

UNIVERZITA TOMÁŠE BATI VE ZLÍNĚ
Fakulta technologická
Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

VALIDACE ANALYTICKÉHO POSTUPU STANOVENÍ AOX VE VODNÝCH
MATICÍCH

Diplomová práce

A VALIDATION OF THE ANALYTICAL PROCEDURE OF THE DETERMINATION
OF AOX IN THE AQUEOUS MATRIXES

Diploma work

Autor práce:

Barbora Tušerová

Vedoucí práce:

ing. Richard Brázdil

Děkuji vedoucímu své diplomové práce ing. Richardu Brázdilovi za odborné vedení. Děkuji též ing. Marii Chudárkové a ing. Miroslavu Běhalovi, CSc, manažeru jakosti, za cenné rady a připomínky, které mi poskytli v průběhu celé diplomové práce. Dále děkuji slečně Petře Janalíkové za neocenitelnou pomoc při řešení problémů souvisejících s touto prací.

Děkuji i ostatním pracovníkům Vodních zdrojů Holešov za spolupráci a vytvoření dobrých podmínek pro vypracování diplomové práce..

Souhlasím s tím, že s výsledky mé diplomové práce může být naloženo podle uvážení vedoucího diplomové práce a ředitele ústavu. V případě publikace budu uvedena jako spoluautorka.

Prohlašuji, že jsem na celé diplomové práci pracovala samostatně a použitou literaturu jsem pouze citovala.

Ve Zlíně dne 20.5.2005

ABSTRAKT

V laboratorní praxi byla ověřena funkčnost komerčního kyvetového testu firmy Merck a skutečnost, zda tato metoda, kde místo klasického stanovení adsorbovatelných organicky vázaných halogenů metodou mikrocoulometrické titrace, jsou AOX stanoveny spektrofotometricky ve viditelné oblasti spektra, je vhodná k zavedení do běžné laboratoře. Metoda založená na spektrofotometrickém stanovení byla porovnávána s metodou mikrocoulometrické titrace. Z porovnání obou metod vyšla vítězně již zavedená a ověřená metoda mikrocoulometrické titrace, která je na rozdíl od spektrofotometrického stanovení velmi přesná. Jedinou její nevýhodou je vysoká pořizovací cena přístroje a nepřesnost při měření vysokých koncentrací. Naopak kyvetový test firmy Merck je ekonomicky výhodnější, nicméně se hodí pouze k orientačnímu zjišťování AOX ve vodách a je vhodný při stanovování vysokých koncentrací ve vodných matricích. Pro potřeby laboratoře byl vypracován standardní operační postup. Diplomovou prací byl zvalidován postup spektrofotometrického stanovení AOX testu firmy Merck.

Functionality of the commercial cell set of Merck company in laboratory practice and whether this method where adsorbable organically bound halogens are determined using spectro-photometric method in the visible spectrum zone is used instead of usually used micro-coulometric titration is suitable for introduction into a standard laboratory was verified. The method based on the spectro-photometric determination was compared with the method of micro-coulometric titration. The duel of both the methods has been won out through by the already introduced and proved method of micro-coulometric titration which is very accurate unlike the spectro-photometric determination. High purchase price of the instrument and inaccuracy when measuring in the field of high concentrations is the only disadvantage of this method. On the contrary, the cell test of Merck company is more advantageous when considering economical point of view. However, it is suitable only for approximate determination of AOX in water and when determining high concentrations in aqueous matrixes. A standard operation procedure has also been prepared. The dissertation has validated the procedure of spectro-photometric determination of AOX using the set of Merck company.

OBSAH

ÚVOD.....	7
I. TEORETICKÁ ČÁST.....	8
1.1 VODA A CHEMIE.....	8
1.1.1 Historický vývoj ve světě.....	8
1.1.2 Historický vývoj v českých zemích.....	8
1.1.3 Organické halogenderiváty.....	9
1.1.4 Shrnutí.....	10
1.2 Adsorbovatelné organicky vázané halogeny.....	11
1.2.1 Povaha adsorbovatelných organicky vázaných halogenů.....	11
1.2.2 Historický přehled stanovování AOX.....	12
1.2.3 Definice AOX.....	12
1.2.4 Stanovení AOX v různých typech vzorku.....	12
1.2.5 Vzorkování, stability vzorků.....	13
1.2.6 Legislativa.....	14
1.2.7 Sazby a limity.....	14
1.3 COULOMETRIE.....	16
1.3.1 Definice coulometrie.....	16
1.3.2 Historický přehled coulometrického stanovení.....	16
1.3.3 Rozdělení coulometrie.....	17
1.3.4 Faradayovy zákony.....	17
1.3.5 Laboratorní technika.....	18
1.3.6 Stanovení AOX mikrocoulometrickou titrací ve Vodních zdrojích Holešov a. s.....	18
1.3.6.1 Název metody.....	18
1.3.6.2 Oblast použití.....	18
1.3.6.3 Princip metody.....	19
1.3.6.4 Přístrojové vybavení.....	19
1.4 SPEKTROFOTOMETRICKÉ STANOVENÍ.....	20
1.4.1 Definice spektrofotometrie.....	20
1.4.2 Spektrofotometrie ve viditelné oblasti spektra.....	20
1.4.3 Zákon Lambertův – Beerův zákon.....	21
1.4.4 Zavedení spektrofotometrické metody pro stanovení AOX ve Vodních zdrojích Holešov a. s.....	22
1.4.4.1 Název postupu.....	22

1.4.4.2	Oblast použití.....	22
1.4.4.3	Princip metody.....	22
1.4.4.4	Přístrojové vybavení.....	22
1.4.5	Výhody či nevýhody spektrofotometrického stanovení AOX.....	23
1.5	VALIDACE.....	23
II. CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE.....		24
III EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....		25
3.1	Činidla a materiály.....	25
3.2	Přístroje a vybavení.....	26
3.3	Stanovení AOX spektrofotometricky pomocí kyvetového testu firmy Merck.....	26
3.3.1	Postup.....	26
3.3.2	Příprava kalibračních roztoků.....	27
3.3.3	Spektrofotometrické měření.....	29
3.3.4	Vyjadřování výsledků.....	29
IV DISKUSE VÝSLEDKŮ.....		31
4.1	Kalibrace standardního operačního postupu na 4-CP.....	31
4.2	Měření slepých stanovení.....	36
4.3	Kalibrace standardního operačního postupu na 2,4-DCP.....	37
4.4	Posouzení vlivu změněného pracovního postupu na výslednou koncentraci.....	40
4.5	Měření reálných vzorků.....	40
4.6	Regulační diagramy.....	45
4.6.1	Regulační diagram kontrolního vzorku.....	46
4.6.2	Regulační diagram slepého stanovení.....	48
4.7	Vliv několikanásobného opakování vložení kyvety do spektrofotometru Merck.....	50
4.8	Sledování adsorbance v závislosti na čase.....	51
4.9	Opakovatelnost pracovního postupu.....	54
4.10	Statistické výpočty.....	56
ZÁVĚR.....		57
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....		60
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....		63
TERMÍNY A DEFINICE.....		64
SEZNAM PŘÍLOH.....		67

ÚVOD

Pro existenci života je voda nepostradatelná a nelze ji ničím nahradit. Proto poutala pozornost filozofů a badatelů v oboru přírodních věd již od nejstarších dob.

Rozvoj hydrochemie a technologie vody probíhal souběžně s rozvojem čisté a aplikované chemie a byl koncem 18. a v 19. století podpořen jednak rozvojem průmyslu, jednak stoupajícími požadavky na kvalitu pitné vody v souvislosti s růstem počtu obyvatelstva ve městech. V té době se již začal sledovat vliv složení vody na výrobní procesy a kvalitu výrobků.

Významné znečištění v dnešní době tvoří halogenované (nejčastěji chlorované) organické látky. Proti ostatním látkám se vyznačují většinou vyšší toxicitou a obtížnou biologickou rozložitelností, proto je stále více věnována pozornost analytickým metodám umožňujícím stanovení těchto látek.

Nejrozšířenějším skupinovým stanovením organických halogenovaných látek ve vodách je stanovení adsorbovatelných organicky vázaných halogenů.

V České republice ve velké míře používanou metodou na stanovení AOX je sumární stanovení organických halogenovaných sloučenin mikrocoulometrickou titrací. Jedná se o sumární stanovení, kde se dohodnutými postupy zjišťuje množství organicky vázaného chloru, bromu a částečně i jodu. Fluorované sloučeniny se touto metodou nestanoví. Za normálních okolností v běžných vzorcích chlorované organické látky převládají.

Metoda mikrocoulometrické titrace je v této diplomové práci srovnávána se stanovením adsorbovatelných organicky vázaných halogenů ve vodě spektrofotometricky ve viditelné části spektra pomocí běžně dostupných komerčních kyvetových testů firmy Merck s adsorpcí na aktivním uhlí.

1. TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Voda a chemie

1.1.1 Historický vývoj ve světě

Zvětšující se znečišťování povrchových vod odpadními vodami splaškovými a průmyslovými si vynutilo vypracování speciálních metod pro analýzu vod.

Ve druhé polovině devatenáctého století byla již vydána řada knih o analýze vody. V této době jsou již k dispozici metody pro téměř úplnou analýzu vody a tento proces je dovršen počátkem století dvacátého.

Chemie vod povrchových a podzemních byla velmi pěstována v Rusku a nazvána hydrochemií. Za jejího zakladatele lze považovat Lomonosova.

Na rozhraní 19. a 20. století se ve střední Evropě používaly hlavně publikace německých autorů. Metody pro analýzu vody zavedené v různých zemích byly rozdílné, takže výsledky rozborů se nemohly dobře srovnávat. Problémy vyvstaly při posuzování znečišťování hraničních toků na mezinárodních jednáních a vedly ke snaze vypracovat metody jednotné [1].

Prvním pokusem o sjednocení metod pro rozbor vody bylo vydání amerických standardních metod v roce 1905. Pro tento účel byla již v roce 1880 ustavena zvláštní komise. Čtrnácté vydání těchto metod vyšlo v roce 1975 pod názvem „Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater“ [1].

V období před 1. světovou válkou se začíná poprvé mluvit o znečištění vod organickými chlorovanými látkami, protože třicátá léta 20. století jsou počátkem moderní éry syntetických organických pesticidů. Roku 1939 objevil dr. Paul Müller silné isekcidní vlastnosti 4,4-dichlordifenyiltrichlorethanu neboli DDT. Používání různých chemických pesticidů a zvláště DDT se zejména v letech po druhé světové válce velmi rychle rozšířilo [3].

1.1.2 Historický vývoj v českých zemích

První objektivní zprávy o složení některých podzemních a povrchových vod pocházejí asi z roku 1837. Ve druhé polovině 19. století byla již k dispozici řada systematických studií v souvislosti se stavbou nové vodárny v Praze.

V 19. století má vodohospodářská problematika již svůj zákonný podklad. V Rakousku – Uhersku byl roku 1869 vydán zákon o hospodaření s vodami a v roce 1870 příslušný český vodní zákon. Obdobný zákon na Slovensku byl vydán v roce 1885. Ovšem až teprve v roce 1955 byl schválen moderní „Zákon o vodním hospodářství“, který byl základní právní úpravou pro řízení vodního hospodářství v celém státě [1].

V dnešní době je v platnosti zákon č. 254/2001 Sb., o vodách a změně některých zákonů (vodní zákon) [12], novelizován zákonem 20/2004 Sb., dále vyhláška č. 428/2001 Sb., o vodovodech a kanalizacích pro veřejnou potřebu a o změně některých zákonů (zákon o vodovodech a kanalizacích) [13] a dále pak vyhlášky č.61/2003 (přípustné znečištění povrchových a odpadních vod) [14] a č.71/2003 (kvalita povrchových vod pro život) [15].

Vyhláška Ministerstva životního prostředí č.376/2000 Sb., požadavky na pitnou vodu [16] byla novelizována 22.4.2004 vyhláškou č.252/2004 [23], která byla dále novelizována vyhláškou 187/2005 Sb. ze 4.5.2005 [24].

1.1.3 Organické halogenderiváty

I když se obecně hovoří o organických halogenderivátech, jde převážně o chlorderiváty. V přírodě se prakticky netvoří žádné halogenované organické látky, i když někdy za určitých podmínek může v půdě probíhat halogenace huminových látek. Pocházejí především z komunální, průmyslové a zemědělské sféry (čistírny, strojírenský průmysl, chemický průmysl, konzervační prostředky, pesticidy).

Nasycené chloralkany, chloralkeny, chlorcykloalkany a chlorcykloalkeny se v technické praxi, průmyslu a domácnostech používají jako odmašťovací a čistící prostředky, extrakční činidla a rozpouštědla (např. mono- až tetrachlormethan, mono- až hexachlorethan, trichlorethan a tetrachlorethan). Hexachlorcyklohexan patří mezi pesticidy, rovněž tak chlorpolycykloalkeny. Zvláštní skupinu alifatických halogenderivátů tvoří tzv. trihalogenmethany (THM), vznikající při hygienickém zabezpečování vody chlorací. THM byly poprvé zjištěny v sedmdesátých letech. Jde především o trichlormethan (chloroform), dibromdichlormethan, dibromchlormethan a tribrommethan (bromoform). K tvorbě bromderivátů stačí stopové koncentrace bromidů ve vodách, protože brom uvolněný při chloraci vody reaguje podstatně snáze s organickými prekurzory než chlor. Vznik THM a jejich poměrné zastoupení závisí na teplotě, hodnotě pH, koncentraci huminových látek,

počáteční a konečné koncentraci chloru a reakční době. Reakce probíhá poměrně pomalu, takže zjištěné koncentrace se mohou lišit v závislosti na době odběru po chloraci vody.

Z vodohospodářského hlediska se někdy odlišují velmi těžké halogenované uhlovodíky, kam se zařazují chlorované, fluorované a bromované (popř. i jodované) obvykle nearomatické uhlovodíky obsahující jeden až šest uhlíkových atomů (v analytice vody jde nejčastěji o halogenderiváty methanu, ethanu a propanu).

Široké spektrum použití mají chlorované aromatické uhlovodíky. Mono-, di- a trichlorbenzeny jsou rozsáhle využívány v průmyslu (např. výchozí surovina pro výrobu pesticidů).

Další vodohospodářsky významnou skupinou jsou chlorfenoly. V průmyslových odpadních vodách z organických výrob se často vyskytují mono-, di- a trichlorfenoly. Pentachlorfenol (PCP) má výrazně baktericidní vlastnosti. Vzhledem k jeho vysoké toxicitě byl již např. v Německu vydán zákaz výroby a používání PCP. Chlorfenoly vznikají druhotně při chloraci vod obsahujících různé fenoly.

Od šedesátých let se věnuje zvláštní pozornost polychlorovaným bifenylym (PCB). V 70. a 80. letech patřily PCB k nejvíce sledovaným prioritním škodlivinám v prostředí. Koncem 80. let byla jejich výroba ve světě ukončena. PCB jsou nyní nahrazovány jinými netoxickými a méně toxickými látkami.

Zvláštní samostatnou skupinu nebezpečných organických chlorderivátů tvoří polychlorované dibenzodioxiny (PCDD) a dibenzofurany (PCDF) s různým počtem chloru v molekule.

Vzhledem k širokému používání jsou různé organické chlorderiváty v malých koncentracích přítomny ve většině užitkových a přírodních vodách [1].

1.1.4 Shrnutí

Znečišťování prostředí halogenovanými (převážně chlorovanými) organickými látkami zůstává v popředí zájmů vodohospodářů. Jde o látky většinou značně toxické, z nichž některé mají potenciálně karcinogenní a mutagenní účinky (asi polovinu tzv. prioritních polutantů tvoří různé organické halogenderiváty). Jde především o alifatické a aromatické polychlorované deriváty (PCB, trihalogenmethany, polychlorované dibenzodioxiny a dibenzofurany, chlorované pesticidy aj.). Vzhledem ke své kumulační schopnosti a chemické a biologické stabilitě se mohou hromadit v prostředí. Proto je jim při hodnocení jakosti vod vždy věnována zvláštní pozornost [1].

1.2 Adsorbovatelné organicky vázané halogeny

1.2.1 Povaha adsorbovatelných organicky vázaných halogenů

Významné znečištění životního prostředí tvoří halogenované (nejčastěji chlorované) organické látky. V menší míře (1%) vznikají vzácně přirozenými procesy. Podstatnou část tvoří antropogenní znečištění. Proti ostatním látkám se vyznačují většinou vyšší toxicitou a obtížnou biologickou rozložitelností. Jelikož se vesměs jedná o látky lipofilní povahy, mohou se proto snadno akumulovat v sedimentech a v tukových tkáních organismů. Velmi často se chlorované organické látky používají v průmyslu (teplonosná a chladicí media, rozpouštědla a odmašťovací přípravky, desinfekční prostředky). Technologickou nekázní nebo ještě před pár lety nevědomostí při používání různých postřiků (např. DDT) se dostávaly do prostředí, do vod, sedimentů a odpadů, komplikují likvidaci odpadů a kontaminují potravní řetězce. Spolu s těžkými kovy představují v dnešní době halogenované organické sloučeniny nejvíce sledovanou skupinu polutantů [6].

Pozornost je stále více věnována analytickým metodám umožňujícím stanovení těchto látek. V České republice ve velké míře používanou metodou je sumární stanovení organických halogenovaných sloučenin mikrocoulometrickou titrací. Jedná se o sumární stanovení, kde se dohodnutými postupy zjišťuje množství organicky vázaného chloru, bromu a částečně i jodu. Fluorované sloučeniny se touto metodou nestanoví. Za normálních okolností v běžných vzorcích chlorované organické látky převládají. Je třeba zdůraznit, že se jedná o uzanční metodu, kde je správný výsledek stanovení závislý na dodržování předepsaných postupů. Halogenované organické sloučeniny přítomné v analyzovaném vzorku se mohou vyskytovat kromě již zmíněných adsorbovatelných organicky vázaných halogenů, zkráceně zvaných AOX, také v jiných navzájem se překrývajících analyticky stanovitelných formách jako jsou extrahovatelné organické halogeny (EOX) a těžké organické halogeny (POX). Nicméně hlavní podíl na celkovém zatížení recipientů tvoří zpravidla netěžké organické halogenové sloučeniny. Do nich spadají mj. i sloučeniny vzniklé nachlorováním ligninu a huminových kyselin. Pro každou formu je v současné době k dispozici příslušná metoda sumárního stanovení organických halogenovaných sloučenin [6].

1.2.2 Historický přehled stanovování AOX

U zrodu coulometrického stanovení AOX stál W. Kuhn z univerzity v Karlsruhe. Tento německý vědec při své dizertační práci počátkem 70. let 20. století vyvinul novou analytickou metodu. Současně také zkonstruoval první analyzátor AOX a s jeho pomocí provedl analýzy různých vzorků. Nová analytická metoda se osvědčila a výsledky rozborů byly mimořádně zajímavé. Není proto divu, že se velmi rychle rozšířila a používá se dnes pro rozborů všech druhů vod [6].

1.2.3 Definice AOX

Ukazatel AOX charakterizuje celkové množství halogenů obsažených v organických sloučeninách, které jsou stanovené jako chloridy. Písmeno X ve zkratce symbolizuje obecně halogen, mimo fluor, který není touto metodou zachycen. Při numerickém vyjádření výsledků rozborů se postupuje tak, jako kdyby změřený halogen představoval v každém případě chlor s atomovou hmotností 35,45 (g/mol). Výsledek se také uvádí jako koncentrace takto zjištěného chloru.

V amerických publikacích se pro tento sumární ukazatel znečištění občas používá zkratky „TOX“ – „total halogen organic compounds“ (celkové halogenové organické sloučeniny) [5], [6].

1.2.4 Stanovení AOX v různých typech vzorků

Ve vodách zjišťujeme nejnižší koncentrace AOX v případě čistých pramenů, které nejsou hygienicky zabezpečovány chlorací. V těchto případech se pohybují zjištěné hodnoty pod mezí detekce používaných metod.

V případě ostatních druhů vod jsou samozřejmě hodnoty AOX podstatně vyšší. Pro povrchové vody je k dispozici dostatek aktuálních údajů týkajících se Labe a jeho přítoků. Tyto údaje zjištěné při měřeních prováděných v rámci „Projektu Labe“ počátkem 90. let jsou k dispozici ve Výzkumném ústavu vodohospodářském TGM v Praze. V čistých tocích se pohybovaly koncentrace AOX okolo 0,03 mg/l, zatímco v nejvíce znečištěných tocích hodnoty občas přesahovaly i 1 mg/l. Koncentrace AOX Labe v místech, kde opouštělo Českou republiku, se pohybovalo okolo 0,1 mg/l, zatímco cílový limit pro povrchové vody se předpokládal 0,05 mg/l [5], [6].

V městských odpadních vodách závisí zjišťované koncentrace na podílu a druhu průmyslových odpadních vod připojených na kanalizační síť. Vzhledem k tomu, že se jedná o látky biologicky obtížně rozložitelné, nepřekvapuje, že je malý rozdíl mezi koncentracemi změřenými na přítoku a v odtoku z biologické čistírny odpadních vod. Poměrně často je koncentrace AOX v odtoku dokonce o něco vyšší. V roce 1998 byla měřena koncentrace AOX na 27 vzorcích městských odpadních vod, průměrná hodnota na přítoku činila 192 mg/l a na výtoku 70 mg/l [20]. .

Koncentrace AOX v průmyslových odpadních vodách závisí na tom, zda a jak se v technologickém procesu používá chlor a jeho sloučeniny. V některých proudech technologických vod v průmyslu se vyskytují AOX v množství více než 150 mg/l. Velmi často se zjišťují vysoké hodnoty v odpadních vodách z povrchové úpravy výrobků, pokud se používá k odmašťování chlorovaných organických rozpouštědel. Při technologické nekázní se pak znečištěné odmašťovací prostředky dostávají do vyčerpaných emulzí a při jejich likvidaci přecházejí z větší části do olejů uvolňovaných rozkladem emulzí. Nicméně zbytkové koncentrace AOX ve vyčištěné vodě jsou stále vysoké, většinou se pohybují okolo 5 mg/l [6].

V odpadních vodách z nemocnic, kde jsou používána rentgenová kontrastní média na bázi jodovaných organických látek, se organický jód vyskytuje ve větších koncentracích. Stanovení AOX je pak zatíženo chybou, která vede k nadhodnocení daného znečištění. Proto je v některých případech důležité rozlišit mezi sloučeninami chlorovanými, bromovanými a jodovanými [21].

V kalech je koncentrace AOX ještě vyšší než v odpadních vodách. Protože obsah AOX je využíván jako indikátor organického znečištění půd a odpadů, byla vyhláškou stanovena maximální přípustná hranice obsahu těchto látek v kalech na 500 mg/kg v sušině [22].

1.2.5 Vzorkování, stabilita vzorků

Vzorkování je považováno za nedílnou součást analytického postupu a proto je třeba zmínit i podmínky pro odběr, transport a skladování vzorků. Pro odběr vzorků, jejich dopravu a skladování je třeba používat výhradně skleněné nádoby, protože vzorkovnice z jiného materiálu nejsou vhodné a mohla by hrozit ztráta vzorku, což by velmi zkreslilo výsledek měření [26]. Vzorkovnice se při odběru vypláchne vzorkem a pak se naplní až po hrdlo, aby v láhvi nebyl přítomen vzduch. V opačném případě by potenciálně přítomné těkavé halogenované látky mohly přejít z vody do plynné fáze nad vzorkem a vyprchat

ven, tím by se stanovení stalo taktéž nesprávné. Vzorky obsahující volný chlor se okamžitě po odběru stabilizují přidavkem roztoku siřičitanů. Tím se zabrání možnosti dodatečné chlorace organických sloučenin v odebraném vzorku.

Vzorky je nejvýhodnější analyzovat co nejdříve po odběru. Při transportu je třeba zabránit velkým změnám teploty, zejména ohřátí vzorku, což by mohlo způsobit únik těkavých halogenovaných látek nebo biologický rozklad a změnu složení organických látek včetně chlorovaných. V laboratoři se vzorky skladují při teplotě okolo 4 °C, a to maximálně do druhého dne. Osvědčilo se rovněž okamžité zpracování vzorků ihned po dodání. Před zpracováním se přidá ke vzorku NaNO_3 nebo HNO_3 pro úpravu pH, aby byl potlačen růst mikroorganismů, ale současně působí i jako konzervační činidlo. Samozřejmě je možný i přídavek potřebné dávky adsorbentu. Pokud se předpokládá delší skladování vzorku, je třeba vzorek konzervovat a to tak, že se pH vzorku při odběru upraví přidavkem kyseliny dusičné na hodnotu 1,5 – 2, a to maximálně na tři dny. Před analýzou se teplota vzorku upraví na laboratorní teplotu [17], [6].

1.2.6 Legislativa - mezinárodní normy v oblasti základního chemického rozboru vod [11]

V souvislosti se zavádění norem řady ISO a evropských norem (EN) byly od roku 1992 postupně přebírány tyto mezinárodní normy i pro stanovení v rámci základního chemického rozboru vody [11], [12], [13], [14], [15], [16],

1.2.7 Sazby a limity

Z norem jsou vybrány ty ukazatele, které se v měřené vodě mohou vyskytovat.

Tabulka č. I : Sazby pro výpočet poplatku a limity pro vypouštění odpadních vod [12]

ukazatel	platí od	hmotnostní limit zpoplatnění (kg/rok)	koncentrační limit zpoplatnění (mg/l)	sazba (Kč/kg)
AOX	1.1.2002	15	0,2	300

Tabulka č. II : Požadavky na jakost surové vody a imisní standardy (přípustné hodnoty znečištění povrchových vod, které jsou používány jako zdroj pitné vody) [12], [14]

ukazatel	pro pitnou vodu (mg/l)	pro povrchovou vodu (mg/l)	pro odpadní vodu (mg/l)
	povinná hodnota	povinná hodnota	povinná hodnota
AOX	0,005	0,005	0,01
pesticidy	0,0005	0,0005	0,0005

Tabulka č. III : Podmínky měření ukazatelů jakosti surové vody [13]

ukazatel	mez stanovitelnosti (µg/l)	přesnost (+/-) (%)	správnost (+/-) (%)
AOX	2	20	20
pesticidy	0,1	50	50

Tabulka č. IV : Imisní standardy ukazatelů přípustného znečištění povrchových vod [14]

ukazatel	limit (µg/l)
AOX	30
DDT	0,025
1,2 – dichlorethan	1
1,2 – dichlorethen	10
2,4 – dichlorfenol	10
dichlormethan	0,01
PCP	0,01

Tabulka č. V : Mezní limity pro pitnou a balenou vodu [16]

ukazatel	limit (µg/l)
tetrachlormethan	2
dichlormethan	20
1,2 – dichlorethan	3 – 10
chlorethen	0,5
1,2 – dichlorethen	50
trichlorethen	10
tetrachlorethen	10
chlorbenzen	10 - 300
pesticidní látky (PL)	0,1
pesticidní látky celkem (PCL)	0,5
chlor volný	0,3
trihalomethany (THM)	0,1 – 0,15

Tabulka č. VI : Prahová množství vypouštěných vybraných nebezpečných a zvláště nebezpečných látek [14], [15]

ukazatel	roční množství (kg)	denní množství (g)
AOX	10	3
DDT	0,15	0,5
PCB	0,15	0,5

V tabulkách jsou chlorované organické látky, které se vyskytují ve výše zmíněných vyhláškách.

1.3 Coulometrie

1.3.1 Definice coulometrie

Coulometrie je elektroanalytická metoda shrnující fyzikálně chemické metody, které využívají Faradayových zákonů o elektrolyze. Název byl odvozen od základní jednotky coulombu, používané k vyjádření elektrického náboje.

V analytické chemii se coulometrie používá k určování množství látky nebo její koncentrace ze změřeného prošlého náboje, který je potřebný ke stechiometrické reakci v elektrochemickém článku. Je to absolutní metoda, protože je možné se navázat na základní jednotky SI. Je třeba ještě zmínit, že coulometrická metoda patří mezi metody amperometrické [2], [4].

Coulomb C je elektrický náboj, kdy vodičem proteče ampér za sekundu.

1.3.2 Historický přehled coulometrického stanovení

Za autory coulometrie se považují Szebelledy a Somogyi, kteří ji uvedli do praxe roku 1938 a nazvali ji coulometrická analýza. K jejímu velkému rozšíření došlo o deset let později [2], [4].

1.3.3 Rozdělení coulometrie

Podle pracovního způsobu rozdělujeme coulometrii na coulometrickou analýzu za konstantního potenciálu (potenciometrická coulometrie) a na coulometrii za konstantního proudu (coulometrická titrace).

V případě potenciometrické coulometrie se stanovovaná látka redukuje nebo oxiduje na pracovní elektrodě, jejíž potenciál je udržován na stálé hodnotě, takže intenzita proudu klesá s časem v souladu s ubýváním obsahu látky v roztoku. Reakce je ukončena, když proud klesne téměř na nulu.

Při stanovení látky coulometrickou titrací se elektrolyza provádí za konstantního proudu. V zásadě jsou možné dva pracovní postupy. V prvním případě látka reaguje elektrochemicky přímo na jedné z elektrod a mluví se o primární coulometrické titraci. V druhém případě reaguje stanovovaná látka s činidlem vzniklým na jedné z elektrod. Tato sekundární metoda je výhodnější, neboť umožňuje stanovení látek, jež nelze elektrolyzovat přímo, a je vhodnější k dosažení podmínek pro 100%ní proudový výtěžek [2], [4].

Při metodě stanovení AOX jsou organické halogenované látky izolovány adsorpcí na aktivní uhlí. Lze použít buď třepací (vsádkovou) metodu nebo v menší míře používanou sloupcovou metodu.

1.3.4 Faradayovy zákony

Z Faradayových zákonů vyplývá, že k oxidaci nebo redukci molu chemického ekvivalentu látky při elektrolyze je zapotřebí takového množství nábojů, které se rovná jednomu Faradu. Hmotnostní množství odpovídající jednomu ekvivalentu elektrolyzované látky se rovná její atomové nebo molekulové hmotnosti, dělené počtem elektronů zúčastněných při elektrodové reakci.

Vztah mezi hmotnostním množstvím látky m , vyloučené nebo jinak chemicky přeměněné během elektrolyzy je přímo úměrné molu chemického ekvivalentu dané látky Q a je dán rovnicí :

$$m = \frac{Q \cdot M}{F \cdot n}$$

kde je $\underline{M}$ - atomová nebo molekulová hmotnost látky, $\underline{n}$ - počet elektronů a $\underline{F}$ - Faradayova konstanta, tj. 96493 coulombů (1 F = 96493 C) [2].

Množství el. nábojů $\underline{Q}$ (v coulombech) je funkcí proudové intenzity a času [2], [4] :

$$Q = \int_0^t i_t * dt$$

1.3.5 Laboratorní technika

Vzhledem k významu hodnocení obsahu chlorovaných organických látek z hlediska kvality vody se stala analýza AOX v zemích EU jedním ze základních kritérií. Je to pochopitelné, neboť se jedná o metodu v zásadě jednoduchou, poměrně rychlou a přitom dostatečně přesnou. Analýza AOX umožňuje rozhodnout, pro které vzorky je třeba podrobnější analýza náročnějšími alternativními metodami, a tím pádem samozřejmě vydání větších finančních prostředků. Na poptávku po přístrojích pro analýzu AOX reagovali rychle i výrobci laboratorní techniky. V krátké době se na trhu objevilo několik typů analyzátorů AOX pro běžné užívání v laboratorní praxi.

Existuje celá řada výrobců, mezi něž patří i firma EUROGLAS DELFT z Nizozemí, jejíž přístroj využívají i Vodní zdroje Holešov a. s.

Konstrukce analyzátorů AOX různých výrobců se sice poněkud liší, nicméně základní principy jsou prakticky shodné [6].

1.3.6 Stanovení AOX mikrocoulometrickou titrací ve Vodních zdrojích Holešov a. s.

1.3.6.1 Název metody

Stanovení adsorbovatelných organicky vázaných halogenů ve vodě pomocí srážecí coulometrické titrace s potenciometrickým způsobem indikace [7].

1.3.6.2 Oblast použití

Postup je vhodný pro stanovení organicky vázaných halogenů absorbujících se na aktivním uhlí. Používá se pro účely kontroly jakosti vody – pitné, povrchové, odpadní a vodného výluhu. V těchto matricích je možno stanovit hmotnostní koncentrace organicky vázaného chloru, bromu a jodu (vyjádřeno jako chlorid) adsorbovatelných na aktivní uhlí.

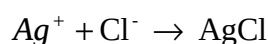
Většina chlorovaných a bromovaných organických látek se stanoví postupem AOX kvantitativně, výjimku tvoří např. hydrofilní látky, jako je kyselina monochloroctová nebo některé fluorované sloučeniny, jako je trichlorotrifluorethan [7].

1.3.6.3 Princip metody

Principem metody je stanovení uvolněných halogenovodíků za použití srážecí coulometrické titrace s potenciometrickým způsobem indikace.

Spalováním vzorku v proudu kyslíku při teplotě 950°C se halogeny převedou na příslušné halogenovodíky. Spaliny jsou vedeny přes absorbér, kde je pohlcena voda vzniklá spalováním, aby nedocházelo ke zředování elektrolytu v titrační nádobce. V titrační nádobce je nastavena koncentrace stříbrných iontů na koncentraci $1 \cdot 10^{-4}$ mol/l. Jakmile jsou přiváděny halogenovodíky do titrační nádoby, nastavený potenciál daný koncentrací stříbrných iontů v roztoku se změní, protože dochází k tvorbě halogenidů stříbrných. Stříbrnou generační elektrodou mikrocoulometru jsou potom generovány ionty Ag^+ až do dosažení původního potenciálu indikační elektrody. Proud spotřebovaný na vygenerování stříbrných iontů je úměrný množství halogenovodíků, přivedených do titrační nádoby. Fluoridy nejsou tímto postupem stanovovány. Výsledek se udává jako obsah chloru [19].

Organicky vázané halogeny se adsorbují na aktivní uhlí. Anorganicky vázané halogeny se odstraní promytím kyselým roztokem dusičnanu sodného. Frita s filtračním koláčem se umístí do lodičky z křemenného skla. Po spuštění přístroje lodička s fritou zajede do spalovací křemenné trubice, kde se filtrační koláč spálí. Spaliny jsou vedeny do titrační cely, kde proběhne coulometrická titrace [7].



1.3.6.4 Přístrojové vybavení

Laboratoř používá přístroj ECS 1600 Euroglas.

1.4 Spektrofotometrické stanovení

1.4.1 Definice spektrofotometrie

Spektrální metody patří mezi optické metody a jsou založeny na principu sledování interakce elektromagnetického záření s atomy a molekulami analyzované látky. Energetické stavy atomů a molekul jsou kvantovány, což znamená, že energie mohou nabývat jen určitých hodnot. V podstatě látka má schopnost absorbovat takovou energii, která je rovna kvantovému přechodu mezi dvěma energetickými hladinami.

Spektrální metody rozlišujeme povětšinou podle toho, v které oblasti spektra mají své pole působnosti [2], [4].

1.4.2 Spektrofotometrie ve viditelné oblasti spektra

Tato metoda je nejhojněji používanou spektrální metodou.

Spektrofotometrie UV/VIS navazuje vývojově na klasickou kolorimetrii a je tudíž nejstarší fyzikálně chemickou metodou, a to nejen ve skupině optických metod. Po více než staletém vývoji si spektrofotometrie, ale i kolorimetrie, drží stále své pevné postavení v systému analytických instrumentálních metod především díky své jednoduchosti jak v přípravě vzorků, tak i v konečném měření absorpce. Také automatizace měření nejen spekter, ale i sérií vzorků při praktické analýze byla v souladu se současnými požadavky uspokojivě vyřešena. Metodu lze realizovat i v tzv. polních podmínkách terénu, provozů apod.

UV/VIS tvoří malý úsek v oblasti elektromagnetického vlnění v rozmezí 10 až 1000 nm. Z toho viditelná část spektra leží mezi 400 a 760 nm.

Ultrafialové, viditelné, jakož i všechna další záření jsou v podstatě zářivé toky, jejichž energie se zvyšuje se zkracující se délkou příslušného záření. UV a VIS záření je tedy např. energeticky účinnější než záření infračervené, a proto se jeho absorpcí excituje elektronový systém, resp. valenční elektrony atomu nebo molekuly. Obor ultrafialového a viditelného záření bývá též nazýván oblastí elektronových spekter.

Absorpce UV/VIS je výsledkem interakce záření – molekula (atom). Sleduje se na absorpčním spektru, tj. na záznamu závislosti množství absorbovaného záření na jeho vlnové délce, popř. vlnočtu. UV nebo VIS o různé vlnové délce poskytuje dostatečnou energii k tomu, aby se vazebné elektrony excitovaly a vybudily tak z molekulového

orbitalu s nižší energií do orbitalu s energií vyšší a poskytly spektrum o jednom nebo více absorpčních pásech [2], [4].

.

1.4.3 Zákon Lambertův – Beerův

Spojený zákon Lambertův – Beerův vyjadřuje vztah mezi absorbovaným zářivým tokem, tloušťkou absorbujícího prostředí a koncentrací absorbující látky. Vzájemný vztah mezi tloušťkou absorbující vrstvy l , koncentrací absorbující složky c a vlastní velikostí absorpce, vyjádřenou jako absorbance (dříve nazývaná extinkce) A , definuje spojený Lambertův – Beerův zákon :

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l$$

kde ε je molární absorbanční koeficient, který v rozsahu platnosti zákona je pro danou látku konstantou nezávislou na koncentraci c za podmínky, že se nemění vlnová délka λ světelného toku a teplota.

Absorpce zářivé energie se hodnotí ještě dalšími veličinami. Je to především transmittance T , udávaná většinou v procentech, která je daná poměrem zářivého toku vycházejícího z absorbujícího prostředí k zářivému toku původnímu :

$$T = Q / Q_0$$

Vztah mezi absorpcí A a transmittancí T je následující :

$$A = - \log T$$

Platnost Lambertova – Beerova zákona je nutným předpokladem pro spektrofotometrická měření. Platnost zákona se nejběžněji ověřuje vynesáním funkční závislosti absorbance na koncentraci při konstantní tloušťce absorbující vrstvy. V koncentračním rozmezí platnosti zákona má tento vztah přímkový průběh a nazývá se kalibrační křivka. Není-li v extraktu přítomna žádná další látka absorbující záření určité vlnové délky, prochází kalibrační křivka počátkem. Dochází-li však k absorpci slepého stanovení, kalibrační křivka protíná osu absorbance a je definována vztahem :

$$A = A_0 + \varepsilon \cdot c \cdot l$$

kde A_0 je absorbance slepého stanovení. Kalibrační křivka se transponuje do počátku podle vztahu :

$$A - A_0 = f(c)$$

nebo měřením proti slepému stanovení (blanku). [2], [4].

1.4.4 Zavedení spektrofotometrické metody pro stanovení AOX ve Vodních zdrojích Holešov a. s.

1.4.4.1 Název postupu

Stanovení adsorbovatelných organicky vázaných halogenů ve vodě spektrofotometricky pomocí běžně dostupných komerčních kyvetových testů firmy Merck s adsorpcí na aktivním uhlí [8].

1.4.4.2 Oblast použití

Tento test se používá pro určování AOX u upravených odpadních vod průmyslových i komunálních, u upravených vod z elektrolytického pokovování, stejně tak u vod upravovaných vzniklých při bělení chlórem.

Výrobce testu doporučuje měřit při vlnové délce 468 nm. V případě přístroje SPECTROFOTOMETR SQ 118 dodávaném firmou MERCK je vlnová délka stanovena na 446 nm. Je zřejmé, že tato metoda pracuje ve viditelné oblasti spektra a je navržena pro koncentračním rozpětí 0,05 – 2,50 mg/l. Teplotní rozsah činí rozpětí od +15 do +25 °C [8].

1.4.4.3 Princip metody

Princip fotometrického měření je založen na zeslabení světelného toku po průchodu monochromatického paprsku zbarveným roztokem. Z velikosti absorpce pak lze určit koncentraci. Průběh měření je velmi jednoduchý a výsledek získáme ihned.

1.4.4.4 Přístrojové vybavení

V laboratoři je k dispozici kyvetový spektrofotometr MERCK SQ 118 a průtokový spektrofotometr UNICAM 5625.

1.4.5 Výhody či nevýhody spektrofotometrického stanovení AOX

Spektrofotometr je levnější přístroj, zabere méně místa a umožňuje jednodušší stanovení. Nicméně nevýhodou této metody je, že zatím není prozkoumaná.

1.5 Validace

Validací se rozumí potvrzení, že použitý analytický postup dosahuje očekávaného výsledku při analytickém stanovení.

Validace metod je v praxi chemických analýz důležitým požadavkem. Názory na validaci metody se různí, od striktního požadavku na úplnou validaci každé metody (analytického postupu) při sebemenší změně, až po volný přístup, kde je možné normalizované metody považovat za validované.

Současná analytická praxe vychází z toho, že je nutné přiměřeně potvrdit (verifikovat) každou metodu nezávisle na zdroji, tj. i normovanou tzv. validovanou metodu vzhledem k častým chybám, které se v normách vyskytují [10].

Laboratoř je povinna si ověřit pracovní postup a zdokumentovat, že v podmínkách její laboratoře metoda funguje, nebo je vhodná k zamýšlenému použití.

2. CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

Na základě zadání diplomové práce byly stanoveny následující cíle :

- a) Experimentálně ověřit využitelnost komerčního setu na stanovení AOX firmy Merck založeného na fotometrickém principu pro potřeby laboratoře (dále jen fotometrický postup).
- b) Validovat analytický postup v co nejširším rozsahu validačních charakteristik, včetně srovnání s jinými postupy na stanovení AOX, založenými na jiném principu. K validaci postupu využít účast v mezi laboratorním porovnání zkoušek.
- c) Validací charakteristiky vyhodnotit jednak použitím běžného tabulkého procesoru (Excel) s cílem objasnit výpočetní vztahy jednak za použití programu Effivaldation určeného k rutinnímu používání v laboratoři.
- d) V průběhu diplomové práce vést regulační diagram na stanovení AOX alespoň na dvou různých koncentracích a regulační diagram na slepé stanovení.
- e) Vypracovat standardní operační postup (SOP) podle vzoru používaného v laboratoři VZH na stanovení AOX ve vodných matricích (pitná, povrchová, odpadní voda, výluh).
- f) Stanovit nejistotu analytického postupu. Odhad nejistoty provést jednak úplným rozkladem celého měřicího postupu s vyjádřením nejistoty každého kroku, jednak pomocí údajů regulačního diagramu. Porovnat dosažené výsledky.
- g) Proměřit duplicitně sadu reálných vzorků s požadavky na stanovení AOX v období únor – květen a porovnat výsledky s používanou metodou v laboratoři VZH založenou na coulometrické titraci.

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Činidla a materiály

Metoda AOX – kyvetový test firmy Merck (katalogové číslo 1.00675.0001, 1.00677.0001, 1.00680.0001)

Katalogová čísla jsou z katalogu firmy Merck.

Dle pracovního manuálu firmy Merck se používají tyto látky:

- Speciální voda (balená pitná voda pod obchodním označením Dobrá voda)
- Na_2SO_3 – siřičitan sodný, čistota 98%, dodavatel firma LACHEMA)
- Parachlorfenol – 4-chlorfenol (dále jen 4-CP) – referenční materiál, podle normy DIN 38409-H 14, AOX = 194 – 206 mg/l, dodavatel firma MERCK
- NaOH – hydroxid sodný, čistota 98%, dodavatel firma LACHNER
- HNO_3 – kyselina dusičná, čistota 65%, dodavatel firma LACHEMA
- H_2SO_4 – kyselina sírová, čistota 96%, dodavatel firma LACHEMA
- Slepý vzorek (Merck) – vodný roztok anorganických sloučenin v kyselině sírové
- Činidlo AOX-1 – C – aktivní uhlí
- Činidlo AOX-2 – $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$ + $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ – dimethylether + ethanol
- Činidlo AOX-3 – vodný roztok anorganických sloučenin
- Činidlo AOX-4 – HNO_3 – kyselina dusičná
- Činidlo AOX-5 – H_2O – voda
- Činidlo AOX-6 – $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ – peroxodisíran draselný
- Činidlo AOX-1K – HNO_3 + $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ – kyselina dusičná + dusičnan železitý
- Reagenční kyveta – $\text{Hg}(\text{SCN})_3$ + CH_3OH – thiokyanát rtuťnatý + methanol
- AOX standard – 2,4-dichlorfenol (vodný roztok)

Stanovením vybraných chlorfenolů v kapalných a pevných matricích metodou plynové chromatografie za použití detektoru elektronového záchytu (ECD) bylo zjištěno, že AOX standard neznámého obsahu dodaný firmou Merck je složen z 2,4-dichlorfenolu (dále jen 2,4-DCP).

Vlastnosti chemikálií dodaných firmou Merck, zjištěné na základě vlastního měření a opsané z bezpečnostních listů dodaných firmou Merck.

- Slepý vzorek (Merck) – kapalný, žluto-oranžový, bez zápachu, pH = 1,5
- AOX-1 – pevný, černý, bez zápachu, nerozpustný ve vodě
- AOX-2 – kapalný, bezbarvý, zapáchá po alkoholu, rozpustný ve vodě, pH = 7
- AOX-3 – kapalný, bezbarvý, bez zápachu, pH = 3
- AOX-4 – kapalný, bezbarvý, bez zápachu, pH = 0
- AOX-5 – kapalný, bezbarvý, bez zápachu, pH = neutrální, rozpustný v ethanolu
- AOX-6 – jemně krystalický prášek, bílý, bez zápachu, nerozpustný ve vodě
- AOX-1K – kapalný, žlutý, slabě pronikavý zápach, pH = 1
- Reagenční kyveta – kapalný, bezbarvý, charakteristicky zapáchá
- AOX standard – kapalný, bezbarvý, zapáchá po fenolu, pH = 5

Pomocí pH papírků bylo zjišťováno pH jednotlivých látek. Další vlastnosti byly zjištěny subjektivně a zkonfrontovány s bezpečnostními listy.

3.2 Přístroje a vybavení

- Přístroj UV/VIS SPEKTROFOTOMETR UNICAM 5625 (průtokový)
- Přístroj SPEKTROFOTOMETR SQ 118 (kyvetový)
- Termoreaktor SPECTROQUANT TR 320
- Běžné laboratorní vybavení
- Speciální nádoby dodané pro kyvetový test

3.3 Stanovení AOX spektrofotometricky pomocí kyvetového testu firmy Merck

3.3.1 Postup

Příprava adsorpční kolony

Kolona se naplní jednou modrou mikrolžičkou činidla AOX-1 (aktivní uhlí), promyje 3 x 1 ml činidla AOX-2 a 3 x 1 ml činidla AOX-3, proplachovací roztoky se v obou případech vylijí, horní konec kolony se uzavře zátkou a pak se naplní až po okraj činidlem AOX-3. Případné bublinky se odstraní jemným poklepáním na kolonu.

Zakoncentrování vzorku

100 ml kalibračního roztoku (případně odpadní vody) se přenese do skleněné děličky, přidá se tolik kapek činidla AOX-4, aby hodnota pH kalibračního roztoku (odpadní vody) byla nižší než 2. Následně se vytáhne zátky z kolony a obsah skleněné děličky se nechá protéct kolonou do kádinky. Až celý zásobník proteče kolonou, kolona se odpojí. Obsah kádinky se vylije. Kolona se umístí do prázdné kyvety a opět se promyje 3 x 1 ml činidla AOX-3. Proplachovací roztok se vylije.

Rozklad

10-ti ml plastová stříkačka se naplní 10-ti ml činidla AOX-5 bez bublinek a stříkačka se připojí k výtokovému otvoru kolony s pomocí spojky. Horní konec kolony se vloží do prázdné rozkladné kyvety a náplň kolony se okamžitě propláchne do kyvety s pomocí plastové stříkačky. Následně se použije stejná stříkačka k vytlačení vzduchu z kolony, aby se do kyvety dostala veškerá zbytková kapalina. Do kyvety se přidají 2 zelené mikrolžičky činidla AOX-6, kyveta se uzavře, promíchá a vloží na 30 minut do termoreaktoru předehřátého na 120°C. Potom se nechá kyveta ochladit na pokojovou teplotu, přidá se 5 kapek činidla AOX-4, kyveta se uzavře a promíchá. Aktivní uhlí v kyvetě se nechá usadit.

Měření

0,20 ml činidla AOX-1K se pipetuje do reagenční kyvety a promíchá. 7 ml připraveného vzorku se přidá do reagenční kyvety, promíchá a nechá 15 minut reagovat. Potom se měří absorbance na spektrofotometru.

Předpokládaný chemismus :

Vzhledem k tomu, že přesné složení ampulek není známo, chemismus je pouze naším předpokladem. Vzorek s neznámou koncentrací AOX se naadsorbuje na aktivní uhlí. Neznámá látka se oxiduje peroxodisíranem draselným. Probíhá mineralizace organické látky a halogenidové ionty přecházejí zřejmě do mineralizátu. Mineralizát po smíchání s thiokyanátem rtuťnatým a dusičnanem železitým v kyselém prostředí vytvoří žluté zbarvení, jehož intenzitu měříme spektrofotometricky.

3.3.2 Příprava kalibračních roztoků

Vytvoření kalibrační křivky za použití 4-CP

Kalibrační roztoky se připravují z referenčního materiálu 4-CP dodávaném firmou Merck následovně :

- standardní roztok (AOX = 2,5 mg/l) – byl připraven autorem diplomové práce

Do odměrné baňky na 1000 ml naplněné z poloviny speciální vodou se pipetou převede 12,5 ml referenčního materiálu 4-CP pod hladinu a doplní se po rysku speciální vodou.

- kalibrační roztoky

Připraví se 9 kalibračních roztoků. Kalibrační roztoky se připravují v den použití.

Do odměrných baněk na 100 ml se postupně odpipetuje 2 ml, 4 ml, 8 ml, 20 ml, 30 ml, 40 ml, 60 ml, 80 ml a 100 ml pracovního roztoku a objemy se doplní po rysku speciální vodou.

Hmotnostní koncentrace AOX těchto roztoků jsou 0,05 mg/l, 0,1 mg/l, 0,2 mg/l, 0,5 mg/l, 7,5 mg/l, 1,0 mg/l, 1,5 mg/l, 2,0 mg/l a 2,5 mg/l. Tyto roztoky pro ověření postupu se připravují vždy čerstvé.

Kalibrační roztoky se zpracovávají stejným způsobem jako vzorek. Namísto zkoušeného objemu vzorku se použije odpovídající objem příslušného kalibračního roztoku.

Vytvoření kalibrační křivky za použití 2,4-DCP

Kalibrační roztoky se připravují z 2,4-DCP dodaného firmou Merck následovně :

- standardní roztok – je dodán firmou Merck

- kalibrační roztoky

Připraví se 8 kalibračních roztoků. Kalibrační roztoky se připravují v den použití. Do odměrných baněk na 100 ml se postupně pipetuje 0,25 ml, 0,5 ml, 1 ml, 2,5 ml, 5 ml, 7,5 ml, 10 ml, 12,5 ml standardního roztoku a objemy se doplní po rysku speciální vodou.

Hmotnostní koncentrace AOX těchto roztoků jsou 0,05 mg/l, 0,1 mg/l, 0,2 mg/l, 0,5 mg/l, 1,0 mg/l, 1,5 mg/l, 2,0 mg/l a 2,5 mg/l. Tyto roztoky pro ověření postupu se připravují vždy čerstvé.

Kalibrační roztoky se zpracovávají stejným způsobem jako vzorek. Namísto zkoušeného objemu vzorku se použije odpovídající objem příslušného kalibračního roztoku.

3.3.3 Spektrofotometrické měření

Firma Merck doporučuje pracovat při vlnové délce 468 nm. U kyvetového spektrofotometru Merck tato vlnová délka nelze nastavit, protože vlnové délky se zde nastavují skokově a ne kontinuálně. Nicméně pro tento spektrofotometr doporučuje firma Merck pracovat při vlnové délce 446 nm..

Absorbance kalibračních roztoků se měří spektrofotometrem při následujících vlnových délkách :

- 468 nm - přístroj UV/VIS SPEKTROFOTOMETR UNICAM 5625 (průtokový)
- 446 nm - přístroj SPEKTROFOTOMETR SQ 118 (kyvetový)

Na spektrofotometru Merck se nastaví metoda č. 232 a proměří se hodnota absorbance. Hodnota slepého stanovení se odečítá při nastavení fotometru. Slepý vzorek dodala firma Merck.

Na spektrofotometru UNICAM se nastaví požadovaná vlnová délka a proměří se hodnota absorbance.

Absorbance slepého stanovení a vzorků se na spektrofotometru UNICAM měřila zvlášť.

3.3.4 Vyjadřování výsledků

Používala se kalibrační křivka 4-PC. Koncentrace AOX v neznámém vzorku se odečítá z kalibrační křivky závislosti absorbance na koncentraci.

$$c \text{ (mg/l)} = (A - b_0) / b_1$$

Kde A absorbance

b_0, b_1 parametry přímky

4. DISKUSE VÝSLEDKŮ

4.1 Kalibrace standardního operačního postupu na 4-CP

U mikrocoulometrické titrace byl jako standard zvolen 4-CP.

V této kapitole byla provedena kalibrace 4-CP nejen v rozpětí doporučeném výrobcem, které je 0,05 – 2,5 mg/l, ale i pod prvním bodem kalibrační křivky a nad posledním bodem kalibrační křivky, protože součástí validačního postupu je ověření rozsahu kalibrační závislosti či rozsahu metody na sérii kalibračních roztoků.

Nejnižším bodem kalibrační křivky byla hodnota 0,00625 mg/l a nejvyšší hodnota byla stanovena na 3 mg/l.

Kalibrace těchto bodů byla prováděna průběžně po celou dobu experimentu. Veškeré hodnoty jsou zaneseny v tabulce I a II.

Na základě výsledků byly sestaveny kalibrační grafy, a to v koncentračním rozpětí 0,05 – 2,5 mg/l a 0,00625 – 0,05 mg/l a následně vypočítána lineární regrese.

Vzhledem k tomu, že tato metoda je založena na odečtu z kalibrační křivky, obě lineární regrese byly využity při počítání koncentrace u reálných vzorků.

Součástí validačního postupu je ověření rozsahu kalibrační závislosti (rozsahu metody) na sérii kalibračních roztoků. Jeho součástí je i ověření funkčnosti metody pod prvním bodem kalibrační křivky a nad posledním bodem kalibrační křivky.

Tabulka I : Všechny naměřené absorbance na obou spektrofotometrech v koncentračním rozpětí doporučeném výrobcem (závislost absorbance na koncentraci)

koncentrace (mg/l)	absorbance (Merck)					absorbance (UNICAM)
0,05	0,031	0,033	0,034	0,031	0,031	0,128
0,05	0,044	0,047	0,047	0,045	0,048	0,149
0,05	0,042	0,039	0,042	0,040	0,040	0,135
0,05	0,060	0,064	0,063	0,064	0,062	0,150
0,05	0,048	0,046	0,046	0,047	0,044	0,147
0,05	0,058	0,062	0,062	0,062	0,061	0,150
0,05	0,049	0,049	0,051	0,053	0,049	0,157
0,05	0,066	0,066	0,064	0,063	0,064	0,151
0,05	0,036	0,038	0,038	0,036	0,038	0,133
0,05	0,029	0,032	0,032	0,033	0,030	0,110
0,05	0,049	0,054	0,048	0,049	0,046	0,158
0,05	0,028	0,030	0,027	0,027	0,028	0,117
0,05	0,036	0,036	0,038	0,035	0,038	0,119

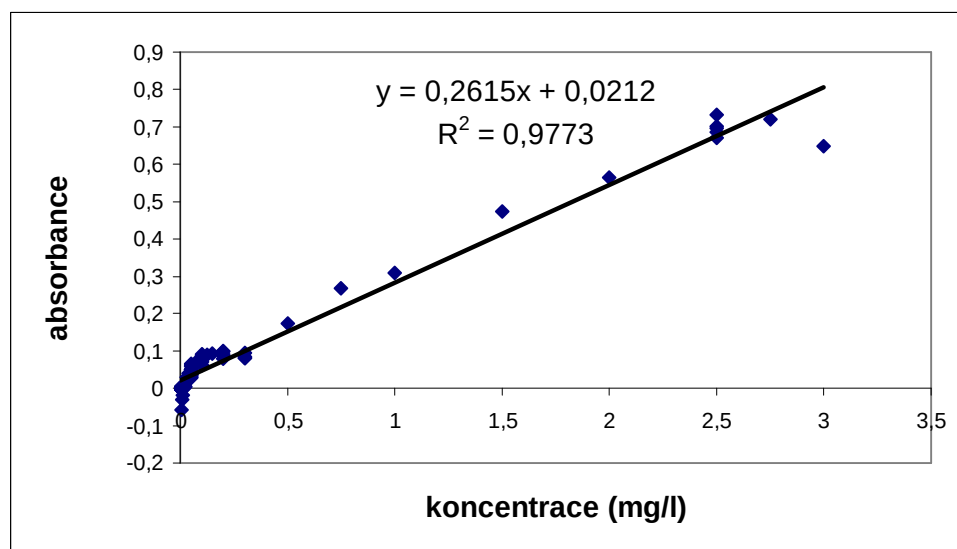
koncentrace (mg/l)	absorbance (Merck)					absorbance (UNICAM)
0,05	0,041	0,042	0,043	0,044	0,041	0,140
0,05	0,050	0,048	0,050	0,049	0,050	0,150
0,05	0,041	0,042	0,043	0,040	0,041	0,142
0,05	0,039	0,041	0,039	0,038	0,039	0,137
0,05	0,042	0,045	0,043	0,044	0,042	0,131
0,05	0,040	0,039	0,044	0,042	0,041	0,138
0,05	0,041	0,043	0,040	0,041	0,041	0,140
0,05	0,035	0,034	0,034	0,036	0,035	0,132
0,05	0,036	0,038	0,038	0,037	0,038	0,132
0,05	0,061	0,059	0,060	0,061	0,060	0,148
0,075	0,070	0,071	0,072	0,070	0,071	0,160
0,1	0,088	0,083	0,083	0,085	0,084	0,163
0,1	0,091	0,095	0,096	0,091	0,092	0,166
0,1	0,071	0,072	0,075	0,072	0,071	0,128
0,1	0,061	0,058	0,059	0,062	0,061	0,121
0,1	0,078	0,076	0,080	0,079	0,080	0,122
0,125	0,089	0,090	0,088	0,088	0,090	0,167
0,15	0,092	0,094	0,092	0,093	0,092	0,171
0,2	0,078	0,081	0,078	0,078	0,082	0,161
0,2	0,098	0,100	0,099	0,102	0,101	0,168
0,2	0,088	0,090	0,086	0,086	0,084	0,149
0,2	0,09	0,092	0,089	0,092	0,093	0,162
0,2	0,099	0,098	0,100	0,102	0,100	0,190
0,3	0,081	0,084	0,085	0,084	0,086	0,173
0,3	0,080	0,082	0,084	0,083	0,084	0,168
0,3	0,084	0,079	0,076	0,078	0,080	0,175
0,3	0,094	0,098	0,095	0,090	0,092	0,268
0,5	0,173	0,157	0,154	0,167	0,166	0,224
0,75	0,268	0,266	0,263	0,266	0,266	0,289
1	0,309	0,308	0,312	0,308	0,312	0,328
1,5	0,474	0,470	0,479	0,475	0,478	0,448
2	0,564	0,566	0,567	0,566	0,564	0,542
2,5	0,697	0,694	0,700	0,696	0,698	0,669
2,5	0,702	0,705	0,705	0,705	0,703	0,685
2,5	0,733	0,729	0,729	0,732	0,730	0,699
2,5	0,687	0,683	0,689	0,684	0,689	0,658
2,5	0,671	0,665	0,675	0,666	0,665	0,646

Na spektrofotometru Merck byl každý vzorek měřen pětkrát, protože v kapitole 4.6 byl sledován vliv několikanásobného opakování vložení kyvety do spektrofotometru Merck. Bylo tak činěno proto, že kyveta je válcovitého tvaru a jejím pootočením se hodnota absorbance skutečně nepatrně mění.

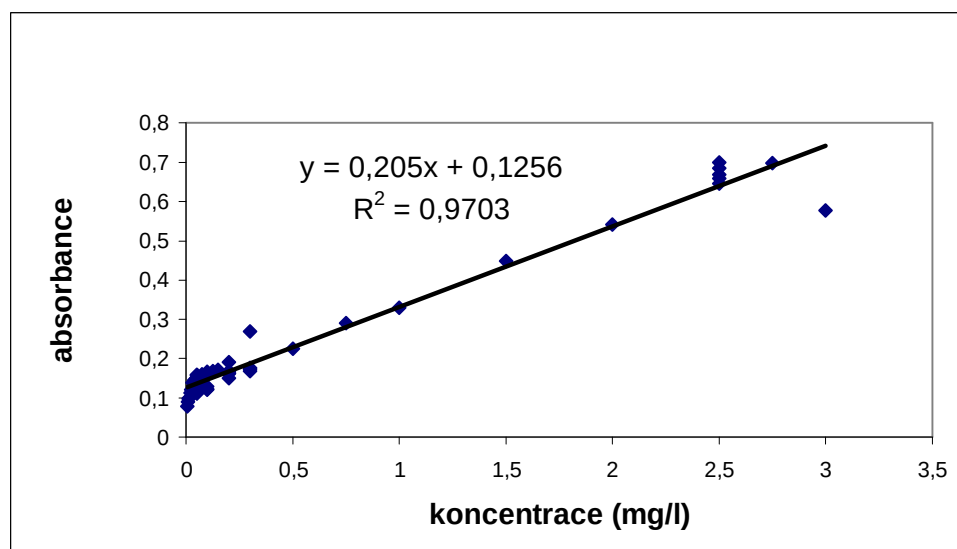
Tabulka II : Všechny naměřené absorbance na obou spektrofotometrech pod a nad hranicí doporučenou výrobcem (závislost absorbance na koncentraci)

koncentrace (mg/l)	absorbance (Merck)					absorbance (UNICAM)
0,00625	-0,058	-0,056	-0,049	-0,052	-0,054	0,078
0,01	-0,03	-0,031	-0,030	-0,031	-0,033	0,090
0,0125	-0,018	-0,017	-0,021	-0,022	-0,016	0,098
0,015	-0,001	-0,002	0,001	0,001	-0,001	0,099
0,02	0,009	0,011	0,012	0,011	0,014	0,112
0,025	0,004	0,004	0,006	0,004	0,006	0,121
0,03	0,030	0,033	0,030	0,030	0,030	0,139
0,04	0,039	0,041	0,039	0,040	0,041	0,144
2,75	0,721	0,716	0,721	0,720	0,716	0,698
3	0,648	0,643	0,646	0,643	0,645	0,577

Kalibrační křivky vzniklé ze všech naměřených dat

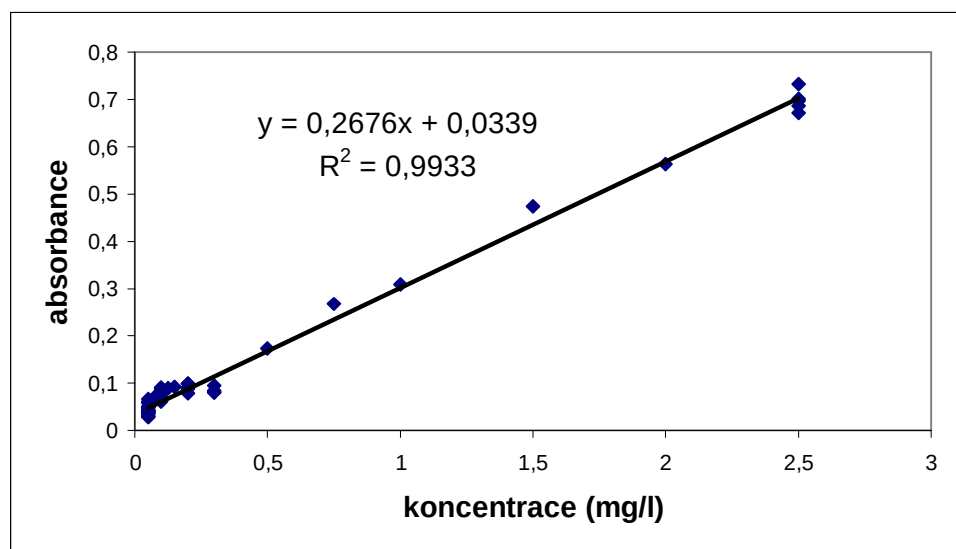


Obr. 1 Kalibrace všech naměřených hodnot na Mercku

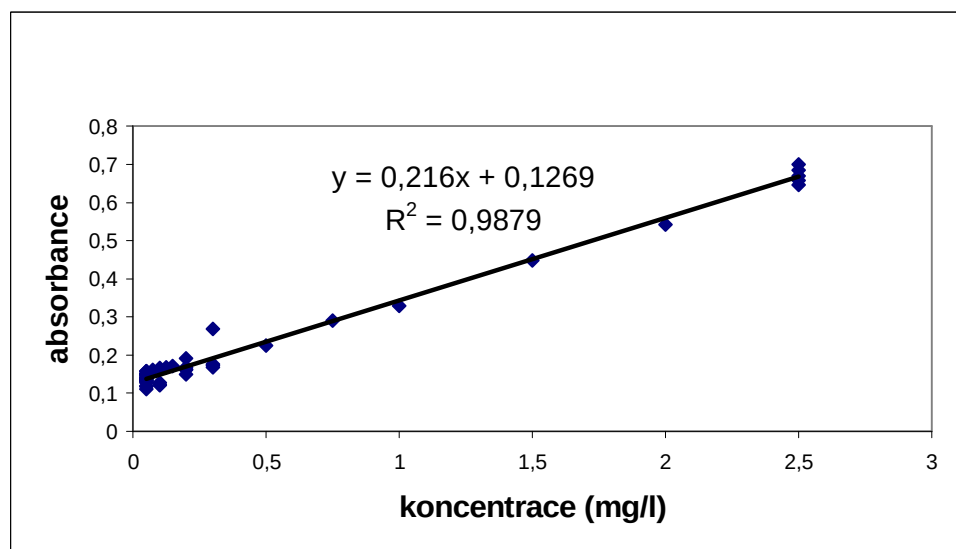


Obr. 2 Kalibrace všech naměřených hodnot na UNICAMu

Kalibrační křivky v koncentračním rozpětí doporučeném výrobcem (0,05 – 2,5 mg/l)

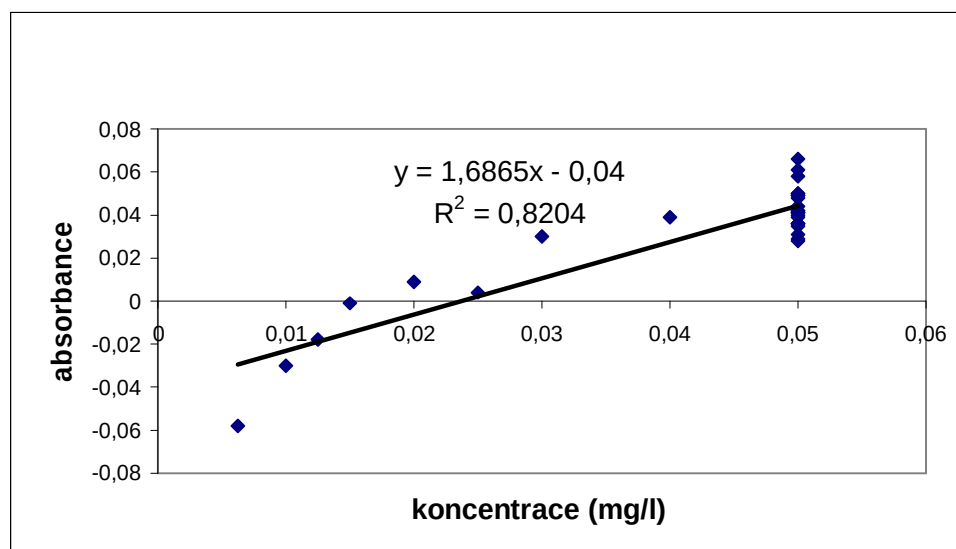


Obr. 3 Kalibrace na Mercku

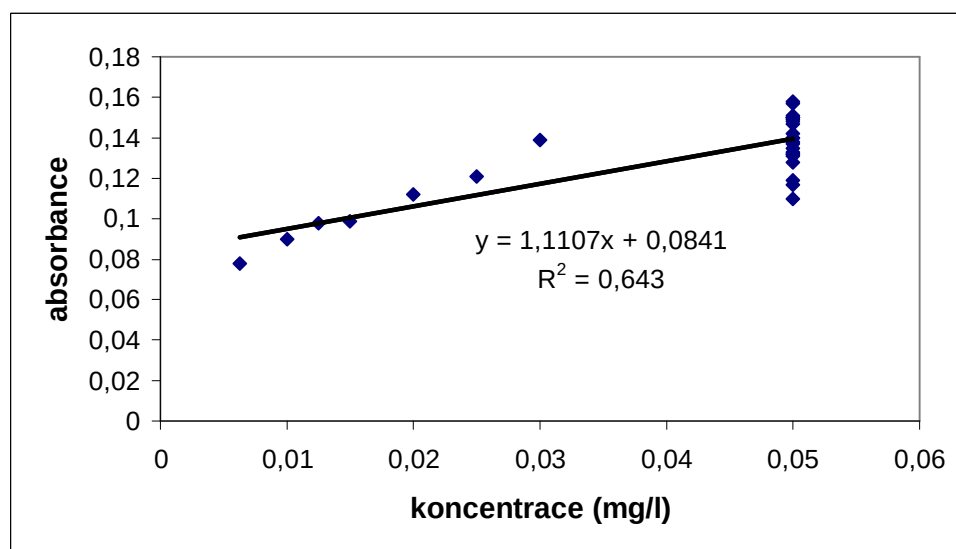


Obr. 4 Kalibrace na UNICAMu

Kalibrační křivky pod hranicí doporučenou výrobcem (0,00625 – 0,05 mg/l)



Obr. 5 Kalibrace na Mercku



Obr. 6 Kalibrace na UNICAMu

Z obrázků 5 a 6 je patrné, že kalibrace v koncentračním rozpětí pod hranicí 0,05 mg/l je velmi problematická, a zřejmě proto výrobce nedoporučuje tento test používat u vzorků s koncentrací AOX nižší než 0,05 mg/l.

Díky skutečnosti, že většina reálných vzorků měla koncentraci nižší než je pracovní oblast doporučovaná výrobcem a tudíž byly pro tuto metodu příliš „čisté“, bylo nutné počítat i s lineárními regresemi z obr. 5 a 6.

Protože měření kalibračních bodů pod a nad oblastí doporučenou výrobcem vycházelo špatně, nebylo možné křivku extrapolovat.

4.2 Měření slepých stanovení

Součástí testu byl slepý vzorek dodaný firmou Merck, a proto bylo vhodné změřit i slepé stanovení. Toto slepé stanovení bylo porovnáváno se slepým stanovením složeným z Dobré vody. Rozdíl absorbancí je uveden v tabulce III.

Tabulka III : Porovnání hodnot absorbancí u slepého vzorku dodaném firmou Merck a slepým stanovením složeným z Dobré vody na spektrofotometru UNICAM

datum	absorbance (Merck)	absorbance (Dobrá voda)
16.4.2004	0,084	0,089
20.4.2004	0,100	0,089
27.4.2004	0,106	0,098
1.6.2004	0,089	0,096
6.9.2004	0,090	0,092
5.10.2004	0,096	0,089
průměr	0,094	0,092
SM.VÝB	0,0081	0,0040
RSD	8,6%	4,3%

Z tabulky III je patrné, že v jednotlivých dnech se hodnoty absorbancí mezi slepým stanovením Mercku a slepým stanovením složeným z Dobré vody mírně lišily. Nicméně průměrné hodnoty jsou stejné, takže se domnívám, že slepé stanovení dodané firmou Merck je složené z některé destilované vody.

Rozptyly u obou slepých stanovení jsou jiné. Z tohoto hlediska vychází lépe měření slepého stanovení složeného z Dobré vody.

4.3 Kalibrace standardního operačního postupu na 2,4-DCP

Firma Merck dodala standard pod obchodním názvem AOX standard, u kterého nebylo známo, o jakou chemikálii se jedná. Tato diplomová práce si dala jako jeden z dílčích cílů zjistit složení tohoto standardu.

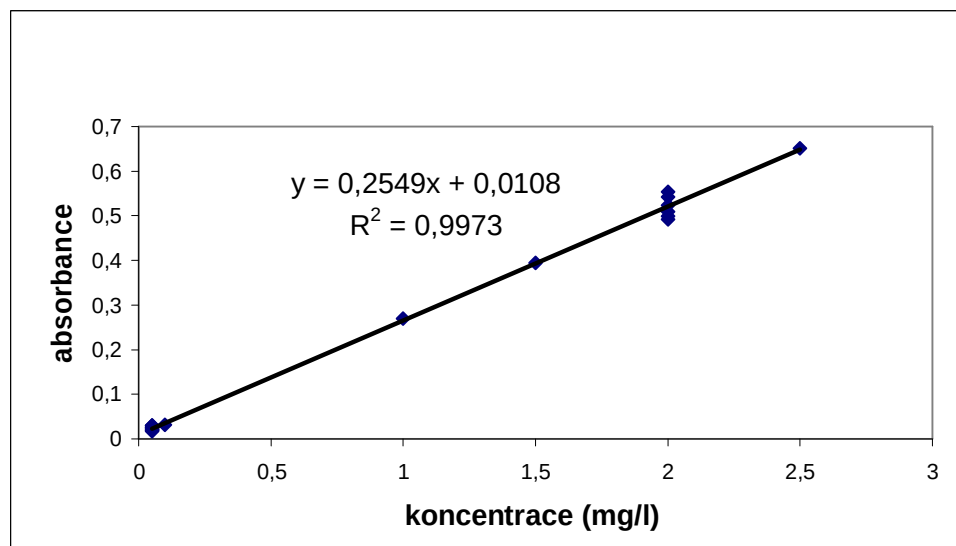
Stanovením vybraných chlorfenolů v kapalných a pevných matricích metodou plynové chromatografie za použití detektoru elektronového záchyty (ECD) jak již bylo řečeno, bylo zjištěno, že se jedná o 2,4-dichlorfenol.

Stanovení na plynovém chromatografu prováděl pracovník laboratoře ing. Radka Škorpíková.

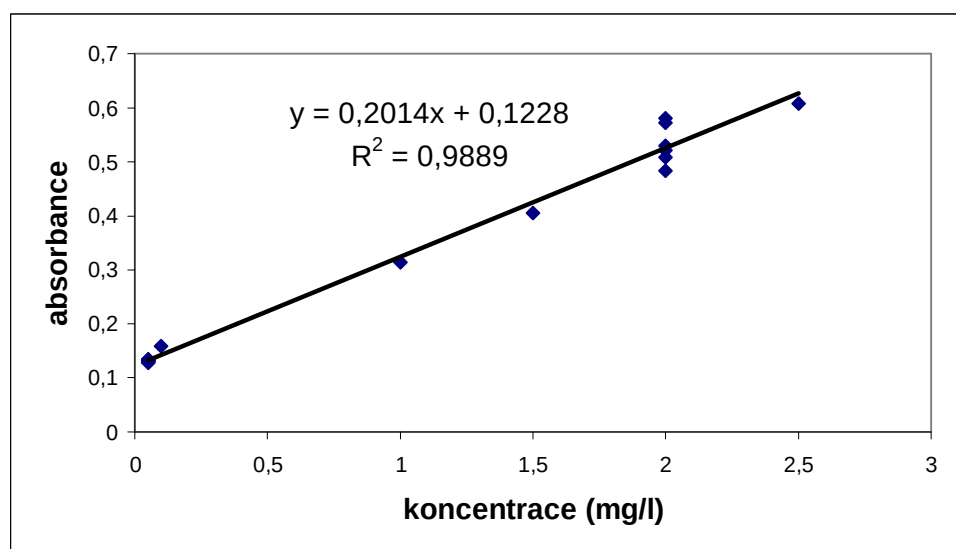
Tabulka IV: Tabulka všech naměřených absorbancí na obou spektrofotometrech (závislost absorbance na koncentraci)

koncentrace (mg/l)	absorbance (Merck)					absorbance (UNICAM)
0,05	0,020	0,019	0,017	0,018	0,019	0,132
0,05	0,027	0,028	0,026	0,027	0,026	0,134
0,05	0,020	0,017	0,018	0,019	0,017	0,133
0,05	0,025	0,026	0,027	0,025	0,025	0,134
0,05	0,030	0,028	0,028	0,029	0,030	0,136
0,05	0,017	0,019	0,017	0,018	0,019	0,134
0,05	0,030	0,031	0,030	0,032	0,031	0,131
0,05	0,025	0,024	0,027	0,027	0,026	0,130
0,05	0,026	0,028	0,029	0,027	0,028	0,130
0,05	0,020	0,019	0,021	0,022	0,021	0,128
0,1	0,031	0,029	0,032	0,030	0,031	0,158
1	0,269	0,267	0,268	0,264	0,268	0,315
1,5	0,394	0,391	0,392	0,390	0,391	0,405
2	0,492	0,492	0,490	0,491	0,490	0,509
2	0,523	0,519	0,520	0,524	0,521	0,484
2	0,509	0,511	0,512	0,513	0,509	0,530
2	0,553	0,549	0,548	0,550	0,550	0,580
2	0,499	0,500	0,498	0,501	0,501	0,521
2	0,542	0,539	0,540	0,542	0,542	0,572
2,5	0,651	0,654	0,658	0,652	0,654	0,608

Kalibrační křivky v koncentračním rozpětí doporučeném výrobcem (0,05 – 2,5 mg/l)



Obr. 7 Kalibrace na Mercku



Obr. 8 Kalibrace na UNICAMu

Kalibrační křivky 2,4-DCP se mírně lišily od kalibračních křivek 4-CP. Hodnota absorbancí 2,4-DCP byla trochu nižší než absorbance u 4-CP.

4.4 Posouzení vlivu změněného pracovního postupu na výslednou koncentraci

Ze začátku neměla laboratoř k dispozici termoreaktor s nastavitelnou teplotou 120°C, kterou výrobce testu doporučuje. V tomto období se nouzově používal termostat, který pracoval při teplotách 100°C a 148°C. Kromě jiného byla zvolena i jiná reakční doba.

Měření probíhalo na průtokovém spektrofotometru UNICAM.

Bylo zkoumáno, zda změna teploty a času při zahřívání reagenční kyvety má vliv na výsledné absorbanci. Výpočet byl proveden z kalibrační křivky na obr. 4.

Tabulka V : Naměřené hodnoty absorbance při změněném pracovním postupu

koncentrace (mg/l)	absorbance (100°C, 45 min)	vypočítaná koncentrace (mg/l)	absorbance (148°C, 30 min)	vypočítaná koncentrace (mg/l)
0,05	0,125	-	0,148	0,097
0,1	0,148	0,097	0,185	0,268
0,3	0,159	0,148	0,162	0,162

Z tabulky VI lze vyčíst, že teplota termoreaktoru i čas setrvání kyvety v termoreaktoru doporučené výrobcem jsou velmi důležité parametry, které je nutné dodržovat, protože při změně těchto parametrů není pracovní postup použitelný ani v jednom případě.

4.5 Měření reálných vzorků

Funkčnost metody byla zkoumána na reálných vzorcích. Reálné vzorky byly měřeny v jeden den metodou spektrofotometrickou i coulometrickou a výsledky posléze vyneseny do tabulky VII.

Vzhledem k tomu, že obsah AOX ve vzorcích byl nižší než je výrobcem kyvetového testu na stanovení AOX doporučována spodní hranice, srovnání vyšlo v neprospěch spektrofotometrické metody.

Všechny výsledky i s charakteristikou měřených vzorků byly zaneseny do tabulek VI, VII a VIII a podpořeny statistickými výpočty.

Tabulka VI : Charakteristika měřených reálných vzorků

vzorek	identifikační číslo v laboratoři	odebrán	zdroj	materiál
1	7471	10.5.2004	Morava výtok	odpadní voda
2	7472	10.5.2004	Dřevnice výtok	odpadní voda
3	7480	11.5.2004	Březová průsak	průsaková voda
4	7493	7.5.2004	Energoaqua,a.s.	voda
5	7494	7.5.2004	Centroprojekt,a.s.	voda
6	7496	11.5.2004	Deemulgační stanice	odpadní voda
7	7499	11.5.2004	Energoaqua,a.s.	voda
8	7500	11.5.2004	Energoaqua,a.s.	voda
9	7501	11.5.2004	Energoaqua,a.s.	voda
10	7502	11.5.2004	Energoaqua,a.s.	odpadní voda
11	7503	11.5.2004	Energoaqua,a.s.	odpadní voda
12	7504	11.5.2004	Energoaqua,a.s.	odpadní voda
13	7515	10.5.2004	VaK Zlín,a.s.	voda
14	7522	12.5.2004	VaK Hodonín a.s.	surová voda
15	7697	13.5.2004	Výstup OV z ČOV	odpadní voda
16	7704	14.5.2004	VaK Zlín,a.s.	voda
17	7705	14.5.2004	VaK Zlín,a.s.	voda
18	7706	14.5.2004	VaK Zlín,a.s.	voda
19	7707	14.5.2004	VaK Zlín,a.s.	voda
20	7708	14.5.2004	VaK Zlín,a.s.	voda
21	7722	12.5.2004	ČOV Kateřinice odtok	odpadní voda
22	7723	12.5.2004	ČOV Kateřinice přítok	odpadní voda
23	7724	12.5.2004	ČOV Ratiboř odtok	odpadní voda
24	7725	12.5.2004	ČOV Ratiboř přítok	odpadní voda
25	7726	11.5.2004	ČOV Hutisko-Solanec odtok	odpadní voda
26	7727	11.5.2004	ČOV Hutisko-Solanec přítok	odpadní voda
27	7728	11.5.2004	ČOV Hutisko-Vezník odtok	odpadní voda
28	7729	11.5.2004	ČOV Hutisko-Vezník přítok	odpadní voda
29	7732	12.5.2004	ČOV Vsetín odtok	odpadní voda
30	7733	12.5.2004	ČOV Val.Meziříčí odtok	odpadní voda
31	7734	12.5.2004	ČOV Zubří odtok	odpadní voda
32	8265	19.5.2004	VaK Hodonín,a.s.	pitná voda
33	8332	20.5.2004	Výstup OV z ČOV	odpadní voda
34	13871	30.9.2004	Městská kanalizace	odpadní voda
35	13877	30.9.2004	Odtok z ČOV	odpadní voda
36	13878	30.9.2004	Přítok do ČOV	odpadní voda
37	8575	25.5.2005	Energoaqua,a.s.	odpadní voda
38	8413	21.5.2004	Nová jímka	odpadní voda
39	8743	28.5.2004	Předávací šachta	odpadní voda
40	8740	28.5.2004	kanál	odpadní voda
41	8608	27.5.2004	Výstup OV z ČOV	odpadní voda

Tabulka VII : Absorbance reálných vzorků měřených na spektrofotometrech UNICAM a Merck

vzorek	absorbance (Merck)					absorbance (UNICAM)	
1	-0,020	-0,022	-0,023	-0,022	-0,022	0,096	
2	-0,009	-0,008	-0,009	-0,007	-0,008	0,104	
3	-0,028	-0,028	-0,026	-0,028	-0,025	0,091	
4	-0,051	-0,048	-0,048	-0,050	-0,051	0,080	
5	-0,018	-0,019	-0,017	-0,018	-0,018	0,096	
6	-0,025	-0,024	-0,024	-0,026	-0,025	0,089	
7	-0,056	-0,058	-0,056	-0,055	-0,058	0,074	ředění 1:2
8	0,004	0,005	0,005	0,006	0,004	0,120	
9	0,119	0,120	0,121	0,118	0,121	0,178	
10	-0,030	-0,031	-0,032	-0,031	-0,030	0,092	
11	0,215	0,203	0,199	0,200	0,203	0,282	zabarvení
12	0,095	0,094	0,096	0,094	0,095	0,166	
13	0,056	0,058	0,056	0,056	0,054	0,160	
14	-0,037	-0,035	-0,037	-0,034	-0,037	0,100	ředění 1:2
15	0,001	0,002	-0,002	0,004	0,003	0,115	
16	0,000	-0,005	-0,003	-0,003	-0,004	0,105	ředění 1:2
17	0,029	0,026	0,024	0,026	0,028	0,148	
18	0,042	0,043	0,046	0,044	0,042	0,139	ředění 1:2
19	0,027	0,030	0,031	0,031	0,030	0,138	
20	0,018	0,020	0,021	0,017	0,021	0,125	
21	0,058	0,056	0,055	0,056	0,052	0,155	
22	-0,014	-0,017	-0,014	-0,016	-0,014	0,103	
23	0,028	0,029	0,320	0,029	0,028	0,135	
24	0,048	0,042	0,042	0,046	0,049	0,152	
25	0,084	0,089	0,086	0,088	0,089	0,162	
26	0,025	0,022	0,024	0,025	0,025	0,138	
27	0,060	0,062	0,064	0,062	0,063	0,157	
28	0,040	0,047	0,043	0,042	0,044	0,131	
29	0,098	0,100	0,096	0,098	0,096	0,171	
30	0,089	0,088	0,086	0,084	0,088	0,165	
31	0,023	0,024	0,020	0,019	0,020	0,101	
32	0,018	0,014	0,016	0,016	0,018	0,098	
33	0,115	0,110	0,114	0,112	0,114	0,186	ředění 1:2
34	0,043	0,042	0,044	0,042	0,042	0,137	
35	0,061	0,059	0,060	0,061	0,061	0,137	
36	0,045	0,046	0,045	0,045	0,046	0,134	
37	0,102	0,102	0,104	0,102	0,102	0,168	
38	0,230	0,232	0,230	0,231	0,232	0,267	
39	0,070	0,068	0,071	0,069	0,070	0,160	
40	0,085	0,083	0,086	0,085	0,086	0,164	
41	0,098	0,100	0,097	0,098	0,098	0,170	

Tabulka VIII : Srovnání mikrocoulometrické titrace a spektrofotometrického stanovení

vzorek	koncentrace coulometr (mg/l)	koncentrace UNICAM (mg/l)	koncentrace Merck (mg/l)	procent. rozdíl mezi coul. a UNICAMem	procent. rozdíl mezi coul. a Merckem
1	0,015	0,011	0,012	-26,6%	-20,0%
2	0,022	0,018	0,018	-18,2%	-18,1%
3	0,013	0,006	0,007	-53,8%	-46,1%
4	0,0098	-	-	-	-
5	0,017	0,011	0,013	-35,2%	-23,5%
6	0,014	0,004	0,009	-71,4%	0,0%
7	0,012	-	-	-	-
8	0,030	-	-	-	-
9	0,304	0,237	0,318	-22,0%	4,6%
10	0,012	0,011	0,006	-8,3%	-50,0%
11	0,069	0,178	0,677	157,9%	881,1%
12	0,110	0,181	0,228	64,54	107,2%
13	0,048	0,068	0,082	41,6%	70,8%
14	0,029	0,029	0,002	0,0%	-93,1%
15	0,035	0,028	0,024	-20,0%	-31,4%
16	0,056	-	-	-	-
17	0,037	0,057	0,041	54,0%	10,8%
18	0,086	0,056	0,061	-34,8%	-29,0%
19	0,038	0,048	0,039	26,3%	2,6%
20	0,033	0,036	0,034	9,0%	3,0%
21	0,045	0,063	0,058	40,0%	28,8%
22	0,014	0,017	0,015	21,4%	7,1%
23	0,043	0,045	0,040	4,6%	-6,9%
24	0,064	0,116	0,053	81,2%	-17,1%
25	0,110	0,162	0,187	47,2%	70,0%
26	0,038	0,048	0,038	26,3%	0,0%
27	0,060	0,139	0,097	131,6%	61,6%
28	0,052	0,019	0,023	-63,4%	-55,7%
29	0,120	0,204	0,239	70,0%	99,1%
30	0,140	0,176	0,205	25,7%	46,4%
31	0,026	0,015	0,037	-42,3%	42,3%
32	0,027	0,013	0,034	-51,8%	25,9%
33	0,250	0,547	0,606	118,8%	142,4%
34	0,021	0,047	0,049	123,8%	133,3%
35	0,022	0,047	0,059	113,6%	168,1%
36	0,043	0,044	0,050	2,3%	16,2%
37	0,150	0,190	0,254	26,6%	69,3%
38	0,630	0,648	0,732	2,8%	16,1%
39	0,066	0,153	0,134	131,8%	113,0%
40	0,098	0,171	0,190	74,4%	93,8%
41	0,150	0,199	0,239	32,6%	59,3%
procentuální průměr jednotlivých metod				45,7%	65,0%

Metoda mikrocoulometrické titrace byla brána jako referenční a podle toho probíhalo srovnání.

Kyvetový spektrofotometr Merck při měření nízkých koncentrací vykazoval záporné hodnoty. Záporné hodnoty jsou důsledkem faktu, že spektrofotometrická metoda není vhodná k měření koncentrací nižších jak 0,05 mg/l.

U vzorků, u kterých metoda mikrocoulometrické titrace ukázala koncentraci nižší než 0,05 mg/l, byla použita rovnice přímek odečtených z obr. 5 v případě spektrofotometru Merck a obr. 6 u UNICAMu. V případě vzorků, u nichž coulometr ukázal koncentraci v rozpětí doporučeném výrobcem byly použity rovnice přímek odečtených z obr. 3 u Mercku a obr. 4 u UNICAMu.

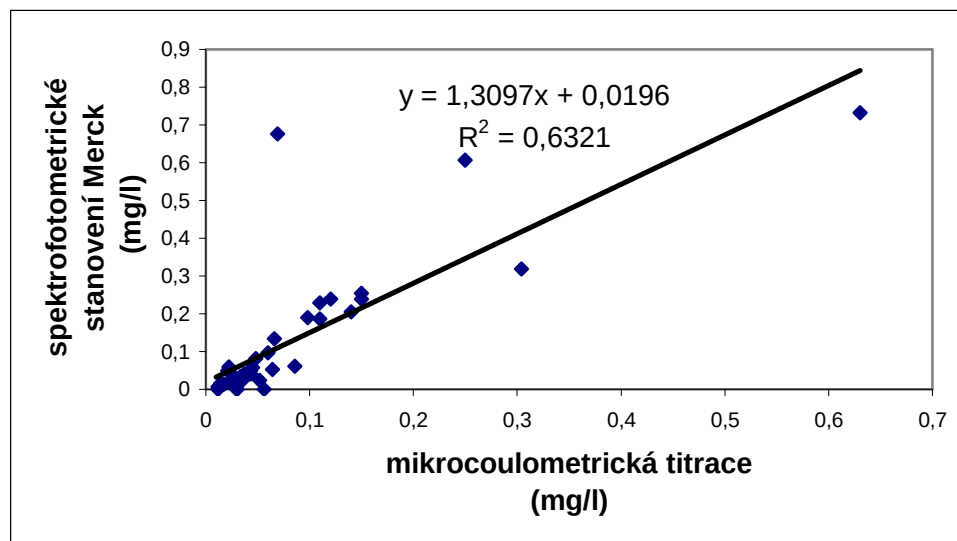
Kdyby byly použity rovnice přímek z obr. 1 a 2, kde byly zkalibrovány všechny naměřené hodnoty, většina vypočítaných koncentrací u reálných vzorků by vyšla v záporných číslech. Proto bylo nutné kalibraci rozdělit na dvě přímky pro každý spektrofotometr, viz obr. 3, 4, 5 a 6.

I když výrobce setu udává, že zabarvené vzorky jsou metodou spektrofotometrického stanovení neměřitelné, byl pro zajímavost vzorek č. 11, který vykazoval zabarvení, stanovován. Na tomto vzorku bylo potvrzena pravdivost této informace.

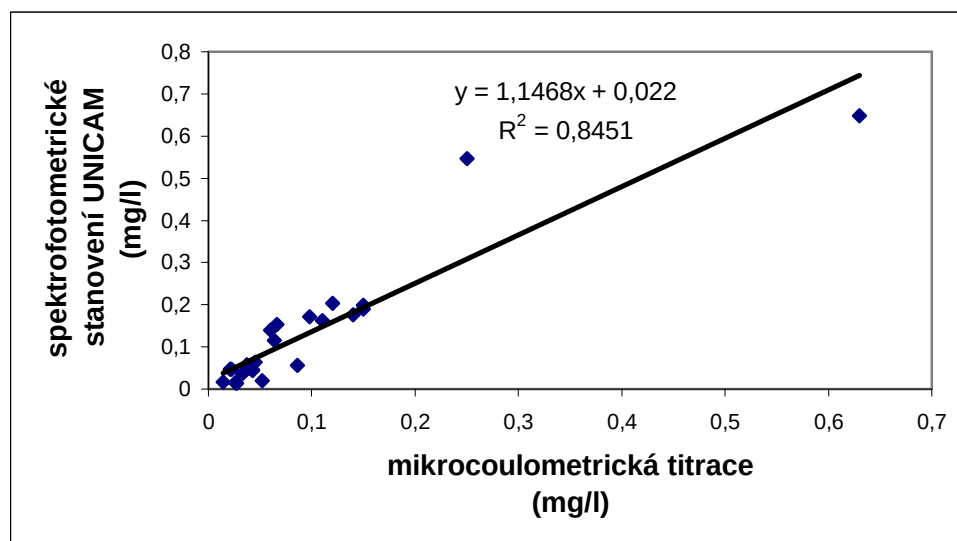
Dle procentuálního vyhodnocení vychází lépe stanovení spektrofotometrem UNICAM.

Srovnání metody mikrocoulometrické titrace s metodou spektrofotometrického stanovení probíhalo na obou spektrofotometrech. Srovnání obou metod je graficky znázorněno na obr. 9 a obr. 10.

Srovnání výsledků proběhlo na základě koncentrace změřené na coulometru a vypočítané koncentrace u spektrofotometru Merck a UNICAM, viz tabulka VIII.



Obr. 9



Obr. 10

Zdá se, že dosažené výsledky měření reálných vzorků jsou na coulometru a na spektrofotometru UNICAM podle obr. 10 vzájemně srovnatelné. Protože směrnice dané přímky se blíží jedné.

Z obr. 9 je zřejmé, že korelace u spektrofotometru Merck je horší.

4.6 Regulační diagramy

Úkolem regulačního diagramu je ověřit, že zvolený pracovní postup je stabilní v průběhu měření diplomové práce. V tomto případě byla použita koncentrace kalibračního vzorku 0,05 mg/l a 0 mg/l (slepý vzorek).

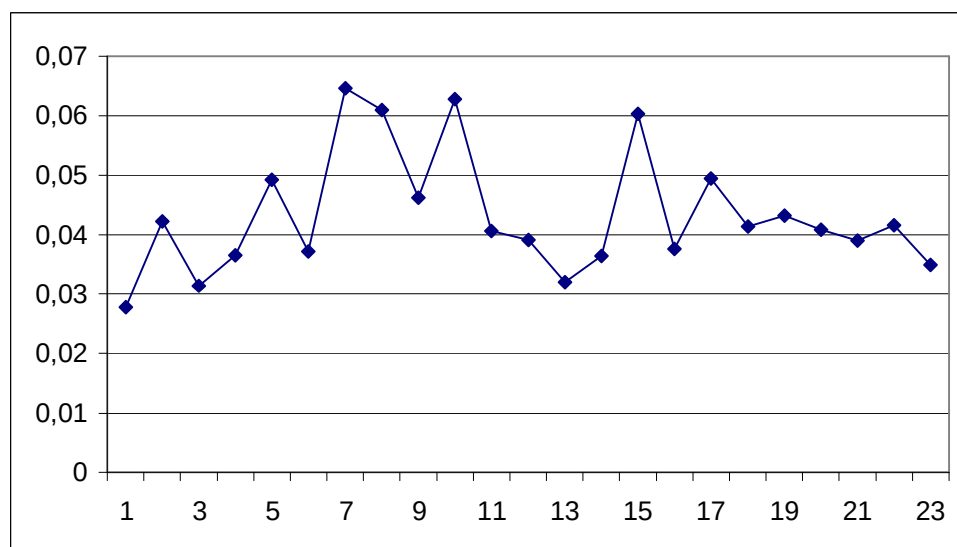
Absorbance stanovené koncentrace byla v případě koncentrace 0,05 mg/l opět měřena na obou spektrofotometrech, takže naměřená data poskytla dva regulační diagramy, a to obr. 11 a obr. 12. V případě slepého vzorku bylo měřeno pouze na spektrofotometru UNICAM, takže je k dispozici pouze jeden diagram znázorněný na obr. 13.

4.6.1 Regulační diagram kontrolního vzorku

Tabulka IX : Hodnoty pro regulační diagram na hladině 0,05 mg/l u Mercku

pořadové číslo	datum	absorbance				
1	15.4.2004	0,028	0,026	0,028	0,027	0,030
2	16.4.2004	0,041	0,042	0,043	0,044	0,041
3	20.4.2004	0,029	0,032	0,033	0,030	0,033
4	21.4.2004	0,036	0,036	0,038	0,035	0,038
5	28.4.2004	0,049	0,054	0,048	0,049	0,046
6	6.5.2004	0,036	0,038	0,038	0,036	0,038
7	10.5.2004	0,066	0,066	0,064	0,063	0,064
8	11.5.2004	0,058	0,062	0,062	0,062	0,061
9	17.5.2004	0,048	0,046	0,046	0,047	0,044
10	18.5.2004	0,061	0,064	0,063	0,062	0,064
11	19.5.2004	0,042	0,039	0,042	0,040	0,040
12	20.5.2004	0,044	0,047	0,047	0,045	0,048
13	21.5.2004	0,031	0,033	0,034	0,031	0,031
14	1.6.2004	0,036	0,037	0,036	0,037	0,036
15	2.6.2004	0,061	0,060	0,060	0,061	0,060
16	8.6.2004	0,038	0,039	0,037	0,037	0,037
17	18.8.2004	0,048	0,050	0,049	0,050	0,050
18	19.8.2004	0,041	0,042	0,043	0,040	0,041
19	23.8.2004	0,042	0,045	0,042	0,044	0,043
20	24.8.2004	0,040	0,039	0,042	0,042	0,041
21	2.9.2004	0,039	0,041	0,039	0,037	0,039
22	6.9.2004	0,041	0,043	0,041	0,041	0,042
23	5.10.2004	0,035	0,034	0,036	0,035	0,035
průměr		0,044				
SM.VÝB		0,0100				
RSD		23,3%				
varovná mez		0,087				
regulační mez		0,131				

Kontrolní vzorek při koncentraci 0,05 mg/l byl měřen na přístroji Merck a UNICAM.



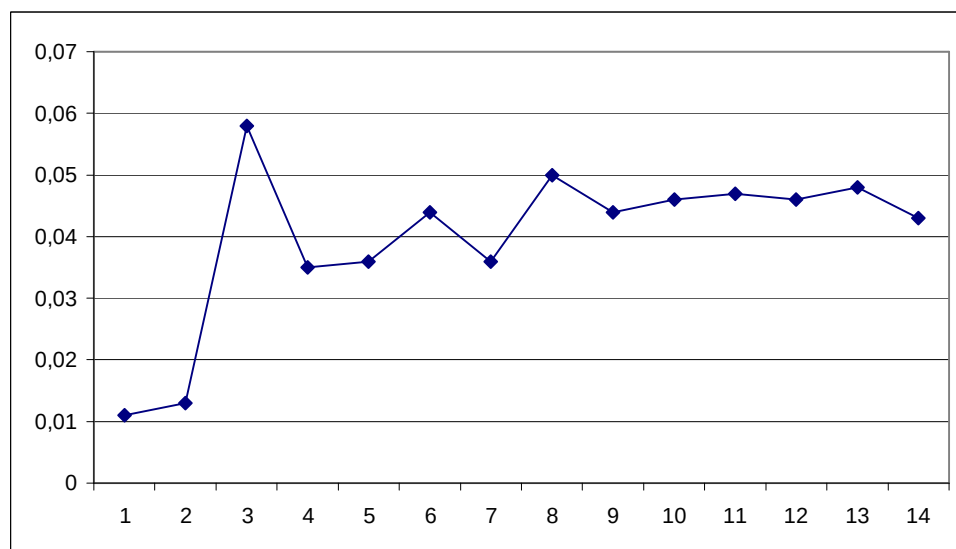
Obr. 11 Regulační diagram kontrolního vzorku na spektrofotometru Merck

Metoda je stabilní, hodnoty se pohybují uvnitř varovných mezí.

Tabulka X : Hodnoty pro regulační diagram na hladině 0,05 mg/l u UNICAMu

pořadové číslo	datum	absorbance	abs. UNICAM – abs. sl. stanov.
-	15.4.2004	0,120	-
-	16.4.2004	0,140	-
1	20.4.2004	0,110	0,011
2	21.4.2004	0,119	0,013
3	28.4.2004	0,158	0,058
4	6.5.2004	0,133	0,035
-	10.5.2004	0,151	-
-	11.5.2004	0,150	-
-	17.5.2004	0,147	-
-	18.5.2004	0,150	-
-	19.5.2004	0,135	-
-	20.5.2004	0,149	-
-	21.5.2004	0,128	-
5	1.6.2004	0,132	0,036
6	2.6.2004	0,148	0,044
7	8.6.2004	0,134	0,036
8	18.8.2004	0,150	0,050
9	19.8.2004	0,142	0,044
10	23.8.2004	0,139	0,046
11	24.8.2004	0,138	0,047
12	2.9.2004	0,137	0,046
13	6.9.2004	0,14	0,048
14	5.10.2004	0,0132	0,043
průměr			0,138348

pořadové číslo	datum	absorbance	abs. UNICAM – abs. sl. stanov.
SM.VÝB			0,011711
RSD			8,5%
varovná mez			0,276696
regulační mez			0,415044



Obr. 12 Regulační diagram kontrolního vzorku na spektrofotometru UNICAM

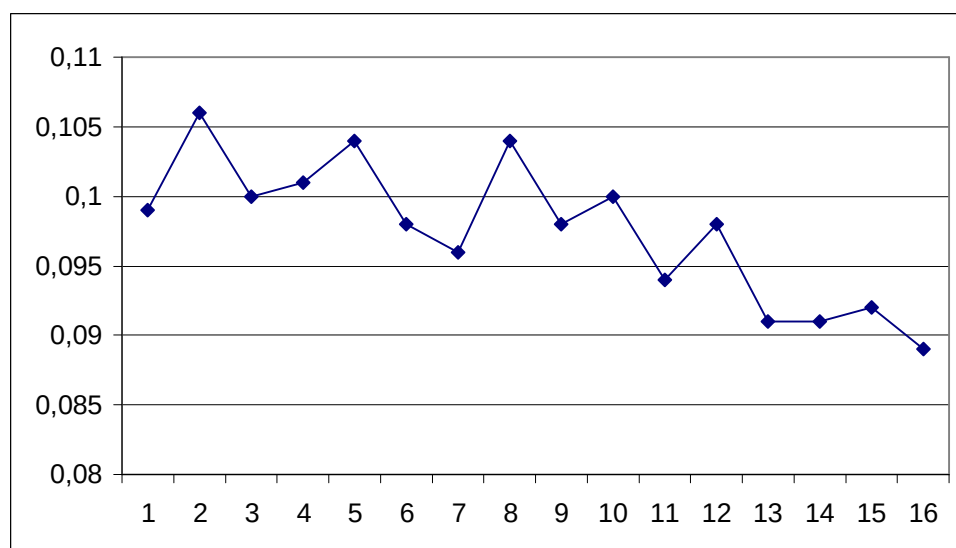
Metoda je stabilní, hodnoty se pohybují uvnitř varovných mezí. Nicméně regulační diagram spektrofotometru UNICAM vykazuje zvláště v počátcích měření velký rozptyl, který je způsoben vysokými absorbancemi slepých stanovení. Tato situace naznačuje, že zpočátku nastaly při měření slepých stanovení menší problémy.

Při porovnání regulačních diagramů kontrolního vzorku na obou spektrofotometrech, hodnocení vychází hodnocení založené na rozptylech ve prospěch spektrofotometru Merck, protože relativní směrodatná odchylka vykazuje u spektrofotometru Merck hodnotu 23,3 %. U spektrofotometru UNICAM je relativní směrodatná odchylka vyšší, což znamená, že opakovatelnost není tak dobrá.

4.6.2 Regulační diagram na slepé stanovení

Tabulka XI : Hodnoty pro regulační diagram na hladině 0 mg/l (slepé stanovení – Dobrá voda)

pořadové číslo	datum	absorbance	vypočítaná koncentrace (mg/l)
1	20.4.2004	0,099	0,243
2	21.4.2004	0,106	0,269
3	27.4.2004	0,100	0,247
4	28.4.2004	0,101	0,250
5	29.4.2004	0,104	0,262
6	6.5.2004	0,098	0,240
7	1.6.2004	0,096	0,232
8	2.6.2004	0,104	0,262
9	8.6.2004	0,098	0,240
10	18.8.2004	0,100	0,247
11	19.8.2004	0,094	0,224
12	23.8.2004	0,098	0,240
13	24.8.2004	0,091	0,213
14	2.9.2004	0,091	0,213
15	6.9.2004	0,092	0,217
16	5.10.2004	0,089	0,206
průměr		0,098	0,238
SM.VÝB		0,0050	0,0190
RSD		5,2%	8,0%
varovná mez		0,195	-
regulační mez		0,293	-
mez detekce		-	0,294746
mez stanovitelnosti		-	0,427592



Obr. 13 Regulační diagram na slepé stanovení

Regulační diagram na obr. 13 ukazuje, že hodnota mírně ale stabilně klesá. Hodnoty v regulačním diagramu nepřekračují varovné a regulační meze, proto pokles není považován za významný, přesto by bylo dobré situaci dlouhodobě sledovat.

4.7 Vliv několikanásobného opakování vložení kyvety do spektrofotometru MERCK

Vzhledem k tomu, že kyvety jsou válcovitého tvaru, záleží na skutečnosti, jak se do spektrofotometru vloží. Bylo nutné zajistit, aby se v optické dráze paprsku neobjevila žádná bublina.

V této kapitole jde o zjišťování reprodukovatelnosti spektrofotometrického měření po opětovném vložení stejného vzorku.

Při každém měření vzorku na spektrofotometru Merck SQ 118 bylo provedeno pět měření za sebou s tím, že bylo kyvetou ve spektrofotometru náhodně pootočeno a byl sledován vliv pootočení kyvety na hodnotě absorbance.

Tabulka XII : Vliv pootočení kyvety ve spektrofotometru MERCK na hodnotě absorbance

koncentr. (mg/l)	absorbance					průměr	SM.VÝB.	%
0,05	0,031	0,033	0,034	0,031	0,031	0,032	0,0014	4,4
0,05	0,044	0,047	0,047	0,045	0,048	0,046	0,0016	3,5
0,05	0,042	0,039	0,042	0,040	0,040	0,041	0,0016	4,0
0,05	0,061	0,064	0,063	0,064	0,062	0,063	0,0013	2,0
0,05	0,048	0,046	0,046	0,047	0,044	0,046	0,0015	3,2
0,05	0,058	0,062	0,062	0,062	0,061	0,061	0,0017	2,8
0,05	0,049	0,049	0,051	0,053	0,049	0,050	0,0018	3,5
0,05	0,066	0,066	0,064	0,063	0,064	0,065	0,0013	2,0
0,05	0,036	0,038	0,038	0,036	0,038	0,037	0,0011	2,9
0,05	0,049	0,054	0,048	0,049	0,046	0,049	0,0030	5,9
0,05	0,028	0,030	0,027	0,027	0,028	0,028	0,0012	4,3
0,05	0,036	0,036	0,038	0,035	0,038	0,034	0,0013	3,9
0,05	0,029	0,032	0,032	0,033	0,030	0,031	0,0016	5,2
0,05	0,041	0,042	0,043	0,044	0,041	0,042	0,0013	3,0
0,05	0,050	0,048	0,050	0,049	0,050	0,049	0,0009	1,8
0,05	0,041	0,042	0,043	0,040	0,041	0,041	0,0011	2,7
0,05	0,039	0,041	0,039	0,038	0,039	0,039	0,0011	2,7
0,05	0,042	0,045	0,043	0,044	0,042	0,043	0,0013	3,0
0,05	0,040	0,039	0,044	0,042	0,041	0,041	0,0019	4,6
0,05	0,041	0,043	0,040	0,041	0,041	0,041	0,0011	2,6
0,05	0,035	0,034	0,034	0,036	0,035	0,035	0,0008	2,4
0,05	0,036	0,038	0,038	0,037	0,038	0,037	0,0009	2,3
0,05	0,061	0,059	0,060	0,061	0,060	0,060	0,0008	1,3

koncentr. (mg/l)	absorbance					průměr	SM.VÝB.	%
0,075	0,070	0,071	0,072	0,070	0,071	0,071	0,0008	1,1
0,1	0,088	0,083	0,083	0,085	0,084	0,085	0,0021	2,4
0,1	0,091	0,095	0,096	0,091	0,092	0,093	0,0023	2,5
0,1	0,071	0,072	0,075	0,072	0,071	0,072	0,0016	2,2
0,1	0,061	0,058	0,059	0,062	0,061	0,060	0,0016	2,7
0,1	0,078	0,076	0,080	0,079	0,080	0,079	0,0017	2,1
0,125	0,089	0,090	0,088	0,088	0,090	0,089	0,0010	1,1
0,15	0,092	0,094	0,092	0,093	0,092	0,093	0,0009	0,9
0,2	0,088	0,090	0,086	0,086	0,084	0,087	0,0023	2,6
0,2	0,090	0,092	0,089	0,092	0,093	0,091	0,0016	1,8
0,2	0,099	0,098	0,100	0,102	0,100	0,100	0,0015	1,4
0,2	0,098	0,100	0,099	0,102	0,101	0,100	0,0016	1,5
0,3	0,081	0,084	0,085	0,084	0,086	0,084	0,0019	2,2
0,3	0,080	0,082	0,084	0,083	0,084	0,083	0,0017	2,0
0,3	0,084	0,079	0,076	0,078	0,080	0,079	0,0030	3,7
0,3	0,094	0,098	0,095	0,090	0,092	0,094	0,0030	3,2
0,5	0,173	0,157	0,154	0,167	0,166	0,163	0,0078	4,7
0,75	0,268	0,266	0,263	0,266	0,266	0,266	0,0018	0,6
1	0,309	0,308	0,312	0,308	0,312	0,310	0,0020	0,6
1,5	0,474	0,470	0,479	0,475	0,478	0,475	0,0036	0,7
2	0,564	0,566	0,567	0,566	0,564	0,565	0,0013	0,2
2,5	0,687	0,683	0,689	0,684	0,689	0,686	0,0028	0,4
2,5	0,671	0,665	0,675	0,666	0,665	0,668	0,0045	0,6
2,5	0,733	0,729	0,729	0,732	0,730	0,731	0,0018	0,2
2,5	0,697	0,694	0,700	0,696	0,698	0,697	0,0022	0,3
2,5	0,702	0,705	0,705	0,705	0,703	0,704	0,0014	0,2
procentuální průměr								2,4%

Z tabulky XII lze vysledovat, že čím je koncentrace vzorku vyšší, tím je procentuální rozdíl mezi jednotlivými absorbancemi u jednoho vzorku menší. To znamená, že při vyšších koncentracích se do měření zanáší menší chyba. Průměrná hodnota se vyjadřuje k nejistotě, z tabulky by se dala kvantifikovat jedna ze složek nejistoty. Procentuální průměr je přijatelné číslo.

. Bylo zjištěno, že pootočení kyvety má určitý vliv na výslednou hodnotu absorbance. Tato zjištění byla zanesena do tabulky XII a následně podpořena statistickými výpočty.

4.8 Sledování absorbance v závislosti na čase

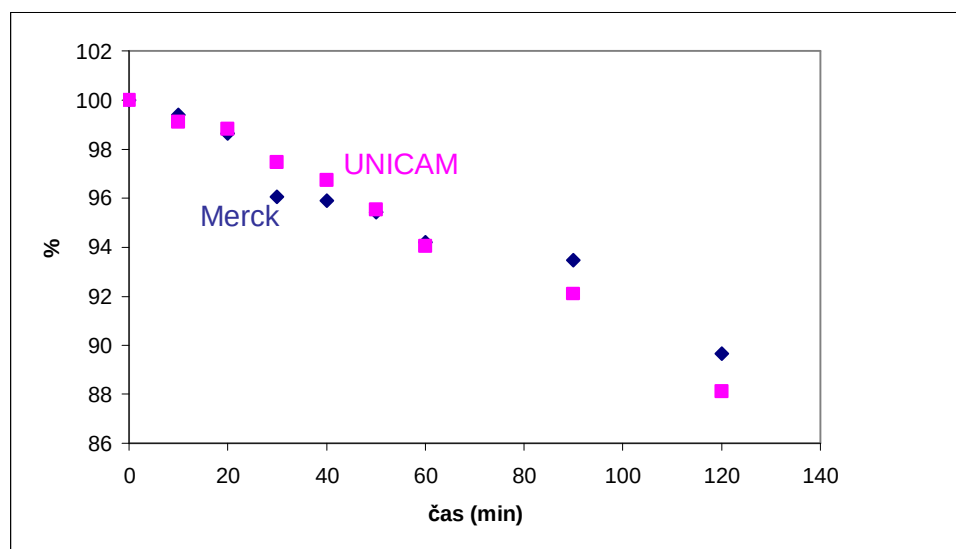
Firma Merck v návodu garantuje, že hodnota absorbance po 30-ti minutách od konce reakční doby neklesne o více jak 5 %. Proto byl sledován vliv času na výsledné absorbanci.

V jeden den byl vedle sebe zjišťován vliv času na absorbanci dvou vzorků při stejné koncentraci a výsledky byly zaneseny v tabulce XIII. Graficky na obr. 14 je znázorněn pouze vzorek č. 1.

Tabulka XIII : Tabulka závislosti poklesu absorbance na čase u dvou vzorků ($c = 2,5 \text{ mg/l}$)

čas (min)	vzorek č. 1				vzorek č. 2			
	absorbance (UNICAM)	%	absorbance (Merck)	%	absorbance (UNICAM)	%	absorbance (Merck)	%
0	0,646	100	0,681	100	0,658	100	0,672	100
10	0,645	99,8	0,671	98,5	0,654	99,3	0,666	99,1
20	0,639	98,9	0,663	97,3	0,649	98,6	0,664	98,8
30	0,629	97,6	0,655	96,1	0,632	96,0	0,655	97,4
40	0,628	97,2	0,651	95,5	0,631	95,9	0,650	96,7
50	0,625	96,7	0,640	96,9	0,628	95,4	0,642	95,5
60	0,610	94,4	0,622	91,3	0,620	94,2	0,632	94,0
90	0,601	93,0	0,608	89,2	0,615	93,4	0,619	92,1
120	0,560	86,6	0,577	84,7	0,590	89,6	0,592	88,1

Ve výsledku se procentuálně oba vzorky měřené při stejné koncentraci lišily jen velmi málo. Do 30-ti minut zbývá v případě vzorku č. 1 2,6% a 1,1 % a u vzorku č. 2 1,0% a 2,7%.

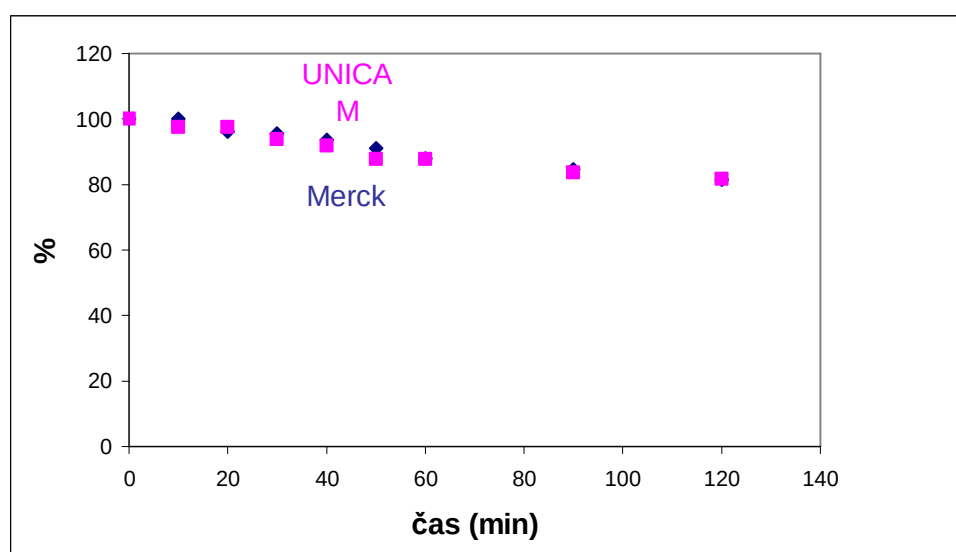


Obr. 14 Závislost poklesu absorbance s časem při $c = 2,5 \text{ mg/l}$

Stejně tak byla tento den měřena závislost poklesu absorbance s časem i při koncentraci $0,05 \text{ mg/l}$. V tomto případě byl měřen pouze jeden vzorek. Výsledky byly zaneseny do tabulky XIV a graficky znázorněny na obr. 15.

Tabulka XIV : Tabulka závislosti poklesu absorbance na čase ($c = 0,05 \text{ mg/l}$)

čas (min)	absorbance (UNICAM)	%	absorbance (Merck)	%
0	0,157	100	0,049	100
10	0,157	100	0,048	97,6
20	0,151	96,1	0,048	97,6
30	0,150	95,5	0,046	93,8
40	0,147	93,6	0,045	91,8
50	0,143	91,0	0,043	87,7
60	0,138	87,9	0,043	87,7
90	0,133	84,7	0,041	83,6
120	0,128	81,5	0,040	81,6

Obr. 15 Závislost poklesu absorbance s časem při $c = 0,5 \text{ mg/l}$

Z tabulek XIII a XIV i obr. 14 a 15 je zřejmé, že absorbance s časem mírně klesá. Experiment potvrdil, že po uplynutí 30-ti min hodnota neklesne o více než 5 % až na jednu výjimku.

Tento fakt byl experimentálně ověřen. Z měření vyplývá, že hodnota, kterou udává výrobce, je splněna v případě koncentrace 2,5 mg/l stoprocentně, ale u koncentrace 0,5 mg/l jen na 50%, protože u spektrofotometru Merck klesla hodnota absorbance o více jak 5%, přesněji o 6,2%.

Pokles absorbance způsobí změny i v hodnotě koncentrace, což je další příspěvek k nejistotě.

4.9 Opakovatelnost pracovního postupu

V průběhu celého experimentu byla měřena opakovatelnost stanovení AOX. Opakovatelnost byla prováděna na kalibračních vzorcích a ty byly zaznamenány v tabulce XV, XVI, XVII a XVIII.

V této kapitole byla sledována koncentrace měřená na spektrofotometru Merck i UNICAM..

Vzhledem ke skutečnosti, že byla sledována opakovatelnost pracovního postupu, k potřebnému výpočtu koncentrací byly kalibrační křivky prohozeny. V tabulce XVII bylo počítáno s kalibrační křivkou z obr. 7 pro Merck a obr. 8 pro UNICAM a v tabulce XVIII s kalibrační křivkou z obr. 3. pro Merck a obr. 4 pro UNICAM.

Tabulka XV : Hodnoty naměřených absorbancí u 4-CP

datum	konc.	spektr.	absorbance					průměr	SM. VÝB.	RSD
10.5.2004	0,05	Merck	0,044	0,042	0,050	0,048	0,049	0,047	0,0034	0,0737
		UNICAM	0,149	0,135	0,150	0,147	0,158	0,148	0,0083	0,0561
17.5.2004	2,5	Merck	0,733	0,729	0,729	0,732	0,730	0,731	0,0018	0,0025
		UNICAM	0,697	0,694	0,700	0,696	0,698	0,700	0,0022	0,0032
18.5.2004	0,1	Merck	0,088	0,091	0,071	0,061	0,078	0,078	0,0123	0,1583
		UNICAM	0,163	0,166	0,128	0,121	0,122	0,140	0,023	0,1611
19.5.2004	0,2	Merck	0,078	0,098	0,088	0,090	0,099	0,091	0,0085	0,0941
		UNICAM	0,161	0,168	0,149	0,162	0,190	0,166	0,0151	0,0908

Tabulka XVI : Hodnoty naměřených absorbancí u 2,4-DCP

datum	konc.	spektr.	absorbance					průměr	SM. VÝB.	RSD
24.8.2004	0,05	Merck	0,020	0,027	0,020	0,025	0,030	0,024	0,0044	0,1800
		UNICAM	0,132	0,134	0,133	0,134	0,136	0,134	0,0015	0,0111
2.9.2004	0,05	Merck	0,017	0,030	0,025	0,026	0,020	0,024	0,0051	0,2173
		UNICAM	0,134	0,131	0,130	0,130	0,128	0,131	0,0022	0,0168
6.9.2004	2	Merck	0,499	0,492	0,523	0,509	0,553	0,515	0,0241	0,0468
		UNICAM	0,509	0,484	0,530	0,580	0,521	0,525	0,0354	0,0674

Tabulka XVII : Výpočty vztahující se k tabulce XV (pro 4-CP)

datum	koncentr. (mg/l)	absorbance		vypoč. konc. (mg/l)		vychýlení metody (%)	
		Merck	UNICAM	Merck	UNICAM	Merck	UNICAM
10.5.2004	0,05	0,044	0,149	0,130	0,130	160,0	160,0
		0,042	0,135	0,122	0,060	144,0	20,0
		0,050	0,150	0,153	0,135	206,0	170,0
		0,048	0,147	0,146	0,120	192,0	140,0
		0,049	0,158	0,149	0,174	198,0	248,0
17.5.2004	2,5	0,733	0,697	2,833	2,851	13,3	14,0
		0,729	0,694	2,817	2,836	12,6	13,4
		0,729	0,700	2,817	2,865	12,6	14,6
		0,732	0,696	2,829	2,846	13,1	13,8
		0,730	0,698	2,821	2,856	12,8	14,2
18.5.2004	0,1	0,088	0,163	0,302	0,199	202,0	99,0
		0,091	0,166	0,314	0,214	214,0	114,0
		0,071	0,128	0,236	0,026	136,0	74,0
		0,061	0,121	0,196	-	96,0	-
		0,078	0,122	0,263	-	22,0	-
19.5.2004	0,2	0,078	0,161	0,263	0,190	31,5	5,0
		0,098	0,168	0,342	0,224	71,0	12,0
		0,088	0,149	0,302	0,130	51,0	35,0
		0,090	0,162	0,310	0,195	55,0	2,5
		0,099	0,190	0,346	0,333	73,0	66,5

Tabulka XVIII : Výpočty vztahující se k tabulce XVI (pro 2,4-DCP)

datum	koncentr. (mg/l)	absorbance		vypoč. konc. (mg/l)		vychýlení metody (%)	
		Merck	UNICAM	Merck	UNICAM	Merck	UNICAM
24.8.2004	0,05	0,020	0,132	-	0,024	-	52,0
		0,027	0,134	-	0,033	-	34,0
		0,020	0,133	-	0,028	-	44,0
		0,025	0,134	-	0,033	-	34,0
		0,030	0,136	-	0,042	-	16,0
2.9.2004	0,05	0,017	0,134	-	0,033	-	34,0
		0,030	0,131	-	0,019	-	62,0
		0,025	0,130	-	0,014	-	72,0
		0,026	0,130	-	0,014	-	72,0
		0,020	0,128	-	0,005	-	990,0
6.9.2004	2	0,499	0,509	1,738	1,769	13,1	11,5
		0,492	0,484	1,712	1,653	14,4	17,3
		0,523	0,530	1,828	1,866	8,6	6,7
		0,509	0,580	1,775	2,097	11,2	4,8
		0,553	0,521	1,940	1,824	3,0	8,8

U nízkých koncentrací vzorků se opakovatelnost pracovního postupu nepotvrdila, ale u vysokých koncentrací vzorků tato skutečnost zjištěna byla.

Vychýlení metody je u 4-CP i 2,4-DCP v řípadě nízkých koncentrací vzorků obrovská, takže z tohoto hlediska se jeví metoda jako nevhodná k měření. Nicméně při měření vysokých koncentrací vzorků jsou výsledky uspokojivé.

4.10 Statistické výpočty

Výpočty byly provedeny pro parachlorfenol a uvedeny v příloze 1 podle české normy [25].

ZÁVĚR

Tato práce se zabývá modifikací klasického stanovení AOX, kde místo mikrocoulometrické titrace jsou adsorbovatelné organicky vázané halogeny stanoveny spektrofotometricky ve viditelné oblasti spektra. Diplomová práce též ověřuje funkčnost komerčního kyvetového testu firmy Merck, který není v praxi příliš obvyklý

V diplomové práci byla ověřována kalibrační závislost AOX standardu dodaného firmou Merck a parachlorfenolu, který je používán jako referenční materiál u mikrocoulometrické titrace.

U parachlorfenolu byla kalibrace provedena nejen v pracovní oblasti doporučované výrobcem, která čítá rozpětí 0,05 mg/l – 2,5 mg/l, ale i pod prvním bodem a nad posledním bodem kalibrační křivky. Kalibrace pod hranicí doporučovanou výrobcem byla velmi problematická, korelační koeficienty vyšly nízké a rozptyly výsledků byly velké na to, aby se tento test dal v praxi použít jako analytická metoda. Zřejmě proto výrobce testu nedoporučuje pracovat mimo pracovní oblast.

U AOX standardu byla kalibrační závislost prověřována pouze v rozpětí doporučeném výrobcem.

Stanovením vybraných chlorfenolů v kapalných a pevných matricích metodou plynové chromatografie bylo zjištěno, že dodaný AOX standard neznámého složení obsahuje 2,4-dichlorfenol.

Součástí dodaného testu byl slepý vzorek. Při porovnání absorbancí slepého vzorku dodaného výrobcem a slepého vzorku složeného z Dobré vody byly zjištěny téměř shodné hodnoty a z toho lze usoudit, že dodaný slepý vzorek je zřejmě složen z destilované vody.

Bylo nutné dodržovat daná doporučení, protože výsledky měřené mimo doporučované podmínky jsou nereprodukovatelné a nedají se použít.

Jedním z úkolů bylo porovnání této metody se zavedenou a ověřenou mikrocoulometrickou titrací. Metodou spektrofotometrického stanovení bylo proměřeno 41 reálných vzorků různých typů vod a výsledky byly srovnány s běžně používanou metodou mikrocoulometrické titrace. Ukázalo se, že relace mezi coulometrickým a spektrofotometrickým stanovením jsou dobré, protože se blíží jedničce. Z toho plyne, že metody jsou vzájemně srovnatelné.

Z regulačních diagramů, které byly vedeny na slepé stanovení a při koncentraci 0,05 mg/l lze vysledovat, že stanovení AOX pomocí kyvetového testu firmy Merck je stabilní, hodnoty se pohybují uvnitř regulačních a varovných mezí. Spektrofotometr Merck vykazoval v případě vedení regulačních diagramů dlouhodobě lepší výsledky.

V praxi bylo ověřeno tvrzení výrobce o stabilitě absorbance, které zní, že do 30-ti minut po konci reakční doby hodnota absorbance neklesne o více jak 5%. Až na jednu výjimku byl tento fakt potvrzen.

Opakovatelnost pracovního postupu ukázala funkčnost testu pouze u vzorků obsahujících vysoké koncentrace AOX.

Metoda spektrofotometrického stanovení se v praxi příliš neosvědčila, protože stanovení každého vzorku je poměrně drahé a nepřesné. Další nevýhodou tohoto testu je skutečnost, že je uzpůsoben k měření vysokých koncentrací AOX ve vzorcích, a to od 0,05 mg/l do 2,5 mg/l. Většina vzorků má však koncentrace daleko nižší a pro tuto metodu jsou příliš „čisté“. Problémem se jevil i fakt, že voda nesměla být filtrována a tudíž vzorky, které byly zakalené, nemohly být změřeny.

Porovnání obou metod vyznělo jednoznačně ve prospěch mikrocoulometrické titrace. I když i u této metody vyvstává problém v případě vzorků obsahujících vysoké koncentrace adsorbovatelných organicky vázaných halogenů, protože tato metoda měří v rozsahu 0,01 mg/l až 0,3 mg/l. U vzorků o vysoké koncentraci přichází na řadu ředění, kterým se do měření zavádí chyba..

Pro potřeby laboratoře byl vypracován standardní operační postup a sestrojena aparatura.

Touto diplomovou prací byl zvalidován postup stanovení AOX ve vodných matricích spektrofotometricky ve viditelné oblasti spektra pomocí běžně dostupných komerčních kyvetových testů firmy Merck s adsorpcí na aktivním uhlí. Celá diplomová práce byla završena zpracováním validačního protokolu.

LITERATURA

1. Pitter P.: Hydrochemie. 3. vydání. VŠCHT, Praha 1999.
2. Zýka J. a kol.: Analytická příručka I, II. FN TL, Praha 1972
3. Cremlyn R.: Pesticidy. SN TL, Praha 1985
4. Beran a kol.: Analytická příručka. FN TL, Praha 1972.
5. Vilímc J., Schindler J.: Stanovení AOX ve vodohospodářských laboratořích (VTEI). Výzkumný ústav vodohospodářský T. G. Masaryka, Praha 1991.
6. Koller J., Zavadil E.: Stanovení organických chlorovaných látek metodou AOX. Pobočka České vědeckotechnické vodohospodářské společnosti MŽP ČR, Uherské Hradiště 1992.
7. AOX SOP 21a, VZH.
8. Pracovní manuál. AOX CELL TEST. MERCK KGaA, Darmstad 2003.
9. Suchánek M.: Kvalimetrie (11. Stanovení nejistoty analytického měření). 3. vydání. EURACHEM – ČR. Praha 2001.
10. Suchánek M.: Kvalimetrie (9. Vhodnost analytických metod pro daný účel). EURACHEM – ČR, Praha 1999.
11. Vilímc J.: Zavádění mezinárodních norem v oblasti základního chemického rozboru vod (VTEI). Výzkumný ústav vodohospodářský T. G. Masaryka, Praha 1998.
12. Zákon č. 254/2001 Sb., o vodách a o změně některých zákonů (vodní zákon)
13. Vyhláška č. 428/2001, kterou se provádí zákon č. 274/2001 Sb., o vodovodech a kanalizacích pro veřejnou potřebu a o změně některých zákonů (zákon o vodovodech a kanalizacích)

14. Nařízení vlády č. 61/2003 Sb., přípustné znečištění povrchových a odpadních vod
15. Nařízení vlády č. 71/2003 Sb., kvalita povrchových vod pro život
16. Vyhláška Ministerstva životního prostředí č. 376/2000 Sb., požadavky na pitnou vodu
17. Horáková M., Lischke P., Grunwald A.: Chemické a fyzikální metody analýzy vod. SNTL ALFA, Praha 1986.
18. Pracovní manuál. ECS 1600
19. Zbíral J.: Stanovení AOX v kalech, půdách a odpadech (BULLETIN '96)
20. Kociánová J.: AOX v městských odpadních vodách
www.vscht.cz/tvp/diplomky/1998/kociánová.htm
21. Haltufová I.: Stanovení adsorbovatelného organicky vázaného jodu (AOI)
www.vscht.cz/obsah/vyzkum/sbornik_ftop_2003.doc
22. Zpráva o výsledcích sledování cizorodých látek v resortu zemědělství – situace v roce 2002
23. Vyhláška Ministerstva životního prostředí č. 252/2004 Sb., kterou se stanoví hygienické požadavky na pitnou a teplou vodu a četnost a rozsah kontroly pitné vody
24. Vyhláška Ministerstva životního prostředí č. 187/2005 Sb., kterou se stanoví hygienické požadavky na pitnou a teplou vodu a četnost a rozsah kontroly pitné vody
25. ČSN ISO 8466-1 - Jakost vod (Kalibrace a hodnocení analytických metod a určení jejich charakteristik)
26. ČSN ISO 757051-11 – Odběr vzorků (Pokyny pro odběr vzorků odpadních vod)

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

EN – evropské normy

AOX - adsorbovatelné organicky vázané halogeny

EOX - extrahovatelné organické halogeny

POX - těkavé organické halogeny

UV - ultrafialové záření

VIS - viditelné záření

MŽP ČR - Ministerstvo životního prostředí České republiky

RSD – relativní směrodatná odchylka

SM.VÝB – směrodatná odchylka výběru

A – absorbance

c - koncentrace

TERMÍNY A DEFINICE

Parametr = ukazatel

Pesticidy – organické insekticidy, herbicidy, fungicidy, nematocidy, akaricidy, atd.

Referenční materiál – materiál nebo látka, jejíž jedna nebo více hodnot vlastností je dostatečně homogenní a dobře stanovená, aby mohl(a) být použit(a) ke kalibraci přístroje, posouzení měřicí metody nebo k přiřazení hodnot materiálům. Tento termín popisuje materiály, které jsou často nazývány standardy k měření, t.j. chemické látky použité pro kalibrační a identifikační účely [11].

CRM - certifikovaný referenční materiál – referenční materiál doprovázený certifikátem, jehož jedna nebo více hodnot vlastností je certifikována postupem, který ustanovuje návaznost na správnou realizaci jednotky v níž jsou hodnoty vlastností vyjádřeny, a jehož každá certifikovaná hodnota je doprovázena nejistotou na uvedené konfidenční úrovni [11].

Standard – má dvojí kontext

- standard k měření – ve smyslu referenční materiál
- normalizované metody – vztahuje se k normám [11].

Slepé stanovení = blank

Měření – soubor činností, jejichž cílem je stanovit hodnotu veličiny [11].

Měřená veličina – konkrétní veličina, která je předmětem měření [11].

Metoda měření – logický sled po sobě následujících genericky posloupně popsaných činností, které jsou používány při měřeních [11].

Postup měření – soubor specificky popsaných činností, které jsou používány při měření danou metodou. Postup měření se obvykle popisuje v dokumentu, který je někdy nazýván

Postup měření nebo Metodika měření a je uveden dostatečně podrobně, aby umožnil pracovníkovi provést měření bez dalších informací [11].

Výsledek měření – hodnota získaná měřením přisouzená měřené veličině [11].

Validace – potvrzení zkoumáním a poskytnutí objektivního důkazu, že jsou splněny jednotlivé požadavky pro specifické zamýšlené použití [11].

Validace metody –

1. Proces potvrzení výkonostních charakteristik a omezení identifikace vlivů, které mohou tyto charakteristiky změnit a do jaké míry.

2. Proces ověření, že metoda je vhodná pro daný účel, t.j. pro řešení určitého analytického problému [11].

Validace instrumentace – popis procesu který potvrzuje, že je přístroj v daném okamžiku schopen funkce v souladu s plánovanou specifikací [11].

Vertifikace – ověření již ověřeného postupu (je funkční), validace v určitých podmínkách. Je to někým navržená metoda a v laboratoři se odskouší, jestli to funguje, jak má (existuje norma).

Pracovní (měřicí) rozsah – soubor hodnot měřených veličin, pro něž leží chyba měřícího zařízení uvnitř stanovených mezí. Rozmezí koncentrací, ve kterých se dá stanovit analyt s přijatelnou správností a přesností. Pracovní rozsah nemusí být nutně lineární. Je měřena odezva signálu na koncentraci standardu v co nejširším rozmezí [11].

Linearita – definuje schopnost metody poskytnout výsledky zkoušky přímo úměrné ke koncentraci analytu. Lineární rozsah je odvozován od rozsahu koncentrací analytu, ve kterém poskytuje metoda výsledky zkoušky úměrné koncentraci analytu [11].

Citlivost – podíl změny výstupního signálu měřícího přístroje a odpovídající změny vstupního signálu. [11].

Citlivost měřícího přístroje – schopnost měřícího přístroje reagovat na malé změny hodnoty podnětu. [11].

Práh citlivosti – nejmenší změna podnětu, který způsobí pozorovatelnou změnu odezvy měřicího přístroje [11].

Mez detekce – nejnižší obsah, který může být měřen s rozumnou statistickou jistotou. Nejnižší koncentrace analytu, která může být za podmínek zkoušky detekována, ale ne nutně kvantifikována. [11].

Mez stanovitelnosti - nejnižší koncentrace analytu stanovená s přijatelnou přesností (opakovatelností) a správností [11].

Správnost - míra těsnosti mezi získanou a skutečnou hodnotou analytu. Analyzuje se vhodný referenční materiál, tam kde není dostupný, se pak stanovuje metodou přidavku standardu [11].

Správnost měřicího přístroje – schopnost měřicího přístroje poskytovat odezvu těsně u skutečné hodnoty. V tomto kontextu je správnost kvalitativním pojmem. [11].

Přesnost – těsnost shody mezi nezávislými výsledky zkoušek získanými za předem specifikovaných podmínek. Míra reprodukovatelnosti měření v rámci daného souboru, což je rozptýlení souboru okolo jeho centrální hodnoty [11].

Jakost – celkový souhrn vlastností a znaků produktu nebo služby, které ovlivňují jejich schopnost uspokojovat stanovené a předpokládané potřeby. [11].

Opakovatelnost – přesnost za podmínek opakovatelnosti [11].

Reprodukovatelnost – přesnost za podmínek reprodukovatelnosti (jiný analytik, jiné zařízení, stejná laboratoř, rozsáhlý časový interval), t.j. typ přesnosti za změněných podmínek [11].

Specifičnost – schopnost metody měřit pouze to, co je v úmyslu měřit. Udává rozsah koncentrace, ve kterém je analyt stanovený ve směsi ostatních látek. Při sledování specifičnosti je třeba sledovat výtěžnost v různých komplexních (reálných) matricích [11].

Směrodatná odchylka – míra rozptýlení hodnoty kolem střední hodnoty v rozdělení hodnot [11].

Konfirmace identity - potvrzení, že signál lze přiřadit danému analytu a nepochází od rušivých vlivů [11].

Robustnost - vyjadřuje necitlivost metody k různým rušivým vlivům. Patří k základním validačním parametrům. Postup je matematicko – statistický. Experimentálně se určuje úmyslným zanášením malých změn do standardního operačního postupu [11].

Odchylka – rozdíl mezi střední hodnotou výsledků zkoušek a přijatou referenční hodnotou. Odchylka je celková systematická chyba v protikladu k náhodné chybě. Charakterizuje systematickou chybu daného analytického postupu odchylkou střední hodnoty analytického výsledku od skutečné hodnoty [11].

Střední hodnota – odsouhlasená referenční hodnota sloužící pro porovnání. Vznikne z nekonečného počtu měření téže veličiny uskutečněných za podmínek opakovatelnosti [11].

Skutečná hodnota – odpovídá definici dané specifikované veličiny.

Rozdíl mezi střední hodnotou (μ) a skutečnou hodnotou (τ) : $\Delta = \mu - \tau$ [11].

Kalibrační křivka – grafické znázornění měřeného signálu jako funkce množství analytu. [11].

Nejistota (nejistota měření) - parametr přidružený k výsledku měření, který charakterizuje rozptýlení hodnot, které mohou být důvodně přisuzovány k měřené veličině. Tímto parametrem může být např. směrodatná odchylka (nebo její násobek) nebo šířka intervalu spolehlivosti. Nejistota měření obecně sestává z mnoha složek. V mnoha případech chemické analýzy bude měřenou veličinou koncentrace (jakýkoliv udaný výraz o koncentraci hmotnostní, látkového množství, objemové nebo procentuální). Chemická analýza je však používána i pro měření jiných veličin, např. barvy, pH apod. Výše uvedená

definice nejistoty je zaměřena na takový rozsah hodnot, o kterém se analytik důvodně domnívá, že ho lze přiřadit měřené veličině [10].

- zdroje nejistoty - v praxi může pocházet nejistota výsledku z mnoha možných zdrojů, mezi něž lze např. uvést nejasnou definici, vzorkování, matricové vlivy a interference, vliv podmínek a prostředí, nejistoty hmotnostních a objemových měřidel, referenční hodnoty, aproximace a předpoklady, které jsou součástí měřicí metody a měřícího postupu, a náhodnou variabilitu [10].

- složky nejistoty - při odhadu celkové nejistoty je vždy nezbytné uvážit každý zdroj nejistoty a vyhodnotit odděleně příspěvek z toho zdroje, každý z dílčích příspěvků je nazýván složkou nejistoty (je-li vyjádřena ve formě směrodatné odchylky, hovoříme o standardní nejistotě), pro výsledek měření se celková nejistota nazývá kombinovanou standardní nejistotou, která je rovna odhadu směrodatné odchylky [10].

Chyba - rozdíl mezi výsledkem měření a skutečnou hodnotou měřené veličiny, chyba má diskrétní hodnotu, v podstatě lze známou hodnotu chyby použít ke korelaci výsledku [11].

Náhodná chyba – rozdíl mezi výsledkem měření a střední hodnotou.

Rozdíl mezi pozorovanou hodnotou (x_i) a mezní střední hodnotou (μ) : $\delta = x_i - \mu$ [11].

Systematická chyba – střední hodnota, která by vznikla z nekonečného počtu měření téže veličiny uskutečněných za podmínek opakovatelnosti, minus skutečná hodnota veličiny.

PŘÍLOHA 1

Ukázka statistických výpočtů pro parachlorfenol

V potaz bylo bráno pouze pět hodnot jak prvního (0,05 mg/l) tak posledního (2,5 mg/l) bodu kalibrační křivky, protože opakovatelnost se měří v krátkém časovém úseku, nejlépe v jeden den. V tomto případě šlo o hodnoty měřené v rozpětí jednoho týdne.

Spektrofotometr Merck

Testování homogenity rozptylů

Tabulka XIX : Záznamový list kalibračních údajů

i	$c_{i,1}$	$A_{i,1}$	$A_{i,2}$	$A_{i,3}$	$A_{i,4}$	$A_{i,5}$
1	0,05	0,044	0,042	0,05	0,048	0,049
2	0,1	0,071				
3	0,2	0,088				
4	0,3	0,094				
5	0,5	0,173				
6	0,75	0,266				
7	1	0,309				
8	1,5	0,475				
9	2	0,566				
10	2,5	0,687	0,671	0,697	0,702	0,733

Tabulka XX : Záznamový list údajů pro jednoduchou lineární regresi

i	c_i	c_i^2	c_i	c_i^2	$c_i \cdot A_i$
1	0,05	0,0025	0,14	0,0196	0,007
2	0,1	0,01	0,281	0,078961	0,0281
3	0,2	0,04	0,405	0,164025	0,081
4	0,3	0,09	0,535	0,286225	0,1605
5	0,5	0,25	0,662	0,438244	0,331
6	0,75	0,5625	0,789	0,622521	0,59175
7	1	1	0,916	0,839056	0,916
8	1,5	2,25	1,058	1,119364	1,587
9	2	4	1,173	1,375929	2,346
10 = N	2,5	6,25	1,303	1,697809	3,2575
Σ		14,455		6,641734	9,30585

Tabulka XXI : Záznamový list údajů k analýze rozptylu

i	c _i	A _{i,1}	A _{i,2}	A _{i,3}	A _{i,4}	A _{i,5}	SM.VÝB.	SM.VÝB. ²
1	0,05	0,044	0,042	0,05	0,048	0,049	0,003435	1,18.10 ⁻⁵
10	2,5	0,687	0,671	0,697	0,702	0,733	0,022869	0,000523

Tabulka XXII : Výpočet směrodatné odchylky základního souboru

i	c _i	A _{i,1}	A _{i,2}	A _{i,3}	A _{i,4}	A _{i,5}	RSD	RSD ²
1	0,05	0,044	0,042	0,05	0,048	0,049	0,003072	9,44.10 ⁻⁶
10	2,5	0,687	0,671	0,697	0,702	0,733	0,020455	0,0004184

Testová hodnota pro F-test (poměr rozptylů): PG = 44,3

$$F_{0,05}(4;9) = 6,6558$$

$$F_{0,01}(4;9) = 6,6558$$

Tabulka XXIII : Kritická hodnota rozdělení F na hladině 95%

hladina	tabulková hodnota	vypočítaná hodnota
99%	6,422056	6,6558
95%	3,63309	6,6558

Metoda je v obou případech sice lineární, protože vypočítané F je v případě hladiny 99% nižší než F-kritické z tabulek a na hladině 95% je to těsné, protože vypočítané F je vyšší o 2 desetiny.

Výpočet parametrů přímky

Tabulka XXIV

i	c _i	A _i	c _i -c ⁻	A _i -A ⁻	(c _i -c ⁻) ²	(c _i -c ⁻)*(A _i -A ⁻)
1	0,05	0,044	-1,01111	-0,27628	1,022346	0,279348
2	0,05	0,042	-1,01111	-0,27828	1,022346	0,28137
3	0,05	0,05	-1,01111	-0,27028	1,022346	0,273281
4	0,05	0,048	-1,01111	-0,27228	1,022346	0,275303
5	0,05	0,049	-1,01111	-0,27128	1,022346	0,274292
6	0,1	0,071	-0,96111	-0,24928	0,923735	0,239584
7	0,2	0,088	-0,86111	-0,23228	0,741512	0,200017
8	0,3	0,094	-0,76111	-0,22628	0,57929	0,172223
9	0,5	0,173	-0,56111	-0,14728	0,314846	0,082639
10	0,75	0,266	-0,31111	-0,05428	0,09679	0,016886
11	1	0,309	-0,06111	-0,01128	0,003735	0,000689
12	1,5	0,475	0,438889	0,154722	0,192623	0,067906
13	2	0,566	0,938889	0,245722	0,881512	0,230706
14	2,5	0,733	1,438889	0,412722	2,070401	0,593861

i	c_i	A_i	$c_i \cdot c^-$	$A_i \cdot A^-$	$(c_i \cdot c^-)^2$	$(c_i \cdot c^-) \cdot (A_i \cdot A^-)$
15	2,5	0,702	1,438889	0,381722	2,070401	0,549256
16	2,5	0,697	1,438889	0,376722	2,070401	0,542061
17	2,5	0,671	1,438889	0,350722	2,070401	0,50465
18	2,5	0,687	1,438889	0,366722	2,070401	0,527673
průměr	1,061111	0,320278				

Tabulka XXV: Hodnota směrnice b jako míra citlivosti

$\Sigma(c_i - \bar{c}) * (A_i - \bar{A})$	$\Sigma(c_i - \bar{c})^2$	b	a
5,111744	19,19778	0,266268	0,037738

Z tabulky se odvodí výpočet : $y^{\wedge} = a + b * c^{-} = 0,32078$

Hodnota směrodatné odchylky metody $s_{x_0} = 0,011392$

Hodnota variačného koeficientu metódy $V_{x_0} = 1,073568\%$

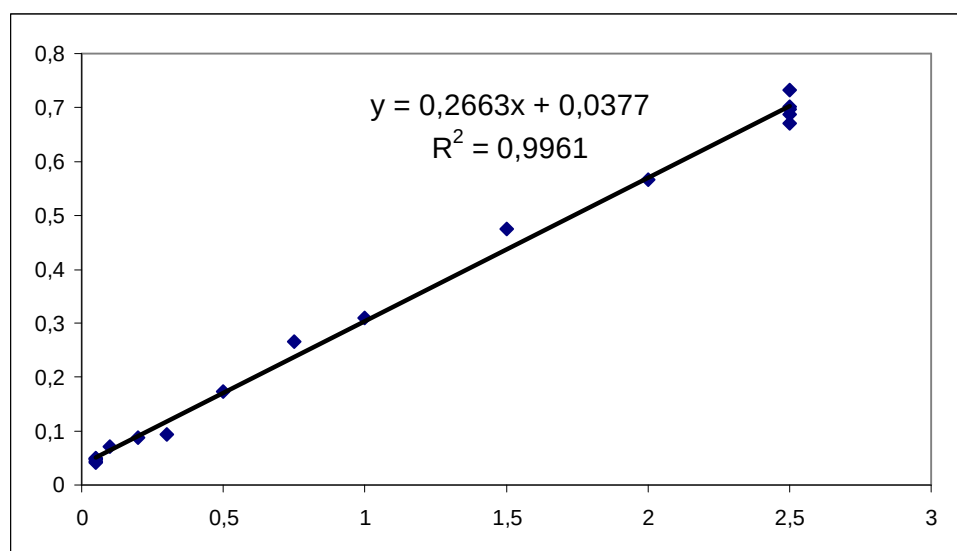
Tabulka XXVI : Hodnota reziduální směrodatné odchylky s_v

[illegible]

Lineární rovnice

Tabulka XXVII

i	c_i	A_i
1	0,05	0,044
2	0,05	0,042
3	0,05	0,05
4	0,05	0,048
5	0,05	0,049
6	0,1	0,071
7	0,2	0,088
8	0,3	0,094
9	0,5	0,173
10	0,75	0,266
11	1	0,309
12	1,5	0,475
13	2	0,566
14	2,5	0,733
15	2,5	0,702
16	2,5	0,697
17	2,5	0,671
18	2,5	0,687
průměr	1,061111	0,320278



Obr. 17 Lineární regrese vypočítaná na základě hodnot z předcházející tabulky

Tabulka XXVIII : Hodnota reziduální směrodatné odchylky s_y

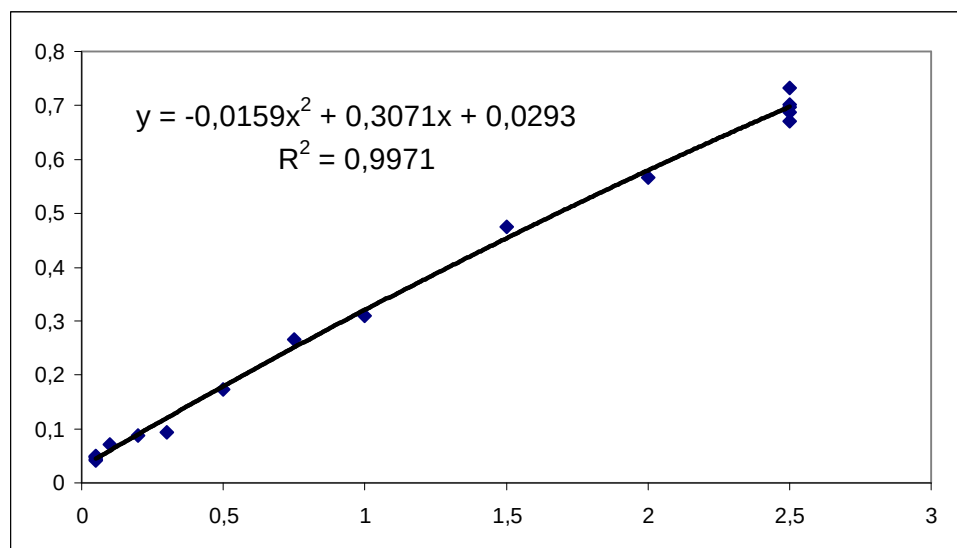
$A_i - A_i^{\wedge}$	$(A_i - A_i^{\wedge})^2$	$\Sigma(A_i - A_i^{\wedge})^2 / (N-2)$	s_y
-2,69896	7,284406	7,009778	0,026476
-2,70096	7,295206		
-2,69296	7,252055		
-2,69496	7,26283		
-2,69396	7,257441		
-2,67196	7,139391		
-2,65496	7,048833		
-2,64896	7,01701		
-2,56996	6,604714		
-2,47696	6,13535		
-2,43396	5,92418		
-2,26796	5,14366		
-2,17696	4,739172		
-2,00996	4,039955		
-2,04096	4,165534		
-2,04596	4,185968		
-2,07196	4,293034		
-2,05596	4,226988		
-2,74296	7,523851		
-2,74296	7,523851		
-2,74296	7,523851		
-2,74296	7,523851		
-2,74296	7,523851		
-2,74296	7,523851		
-2,74296	7,523851		
-2,74296	7,523851		
-2,74296	7,523851		
-2,74296	7,523851		
-2,74296	7,523851		
-2,74296	7,523851		

Kvadratická rovnice

Tabulka XXIX

i	c_i	A_i
1	0,05	0,044
2	0,05	0,042
3	0,05	0,05
4	0,05	0,048
5	0,05	0,049
6	0,1	0,071
7	0,2	0,088
8	0,3	0,094
9	0,5	0,173
10	0,75	0,266
11	1	0,309

i	c _i	A _i
12	1,5	0,475
13	2	0,566
14	2,5	0,733
15	2,5	0,702
16	2,5	0,697
17	2,5	0,671
18	2,5	0,687
průměr	1,061111	0,320278



Obr. 18 Rovnice polynomu vypočítaná na základě hodnot z předcházející tabulky

Tabulka XXX : Hodnota reziduální směrodatné odchylky s_y

$A_i - A_i^{\wedge}$	$(A_i - A_i^{\wedge})^2$	$(A_i - A_i^{\wedge})^2 / (N-2)$	Σs_y
-2,63566	6,946688	6,668156	0,025823
-2,63766	6,957234		
-2,62966	6,915096		
-2,63166	6,925619		
-2,63066	6,920356		
-2,60866	6,805091		
-2,59166	6,716686		
-2,58566	6,685622		
-2,50666	6,283329		
-2,41366	5,82574		
-2,37066	5,620015		
-2,20466	4,860512		
-2,11366	4,467546		
-1,94666	3,789473		
-1,97766	3,911127		
-1,98266	3,930929		

$A_i - A_i^{\wedge}$	$(A_i - A_i^{\wedge})^2$
-2,00866	4,034703
-1,99266	3,970682
-2,67966	7,180562
-2,67966	7,180562
-2,67966	7,180562
-2,67966	7,180562
-2,67966	7,180562
-2,67966	7,180562
-2,67966	7,180562
-2,67966	7,180562
-2,67966	7,180562
-2,67966	7,180562
-2,67966	7,180562

Spektrofotometr UNICAM

Testování homogenity rozptylů

Tabulka XXXI : Záznamový list kalibračních údajů

i	$c_{i,1}$	$A_{i,1}$	$A_{i,2}$	$A_{i,3}$	$A_{i,4}$	$A_{i,5}$
1	0,05	0,149	0,135	0,15	0,147	0,158
2	0,1	0,128				
3	0,2	0,149				
4	0,3	0,268				
5	0,5	0,224				
6	0,75	0,289				
7	1	0,328				
8	1,5	0,448				
9	2	0,542				
10	2,5	0,658	0,646	0,669	0,685	0,699

Tabulka XXXII : Záznamový list pro jednoduchou lineární regresi

i	c_i	c_i^2	A_i	A_i^2	$c_i \cdot A_i$
1	0,05	0,0025	0,14	0,0196	0,007
2	0,1	0,01	0,281	0,078961	0,0281
3	0,2	0,04	0,405	0,164025	0,081
4	0,3	0,09	0,535	0,286225	0,1605
5	0,5	0,25	0,662	0,438244	0,331
6	0,75	0,5625	0,789	0,622521	0,59175
7	1	1	0,916	0,839056	0,916
8	1,5	2,25	1,058	1,119364	1,587
9	2	4	1,173	1,375929	2,346
10 = N	2,5	6,25	1,303	1,697809	3,2575
Σ		14,455		6,641734	9,30585

Tabulka XXXIII: Záznamový list údajů k analýze rozptylu

i	c_i	$A_{i,1}$	$A_{i,2}$	$A_{i,3}$	$A_{i,4}$	$A_{i,5}$	SM.VÝB.	SM.VÝB. ²
1	0,05	0,149	0,135	0,15	0,147	0,158	0,008289	$6,87 \cdot 10^{-5}$
10	2,5	0,658	0,646	0,669	0,685	0,699	0,021078	0,0004443

Tabulka XXIV : Výpočet směrodatné odchylky základního souboru

i	c_i	$A_{i,1}$	$A_{i,2}$	$A_{i,3}$	$A_{i,4}$	$A_{i,5}$	RSD	RSD ²
1	0,05	0,149	0,135	0,15	0,147	0,158	0,007414	$5,496E \cdot 10^{-5}$
10	2,5	0,658	0,646	0,669	0,685	0,699	0,018853	0,00035544

Testová hodnota pro F-test (poměr rozptylů): $PG = 6,5$

$$F_{0,05}(4;9) = 2,5495$$

$$F_{0,01}(4;9) = 2,5495$$

Tabulka XXIII : Kritická hodnota rozdělení F na hladině 95%

hladina	tabulková hodnota	vypočítaná hodnota
99%	6,422056	2,5495
95%	3,63309	2,5495

Metoda je lineární, protože vypočítané F je v obou případech nižší než F-kritické z tabulek.

Výpočet parametrů přímky

Tabulka XXXVI

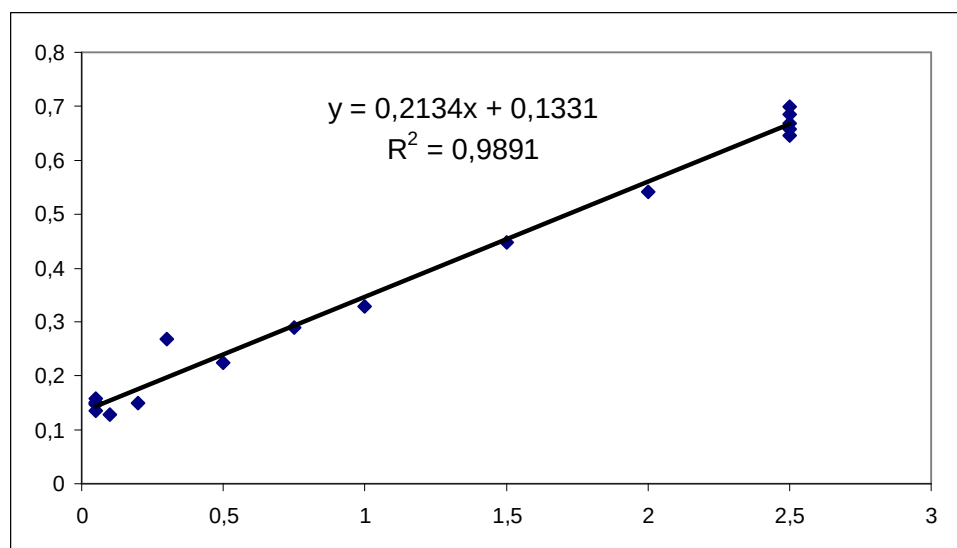
i	c_i	A_i	$c_i - \bar{c}$	$A_i - \bar{A}$	$(c_i - \bar{c})^2$	$(c_i - \bar{c}) \cdot (A_i - \bar{A})$
1	0,05	0,149	-1,01111	-0,17128	1,022346	0,173181
2	0,05	0,135	-1,01111	-0,18528	1,022346	0,187336
3	0,05	0,15	-1,01111	-0,17028	1,022346	0,17217
4	0,05	0,147	-1,01111	-0,17328	1,022346	0,175203
5	0,05	0,158	-1,01111	-0,16228	1,022346	0,164081
6	0,1	0,128	-0,96111	-0,19228	0,923735	0,1848
7	0,2	0,149	-0,86111	-0,17128	0,741512	0,147489
8	0,3	0,268	-0,76111	-0,05228	0,57929	0,039789
9	0,5	0,224	-0,56111	-0,09628	0,314846	0,054023
10	0,75	0,289	-0,31111	-0,03128	0,09679	0,009731
11	1	0,328	-0,06111	0,007722	0,003735	-0,00047
12	1,5	0,448	0,438889	0,127722	0,192623	0,056056
13	2	0,542	0,938889	0,221722	0,881512	0,208173

$A_i - A_i^{\wedge}$	$(A_i - A_i^{\wedge})^2$
-0,32028	0,102578
-0,32028	0,102578
-0,32028	0,102578

Lineární rovnice

Tabulka IXL

i	c_i	A_i
1	0,05	0,149
2	0,05	0,135
3	0,05	0,15
4	0,05	0,147
5	0,05	0,158
6	0,1	0,128
7	0,2	0,149
8	0,3	0,268
9	0,5	0,224
10	0,75	0,289
11	1	0,328
12	1,5	0,448
13	2	0,542
14	2,5	0,658
15	2,5	0,646
16	2,5	0,669
17	2,5	0,685
18	2,5	0,699
průměr	1,061111	0,359556



Obr. 19 Lineární regrese vypočítaná na základě hodnot z předcházející tabulky

Tabulka XL : Hodnota reziduální směrodatné odchylky s_y

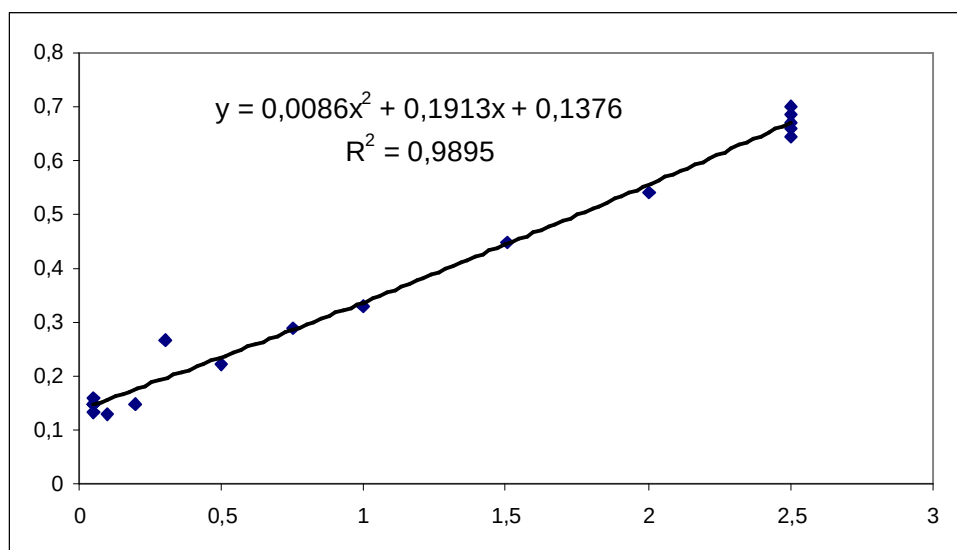
$A_i - A_i^{\wedge}$	$(A_i - A_i^{\wedge})^2$	$\Sigma(A_i - A_i^{\wedge})^2 / (N-2)$	s_y
-2,59396	6,728649	6,860547	0,026193
-2,60796	6,801476		
-2,59296	6,723462		
-2,59596	6,739029		
-2,58496	6,682038		
-2,61496	6,838036		
-2,59396	6,728649		
-2,47496	6,125446		
-2,51896	6,345179		
-2,45396	6,021939		
-2,41496	5,832051		
-2,29496	5,266859		
-2,20096	4,844242		
-2,08496	4,347074		
-2,09696	4,397258		
-2,07396	4,301326		
-2,05796	4,235215		
-2,04396	4,177788		
-2,74296	7,523851		
-2,74296	7,523851		
-2,74296	7,523851		
-2,74296	7,523851		
-2,74296	7,523851		
-2,74296	7,523851		
-2,74296	7,523851		
-2,74296	7,523851		
-2,74296	7,523851		
-2,74296	7,523851		
-2,74296	7,523851		
-2,74296	7,523851		

Kvadratická rovnice

Tabulka XLI

i	c_i	A_i
1	0,05	0,149
2	0,05	0,135
3	0,05	0,15
4	0,05	0,147
5	0,05	0,158
6	0,1	0,128
7	0,2	0,149
8	0,3	0,268
9	0,5	0,224
10	0,75	0,289
11	1	0,328

i	c _i	A _i
12	1,5	0,448
13	2	0,542
14	2,5	0,658
15	2,5	0,646
16	2,5	0,669
17	2,5	0,685
18	2,5	0,699
průměr	1,061111	0,359556



Obr. 20 Rovnice polynomu vypočítaná na základě hodnot z předcházející tabulky

Tabulka XLII : Hodnota reziduální směrodatné odchylky s_y

$A_i - A_i^{\wedge}$	$(A_i - A_i^{\wedge})^2$	$\Sigma(A_i - A_i^{\wedge})^2 / (N-2)$	s_y
-2,53066	6,404225	6,522368	0,025539
-2,54466	6,475279		
-2,52966	6,399165		
-2,53266	6,414351		
-2,52166	6,358754		
-2,55166	6,510953		
-2,53066	6,404225		
-2,41166	5,816089		
-2,45566	6,030251		
-2,39066	5,715241		
-2,35166	5,530291		
-2,23166	4,980293		
-2,13766	4,569577		
-2,02166	4,087097		
-2,03366	4,135761		
-2,01066	4,042742		
-1,99466	3,978657		

[illegible]

PŘÍLOHA 2

Standardní operační postup (SOP)

1. Název metody

Stanovení adsorbovatelných organicky vázaných halogenů ve vodě pomocí kyvetové spektrofotometrické metody s adsorpcí na aktivním uhlí.

2. Oblast použití

Postup je vhodný pro stanovení organicky vázaných halogenů absorbujících se na aktivním uhlí. Používá se pro účely kontroly jakosti vody – pitné, povrchové a odpadní. V těchto matricích je možno stanovit hmotnostní koncentrace organicky vázaného chloru, bromu a jodu (vyjádřeno jako chlorid) adsorbovatelných na aktivní uhlí.

Rušivé vlivy :

Vysoké hodnoty AOX může působit přítomný aktivní chlor. Reakci tohoto oxidačního činidla s organickými látkami ve vzorku a s aktivním uhlím lze zabránit siřičitanem sodným, který se přidává ihned po odběru.

Vzorky, které obsahují živé buňky (například mikroorganismy nebo řasy), mohou poskytovat zvýšené výsledky vzhledem k tomu, že obsahují chloridy. V těchto případech se vzorek analyzuje až 8 h po okyselení.

1,1,2-trifluortrichlorethan (freon)

3. Bezpečnostní opatření

Při obsluze přístrojů SPEKTROFOTOMETR UNICAM 5625 a SPEKTROFOTOMETR SQ 118 je nutno postupovat a dodržovat bezpečnostní opatření podle příruček.

Při práci s koncentrovanými kyselinami je nutno použít ochranné rukavice a brýle.

Pracovník je povinen dodržovat obecné zásady bezpečnosti práce a ochrany zdraví při práci v chemické laboratoři. Pracovník je proškolen o Zákonu č. 157 Sb., o chemických látkách a přípravcích a souvisejících předpisů v platném znění. Je povinen dodržovat pokyny autorizované osoby při nakládání s chemickými látkami a přípravky. Pracovník má k dispozici bezpečnostní a materiálový list k chemikáliím, které k metodě používá. Zná obsah bezpečnostních vět (R+S věty), kterými jsou chemikálie označeny a tyto pokyny je povinen dodržovat.

Likvidace odpadů v laboratoři se řídí směrnicí odpadového hospodářství akciové společnosti Vodní zdroje Holešov.

4. Definice

AOX – adsorbovatelné organicky vázané halogeny (ekvivalentní hmotnost chloru, bromu a jodu obsažená v organických sloučeninách, vyjádřená jako chloridy).

Spektrofotometrie – optická metoda založená na principu sledování interakce elektromagnetického záření s atomy a molekulami analyzované látky.

Lambertův – Beerův zákon – vyjadřuje vztah mezi absorbovaným zářivým tokem, tloušťkou absorbujícího prostředí a koncentrací absorbujícího prostředí.

5. Princip

Princip metody je založen na zeslabení světelného toku po průchodu monochromatického paprsku zbarveným roztokem. Z velikosti absorpce pak lze určit koncentraci.

AOX jsou adsorbovány aktivním uhlím a poté po vymytí jakýchkoliv adherujících anorganických halogenů rozloženy. Výsledné halogeny se následně stanovují fotometricky.

6. Činidla a materiály

Všechna připravená činidla jsou označena názvem roztoku, datem přípravy a jménem pracovníka, který roztok připravoval. Pokud není uvedeno jinak, chemikálie se používají do spotřebování.

Ke kalibraci se používá referenční materiál parachlorfenol od firmy Merck (6.5.).

6.1. Speciální voda – voda prostá stanovovaných analytů, např. balená pitná voda pod obchodním označením Dobrá voda (nesycená CO₂, modrý uzávěr).

6.2. Slepý vzorek – MERCK, kyveta s bílým šroubovacím víčkem (je nezbytný pouze při používání spektrofotometru SQ 118).

6.3. Slepý vzorek – vlastní, speciální voda.

6.4. Siřičitan sodný, roztok, $c(\text{Na}_2\text{SO}_3) = 1 \text{ mol/l}$.

V odměrné baňce na 1000 ml (7.11.) se ve speciální vodě (6.1.) rozpustí 126 g siřičitanu sodného (Na₂SO₃). Objem se doplní po rysku speciální vodou (6.1.).

6.5. Parachlorfenol, referenční materiál, podle normy DIN 38409-H 14, AOX = 194 – 206 mg/l, dodavatel firma MERCK. Skladuje se v lednici při 4°C..

6.6. Parachlorfenol, pracovní roztok, AOX = 2,5 mg/l

Do odměrné baňky na 1000 ml (7.11.) naplněné z poloviny speciální vodou (6.1.) se pipetou (7.5.) převede 12,5 ml referenčního materiálu (6.4.) pod hladinu a doplní se po rysku speciální vodou (6.1.). Pracovní roztok se může skladovat v lednici při 4°C jeden měsíc.

6.7. Hydroxid sodný, roztok, $c(\text{NaOH}) = 1 \text{ mol/l}$

V odměrné baňce na 1000 ml (7.12.) se ve speciální vodě rozpustí 40 g hydroxidu sodného (NaOH) p. a. a doplní se po rysku speciální vodou (6.1.). Skladuje se v lednici při 4°C.

6.8. Kyselina dusičná (HNO₃), roztok, c(HNO₃) = 1 mol/l

Do odměrné baňky na 1000 ml (7.11.) naplněné z poloviny speciální vodou se pipetou (7.5.) přidá 10 ml kyseliny dusičné (6.10.) a doplní se po rysku speciální vodou (6.1.). Skladuje se v lednici při 4°C.

6.9. Hydroxid sodný, NaOH.

6.10. Kyselina dusičná, HNO₃, koncentrovaná.

6.11. Kyselina sírová, H₂SO₄, koncentrovaná.

6.12. Činidlo AOX-1.

6.13. Činidlo AOX-2.

6.14. Činidlo AOX-3. .

6.15. Činidlo AOX-4.

6.16. Činidlo AOX-5.

6.17. Činidlo AOX-6. .

6.18. Činidlo AOX-1K.

6.19. AOX standard

7. Přístroje a vybavení

7.1. Přístroj SPEKTROFOTOMETR UNICAM 5625 (průtokový)

7.2. Přístroj SPEKTROFOTOMETR SQ 118 (kyvetový)

7.3. Odměrný válec 100 ml na odměřování vzorku

7.4. Automatická pipeta (pístová) 1-5 ml

7.5. Pipeta 10 ml

7.6. Pipeta 20 ml

7.7. Pipeta 25 ml

7.8. Mikrostříkačka, (Hamilton) 500 μm

7.9. Pipeta, (Transferpette) 200 μm

7.10. Univerzální indikátorové papírky pro měření pH 0 – 12

7.11. Odměrné baňky 25 ml, 100 ml, 1000 ml

7.12. Skleněná vzorkovnice se zábrusem, 250 ml

7.13. Skleněná nálevka

7.14. Modrá mikrolžička, 50-60 mg

7.15. Skleněná kádinka, 100 ml

7.16. Plastová stříkačka, 10 ml

7.17. Zelená mikrolžička

7.18. Pipeta 10 ml, dělená

7.19. Skleněná dělička, 250 ml

7.20. Plastová špička, 10 ml

7.21. Plastová spojka

7.22. Termoreaktor Spectroquant TR 320

7.23. Pipeta 40 ml

7.24. Stojánek

7.25. Držák

7.26. Plastové kolony

7.27. Kyveta

7.28. Rozkladná kyveta - zkumavka válcovitého tvaru z borosilikátového skla s plastovým uzávěrem s teflonovým těsněním (16 x 100 mm)

7.29. Reagenční kyveta - zkumavka válcovitého tvaru z borosilikátového skla s plastovým uzávěrem s teflonovým těsněním (16 x 100 mm)

7.30. Zátka na kolonu

7.31. Kovová jehla

8. Vzorky a vzorkování

Konzervace vzorku po odběru a před analýzou se provádí podle souvisejícího dokumentu (SD 581 příjem a konzervace vodných vzorků), příprava vodného výluhu podle souvisejícího dokumentu (SD 583 příprava vodného výluhu).

K odběru se používají skleněné vzorkovnice 250 ml se zábrusem (7.13). Vzorky vod se fixují 2,5 ml siřičitanu sodného (6.4.) a 1 ml kyseliny dusičné (6.10.). Vzorek se analyzuje co nejdříve po odběru. Jestliže to není možné a je nutno vzorek uchovávat, skladuje se v lednici při 4°C (dle souvisejícího dokumentu SD 21). Před analýzou se vzorek dvě hodiny temperuje při laboratorní teplotě.

9. Kalibrace

Do osmi odměrných baňek na 100 ml (7.4.) se postupně odpipetuje 2 ml (7.4.), 4 ml (7.4.), 8 ml (7.18.), 20 ml (7.6.), 30 ml (7.6. a 7.5.), 40 ml (7.23.), 60 ml (7.6. a 7.23.), 80 ml (7.23.) a 100 ml pracovního roztoku (6.6.) a objemy se doplní po rysku speciální vodou (6.1.).

Hmotnostní koncentrace AOX těchto roztoků jsou 0,05 mg/l, 0,1 mg/l, 0,2 mg/l, 0,5 mg/l, 7,5 mg/l, 1,0 mg/l, 1,5 mg/l, 2,0 mg/l a 2,5 mg/l. Tyto roztoky pro ověření postupu se připravují vždy čerstvé.

Ověření se provádí 2 x ročně a při každé závažnější změně na přístroji nebo změně chemikálií. Výsledky se zapisují do provozního deníku.

10. Zabezpečení a řízení jakosti

Zabezpečení jakosti v laboratoři je realizováno zásadami obsaženými v souvisejícím dokumentu (SD 591 řízení jakosti).

Pracovník je povinen při analýze postupovat tak, aby zabránil vzájemné kontaminaci vzorků. Zpravidla analyzuje stejné očekávané čistoty v jedné dávce a postupuje od vzorků relativně čistých ke vzorkům znečištěným. V odůvodněných případech se používá zvláštní sada chemického nádobí na kontaminované vzorky.

11. Příprava

Musí se dbát na ochranu očí.

Kyvety při fotometrickém měření musí být čisté. V případě potřeby se otřou čistým, suchým hadříkem.

Láhve s činidly se musí ihned po použití uzavřít.

Naměřené výsledky lze oficiálně uznat pod podmínkou, že jsou dodržovány zásady zjištění analytické jakosti (ATV M 704).

Zakalení roztoku způsobuje vykazání falešných hodnot.

Barva měřeného roztoku zůstává stabilní pouze po krátkou dobu. Po 15 minutách se naměřené hodnoty mírně snižují a po 30 minutách se snižují o více než 5 %.

Odpadní voda se nechá usadit. Nefiltruje se! Pro zakoncentrování je potřeba 100 ml odpadní vody bez suspenze (11.2.).

Vzorky, které obsahují více než 2,5 mg/l AOX nebo více než 2500 mg/l Cl nebo hodnotu CHSK vyšší než 100 mg/l musí být zředěny destilovanou vodou.

Hodnota pH musí být v rozsahu 6-7. V případě nutnosti je třeba upravit pH kyselinou dusičnou (6.8.) nebo hydroxidem sodným (6.7.)

11.1. Příprava adsorpční kolony

Kolona (7.26.) se vloží do prázdné kyvety (7.27.).

Činidlo AOX-1 (1 modrá mikrolžička (7.15.)) se naplní do kolony (7.26.) s pomocí skleněné nálevky (7.13.).

Činidlo AOX-2 (6.13.) (3 x 1 ml) a poté činidlo AOX-3 (6.14.) (3 x 1 ml) se přenesou do kolony (7.26.) s pomocí pipety (7.4.) a nechají se protéct kolonou. Proplachovací roztok se v obou případech vylije.

Výtokový otvor kolony se uzavře uzávěrem (7.30.).

Činidlo AOX-3 (6.14.) (1 ml) se znovu přenesou do kolony s pomocí pipety (7.4.).

Uzavře se horní konec kolony zátkou (7.30.) a kolona (7.26.) se mírně protřepe tak, aby se odstranili případně zachycené vzduchové bublinky. Sundá se horní víčko kolony a kolona se až po okraj naplní činidlem AOX-3 (6.14.).

11.2. Zakoncentrování vzorku

Připraví se aparatura. Aparatura se skládá ze skleněné děličky (7.19.), fungující jako zásobník a 10-ti ml plastové špičky (7.20.). Skleněná dělička (7.19.) se připrvní ve vertikální poloze ke stojánku (7.24.) s pomocí držáku (7.25.), stejně tak i plastová špička (7.20.) se připevní ve vertikální poloze ke stojánku (7.24.) s pomocí držáku (7.25.). K plastové špičce (7.20.) se připevní připravená kolona a pod kolonu se umístí 100 ml kádinka (7.15.).

100 ml odpadní vody se přenesse do skleněné děličky (7.19.), přidá se 6 kapek činidla AOX-4 (6.15.) kvůli snížení pH. Hodnota pH musí být nižší než 2,0 a pokud není, tak přidáme dle potřeby více kapek činidla AOX-4 (6.15.).

Zátka (7.30.) se vytáhne z výtokového otvoru kolony (7.26.) a obsah skleněné děličky (7.19.) se nechá protéct skrz kolonu (7.26.) do skleněné kádinky (7.16.) (trvání 1-2 hod). Pokud je vzorek příliš hustý, vhodně naředíme. Obsah skleněné kádinky (7.16.) se vylije. Kolona (7.26.) se odpojí od plastové špičky (7.20.).

Pod kolonu se umístí prázdná kyveta (7.27.).

Do kolony se přenesse pomocí pipety (7.4.) činidlo AOX-3 (6.14.) (3 x 1 ml) a nechá se zcela protéct kolonou (7.27.). Proplachovací roztok se vylije.

11.3. Rozklad

Plastová stříkačka (7.16.) se naplní 10-ml činidla AOX-5 (6.16.) bez bublinek a stříkačka (7.16.) se připojí k výtokovému otvoru kolony (7.27.) s pomocí plastové spojky (7.21.).

Horní konec kolony (7.27.) se vloží do prázdné rozkladné kyvety (7.28.) a okamžitě se propláchne náplň kolony (aktivní uhlí) do kyvety (7.28.) s pomocí plastové stříkačky (7.16.). Následně je použita stejná stříkačka (7.16.) k vytlačení vzduchu z kolony, aby se do kyvety (7.28.) dostala veškerá zbytková kapalina.

Přidá se činidlo AOX-6 (6.17.) (2 zelené mikrolžičky (7.17.)), kyveta (7.28.) se uzavře šroubovacím víčkem a promíchá se.

Kyveta (7.28.) je zahřívána po dobu 30-ti minut při teplotě 120°C v předehřátém termoreaktoru (7.22.).

Potom se nechá kyveta (7.28.) stát ve stojánku, dokud se neochladí na pokojovou teplotu (trvání 40-50 min). Kyveta se nechladí studenou vodou!

Přidá se 5 kapek činidla AOX-4 (6.15.), kyveta (7.28.) se uzavře a promíchá. Hodnota pH musí být cca 1.

Aktivní uhlí se nechá usadit (trvání 20-30 min). Vzorek je připravený, když je čirý.

12. Pracovní postup

200 µl činidla AOX-1K (6.18.) se pipetuje pipetou (7.9.) do regenerační kyvety (7.29.) a promíchá se.

7 ml připraveného vzorku z rozkladné kyvety (7.28.) se pomocí 10-ti ml plastové stříkačky (7.16.) s kovovou jehlou (7.31.) přenese do reagenční kyvety (7.29.), kyveta (7.29.) se uzavře a promíchá. Nechá se stát 15 minut (reakční čas) a následně se provede měření na spektrofotometru (7.1. a 7.2.).

12. Výpočet

Výpočty se provádí automaticky pomocí software. Výsledek lze ověřit ručním výpočtem.

$$c = \frac{A}{\epsilon \cdot l}$$

c – koncentrace

A – absorbance

l – tloušťka absorpční vrstvy (1 cm)

ε – absorbanční koeficient (z tabulek)

PŘÍLOHA 3

Validační protokol metody pro spektrofotometr Merck

Datum	15.4.2004 – 5.10.2004			
Analytik	Tušerová Barbora			
Matrice	Dobrá voda			
Referenční materiál	Parachlorfenol			
Název standardního operačního postupu (SOP)	Stanovení adsorbovatelných organicky vázaných halogenů ve vodě pomocí kyvetové spektrofotometrické metody s adsorpcí na aktivním uhlí			
Oblast použití	Pitné, povrchové a odpadní vody			
Analyzovaný ukazatel	AOX			
	pozn. 1	hodnota	jednotka	pozn. 2
Pracovní rozsah		0,05 -2,5	mg/l	
Linearita		potvrzena		obr. 16
Homoskedasticita		potvrzena		rovnost rozptylů na začátku a na konci koncentrací
Parametry regresivní závislosti	b_0	0,0293		obr. 17
$\text{signál} = b_0 + b_1 \cdot \text{konc} + b_2 \cdot \text{konc}^2$	b_1	0,3071		obr. 17
	b_2	-0,0159		obr. 17
	$=b_1$	0,3071	signál/konc	obr. 17
Citlivost metody (v počátku)			signál/konc	
Citlivost metody (na konci)				
Opakovatelnost na hladině	0,05 mg/l	5	%	
Opakovatelnost na hladině	2,5 mg/l	5	%	
Mez stanovitelnosti ze slepých stanovení podle $MS = x + 10s$		0,42	mg/l	tab.11 x-konc. průměr sl. s-SM.VÝB konc.sl.
Mez detekce ze slepých stanovení podle $MD = x + 3s$		0,29	mg/l	tab.11 x-konc. průměr sl.

Mez stanovitelnosti z opakovatelnosti		0,96	mg/l	s-SM.VÝB konc.sl. 12% RSD
Nejistota metody na koncentrační hladině regulačního diagramu	slepé stanovení	8	%	RSD
Nejistota vlastního referenčního materiálu		AOX= 194-206	mg/l	z etikety

PŘÍLOHA 4



Foto 1: Aparatura a termoreaktor TR Spectroquant s nastavitelnou teplotou



Foto 2 : Přístroj pro mikroculomertrickou titraci

Foto 3 : Kyvetový spektrofotometr SQ 118



Foto 3 : Kyvetový spektrofotometr SQ 118



Foto 4 : Průtokový spektrofotometr UNICAM 5625