritérium při volbě metody. Za nevhodnější metodu byla zvolena metoda 1 s thiokyanatanem draselným. Díky této metodě bylo realizováno vlastní měření odebraných vzorků.

Během porovnávání metod bylo zjištěno, že metoda 2 s 1,10-fenantrolinem je velice citlivá, ale náročná na přípravu pracovních roztoků. V tomto případě nebylo dosaženo uspokojivých výsledků kalibrace. V dostupných laboratorních podmínkách a pro účel této práce, byla tato metoda nevhodná. Jako nevyhovující se ukázala i metoda 3 s kyselinou sulfosalicylovou, u které se projevil značný vliv pH. Nastavit optimální hodnotu pH roztoku kyseliny sulfosalicylové bylo značně náročné. Bylo prokázáno, že se zvyšující se hodnotou pH roztoku, se zvyšuje i hodnota naměřené absorbance. Jako nejvhodnější metoda se tedy projevila metoda 1 s thiokyanatanem draselným, u které nebyla zaznamenána větší komplikace. Metoda vyhovuje běžným laboratorním podmínkám. Je vhodná pro analýzu odebraných vzorků, kde předpokládáme vyšší výskyt železa o koncentraci větší než 0,5 mg/l. V těchto případech je pak možné exaktně stanovovat hodnoty pro koncentraci železa ve vzorku.

V této práci byla přítomnost železa prokázána ve všech odebraných vzorcích. Exaktní hodnoty koncentrace byly však naměřeny pouze ve vzorcích, u kterých byl splněn limit stanovitelnosti. Naměřené hodnoty byly srovnány a zaznamenány do přehledných tabulek. Je třeba ale podotknout, že výsledné hodnoty nebyly nejdůležitějším bodem této práce. Podstata této práce spočívala ve volbě metody. Úkolem bylo najít vhodnou metodu, dle které bude možné stanovovat koncentrace železa za běžných laboratorních podmínek, např. ve školních laboratořích.

Na základě této práce můžeme tvrdit, že vyšší koncentrace železa ve vodě jsou na západě Čech poměrně časté. Nabízí se tedy otázka, proč tomu tak je. Dále může přemýšlet o tom, jaký vliv mají vyšší koncentrace železa nejen na člověka, ale i na ráz

krajiny. Můžeme si položit i otázky týkající se odstraňování železa. Zmíněné otázky se mohou stát náplní pro další bakalářské či diplomové práce.

## 5 RESUMÉ

This bachelor's thesis is focused on spectral methods, which we can make use of in determination of iron in the water. The quantity of iron in the water in my thesis was determined by using three spectrophotometric methods. These methods were tested and then afterwards compared to each other. The results of the comparison lead to selection of the most suitable method for laboratory use.

I consider the method of photometric determination of iron using potassium thiocyanate as one of the most suitable and effective in consideration of my work.

I was using this method to measure the concentration of iron in my collected samples of water, which came from various sources. The recorded data was evaluated and eventually compared with CSN standards. CSN standards state maximum permitted amount of iron in drinkable water.

From conclusions of my experiments we can infer, that the method of determination of iron using potassium thiocyanate is very suitable for measurement of samples with higher concentration of iron.

## 6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY A ZDROJŮ

- (1) Zýka J.: Analytická příručka, Díl II. SNTL - Nakladatelství technické literatury, Praha 1988.
- (2) Opekar F., Jelínek I., Rychlovský P., Plzák Z.: Základní analytická chemie. Karolinum, Praha 2005.
- (3) Spektrum elektromagnetického záření [online]. [cit. 2014-04-18]. Dostupné z:[http://cs.wikipedia.org/wiki/Elektromagnetick%C3%A9\\_spektrum#mediaviewer/Soubor:ElmgSpektrum.png](http://cs.wikipedia.org/wiki/Elektromagnetick%C3%A9_spektrum#mediaviewer/Soubor:ElmgSpektrum.png)
- (4) Bekárek V., Wiedermannová I.: Optické metody v chemické analýze. Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc 2003.
- (5) Němcová I., Čermáková L., Rychlovský P.: Spektrometrické analytické metody I. Karolinum, Praha 2004.
- (6) Spektrofotometrie. In: *Wikiskripta* [online]. [cit. 2014-04-14]. Dostupné z:<http://www.wikiskripta.eu/index.php/Spektrofotometrie>
- (7) Klouda P.: Moderní analytické metody. Nakladatelství Pavel Klouda, Ostrava 1996.
- (8) Farková M., Vrbková B., Zavadilová H.: Metody chemického výzkum – praktikum. Masarykovo univerzita, Brno 2012.
- (9) Elektromagnetické spektrum. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online], 2001- [cit. 2014-04-18].  
Dostupné z: [http://cs.wikipedia.org/wiki/Elektromagnetick%C3%A9\\_spektrum](http://cs.wikipedia.org/wiki/Elektromagnetick%C3%A9_spektrum)
- (10) Podpora talentů: 2013 odporný přírodovědný kemp. [online]. [cit. 2014-04-22].  
Dostupné z: <http://www.podporatalentu.cz/ke-stazeni.htm>
- (11) Rozklad světla hranolem. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. [cit. 2014-05-22].  
Dostupné z: [http://cs.wikipedia.org/wiki/Optick%C3%BD\\_hranol#mediaviewer/Soubor:Prism-rainbow.svg](http://cs.wikipedia.org/wiki/Optick%C3%BD_hranol#mediaviewer/Soubor:Prism-rainbow.svg)
- (12) Malát M.: Absorpční anorganická fotometrie. Academia, Praha 1973.

- (13) Horáková M., Lischke P., Pekárková K., Grünwald A.: Metody chemické analýzy vod. SNTL – Nakladatelství technické literatury, Praha 1986.
- (14) Horáková M. a kolektiv: Analytika vody. VŠCHT, Praha 2003.
- (15) ČSN ISO 6332 (75 7433). Jakost vod. Stanovení železa. Fotometrická metoda s 1,10-fenantrolinem. 02 1995.
- (16) Meze detekce a stanovitelnosti. In: *Terminologie* [online]. [cit. 2014-05-20]. Dostupné z: <http://www.sekk.cz/terminologie/Text/Terminologie.htm>
- (17) Brandštýl J.: Stanovení fosforečnanů ve vzorcích půdy fotometrickou metodou. Diplomová práce. Plzeň 2013.
- (18) Validace metody. In: *VŠCHT - KTK* [online]. [cit. 2014-05-18]. Dostupné z: [http://www.vscht.cz/ktk/www\\_324/lab/texty/ana/validace.pdf](http://www.vscht.cz/ktk/www_324/lab/texty/ana/validace.pdf)
- (19) Obrázek - mapy [online]. [cit. 2014-05-22]. Dostupné z: <http://mapy.cz/>
- (20) Koncentrační mapa Fe [online]. [cit. 2014-06-22]. Dostupné z: [http://www.geology.cz/project666400/uvod/vysledky\\_potoky\\_vzorky/vysledky\\_potoky\\_ca](http://www.geology.cz/project666400/uvod/vysledky_potoky_vzorky/vysledky_potoky_ca)

## SEZNAM OBRÁZKŮ, TABULEK A GRAFŮ

Obr. 1 Schematické rozdělení spektrálních metod .....	3
Obr. 2 Elektromagnetické spektrum <sup>(3)</sup> .....	4
Obr. 3 Lambert-Beerův zákon .....	8
Obr. 4 Schéma absorpce, emise a fluorescence záření <sup>(5)</sup> .....	9
Obr. 5 Schematické znázornění absorpce a emise pro atomy a molekuly látek <sup>(2)</sup> .....	11
Obr. 6 Příslušná spektra pro atomy (čárová) a molekuly (pásová) <sup>(2)</sup> .....	11
Obr. 7 Rozklad světla hranolem <sup>(11)</sup> .....	15
Obr. 8 Schéma interferenčního filtru <sup>(5)</sup> .....	16
Obr. 9 Schéma uspořádání základních částí spektrometrických přístrojů <sup>(5)</sup> .....	18
Obr. 10 Záznam průběhu absorpční křivky .....	31
Obr. 11 Intenzita zabarvení kalibračních roztoků .....	51
Obr. 12 Zobrazení míst odebraných vzorků <sup>(19)</sup> .....	55
Obr. 13 Zobrazení míst odebraných vzorků <sup>(19)</sup> .....	56
Obr. 14 Vrt mezi Babinou a Nebřezinama .....	57
Obr. 15 Zobrazení míst odebraných vzorků <sup>(19)</sup> .....	58
Obr. 16 Zobrazení míst odebraných vzorků <sup>(19)</sup> .....	59
Obr. 17 Mapa s názorně vyznačenými oblastmi výskytu železa <sup>(20)</sup> .....	60
Tabulka 1 Elektromagnetické záření využívané v chemické analýze <sup>(2)</sup> .....	12
Tabulka 2 Barvy absorbovaného viditelného záření a příslušné barvy doplňkové .....	19
Tabulka 3 Kalibrační roztoky pro metodu 1 .....	27
Tabulka 4 Kalibrační roztoky pro metodu 2 .....	28
Tabulka 5 Maximální hodnoty absorpance kalibračních roztoků pro metodu 1 .....	33
Tabulka 6 Kalibrace metoda 1 .....	33
Tabulka 7 Absorbance slepých vzorků metoda 1 .....	34

Tabulka 8 Mez detekce a mez stanovitelnosti metoda 1 .....	35
Tabulka 9 Maximální hodnoty absorbance kalibračních roztoků pro metodu 2 .....	36
Tabulka 10 Kalibrace metoda 2 .....	36
Tabulka 11 Kalibrace 2 metoda 2 .....	37
Tabulka 12 Absorbance slepých vzorků metoda 2 (při 460 nm) .....	38
Tabulka 13 Mez detekce a mez stanovitelnosti pro metodu 2 .....	38
Tabulka 14 Maximální hodnoty absorbance kalibračních roztoků pro metodu 3 .....	40
Tabulka 15 Hodnoty absorbance pro kalibrační roztoky zpracované při pH =11 .....	41
Tabulka 16 Absorbance slepých vzorků metoda 3 .....	42
Tabulka 17 Meze detekce a stanovitelnosti metoda 3 .....	43
Tabulka 18 Náklady na metodu 1 .....	43
Tabulka 19 Náklady na metodu 2 .....	43
Tabulka 20 Náklady na metodu 3 .....	44
Tabulka 21 Shrnuté náklady .....	44
Tabulka 22 Časová náročnost .....	44
Tabulka 23 Porovnání mezí detekce a mezí stanovitelnosti .....	44
Tabulka 24 Tabulka standardů .....	46
Tabulka 25 Parametry lineární závislosti .....	47
Tabulka 26 Naměřené hodnoty absorbance a koncentrace u studánek pitných .....	48
Tabulka 27 Naměřené hodnoty absorbance a koncentrace u studánek nepitných .....	48
Tabulka 28 Naměřené hodnoty absorbance a koncentrace pro studny pitné .....	48
Tabulka 29 Naměřené hodnoty absorbance a koncentrace pro studny nepitné .....	49
Tabulka 30 Seznam naměřených hodnot pro koncentraci železa ve vzorku .....	50
Tabulka 31 Koncentrace železa pro vzorky Plzeň-město .....	54
Tabulka 32 Koncentrace železa pro oblast Plzeň-sever .....	56
Tabulka 33 Koncentrace železa pro oblast Plzeň-jih .....	57
Tabulka 34 Koncentrace železa pro oblast Frýdek - Místek .....	58



---

Graf 1 Absorpční křivka pro kalibrační roztok o koncentraci 2,5 mg/l.....	33
Graf 2 Kalibrační křivka pro metodu 1 s regresní rovnicí.....	34
Graf 3 Absorpční křivka pro kalibrační roztok o koncentraci 3 mg/l.....	36
Graf 4 Kalibrační křivka pro metodu 2 s regresní rovnicí (při 510 nm).....	37
Graf 5 Kalibrační křivka pro metodu 2 s regresní rovnicí při vlnové délce 460 nm .....	38
Graf 6 Absorpční křivka pro kalibrační roztok o koncentraci 3 mg/l (při pH = 9) .....	40
Graf 7 Absorpční křivka pro kalibrační roztok o koncentraci 3 mg/l (při pH = 11) .....	40
Graf 8 Kalibrační křivka pro metodu 3 s regresní rovnicí.....	41
Graf 9 Kalibrační křivka pro metodu 3 s regresní rovnicí při pH = 11 .....	42
Graf 10 Kalibrační přímka pro metodu 1 i se slepým stanovením a regresní rovnicí ....	46

## PŘÍLOHY

Tabulka Přehled odebraný vzorků

	Místo odběru	Datum odběru	Datum měření	Typ odběru	Pitná/nepitná
1	Rybnice1	20.2.2014	21.2.2014	Studna - čerpadlo	nepitná
2	Rybnice2	20.2.2014	21.2.2014	Studna - kohoutek	pitná
3	Rybnice3	20.2.2014	21.2.2014	Studna - kohoutek	pitná
4	Rybnice4	20.2.2014	21.2.2014	Studna - čerpadlo	nepitná
5	Rybnice5	20.2.2014	21.2.2014	Studna - kohoutek	pitná
6	Studánka Rybnice	20.2.2014	21.2.2014	Studánka	pitná
7	Bukovec	16.2.2014	21.2.2014	Studánka	pitná
8	České údolí	16.2.2014	21.2.2014	Studánka	nepitná
9	Bolevecká náves	16.2.2014	21.2.2014	Studánka	pitná
10	Bolevec. rybník	16.2.2014	21.2.2014	Studánka	nepitná
11	Na Roudné	16.2.2014	21.2.2014	Studánka	pitná
12	Čižice	16.2.2014	21.2.2014	Studánka	pitná
13	Čižice náves	16.2.2014	21.2.2014	Studna - pumpa	nepitná
14	Kaznějov	23.2.2014	6.3.2014	Studna - čerpadlo	pitná
15	Plasy - hřbitov	23.2.2014	6.3.2014	Studna - pumpa	nepitná
16	Prelátka Plasy	23.2.2014	6.3.2014	Studánka	pitná
17	Rybnice6	23.2.2014	6.3.2014	Studna - kohoutek	pitná
18	Kaznějov	23.2.2014	6.3.2014	Studna - pumpa	nepitná
19	Stod	23.2.2014	6.3.2014	Studna - kohoutek	pitná
20	Ledce	23.2.2014	6.3.2014	Studna - pumpa	nepitná
21	Starý Plzenec	23.2.2014	6.3.2014	Studna - pumpa	nepitná
22	Tachov	23.2.2014	6.3.2014	Studánka	pitná
23	Lipnice	23.2.2014	6.3.2014	Studna - pumpa	nepitná
24	Vejprnická, Plzeň	23.2.2014	6.3.2014	Studna - pumpa	nepitná
25	Vlčejn	26.2.2014	6.3.2014	Studna - kohoutek	pitná
26	Chotěšov	26.2.2014	6.3.2014	Studna - kohoutek	pitná
27	Studna Spankov	2.3.2014	6.3.2014	Studna - pumpa	pitná
28	Bělá, Spankov	2.3.2014	6.3.2014	Potok	nepitná
29	Dolní bělá	2.3.2014	6.3.2014	Studna - kohoutek	pitná
30	Staré Hamry	16.3.2014	20.3.2014	Studánka	pitná
31	Staré Hamry, přehrada	16.3.2014	20.3.2014	Potok	pitná
32	Bílá, Smradlavka	16.3.2014	20.3.2014	Studánka	pitná
33	Plasy, Hutní	19.3.2014	20.3.2014	Studna - pumpa	pitná
34	Babinná vrt 1	19.3.2014	20.3.2014	Pramen	nepitná
35	Babinná vrt 2	19.3.2014	20.3.2014	Potok	nepitná

## Pracovní návod

### Fotometrické stanovení veškerého železa s thiokyanatanem draselným

**Téma:** Stanovení železa ve vodě

**Úkoly:**

- 1) Příprava zásobního roztoku síranu železitého
- 2) Příprava sady kalibračních roztoků
- 3) Vlastní měření odebraných vzorků

**Přístroje:**

Spektrofotometr s možností nastavení vlnové délky 500 nm

**Chemikálie:**

1. Kyselina chlorovodíková ( $\rho = 1,19$  g/ml) p.a.
2. Síran železitý nonahydrát p.a.
3. Thiokyanatan draselný p.a.

#### Příprava zásobního roztoku

Ve 100ml odměrné baňce se rozpustí 0,050 g síranu železitého pomocí 10 ml koncentrované kyseliny chlorovodíkové. Následně se roztok doplní destilovanou vodou po rysku. Zásobní roztok obsahuje v 1 ml 0,1 mg železa, tj. hmotnostní koncentrace železa v roztoku odpovídá 100 mg/l.

#### Příprava kalibračních roztoků

Nejprve je nutné zředění zásobního roztoku (ZR) síranu železitého na hmotnostní koncentraci 50 mg/l. Do 100ml odměrné baňky se odpipetuje 50 ml ZR a doplní destilovanou vodou po rysku. Vzniklý pracovní roztok standardu (PR) slouží ke kalibraci, kterou provedeme dle tabulky. Do šesti 50ml odměrných baněk se postupně napipetují různé objemy PR doplněných po rysku.

Odpipetovaný objem (ml)	Destilovaná voda	Koncentrace KR (mg/l)
0,5	Doplnit po rysku	0,5
1,5	Doplnit po rysku	1,5
2,5	Doplnit po rysku	2,5
3,5	Doplnit po rysku	3,5
4,5	Doplnit po rysku	4,5
5,5	Doplnit po rysku	5,5

## Postup

Kalibrační roztoky o různých koncentracích převedeme do šesti 100ml kádinek a postupně zpracujeme dále uvedeným způsobem. K 50 ml kalibračního roztoku se přidá 2,5 ml kyseliny chlorovodíkové (1:1) a 5 ml 20% roztoku thiokyanatanu draselného. Vzniklý již vybarvený roztok promícháme a necháme odstát cca deset minut. Po uplynutí deseti minut je možné změřit absorbanci a to při vlnové délce 500 nm. Stejným způsobem zpracujeme i slepé stanovení s destilovanou vodou. Na základě naměřených hodnot absorbance jednotlivých kalibračních roztoků vyneseme kalibrační křivku v závislosti absorbance na koncentraci.

Odebrané vzorky je nutné konzervovat pomocí kyseliny chlorovodíkové (cca k 50 ml vzorku 1 ml kyseliny chlorovodíkové 1:1). Takto zakonzervované vzorky vydrží až jeden týden. Pak vzorky zpracujeme obdobně jako kalibrační roztoky. K 10 ml vzorku přidáme 0,5 ml kyseliny chlorovodíkové (1:1) a 1 ml 20% roztoku thiokyanatanu draselného. Vzniklý roztok promícháme a necháme odstát deset minut. Po uplynutí deseti minut měříme absorbanci při vlnové délce 500 nm. Hmotnostní koncentrace železa ve vzorku se určí pomocí lineární rovnice kalibrační křivky, do které dosadíme naměřené hodnoty absorbance.

Metoda je vhodná pro stanovení, kde předpokládáme vyšší obsah železa, tj. > 0,5 mg/l.