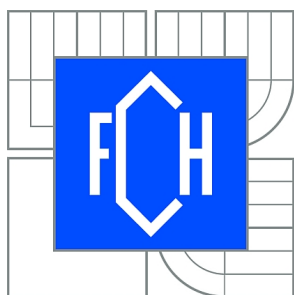


VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE A TECHNOLOGIE OCHRANY
ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY OF
ENVIRONMENTAL PROTECTION

MIKROSTANOVENÍ KOBALTU METODAMI MOLEKULOVÉ A ATOMOVÉ ABSORPČNÍ SPEKTROMETRIE

MICRODETERMINATION OF COBALT BY METHODS OF MOLECULAR AND ATOMIC
ABSORPTION SPECTROMETRY

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. MARTIN CHARUZA

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. RNDr. LUMÍR SOMMER, DrSc.

BRNO 2012



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	FCH-DIP0655/2011	Akademický rok: 2011/2012
Ústav:	Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí	
Student(ka):	Bc. Martin Charuza	
Studijní program:	Chemie a technologie ochrany životního prostředí (N2805)	
Studijní obor:	Chemie a technologie ochrany životního prostředí (2805T002)	
Vedoucí práce	prof. RNDr. Lumír Sommer, DrSc.	
Konzultanti:		

Název diplomové práce:

Mikrostanovení kobaltu metodami molekulové a atomové absorpční spektrometrie

Zadání diplomové práce:

1. Vypracování literární rešerše na zadané téma.
2. Studium reakcí kobaltu s vybranými heterocyklickými azobarvivy (4-(2-thiazolylazo)resorcinolem a 2-(5-bromo-2-pyridylazo)-5-diethylaminofenolem) a podrobné zhodnocení podmínek těchto reakcí.
3. Optimalizace podmínek stanovení kobaltu metodou atomové absorpční spektrofotometrie s elektrotermickou atomizací.
4. Aplikace optimalizovaných postupů na reálné vzorky vod.

Termín odevzdání diplomové práce: 11.5.2012

Diplomová práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

Bc. Martin Charuza
Student(ka)

prof. RNDr. Lumír Sommer, DrSc.
Vedoucí práce

doc. Ing. Josef Čáslavský, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 16.1.2012

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Tato diplomová práce je zaměřena na mikrostanovení kobaltu UV-VIS spektrofotometrií organickými činidly a porovnání s atomovou absorpční spektrometrií.

V první části jsou podrobně popsány vlastnosti, výskyt a význam kobaltu v životním prostředí, včetně jako součásti vitamínu B12. Pozornost je věnována i sloučeninám kobaltu, zejména v oxidačních stavech +II a +III. Dále jsou uvedeny metody prekoncentrace a úpravy vzorku pro stanovení kobaltu ve vzorcích. Jsou popsány některé optické analytické metody stanovení kobaltu s důrazem na nejdůležitější spektrofotometrická činidla pro stanovení kobaltu.

V experimentální části je zahrnuta optimalizace spektrofotometrického stanovení kobaltu s organickými činidly 4-(2-pyridylazo)resorcinolem a 2-(5-brom-2-pyridylazo)-5-diethylaminofenolem a stanovení kobaltu metodou atomové absorpce s elektrotermickou atomizací a s atomizací v plameni.

Z reálných vzorků vod (povrchová, podpovrchová, minerální balená a odpadní) byly všechny proměřeny zmíněnými spektrofotometrickými činidly a metodou atomové absorpce. Výsledky stanovení byly porovnány. Vzorek vitamínu B12 byl proměřen také všemi zmiňovanými metodami.

KLÍČOVÁ SLOVA

kobalt, UV-VIS spektrofotometrie, 4-(2-pyridylazo)rezorcinol, 2-(5-brom-2-pyridylazo)-5-diethylaminofenol, AAS, vitamin B12

ABSTRACT

This diploma thesis is focused on microdetermination of cobalt by UV-VIS spectrophotometry with organic agents and comparison with atomic absorption spectrometry.

In the first part properties, occurrence and importance of cobalt in the environment are described, complete with as a part of vitamin B12. Attention is also given to cobalt compounds, especially in the oxidative states +II and +III. Methods of preconcentration and preparation cobalt determination in real samples are adduced. In this thesis are described some optical analytical methods with accept on spectrophotometric agents for determination of cobalt.

The experimental part of this thesis includes optimization of the spectrophotometric determination of cobalt with chosen organic agents 4-(2-pyridylazo)resorcin and 2-(5-Brom-2-pyridylazo)-5-diethylaminophenol and optimization of atomic absorption spectrometry for cobalt determination.

All of real samples of water (surface, underground, mineral and waste) were measured by both 4-(2-pyridylazo)resorcin and 2-(5-Brom-2-pyridylazo)-5-diethylaminophenol via UV-VIS and via atomic absorption spectrometry. Results of determinations were compared. A sample of vitamin B12 was measured too by all techniques.

KEY WORDS

cobalt, UV-VIS spectrophotometry, 4-(2-pyridylazo)resorcin, 2-(5-Brom-2-pyridylazo)-5-diethylaminophenol, AAS, vitamin B12

CHARUZA, M. *Mikrostanovení kobaltu metodami molekulové a atomové absorpční spektrometrie*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2012. 78 s. Vedoucí diplomové práce prof. RNDr. Lumír Sommer, DrSc..

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citoval. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

Poděkování:

Na tomto místě bych rád poděkoval vedoucímu mé diplomové práce, prof. RNDr. Lumíru Sommerovi, DrSc. za veškeré zapůjčené materiály, odborné rady a vedení této diplomové práce, Ing. Janě Nevrlé a Mgr. Renatě Komendové, PhD. za celkovou pomoc při tvorbě této diplomové práce.

OBSAH

1	KOBALT	9
1.1	Objevení kobaltu.....	9
1.2	Výskyt a vlastnosti	9
1.3	Izotopy kobaltu	11
1.4	Postavení v periodické tabulce prvků.....	11
1.5	Dvojmocné sloučeniny kobaltu	12
1.6	Trojmocné sloučeniny kobaltu	12
1.7	Toxicita kobaltu.....	13
1.8	Kobalt v biologických systémech.....	13
1.9	Vitamin B12	14
1.9.1	Koloběh vitamínu B12.....	15
1.10	Nedostatek a přebytek vitamínu B12 v těle	15
1.11	Funkce vitamínu B12 v těle	16
2	OPTICKÉ ANALYTICKÉ METODY STANOVENÍ KOBALTU	17
2.1	Prekoncentrace a separace vzorku	17
2.1.1	Extrakce.....	18
2.2	Stanovení kobaltu	19
2.2.1	UV-VIS spektrofotometrie	19
2.2.1.1	Faktory ovlivňující spektrofotometrické stanovení.....	21
2.2.1.1.1	Vliv rozpouštědla	21
2.2.1.1.2	Vliv pH.....	22
2.2.1.1.3	Vliv teploty	22
2.2.1.1.4	Vliv koncentrace činidla	22
2.2.1.1.5	Vliv iontové síly.....	23
2.2.1.1.6	Vliv tenzidů	23
2.2.1.2	Spektrofotometrická činidla pro stanovení kobaltu.....	23
2.2.1.2.1	4-(2-pyridylazo)rezorcinol	23
2.2.1.2.2	2-(5-Brom-2-pyridylazo)-5-diethylaminofenol	24
2.2.1.2.3	Další činidla	24
2.2.2	Stanovení kobaltu metodou atomové absorpční spektrometrie	24
2.2.2.1	Faktory ovlivňující stanovení kobaltu metodou AAS	25
2.2.2.1.1	Vliv pozadí.....	25
2.2.2.1.2	Použití modifikátorů.....	26
2.2.2.2	Atomová absorpční spektrometrie s atomizací v plameni (F AAS)	26
2.2.2.3	Atomová absorpční spektrometrie s elektrotermickou atomizací (ET AAS).....	27
2.2.3	Stanovení kobaltu metodou ICP-OES.....	27
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	29
3.1	Přístroje a zařízení	29
3.2	Roztoky a chemikálie.....	29
3.2.1	Analytická činidla a standard	29
3.2.2	Chemikálie pro přípravu roztoků iontů.....	30
3.2.3	Další použitá rozpouštědla a chemikálie	30
3.3	Charakteristika vzorků.....	31
3.3.1	Minerální voda	31
3.3.2	Povrchová voda	31

3.3.3	Podzemní voda.....	31
3.3.4	Odpadní voda	31
3.3.5	Vitamin B12	31
3.4	Metodika vyhodnocení výsledků	32
3.4.1	Hodnocení kalibrace	32
3.4.2	Test homogenity rozptylů	32
3.4.3	Test linearity	33
3.4.4	Mez detekce	33
3.4.5	Mez stanovitelnosti	34
3.4.6	Výpočet detekčního limitu Millerovou metodou	34
3.4.7	Výpočet detekčního limitu podle Grahama.....	34
3.4.8	Metoda standardních přídavek.....	35
3.4.9	Určení stechiometrie komplexu	35
4	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	37
4.1	Spektrofometrické studium tvorby komplexu Co(III)-PAR	37
4.1.1	Vliv komponent na samotné činidlo PAR	37
4.1.1.1	Vliv teploty a časový vývoj.....	37
4.1.1.2	Vliv pH	37
4.1.1.3	Vliv acetátového pufru	38
4.1.1.4	Vliv kationtového tenzidu Septonexu	38
4.1.2	Vliv komponent na komplex Co(III)-PAR	39
4.1.2.1	Vliv teploty a časový vývoj.....	39
4.1.2.2	Vliv pH	39
4.1.2.3	Vliv koncentrace kovu a činidla	41
4.1.2.4	Vliv tenzidů	42
4.1.2.4.1	Vliv Septonexu	42
4.1.2.5	Vliv acetátového pufru	44
4.1.2.6	Vliv oxidačních a redukčních činidel.....	44
4.1.2.7	Kalibrace.....	45
4.1.2.8	Vliv cizích iontů	47
4.1.2.9	Metoda kontinuálních variací komplexu Co(III)-PAR.....	48
4.2	Spektrofometrické studium tvorby komplexu Co(III)-PADAP	49
4.2.1	Vliv komponent na samotné činidlo PADAP	49
4.2.1.1	Vliv pH	49
4.2.1.2	Vliv neiontového tenzidu Tritonu X-100.....	49
4.2.1.3	Vliv acetátového pufru	50
4.2.1.4	Vliv peroxodisíranu amonného	51
4.2.2	Vliv komponent na komplex Co(III)-PADAP	52
4.2.2.1	Časový vývoj.....	52
4.2.2.2	Vliv pH	53
4.2.2.3	Vliv koncentrace činidla a koncentrace kovu.....	54
4.2.2.4	Vliv oxidačních a redukčních činidel.....	56
4.2.2.5	Vliv neiontového tenzidu Tritonu X-100.....	58
4.2.2.6	Vliv acetátového pufru	58
4.2.2.7	Kalibrace.....	59
4.2.2.8	Vliv cizích iontů	60
4.2.2.9	Metoda kontinuálních variací	62
4.3	Optimalizace stanovení kobaltu metodou ET AAS.....	63
4.3.1	Optimalizace parametrů přístroje, lampy a teplotního programu	63

4.3.2	Vliv modifikátoru	65
4.3.3	Vliv peroxidisíranu amonného	65
4.3.4	Kalibrace	66
4.3.5	Vliv cizích iontů	67
4.4	Kalibrační křivka pro stanovení kobaltu metodou F AAS	68
4.5	Analýza reálných vzorků vod a vitamínu B12	69
4.5.1	Stanovení metodou ET AAS	70
4.5.2	Stanovení kobaltu metodou F AAS	70
4.5.3	Stanovení kobaltu metodou UV-VIS po reakci s činidlem PAR	71
4.5.4	Stanovení kobaltu metodou UV-VIS po reakci s činidlem PADAP	71
4.5.5	Shrnutí výsledků stanovení kobaltu v reálných vzorcích	72
5	ZÁVĚR	73
6	SEZNAM LITERATURY	75
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	78

ÚVOD

Kobalt je prvek, který má nezastupitelné místo v lidském organismu, přírodě ale i v technickém využití. V lidském organismu zastává funkci katalyzátoru některých reakcí a funkci centrálního atomu molekuly vitamínu B12, který je v lidském těle nezbytný pro život. V přírodě se nachází v půdě a v horninách, kde doprovází ostatní kovy jako je arsen, měď, nikl a železo. V technické praxi se využívá jako součást magnetů. Z těchto oblastí může vždy dojít ke kontaminaci přírody a životního prostředí.

Kromě antropogenní kontaminace se kobalt v životním prostředí vyskytuje i přirozeně. Většinou jako aquakation, v němž je kobalt dvojmocný. Trojmocný kobalt se vyskytuje pouze jako vázaný na složité organické molekuly.

Jedny z nejběžnějších metod, které se používají pro stanovení anorganických prvků ve složkách životního prostředí jsou metody atomové a molekulové spektrometrie. Pro metodu molekulové spektrometrie je nutno převést kobalt v komplex, který je schopen absorbovat energii záření. K tomuto účelu se používají spektrofotometrická činidla. Dva ze způsobů jsou reakce s 4-(2-pyridylazo)rezorcínem a 2-(5-brom-2-pyridylazo)-5-diethylaminofenolem. Právě optimalizace těchto dvou postupů jsou náplní této diplomové práce.

Další částí této diplomové práce je optimalizace metody stanovení kobaltu atomovou absorpční spektrometrií, jakožto konvenčně uznávanou metodou pro analýzu anorganických látek.

1 KOBALT

1.1 Objevení kobaltu

Sloučeniny kobaltu byly po staletí využívány k barvení skla, keramiky či glazury modrým odstínem, přesto k objevení kobaltu došlo až v roce 1735 švédským chemikem Georgem Brandtem. Důkazem používání kobaltu dříve je to, že kobalt lze nalézt v egyptských soškách a v korálcích perských náhrdelníků ve 3. století před Kristem. Dále byl kobalt detekován i ve skle nalezeném v Pompejích, v porcelánu za dob dynastií T'Ang a Ming. V 16. století byl poprvé použit název Kobolt pro rudy obsahující Měď a Arsen. Tyto rudy byly zbarveny do modra a George Brandt později určil, že modré zbarvení způsobuje právě kobalt. Brandt izoloval velmi nečistý kov a nazval jej „cobalt rex“. V roce 1780 T. O. Bergman později určil že se jedná o nový prvek.

Název kobalt pochází z německého slova kobolt, značící „skřítek“ nebo „zlý duch“. Toto označení se používalo v severských zemích Evropy, kde se kobalt vyskytoval v rudách s arsenem. Tyto rudy se tehdejšími technologiemi nedaly hutnicky zpracovat na očekávaný kov a tavením vznikaly jedovaté výpary As_4O_6 , místní horníci to považovali za schválnost ze strany zlých duchů nebo skřítků. [1]

1.2 Výskyt a vlastnosti

Kobalt je esenciální stopový prvek, který je široce rozšířený v přírodě. Hlavní výskyt kobaltu představují rudy kobaltin ($CoAsS$) a smaltin ($CoAs_2$). Dále se nachází zejména v čedičových minerálech obsahující převážně železo a hořčík. Distribuce kobaltu v čedičových minerálech závisí na struktuře Fe-Mg mřížky. V žulových horninách se kobalt vyskytuje a má stejné vlastnosti jako hořčík. V sedimentovaných horninách se většina kobaltu vyskytuje v jílovitých frakcích a opět doprovází železo a hořčík. [2]

Kobalt je na Zemi rozptýlený a tvoří pouze 0,001 % zemské kůry. Nalezen může být jak v pozemských tak v meteoritických rudách, kde doprovází nikl, avšak v malých množstvích. Dále se nachází v atmosféře slunce a jiných hvězd. Většinou doprovází jiné prvky v přírodní vodě, v půdách, rostlinách a živočiších. Stopy kobaltu jsou přítomny v mnoha rudách mědi, stříbra, niklu, zinku, manganu, arsenu. Kobalt je zkoncentrován a vyextrahován z těchto rud a je získáván jako vedlejší produkt. [3]

Ve vodě se nachází jako organicky vázaný ve vitamínu B12 a v kalech z biologického čištění odpadních vod. Kobalt ve vodě může pocházet i z antropogenního znečištění, zejména se jedná o odpadní vody z metalurgického průmyslu a galvanického pokovování, kde je přítomen zejména ve formě komplexů. Kobalt má schopnost tvořit mnoho komplexních sloučenin, zejména hydrokomplexy a komplexy s huminovými látkami.

Ve vodách se kobalt stanovuje poměrně výjimečně. [4]

Kobalt je stříbrolesklý kov s odstínem do modré. Podobá se železu. Spolu s niklem a železem je feromagnetický za normální teploty a má nejvyšší známou Curriovu teplotu u kovů a slitin ($1121\text{ }^{\circ}\text{C}$). Má poněkud nižší teplotu tání než železo ale tvrdostí a pevností předčí železo i ocel.

Kompaktní kobalt je stabilní na vzduchu i ve vodě. V jemně rozptýleném stavu je pyroforní. mnohem obtížněji než železo se rozpouští ve zředěných kyselinách, např. chlorovodíkové a sírové, což odpovídá jeho postavení v elektrochemické řadě napětí vpravo od železa (standardní elektrochemický potenciál je $-0,28\text{ V}$). Ve zředěné kyselině dusičné se kobalt

rozpouští velmi snadno, avšak koncentrovanou kyselinou dusičnou se pasivuje stejně jako železo.

Pokud je kobalt zahříván na vzduchu oxiduje se a shoří v bílém žáru na Co_3O_4 . Nad teplotou $900\text{ }^\circ\text{C}$ je kobalt oxidován na CoO . Při zahřívání se slučuje s jinými prvky za vzniku plamene (např. se sírou, fosforem, arsenem, antimonem, cínem a zinkem). S křemíkem při tavení tvoří více sloučenin. S dusíkem se neslučuje ani za vysoké teploty, avšak s borem ano. Vůči dusíku a vodíku je inertní. Snadno se slučuje s halogeny. [5]

Kobalt se vyskytuje ve dvou alotropických modifikacích α a β . Modifikace α má hexagonální těsné uspořádání mřížky a je stálá pod $417\text{ }^\circ\text{C}$. Nad touto teplotou je naopak stabilní pouze modifikace β , která má kubickou plošně centrovanou mřížku. Modifikaci β lze stabilizovat přidávkem železa a existuje často i za normální teploty i proto že přechod mezi jednotlivými modifikacemi je obecně pomalý. [3]

Konkrétní hodnoty jednotlivých vlastností kobaltu jsou uvedeny v tabulce č.1 [5, 6]

Tabulka č. 1: Vlastnosti kobaltu

Vlastnosti kobaltu			
název	značka	jednotka	hodnota
Atomové číslo	N	-	27
Atomová hmotnost	A_r	$\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$	58,933 2
Paulingova elektronegativita	χ	-	1,8
Hustota ($20\text{ }^\circ\text{C}$)	ρ	$\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$	8,9
Teplota tání	t_t	$^\circ\text{C}$	1 495
Teplota varu	t_v	$^\circ\text{C}$	3100
Rádus van der Waalsových sil	r_w	nm	0,125
Iontový rádus +II	r_{ion}^{+II}	nm	0,078
Iontový rádus +III	r_{ion}^{+III}	nm	0,063
počet izotopů	-	-	8
Elektronová konfigurace	-	-	$[\text{Ar}] 3d^7 4s^2$
Energie první ionizace	E_1^1	$\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$	757
Energie druhé ionizace	E_1^2	$\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$	1 663,3
Energie třetí ionizace	E_1^3	$\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$	3226
Standardní potenciál (Co^{2+}/Co)	E^0	V	-0,28
Standardní potenciál ($\text{Co}^{3+}/\text{Co}^{2+}$)	E^1	V	1,84
Objevitel	George Brandt, 1737		

Největším producentem kobaltu je od roku 1926 Zaire, kde se kobalt získává při zpracování měďnatých rud jako vedlejší produkt. Poslední dobou je trend posílat vytěžené horniny po separaci hlavní složky s obsahem stopových množství kobaltu do vyspělých skandinávských zemí s patřičnými technologiemi, kde se kobalt a ostatní minoritní prvky oddělí elektrolyticky.

Mezi využití kobaltu patří zejména metalurgie, kde se kobalt používá pro výrobu rezistentních ocelí proti korozi zejména za vyšších teplot. Slitiny chrómu a kobaltu se používají na výrobu umělých protéz a kovových implantátů, jelikož jsou rezistentní tělním tekutinám. Rezistentní slitina s názvem Vitallium má praktické dentální využití. Jelikož je

kobalt feromagnetický tak se vyrábí na výrobu permanentních magnetů (35 % CoO). Sloučeniny kobaltu mají mnoho jiného využití kromě metalurgie, například barvy, laky, tiskařské inkousty, keramiky, glazury, skla, katalyzátory, stabilizátory pěn v pivovarnictví, pokovování, agrochemikálie, potravinářská a fermentační aditiva a výroba vitamínu B12. [6]

1.3 Izotopy kobaltu

Nejvýznamnější izotop kobaltu v přírodě je izotop $^{59}_{27}\text{Co}$, který se vyskytuje v rudách a v menších koncentracích v půdách. Ve skutečnosti existuje 9 izotopů kobaltu, ale jen dva izotopy mají dost vysoké poločasy rozpadu na to, aby byly významné. Jedná se o izotopy $^{57}_{27}\text{Co}$ a $^{60}_{27}\text{Co}$. Ostatní izotopy mají poločas rozpadu menší než 80 dní. Izotop $^{57}_{27}\text{Co}$ má poločas rozpadu 270 dní a rozpadá se zachycením elektronu. Izotop $^{60}_{27}\text{Co}$ se rozpadá vyzářením β částic s dvěma energetickými γ paprsky (jeden paprsek má energii 1,2 MeV a druhý 1,3 MeV) a poločas rozpadu má 5,3 let. Izotop $^{60}_{27}\text{Co}$ byl objeven ve 30. letech 20. století a je produkován v urychlovači částic. Jedná se o radionuklid, který je obsažen ve vyhořelém radioaktivním odpadu. Stopy tohoto izotopu jsou přítomny po celé zeměkouli jako radioaktivní spad. Izotop $^{60}_{27}\text{Co}$ je intenzivní emitér vysoce pronikavého γ nebo rentgenového záření a může poškodit živé buňky, zvláště krvetvorné tkáně. Při větších expozicích tělo není schopno produkovat protilátky. Radionuklid se samovolně přeměňuje na $^{60}_{28}\text{Ni}$.

Izotop $^{60}_{27}\text{Co}$ našel využití v lékařství jako zdroj γ záření pro ozařování rakovinových nádorů. Dále se využívá v defektoskopii pro vyhledávání vnitřních skrytých vad materiálů. Izotop $^{60}_{27}\text{Co}$ se používá při restaurování historických dřevěných předmětů pro likvidaci hub, plísní a dřevokazného hmyzu. [3, 8]

1.4 Postavení v periodické tabulce prvků

Kobalt je umístěn v periodické soustavě prvků s rhodiem a iridiem v 9. skupině (podle starých norem v VIII.B skupině v tzv. triádě železa s železem a niklem).

Společným znakem kobaltu rhodia a iridia je že tvoří v různých oxidačních stavech komplexní sloučeniny. Ve srovnání s předcházející triádou (železo, ruthenium, osmium) mají nižší rozsah oxidačních stavů. Toto omezení, které se objevuje poprvé mezi d prvky, vyplývá ze zvýšeného přitahování elektronů (n-1) d atomovým jádrem, které tak zabraňuje v dosažení nejvyšších oxidačních stavů. Rhodium a iridium netvoří vyšší oxidační stavy než VI, u kobaltu se nesetkáme s vyšším oxidačním stavem než V. Kobalt dosahuje oxidačních čísel IV a V jen velmi vzácně a pokud existují, tak tyto sloučeniny ještě nejsou dostatečně prozkoumány.

Nejčastější oxidační čísla, jichž dosahuje kobalt jsou +II a +III. Oba tyto oxidační stavy tvoří různě stabilní kationty $[\text{Co}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ a $[\text{Co}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$. Kationt $[\text{Co}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$ je silné oxidační činidlo a v nekyselém roztoku se rychle rozkládá, neboť Co^{III+} oxiduje vodu za vývoje kyslíku. Tato nestálost způsobuje, že narozdíl od Co^{II+} poskytuje Co^{III+} jen málo jednoduchých solí, které se snadno rozkládají. Ale naopak Co^{III+} tvoří mnoho komplexních sloučenin, které vytváří zejména s N-donorovými ligandy.

Kobalt, rhodium a iridium mají menší ochotu tvořit sloučeniny s vysokými koordinačními čísly ve srovnání s prvky skupiny železa. U prvků nacházející se v 9. skupině se nejčastěji

vyskytuje koordinační číslo 6, tyto prvky toto koordinační číslo překračují jen výjimečně. Prvky 9. skupiny netvoří oxoanionty [3]

1.5 Dvojmocné sloučeniny kobaltu

Oxidační stav +II je nejstabilnější oxidační stav kobaltu. Kobaltnatých komplexů je méně než kobaltitých, zato ale mají větší strukturní rozmanitost a větší labilitu. Z oxidačně-redukčních potenciálů vyplývá, že příprava komplexů musí probíhat za anaerobních podmínek. Dále se dají komplexní kobaltnaté sloučeniny připravit prací s roztoky, které nejsou alkalické a ligandy neleží ve spektrochemické řadě zcela vpravo.

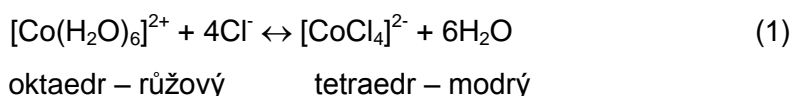
Kobalt tvoří oxid kobaltnatý, který se připraví v podobě olivově zeleného prášku silným zahříváním hydroxidů, uhličitanu nebo dusičnanu za anaerobních podmínek. Krystalizuje stejným způsobem jako chlorid sodný. Pod 289 K je feromagnetický. Po vyžhání s křemenným pískem a oxidem hlinitým se vytvoří pigmenty, které se používají na barvení keramiky. Oxid kobaltnatý je stabilní a při zahřívání nad 600 °C přechází na černý Co_3O_4 .

Dvojmocný kobalt vytváří také halogenidy. CoF_2 je růžový, ve vodě málo rozpustný prášek s teplotou tání 1200 °C. Chlorid kobaltnatý je modrý a teplotu tání má 724 °C. Chlorid kobaltnatý má využití jako indikátor kvality silikagelu, jehož funkce je založena na změně barvy z modré na růžovou, ke které dochází při přechodu z bezvodé formy na hydratovanou. Bromid kobaltnatý je zelený s teplotou tání 678 °C a jodid kobaltnatý je modročerný a má teplotu tání 515 °C.

Co^{II+} tvoří se všemi anionty jednoduché soli, které se v podobě hydrátů vylučují z vodných roztoků. Pokud se působí na vodné kobaltnaté roztoky alkalickými látkami tak se vysráží $\text{Co}(\text{OH})_2$. Hydroxid kobaltnatý má amfoterní charakter a rozpouští se jak v kyselinách tak i v hydroxidech na tmavě modrý roztok, který obsahuje ionty $[\text{Co}(\text{OH})_4]^{2-}$. Hydroxid kobaltnatý má dvě formy, modrou a růžovou. Modrá forma vznikne pomalým srážením z roztoku při 0 °C. Tato modrá forma je nestálá a zahřátím za nepřítomnosti vzduchu přechází na růžovou formu.

Hydratované kobaltnaté soli obsahují růžový oktaedrický kationt $[\text{Co}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$. Dvojmocný kobalt tvoří oktaedrické komplexní sloučeniny nejčastěji s koordinačním číslem 6, které vznikají koordinací dvojných N-donorových ligandů. Co^{II+} tvoří kromě oktaedrických i tetraedrické komplexní sloučeniny. Zinek a kobalt mají nejvyšší schopnost z přechodných prvků vytvořit právě tento typ sloučenin. Ve vodných roztocích se tedy kromě oktaedrických $[\text{Co}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ vyskytují v malém množství i tetraedrické $[\text{Co}(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$. Dalšími tetraedrickými komplexy jsou např. sloučeniny typu $[\text{CoX}_4]^-$ (X = halogen, SCN a OH).

Nejlépe se dá rozlišit uspořádání oktaedrické od tetraedrického podle zbarvení. Oktaedrické komplexy jsou růžové zatímco tetraedrické komplexy jsou modré. Příkladem může být rovnováha zobrazená v rovnici (1).



Dobře charakterizované jsou kobaltnaté komplexy s Schiffovými bázemi. Všechny jsou nízkospinové a jsou to látky schopny přenášet kyslík, který má lomené uspořádání.

1.6 Trojmocné sloučeniny kobaltu

Jediný halogenid, ve kterém má kobalt oxidační číslo +III je světlehnědý prášek CoF_3 . Tato sloučenina existuje jako $\text{CoF}_3 \cdot 3,5\text{H}_2\text{O}$. Fluorid kobaltitý vzniká při 250 °C.

Kobalt s oxidačním číslem +III tvoří mnoho komplexních sloučenin, které jsou oktaedrické a nízkospinové. Existují jednoduché hydratované soli, např. modrý $\text{Co}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 18\text{H}_2\text{O}$, popř. podvojně soli typu $\text{MCo}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, kde $\text{M} = \text{K}, \text{Rb}, \text{Cs}$ a NH_4^+ , ve kterých je přítomen kationt $[\text{Co}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$.

Kobaltité komplexy jsou kineticky inertní a proto se připravují zejména nepřímými metodami. Nejčastěji se to provádí tak, že se k vodnému roztoku kobaltnaté soli přidá ligand a takto vzniklý kobaltnatý komplex se oxiduje oxidačními činidly. Jako katalyzátor zde působí aktivní uhlí. Jako oxidační činidlo se používá buď vzdušný kyslík nebo peroxid vodíku. Při použití peroxidu vodíku se kobaltitý komplex připraví v podstatně kratší době.

Velmi stabilní jsou kobaltité komplexy s N-donorovými ligandy, jako je NH_3 , NO_2^- , CN^- ethylendiamin a bipyridin. Mimořádně stabilní je anion $[\text{Co}(\text{CN})_6]^{3-}$, který je odolný i proti působení alkalických látek. Komplexy odvozené od O-donorových ligandů jsou naopak méně stálé, např. acetátové. Komplexy s O-donorovými ligandy působí jako katalyzátory řady oxidačních reakcí.

Většina kobaltitých komplexů nepodléhá hydrolyze. Pokud hydrolyzují, tak vznikají vícejaderné komplexy, které v případě aminokomplexů obsahují můstkový ligand OH^- . Někdy působí jako můstkové ligandy taky NH_2^- , NH^{2-} a NO_2^- . Jsou známy částice se dvěma a třemi můstkovými ligandy. [3]

1.7 Toxicita kobaltu

Aerosoly jemně rozptýleného práškového kobaltu mohou způsobit vážné plicní abnormality, včetně těžkého kašle a plicní fibrózy. Poškození horních dýchacích cest s příznaky krátkého dechu, kašle i permanentní neschopnost mohou způsobit tyto aerosoly u lidí s expozicí ve vzduchu $1 - 2 \text{ mg/m}^3$. Velké orální dávky vedou k anorexii, nevolnosti, zvracení, průjmů, hluchotě, zrudnutí obličeje a ke kožním vyrážkám. Kobalt aktivuje zvětšení štítné žlázy blokováním příjmu jodu, zejména u dětí. Kobalt je toxický jen jako výsledek časté expozice nebo vysokého jednorázového příjmu. Posiluje množení krvetvorných buněk v kostní dřeni a buněk štítné žlázy.

U hospodářských zvířat kobalt snižuje dostupnost mědi, železa a manganu. Maximální bezpečný obsah v potravě činí 20 ppm pro skot, 50 ppm pro ovce, 10 ppm pro prasata a 4 ppm pro drůbež. Skot při intoxikaci kobaltem trpí anorexií, slabou kondicí, sliněním a průjmem.

Mezi sloučeniny kobaltu toxikologicky významné patří arsenitan kobaltnatý, který představuje nebezpečí hlavně protože obsahuje arsen. Chlorid kobaltnatý při požití způsobuje slabou vyrážku, nevolnost, zvracení a zákal nebo zastínění čočky. Síran kobaltnatý způsobuje alergickou reakci. [8]

1.8 Kobalt v biologických systémech

Pro biologii je kobalt důležitý ve stabilním nízkospinovém stavu, Co^{II+} , který má nepárový elektron odkrytý, narozdíl od stabilních nízkospinových stavů jiných iontů (Mn , Fe a Ni), které neposkytují nepárový elektron pro radikálové reakce.

Kobalt je stopový prvek, jehož přítomnost je hodně důležitá pro člověka a řadu živých organismů. Většina kobaltu v lidském těle je obsažena v molekule vitamínu B12, kde kobalt plní úlohu centrálního atomu. Ze všech vitamínů má nejnižší koncentraci v lidském těle. Existuje 11 extrémně citlivých reakcí kde je přítomnost vitamínu B12 nezbytná. Funkce elementárního kobaltu v těle je spojena s katalýzou volných radikálů a s kontrolou reakcí

těchto radikálů, to znamená že radikály nesmí být příliš reaktivní aby nepoškodily fyziologickou tkáň. [9]

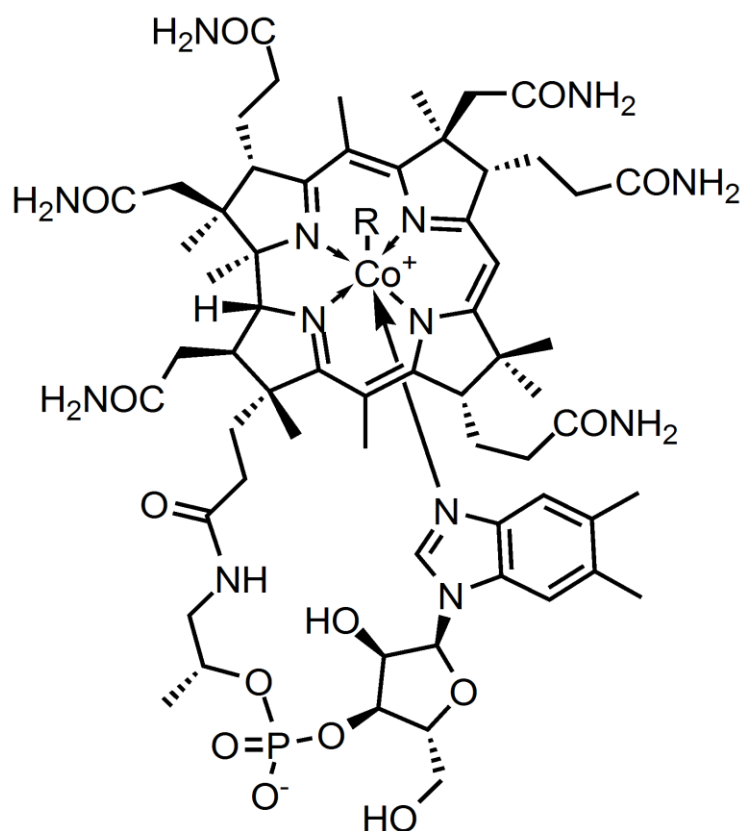
1.9 Vitamin B12

Vitamin B12 byl objeven v roce 1926 Dr. Georgem R. Minotem a Dr. Williamem P. Murphym. Vitamin B12 je složitá organická molekula s kobaltem jako centrálním atomem, která je rozpustná ve vodě. V potravinách se nachází přirozeně, může se podávat i jako doplněk stravy či injekce na lékařský předpis. Vitamin B12 je odolný proti mírně zvýšeným teplotám, svoji aktivitu ztrácí účinkem světla, za přístupu vzduchu či v alkalickém prostředí. Naopak v kyselém prostředí je stabilní a dokonce může být i delší dobu zahříván při 100 °C aniž by ztratil svou aktivitu. Při vaření ve vodě dochází k vyluhování do vody nikoliv k tepelné destrukci molekuly.

Vitamin B12 existuje v několika formách a jelikož obsahuje minerál kobalt jsou jeho formy nazývány „kobalaminy“. Základní vitamin má 2 formy, kyanokobalmin, který často bývá označován za základní formu a hydroxykobalamin, který je účinnější. V lidském těle ovšem jsou aktivní pouze formy methylkobalamin a 5-deoxyadenosylkobalamin.

Chemicky se jedná o derivát korinu, molekula vitaminu B12 je jeden z nejvíce studovaných organokovových systémů v biologii. Originální struktura byla popsána ze základní formy kyanokobalaminu, kde je kyanidová skupina druhým axiálním ligandem spolu s dimethylbenzimidazoleovým nukleotidem, který je kovalentně vázán na korinový kruh. [10, 11, 12]

Strukturní vzorec vitaminu B12 je znázorněn na obrázku č. 1.



R = 5'-deoxyadenosyl, Me, OH, CN

Obr. č. 1: Vitamin B12

1.9.1 Koloběh vitamínu B12

Rostliny ani živočichové nedokáží syntetizovat vitamín B12. Vytvořit vitamín B12 dokáží pouze některé rody bakterií (*Algaligenes*, *Azobacter*), jelikož mají potřebné enzymy. Tyto bakterie jsou přítomné v zažívacím traktu přežvýkavců. Potravním řetězcem se vitamín dostane až do lidského těla, kde dojde ke vstřebání. K absorpci vitamínu B12 z potravy v lidském těle dochází v tenkém střevě. K účinné absorpci je potřeba tzv. vnitřní faktor (intrinsic factor) uvolňovaný ze žaludeční sliznice. Jedná se o glykoprotein secernovaný parietálními buňkami žaludeční sliznice. Tento faktor způsobí separaci vitamínu B12 od ostatních bílkovin. Vytváří se komplex vitamínu B12 s vnitřním faktorem. Komplex vzniká v žaludku a v dvanáctníku a k absorpci dochází v tenkém střevě po vazbě na příslušné receptory transportního mechanismu. Pro absorpci by mělo být pH neutrální a nezbytná je i přítomnost vápenatých iontů. Při konzumaci nadměrného množství potravin s vysokým obsahem tuků, bílkovin a rafinovaných cukrů dochází k inhibici absorpce. Po vstřebání se komplex váže na transkobalamin. Nadbytek vitamínu B12 se kumuluje v játrech, svalech a ledvinách v podobě komplexu vázaného na plasmatické bílkoviny. Inaktivaci hydroxykobalaminu způsobují látky, které narušují střevní mikroflóru jako jsou například cigaretový kouř, alkohol, antikoncepční přípravky, hypnotiky a antibiotika.

Vitamín B12 je v potravinách vázaný na bílkoviny a ještě před absorpcí musí dojít k rozštěpení této vazby.

Vitamín B12 je přítomen v živočišné stravě, například v mase, drůbeži, vejcích a v mléčných výrobcích. V rostlinné stravě se vyskytuje jen zřídka, ale cereálie mohou být zdrojem vitamínu B12 pro vegetariány a vitamín B12 je obsažen i v některých kvasnicích.

V doplňcích stravy je vitamín B12 přítomen jako kyanokobalamin, tedy ve formě, které je tělo schopno převést na aktivní formy methylkobalaminu a 5-deoxyadenosylkobalaminu. Doplňky stravy mohou též obsahovat methylkobalamin i jiné formy vitamínu B12. Vitamín B12 ale nepůsobí sám ale v koordinaci s dalšími vitamíny skupiny B a tudíž je více než vhodné podávat vitamíny skupiny B společně jako B-komplex. Vyšší dávky některého z vitamínů B mohou být bezcenné nebo mohou být příčinou deficitu ostatních.

Průměrná strava obsahuje 5 – 30 µg vitamínu B12 a z toho se absorbuje 1 – 5 µg. Denní potřeba vitamínu B12 pro člověka je 2 – 3 µg, pro těhotné a kojící ženy 4 µg. [13, 14]

1.10 Nedostatek a přebytek vitamínu B12 v těle

S vitamínem B12 spolupůsobí kyselina listová (vitamín B9) a při nedostatku těchto dvou látek dochází k inhibici mitózy a k abnormálnímu zrání vytvořených buněk. Nejvíce je to patrné na rychle rostoucích tkáních jako je například kostní dřeň a epitel zažívacího traktu a vzniká megaloblastická anemie. Základní příčinou je nedostatečná produkce DNA a omezení dělení buněk, zatímco syntéza RNA a proteinů pokračuje. To vede k produkci velkých elementů, které jsou citlivé na poškození. Léčba megaloblastické anemie při nedostatku vitamínu B12 trvá celý život.

Deficit vitamínu B12 je způsoben téměř vždy nedostatečnou absorpcí, která je způsobena nízkou produkcí vnitřního faktoru nebo poruchou vstřebávání komplexu B12 a vnitřního faktoru střevní stěnou. Nejčastější příčinou nedostatku vnitřního faktoru bývá částečné odstranění žaludku nebo dráždění sliznice žaludku potravou například kávou, kořením či léky. Poruchu vstřebávání způsobují také chorobné stavy v tenkém střevě jako jsou například různé záněty, střevní dismikrobie při syndromu slepé křivky, při pankreatitidě či nákaze škulovcem.

Nedostatek vitamínu B12 způsobuje chudokrevnost, únavu, slabost, zácpu, ztrátu chuti a pokles váhy. Mohou se též objevit neurologické změny (otupělost a brnění v končetinách). Dalšími příznaky je obtížné udržování rovnováhy, deprese, dezorientace, slabá paměť a bolest jazyka a úst.

Neurologické poškození způsobené dlouhodobým deficitem vitamínu B12 může být ireversibilní. Dochází k syntéze vadných mastných kyselin, které se zabudovávají do buněčných membrán.

Nedostatek vitamínu B12 způsobuje i mentální choroby jako je deprese a další symptomy podobně popisovaných jako Alzheimerova choroba. Zvýšený homocystein, který může být snížen dodáváním vitamínu B12 se ukázal jako hlavní faktor při vzniku Alzheimerovy choroby. Zvýšený homocystein je též hlavním rizikovým faktorem při vývoji arteriosklerózy, primární poruchy při vzniku onemocnění cév a srdce. Kooperace vitamínu B12, kyseliny listové (B9) a pyridoxolu (B6) pomáhá ochránit zdi cévních kapilár urychlením přeměny homocysteinu zpět na aminokyseliny methionin (B12 a B9) a metabolizováním homocysteinu na cystathionin cystein (B6). Nedostatek vitamínu B12 se léčí injekcemi s vitamínem, ačkoliv mnohem efektivnější by byly dózy s vitamínem k orálnímu užití.

Zatím nebyly zpozorovány žádné nepříznivé účinky způsobené nadbytkem vitamínu B12 dodávaného z potravin. Neabsorbovaný vitamin B12 je vylučován močí podobně jako řada dalších vitamínů. [13, 14]

1.11 Funkce vitamínu B12 v těle

Hlavní funkcí vitamínu B12 v těle je regulace a ovlivnění syntézy DNA, ale také syntéza mastných kyselin a produkce energie. Je zapojen normálně do metabolismu každé buňky v těle, avšak hodně (ne všech) funkcí vitamínu B12 může být nahrazeno kyselinou listovou (vitamin B9, folacin) v dostatečném množství.

Vitamin B12 se podílí na krve tvorbě, činnosti jater a ovlivňuje metabolismus lipidů, sacharidů a replikaci DNA. Dále funguje jako kofaktor methioninsyntázy a L-methylmalonyl-CoA mutázy. Methioninsyntáza funguje jako katalyzátor konverze homocysteinu na methionin. Ten je nezbytný pro tvorbu S-adenosylmethioninu, univerzálního donoru methylových skupin pro téměř 100 různých substrátů, včetně DNA, RNA, hormonů, bílkovin a tuků. L-methylmalonyl-CoA mutáza vytváří sukcinyl Co-A z L-methylmalonyl-CoA při degradaci propionátu. Jde o esenciální biochemické reakce v metabolismu lipidů a proteinů. Sukcinyl Co-A je nezbytný pro syntézu hemoglobinu.

Je důležitý i pro funkci nervové soustavy, protože je třeba při tvorbě fosfolipidů buněčných membrán, což je důležité pro přenos nervových vzruchů a myelinových pouzder, které chrání a kryjí nervové buňky a zrychlují nervový přenos.

Vazba Co-C v koenzymu B12 je velmi reaktivní a zúčastňuje se 3 hlavních enzymatických reakcí v těle:

1. Izomerace – atom vodíku je přenesen mezi dvěma sousedícími atomy s průvodní výměnou druhého substituentu X, který může být atom uhlíku se substituenty, atom kyslíku v alkoholové skupině nebo aminová skupina.
2. Transfer CH_3 skupiny mezi 2 molekulami – uplatňuje se hlavně v nervové soustavě, kdy dárcovství methyl skupiny urychluje výrobu a recyklaci neurotransmiterů, které fungují jako mozkové přenašeče. Neurotransmitery jsou zodpovědné za paměť, náladu, bdělost, mentální jasnost a další procesy v nervové soustavě.
3. Dehalogenace – je to reakce, při které je atom halogenu odstraněn z organické molekuly. [14, 15]

2 OPTICKÉ ANALYTICKÉ METODY STANOVENÍ KOBALTU

2.1 Prekoncentrace a separace vzorku

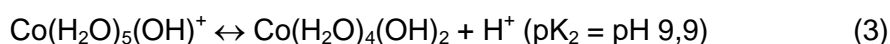
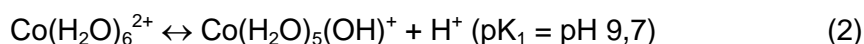
V zemské kůře je kobalt přítomen ve větším množství než olovo, molybden nebo kadmium. Koncentrace a distribuce závisí na akvatickém, terestrickém a atmosférickém systému. Mezi faktory, které ovlivňují distribuci kobaltu do zemské kůry patří biodostupnost pro rostliny, zvířata a samozřejmě člověk. Závisí také na regionální dostupnosti a na transferu kobaltu potravním řetězcem až do lidského těla. [17]

Kromě toho že se kobalt nachází v minerálech a horninách nachází se také v půdě. Množství organické hmoty, pH, podíl jílových minerálů, adsorpce, speciace, výměna iontů, spolusrážení a tvorba komplexů s organickými činidly určují dostupnost kobaltu v půdě pro kořeny rostlin. V systému půda – rostlina se kobalt chová stejně jako železo a mangan. Množství kobaltu v půdách je ovlivněno mnoha faktory, typem mateční horniny, typem půdního profilu, velikostí částic, stářím půdy, vlivem půdního vzduchu, vstupem aerosolů, využitím země a geomorfologickými a klimatickými faktory, hospodařením půdy s vodou a teplotou. [17]

Koncentrace celkového kobaltu v půdě se pohybuje od 0,1 ppm až do 50 ppm a koncentrace dostupného kobaltu pro rostliny. Nedostatek kobaltu v půdách je důsledek nedostatku vitamínu B12 v přežvýkavcích (respektive koenzymu B12). Příjem iontového Co^{2+} rostlinami je ovlivněn chováním manganu, který kontroluje biodostupnost kobaltu a odtokem vody z půd. Půdy, které jsou méně odvodňovány obsahují větší koncentrace extrahovatelného kobaltu a tudíž se zvyšuje i příjem kobaltu kořeny rostlin. [18]

Kobalt je v terestrickém ekosystému velmi perzistentní, stejně jako ostatní kovy. Původ kobaltu je jak přirozený tak antropogenní. Antropogenní znečištění terestrického ekosystému pochází nejvíce z těžby a tavení rud a při průmyslových činnostech. Osud kobaltu v životním prostředí je různý. Vyskytuje se i kontaminace radioaktivním kobaltem ^{60}Co v říčních systémech (z jaderných reaktorů) a v podzemních vodách (prosakováním z nepatříčně zabezpečených nebo utěsněných skládek z úložišť radioaktivních odpadů). Nicméně kinetika tvorby a disociace komplexu kobaltu s přírodními ligandy naznačuje, že speciace kobaltu má výrazný vliv na termodynamickou rovnováhu. K určení speciace je potřeba použít nejen termodynamické výpočty, ale je potřeba zohlednit hlavně kinetické faktory k poznání speciace kobaltu v terestrickém prostředí, chemických vlastností a tudíž i potenciální toxicity. Kinetické aspekty určují biodostupnost a transport do terestrického ekosystému.

Celková koncentrace kobaltu v terestrickém prostředí závisí na podílu pevné složky ve vodě, zdroji kobaltu, obsahu kobaltu v sedimentu nebo na fyzikálně-chemických charakteristikách, které se uplatňují při distribuci kobaltu mezi pevnou a kapalnou fází. Obecně se koncentrace kobaltu v terestrických vodách pohybují od pikomolárních po mikromolární. Koncentrace kobaltu jsou větší ve vodě z půdních pórů a v říčních sedimentech. Ve vodě se kobalt nachází převážně v oxidačním stavu +II. Kobalt v oxidačním stavu +III je málo rozpustný ve vodě a ve vodném prostředí se uplatňuje pouze v případě, že je vázán silnou organickou molekulou. Dvojvázný kobalt je oktaedricky uspořádán se šesti molekulami vody a vzniká tak uspořádání $\text{Co}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$. Tento aqua kationt podléhá hydrolyze podle rovnice (2) a (3)



Produkty hydrolyzy mají o 2 až 6 řádů nižší koncentraci než výchozí $\text{Co}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$ při pH 4 – 8 (pH, které mají obvykle terestrické vody).[16]

V pitné vodě je kobalt detekován jen zřídka, ale v povrchové a podzemní vodě je kobalt přítomen řádově v koncentracích $\mu\text{g/l}$. Zvýšené koncentrace kobaltu v přírodních vodách jsou způsobeny jednak přítomností kobaltu v půdách a jednak antropogenním znečištěním. V oceánech je průměrná koncentrace kobaltu $0,3 \mu\text{g/l}$. [17]

Všechny tyto faktory je potřeba zohlednit při navrhování postupu prekoncentrace vzorku. Proces separace a prekoncentrace vzorku je žádoucí pro stanovení nízkých koncentrací analytu v odebraném vzorku.

2.1.1 Extrakce

Extrakce kapalinou je nejběžnější a nejvíce prostudovaná extrakční metoda. Je založena reakcí Co^{II} iontů s komplexotvorným činidlem za vzniku chelátů, jež jsou lehce extrahovatelné do rozpouštědla. Jako komplexotvorná činidla se dají použít nejrůznější sloučeniny jako je isonitroso-4-methyl-2-pentanon, fenylazobenzalaldoxim, cyanex-272 a isonitroso-5-methyl-2-hexanon (HIMH). Proti většině činidel má činidlo HIMH několik výhod, např. větší citlivost a selektivitu, kratší dobu extrakce a časový vývoj zabarvení a minimální interference cizích prvků. Optimální pH pro extrakci je od 8,2 do 9,4. Vzniklý komplex musí být extrahován do rozpouštědla, např. oktanol, toluen, benzen a chloroform. Extrakce je kvantitativní pouze při použití chloroformu. [19]

Extrakce tuhou fází (SPE) má několik výhod. Například vysoký prekoncentrační faktor, díky kterému prekoncentrace probíhá v krátkém čase, jednoduché oddělení fází a metoda je vhodná pro automatizaci. Extrakce tuhou fází spočívá v zachycení hydrofóbního kobaltu na pevném hydrofóbním sorbentu. Poté dochází k desorpci kovu změnou polaritý rozpouštědla. K technice SPE se nedají použít agresivní činidla a koncentrované kyseliny.

Mezi nepoužívanější sorbenty patří díky silným interakcím aktivní uhlík, ale dají se použít i jiné sorbenty, např. celulóza, Lewatit S 100, mikrokrystalický naftalen a další. Aktivní uhlík je hydrofóbní materiál, který z vodných roztoků adsorbuje nepolární nebo málo polární látky a z tohoto důvodu je nutné převést kobalt do vhodného chelátu (např. se vytvoří komplex s dithiooxamidem – DTO). Sorpce je kvantitativní jestliže chelát obsahuje v molekule systém π -elektronů. Nejlépe probíhá extrakce při pH 6, při nižších pH dochází ke konkurenci H^+ iontů s ionty kovu. Mezi nejlepší eluenty pro prekoncentraci kobaltu metodou SPE patří 3M HCl a 3M HNO_3 v acetonu. Z cizích iontů nejvíce ruší Ag^+ , Pb^{2+} a Hg^{2+} při 150ním nadbytku oproti koncentraci kobaltu. [20, 21]

Separace a prekoncentrace tzv. **Cloud point extrakcí** se stává důležitou praktickou aplikací se začátkem používání surfaktantů v analytické chemii. Cloud point extrakce nabízí výhodnou alternativu pro konvenční metody extrakce. Přidávkem malého množství vodného roztoku neiontového tenzidu a zahřátím na teplotu zakalení (cloud point) se vytvoří dvoufázový systém. Hydrofóbní komplexy se zkoncentrují v povrchové vrstvě tenzidu a tato fáze se oddělí dekantací nebo odstředěním. Mezi výhody tohoto typu extrakce patří jednoduchost, nízké finanční náklady a jelikož se nepoužívají organická rozpouštědla i menší toxicita. Cloud-point extrakce poskytuje výsledky, které jsou srovnatelné s ostatními extrakčními technikami.

Tato metoda je vhodná pro stanovení kobaltu ve vodných vzorcích metodou atomové absorpce s atomizací v plameni. Cloud-point extrakce se používá pro extrakci a prekoncentraci iontů kovů po vytvoření ve vodě rozpustného komplexu s vhodnými činidly (např. 1-(2-thiazolylazo)-2-naftol – TAN) nebo 2-[2'-(6-Methyl-benzothiazolylazo)]-4-bromofenol – BTABr. [22, 23, 24]

Při studiu vlivu koncentrace činidla bylo zjištěno že od koncentrace $c_{\text{TAN}} = 2 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l}$ se extrakční výtěžek již nemění. Z tenzidů se používá např. oktylfenoxypolyethoxyethanol

(Triton X-114). Tento tenzid má vhodné vlastnosti pro extrakci, jako např. nízký bod zákalu, vysoká hustota v hydrofóbní fázi, jednoduchá separace hydrofóbní fáze centrifugou, komerční dostupnost a relativně nízká cena, nízká toxicita a málo elektroaktivních skupin v molekule. Extrakční výtěžek pro kobalt je téměř 100% v rozmezí pH 6 – 10. Od koncentrace tenzidu 0,05 % se výtěžek snižuje, proto je tato koncentrace nejvhodnější pro praktické použití. Při použití činidla TAN dochází jen k minimálním interferencím cizích iontů.

Použití spojení cloud point extrakce s atomovou absorpcí s elektrotermickou atomizací se používá pro stanovení kobaltu v pitné vodě. V rozmezí pH 6 – 11 se dosahuje nejvyšších extrakčních výtěžků, jako tenzid se používá neiontový polyethylenglykolmono-*p*-nonylfenylether (PONPE 7.5), který vytváří chelát s Co^{2+} ionty. Vhodná koncentrace PONPE 7.5 je 0,08 %, kdy je dostatečně vysoký extrakční výtěžek a vliv pozadí je zanedbatelný. [25]

2.2 Stanovení kobaltu

Po předchozí prekoncentraci vzorku následuje analytická koncovka. Kobalt lze stanovit různými analytickými metodami, které se liší instrumentací, citlivostí a lineárním rozsahem. Mezi používané metody stanovení kobaltu patří:

- Molekulová absorpční spektrometrie (spektrofotometrie)
- Atomová absorpční spektrometrie
- Elektrochemické metody
- Separční a jiné metody

Z hlediska mezí detekce jsou nejpoužívanější optické analytické metody (spektrometrie), zejména metody spektrofotometrické a metody atomové absorpční spektrometrie. Spektrometrie je obecně definována jako odvětví, zabývající se měřením a vyhodnocováním elektromagnetického záření, emitovaného hmotou nebo interagujícího s hmotou. Atomová absorpční spektrometrie má nižší mez detekce a v praxi je více využívána. [26]

2.2.1 UV-VIS spektrofotometrie

Molekulová absorpční spektrometrie v ultrafialové a viditelné oblasti (spektrofotometrie, fotometrie) se zabývá měřením a interpretací elektronových spekter molekul látek, které absorbují elektromagnetické záření v rozsahu vlnových délek od 200 do 800 nm. Tyto látky jsou buď bezbarvé nebo barevné. Látky, které se jeví jako bezbarvé absorbují záření o vlnových délkách do 380 nm. Látky, které se jeví jako barevné absorbují záření v rozsahu vlnových délek 380 nm až 770 nm. Tato metoda je velmi spolehlivá a použitelná jak pro kvalitativní tak kvantitativní analýzu.

Molekuly mají schopnost pohlcovat elektromagnetické záření pouze určitých vlnových délek, jelikož mohou existovat v určitých kvantových stavech, které se liší energií. Absorpcí energie, která odpovídá právě rozdílu energií mezi dvěma energetickými hladinami přechází molekula ze stavu s nižší energií do stavu s vyšší energií.

Zdroj záření vypouští záření o vstupujícím zářivém toku ϕ_0 , část tohoto záření je absorbována vzorkem a část v ideálním případě projde a je zaznamenána na detektoru jako vystupující zářivý tok ϕ . Rovnice (4) zobrazuje podíl zářivých toků ϕ a ϕ_0 , který se nazývá transmittance:

$$\tau = \frac{\phi}{\phi_0} \quad (4)$$

V praxi se spíše ale pracuje s absorpční, což je, jak vyjadřuje rovnice (5) záporně vzatý logaritmus transmitance:

$$A = -\log \tau = \log \frac{\phi_0}{\phi} \quad (5)$$

Ve zředěných vodných roztocích vykazuje vlastní absorpce jen málo kationtů kovů. Kationty se proto převádějí do stabilních barevných komplexů, které vznikají reakcí s komplexotvornými činidly obsahujícími chromoforní skupiny.

Spektrofotometrie je využitelná jak při organické analýze, tak při anorganické analýze. Při kvalitativní analýze se využívá λ_{\max} absorpčních pásů. Poloha těchto pásů je dána absorbovanou energií při elektronovém přechodu a souvisí se strukturou látky. Je charakteristická pro část molekuly (chromofor) a je ovlivněna substituenty i použitým rozpouštědlem. Identifikace látky na základě získaného absorpčního spektra není jednoznačná, proto metoda UV-VIS umožňuje přesnou identifikaci látek za využití dat z jiných metod jako jsou IČ, NMR, MS.

Kvantitativní analýza je založena na platnosti Lambert-Beerova zákona, který je uveden v rovnici (6). Lambert-Beerův zákon uvádí vztah mezi naměřenou absorpční A a látkovou koncentrací c ($\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$), kde ε je molární absorpční koeficient a l je optická dráha.

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot c \quad (6)$$

Pro stanovení koncentrace prvku se vybírá vlnová délka, při které má vzorek maximální absorpční, je označována λ_{\max} , a interferující látky mají naopak absorpční minimální.

Citlivost spektrofotometrického stanovení bývá udávána jako nejmenší stanovitelné množství látky vyjádřené v hmotnostní koncentraci, tj. μg látky v 1 ml roztoku (ppm), nebo lépe na základě velikosti směrnice kalibračního grafu (hodnoty molárního absorpčního koeficientu ε). Čím vyšší molární absorpční koeficient, tím nižší koncentrace analytu lze stanovit.

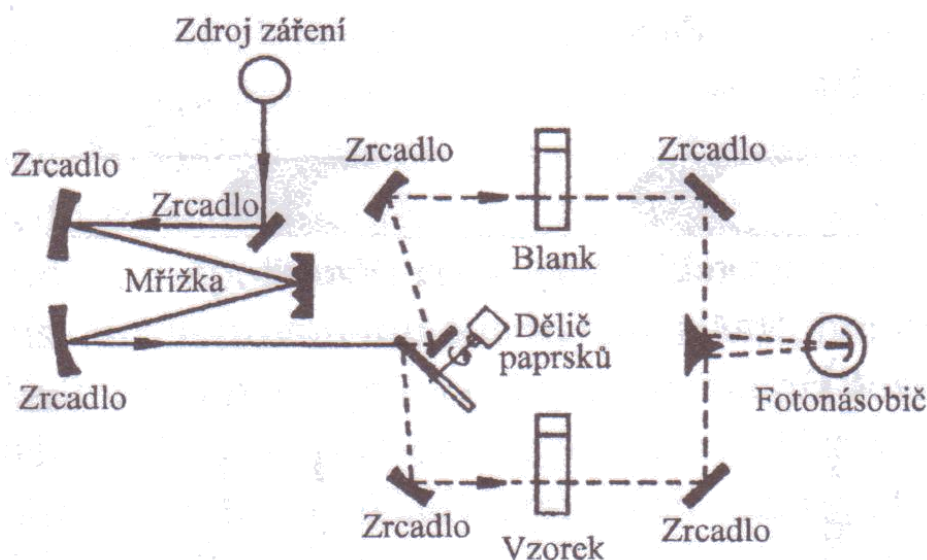
Měření se provádí metodou kalibrační křivky anebo metodou standardního přídávku. Vzorky v této diplomové práci byly proměřeny metodou standardního přídávku. Spektrofotometr je tvořen 4 základními částmi:

1. *Zdroj záření.* Jako zdroj spojitého primárního záření se ve spektrofotometrech pro blízkou UV oblast užívá nejčastěji deuteriová výbojka (160 – 380 nm). Pro viditelnou oblast se používají wolframové ($\lambda > 375$ nm) nebo halogenové žárovky.
2. *Monochromátor.* Monochromátor je tvořen vstupní štěrbinou, optickým prvkem, kterým nejčastěji bývá optická mřížka a výstupní štěrbinou. Spojité záření ze zdroje prochází nejdřív vstupní štěrbinou a rozkládá se na optické mřížce. Jednotlivé složky monochromatického záření se vymezí vstupní štěrbinou. Různým natočením monochromátoru lze získat záření s požadovanou vlnovou délkou. Spektrální šířka vstupní štěrbiny pro tuto diplomovou práci byla zvolena 2 nm. Čím je při registraci spektra použito přístroje s lepším monochromátorem, tím jemnější struktura spektra může být rozlišena.
3. *Absorbující prostředí.* Absorpční prostředí je tvořeno kyvetami. Kyvety mají konstantní známou vnitřní tloušťku absorbující vrstvy, většinou 1 cm. Materiál, ze kterého jsou kyvety zhotovené nesmí absorbovat záření ve sledovaném rozsahu vlnových délek. Pro měření v ultrafialové oblasti se volí kyvety křemenné, pro viditelnou oblast pak kyvety skleněné.
4. *Detekce.* Detekční systém je složen z detektoru záření a registračního záření (PC). Detektor převádí zářivý tok na elektrický signál. Jako detektory se nejčastěji používají fotonky a fotonásobiče.

Kromě uvedených základních prvků, které určují využitelnost a metodiku jsou spektrofotometry vybaveny řadou čoček a zrcadel, které usměřují a fokusují paprsek záření.

Svazek polychromatického záření vycházející ze zdroje dopadá na vstupní štěrbinu monochromátoru. Po rozkladu na optické mřížce vychází z výstupní štěrbinou svazek přibližně monochromatického záření, které je charakterizováno intervalem vlnových délek, které projdou výstupní štěrbinou. Střední hodnotou tohoto intervalu je nastavená vlnová délka. Velikost intervalu je závislá na konstrukci přístroje. Po průchodu absorpčním prostředím dopadá monochromatické záření na fotoelektrický detektor a vzniklý fotoproud se převádí na digitální výstup. [27]

Uspořádání spektrofotometrů může být jednopaprskové či dvouprskové. Pro účely této diplomové práce byl použit dvouprskový spektrofotometr. Při práci s dvouprskovým spektrofotometrem se užívá jedné měřené kyvety se vzorkem a druhé srovnávací kyvety s rozpouštědlem. Po výstupu z monochromátoru je paprsek rozdělen na paprsek procházející měrnou a srovnávací kyvetou. Schéma dvouprskového spektrofotometru je znázorněno na obr. č. 2. [26, 28]



Obr. č. 2: Schéma dvouprskového spektrofotometru[26]

2.2.1.1 Faktory ovlivňující spektrofotometrické stanovení

Optimální podmínky dané spektrofotometrické reakce musí být dodrženy tak, aby proběhla kvantitativně a dostatečně rychle a v měřitelném množství. Nejčastěji se jedná o vznik barevného produktu a pro stanovení organických i anorganických analytů se využívá viditelné oblasti spektra. [26]

2.2.1.1.1 Vliv rozpouštědla

Rozpouštědla používaná ve spektrofotometrii musí splňovat 3 základní požadavky. Měřená látka musí být v daném rozpouštědle rozpustná. Rozpouštědlo nesmí v měřené oblasti absorbovat záření. Rozpouštědla musí být spektrofotometricky čistá, tzn. že nesmí obsahovat příměsi, které absorbují v oblasti vlnových délek, pro které se rozpouštědlo používá.

Největší vliv na spektrum má polarita rozpouštědel a vznik vodíkových můstků. Při spektrofotometrickém stanovení se nejčastěji používá jako rozpouštědlo voda. Ne všechna organická činidla ale jsou rozpustná ve vodě. V tomto případě je nutné použít organická rozpouštědla, popřípadě směsi rozpouštědel. Volba rozpouštědla může ovlivnit také rychlost chemické reakce. Změna rozpouštědla je spojena se změnou solvatace reagujících iontů. [26]

2.2.1.1.2 Vliv pH

V případě acidobazických reakcí je určitá hodnota pH předpokladem vzniku produktu stanovené látky. Při reakci iontů kovů s vhodnými organickými činidly, jejichž struktura je ovlivněna zejména hodnotou pH. Komplexotvorná činidla jsou různě silné báze či kyseliny a pouze některé disociované formy při vhodném pH poskytují požadovaný komplex s iontem kovu. Různé pH také může podporovat vznik nežádoucích komplexů. V případě že je v analyzovaném vzorku přítomno více iontů prvků, se kterými činidlo také tvoří komplexy je důležité určit pH, při kterém vznikne pouze požadovaný komplex iontu kovu. Optimální pH pro stanovení iontů ve směsi lze stanovit v případě, že konstanty stability jednotlivých komplexů přítomných kovů jsou dostatečně rozdílné. Optimální pH pro spektrofotometrické stanovení se realizuje buď přidavkem kyseliny či zásady, nebo přidavkem vhodného pufru. Tyto přidávané látky ale nesmí rušit stanovení, což je potřeba ověřit. [26]

2.2.1.1.3 Vliv teploty

Teplota je termodynamická veličina, která ovlivňuje spektrofotometrické stanovení. Vliv teploty vyplývá především ze základních termodynamických vztahů. Mezi změnou standardní Gibbsovy energie ΔG^0 a rovnovážnou konstantou reakce K platí vztah, který udává rovnice (7).

$$\Delta G_T^0 = -RT \ln K \quad (7)$$

Změna rovnovážné konstanty s teplotou je dána vztahem, který popisuje rovnice (8), kde ΔH^0 je standardní reakční teplo.

$$\frac{d \ln K}{dT} = \frac{\Delta H^0}{RT^2} \quad (8)$$

Jestliže ΔH^0 nezávisí na teplotě, získáme vynesáním závislosti $\ln K$ proti $1/T$ přímkou se směrnici $(-\Delta H^0/R)$. Pro exotermickou reakci ($\Delta H < 0$) rovnovážná konstanta s teplotou klesá, pro endotermickou reakci ($\Delta H > 0$) hodnota K s teplotou roste.

Teplota výrazně ovlivňuje také kinetiku chemické reakce. Závislost rychlostní konstanty k na teplotě T je dána vztahem (9), kde E je aktivační energie, a A je frekvenční faktor, který zahrnuje celkový počet srážek a sférické faktory.

$$k = A \exp\left(\frac{-E}{RT}\right) \quad (9)$$

Pro mnoho reakcí se rychlostní konstanta k zvětšuje 2 až 3krát při vzrůstu teploty o 10 °C. [26]

2.2.1.1.4 Vliv koncentrace činidla

Dostatečná koncentrace činidla posouvá použitou rovnovážnou reakci ve směru tvorby produktu. Současně ovlivňuje také kinetiku reakce, neboť rychlost reakce je přímo úměrná koncentraci výchozích složek. [26]

2.2.1.1.5 Vliv iontové síly

V případech, že přítomnost elektrolytů v polárních rozpouštědlech ovlivňuje chemické rovnováhy činidla (disociace skupin) nebo produktů (stabilita komplexů) je vliv iontové síly největší. Mimo jiné má iontová síla vliv i na rychlost reakce. Při reakci iontů stejných nábojů se rychlost zvyšuje se zvyšující se iontovou silou, při reakci iontů různých nábojů rychlost reakce naopak klesá. Iontová síla nemá vliv na rychlost reakce pouze v případě reakce dvou neutrálních molekul nebo neutrální molekuly a iontu. Při použití tenzidů má iontová síla také výrazný vliv.

Ve většině stanovení se tedy doporučuje udržet konstantní iontovou sílu na optimální hodnotě přidávkem vhodného elektrolytu. [26]

2.2.1.1.6 Vliv tenzidů

V 60. letech 20. století se ukázalo použití tenzidů při spektrofotometrickém stanovení jako vhodné ovlivnění spektrofotometrických reakcí.

Micelární roztoky tenzidů mají schopnost rozpouštět některé málo rozpustné komplexy a umožnit tak jejich stanovení ve vodném prostředí bez nutnosti extrakce do organických rozpouštědel. To je také největší výhoda použití surfaktantů ve spektrofotometrii. Další výhodou je možnost využití iontových asociátů, tvořených ionty tenzidu s velkými ionty analytu s opačným nábojem. Absorbance těchto asociátů se proměřuje po extrakci do organického rozpouštědla nebo méně často ve vodném prostředí.

Tenzidy mají schopnost ovlivňovat acidobazické vlastnosti spektrofotometrických činidel a absorpční spektra chelátů těchto činidel. Dochází ke změně polohy (bathochromní či hypsochromní posuny) a výšky (hyperchromní či hypochromní) absorpčních pásů. Tento jev je způsoben vznikem iontového asociátu a jeho následnou solubilizací v micelách tenzidů, nebo změnou polaritu prostředí při vázání chelátů kovů do micel tenzidů. Hyperchromní posuny zvyšují citlivost stanovení. [26]

2.2.1.2 Spektrofotometrická činidla pro stanovení kobaltu

2.2.1.2.1 4-(2-pyridylazo)rezorcinol

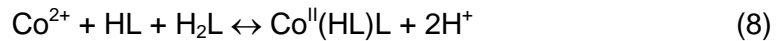
4-(2-pyridylazo)rezorcinol (dále PAR) je oranžová ve vodě rozpustná sloučenina. Vodný roztok je zbarven žlutě. PAR poskytuje ve vodě rozpustné cheláty kovů. Absorpční maximum má při pH 6 – 9 hodnotu 413 nm. PAR je široce používán jako spektrofotometrické činidlo pro stanovení kovů. Má analytické využití pro reakce s Cu (II), Co (III), Ni (II), Fe (II, III), Cd, Zn, Pb (II), Hg (II), UO_2^{2+} , Pd (II), Pt (II, IV), Os, Ru, Rh, Ga, In, Tl (III), Sc, Y, La, lanthanoidy, aktinoidy, Mn (II), Zr, Hf, V (V, VI), Nb, Ta, Bi (III), za varu nebo zvýšené teploty s Cr(III), Os, Ru, Rh.

Významnou výhodou je zvýšená selektivita tohoto činidla na ionty kovů obsahující neobsazený d- nebo d^{10} orbital nebo f-orbital. PAR je více citlivý v adičních reakcích než thiazolylazo barviva nebo pyridylazofenoly. Je docela stabilní vůči rozkladu v kyselinách či zásadách. V závislosti na pH a koncentraci činidla vznikají cheláty kovů složení ML, MLH, $M(\text{LH})_2$, ML_2H nebo ML_2 . Stabilita a molární absorptivita těchto komplexů je různá. Ve formě iontových párů s objemným terciárním organickým kationtem mohou být některé z aniontových chelátů snadno extrahovatelné do nepolárních rozpouštědel.

Kobalt má v chelátu s činidlem PAR výhradně oxidační číslo +III i bez přítomnosti oxidačních činidel, oxidační stav kobaltu +II se s činidlem PAR neuplatňuje. PAR tvoří s kobaltem 2 sloučeniny. V kyselém prostředí při pH < 3 vzniká protonovaný chelát $\text{Co}^{\text{III}}\text{L}(\text{LH})$. Je rozpustný ve vodě i organických rozpouštědlech a má dvě absorpční maxima při 430 nm

a 540 nm. Druhý chelát o složení $\text{Co}^{\text{III}}\text{L}_2^-$ vzniká v equimolárních roztocích i v roztocích jak s nadbytkem činidla tak s nadbytkem kovu. Vytváří se od pH 3,2, ale tvorba je kvantitativní až při pH > 5,85. Tento komplex má absorpční maximum při 510 nm a molární absorpční koeficient činí $6 \cdot 10^4 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Z komplexu $\text{Co}^{\text{III}}\text{L}_2^-$ s malým nadbytkem činidla vzniká po okyselení na pH < 3 chelát $\text{Co}^{\text{III}}\text{L}(\text{LH})$.

Pravděpodobné schéma tvorby chelátu $\text{Co}^{\text{III}}\text{L}_2^-$ udává rovnice (8) a (9) [29, 30, 50]



2.2.1.2.2 2-(5-Brom-2-pyridylazo)-5-diethylaminofenol

Pyridylazo barviva s jednou zcela nebo částečně alkylovanou amino skupinou v *para* pozici k azo skupině náleží do skupiny citlivých azo barviv pro stanovení řady iontů přechodných kovů. 2-(5-brom-2-pyridylazo)-5-diethylaminofenol (dále PADAP) je ve vodě nerozpustná látka, která tvoří tmavě červené roztoky s organickými rozpouštědly. Mezi nejpoužívanější rozpouštědla patří ethanol a dimethylformamid. Roztok PADAP v čistém dimethylformamidu má absorpční maximum při 445 nm. PADAP je spektrofotometrické činidlo pro stanovení Co, U, Zn, Cd, Mn, Ni, Cu, Fe, Tl, In a Ga.

Stanovení kobaltu pomocí činidla PADAP je citlivější než stanovení s PAR. PADAP se rozpouští v čistém dimethylformamidu, ale při přípravě roztoků pro měření se používá jako rozpouštědlo voda. Maximální obsah dimethylformamidu v měřeném roztoku musí být maximálně 10 %. Jako stabilizace činidla a samotného chelátu ve vodné fázi se používá neiontový tenzid Triton X-100 o obsahu maximálně 0,1 – 0,2 %. Při stanovení se používá jako oxidační činidlo peroxodisíran amonný. Komplex vykazuje časový vývoj a s rostoucím časem se i zvyšuje absorbance. V rozmezí pH 4 – 9 má komplex při 586 nm maximální absorbanci. Stanovení kobaltu pomocí PADAP je vhodné pro stanovení ve vodách a ve vitamínu B12. Molární absorpční koeficient pro stanovení kobaltu při 586 nm činí $8,1 \cdot 10^4 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. [31]

2.2.1.2.3 Další činidla

Další spektrofotometrická činidla pro stanovení kobaltu již nejsou tak citlivá jejich používání sebou přináší problémy, například interference cizích iontů a nižší stabilita komplexu.

Jedním z nich je 1-(2-pyridylazo)-2-naftol (PAN), který je rozpustný v methanolu a ethanolu. PAN slouží jako činidlo pro stanovení mnoha kovů (Zn, Mn, Cd, Cu, Co, U...), jejichž cheláty jsou částečně rozpustné ve vodě. Červené cheláty $\text{Co}(\text{II})$ s činidlem PAN jsou ve vodném prostředí rychle oxidovány na zelené $\text{Co}(\text{III})$ cheláty. Molární absorpční koeficient je $1,9 \cdot 10^4 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. [32]

Dalším činidlem pro stanovení kobaltu je 4-(2-thiazolylazo)rezorcinol (TAR). Pro stanovení kobaltu je žádoucí použití maskovacích činidel a správná optimalizace podmínek stanovení. Ionty kobaltu reagují s činidlem TAR v celém rozmezí pH a vytváří tmavě červené roztoky. [33]

Dalšími použitelnými činidly jsou např. 4-(2-thiazolylazo)naftol (TAN), 2-(2-thiazolylazo)-4-methoxyfenol (TAMP), 2-nitroso-1-naftol a další.

2.2.2 Stanovení kobaltu metodou atomové absorpční spektrometrie

Atomová absorpční spektrometrie AAS je optická metoda, která využívá měření absorpce elektromagnetického záření volnými atomy prvků. Volné atomy prvků v plynné fázi

na základní energetické hladině absorbují monochromatické záření, které emitují atomy týchž prvků. Neabsorbované záření po průchodu monochromátorem dopadá na detektor a vzniklý elektrický signál je vyhodnocen. Atomy prvků absorbují na rezonanční čáře.

AAS je relativně mladá metoda, která umožňuje prvkovou analýzu. Využívá se v několika variantách, podle způsobu atomizace sledovaného prvku: F AAS – AAS s atomizací v plameni, ET AAS – AAS s elektrotermickou atomizací a HG AAS – AAS po konverzi na těkavé hydridy.

Detekční limity této metody se pohybují řádově v $\mu\text{g/l}$.

Přístroj se skládá ze čtyř částí:

1. *Zdroj primárního záření.* Primární záření musí mít vysokou zářivou energii soustředěnou do úzkého spektrálního intervalu, dlouhodobě stabilní zářivý tok ϕ_0 , čáry nesmí být deformované samoabsorpcí a pozadí musí být minimální. Tyto požadavky nejlépe splňují zejména výbojky s dutou katodou HCL (Hollow Cathode Lamp). Dalšími méně používanými zdroji jsou Bezelektrodové výbojky EDL (Electrodes Discharge Lamp) a laditelný barvivový laser.
2. *Absorpčního prostředí s volnými atomy.* K absorpci primárního záření dochází v tzv. atomizátoru, což je systém, který účinně převádí prvky z kapalného stavu do stavu atomárního plynného. Atomizaci je možno provádět v plameni, elektrotermicky nebo v křemenných atomizátorech. Jednotlivé atomizátory se liší jak provedením tak citlivostí a časovou závislostí.
3. *Monochromátor.* V monochromátoru dochází k izolaci spektrálního intervalu, ve kterém se nachází příslušná absorpční rezonanční čára sledovaného prvku. Většinou se užívá holografických (interferometricky zhotovených) mřížek pro rozsah vlnových délek 190 – 900 nm. Mřížkové monochromátory se používají nejčastěji konstrukce Czerny – Turner. Hlavním úkolem monochromátoru je tedy separovat určitý interval vlnových délek $\Delta\lambda$ ze spektra. Velikost intervalu $\Delta\lambda$ se volí velikostí výstupní štěrbinu monochromátoru. V AAS se běžně pracuje s intervaly od 0,2 – 2 nm.
4. *Detekční systém.* V AAS se používá jako detektor fotonásobič. Výhodou fotonásobiče je vysoká citlivost a velmi nízká časová konstanta (10^{-8} – 10^{-9} s). Fotonásobič je evakuovaná skleněná baňka se vstupním okénkem z vhodného materiálu (křemen). Detektor sestává z katody, anody a systému dynod. (až 13). [26, 34]

2.2.2.1 Faktory ovlivňující stanovení kobaltu metodou AAS

2.2.2.1.1 Vliv pozadí

Absorpce záření nemusí být při měření způsobena pouze volnými atomy analytu (specifická absorpce), ale i absorpcí pozadí (nespecifická absorpce). Mezi nesespecifickou absorpcí se řadí rozptyl záření na nevypařených částicích a molekulová absorpce. Absorpce pozadí způsobuje kladnou chybu a je nutno ji potlačit. Mezi nejpoužívanější metody korekce pozadí patří kompenzace pozadí se zdrojem kontinuálního záření, Kompenzace systémem Zeeman a kompenzace pozadí systémem Smith – Hieftje.

Kompenzace pozadí s kontinuálním zdrojem záření je založeno na střídání čárového a kontinuálního zdroje záření v optické cestě spektrometru, což je u většiny spektrometrů zajištěno elektrickou modulací obou zdrojů záření, jejichž fáze je vzájemně posunuta. Absorbance čárového zdroje odpovídá absorpci celkové, zatímco absorpce změřená kontinuálním zdrojem odpovídá pouze absorpci pozadí. Odečtením obou hodnot se získá specifická absorpce, která odpovídá koncentraci analytu v absorpčním prostředí.

Zeemanova korekce pozadí využívá Zeemanova jevu, tedy štěpení spektrálních čar v přítomnosti magnetického pole. Používá se štěpení jak emisních čar zdroje (přímá

Zeemanova korekce), tak absorpčních čar (přímá Zeemanova korekce). Při přímé Zeemanově korekci je zdroj umístěn v poli elektromagnetu, při nepřímé Zeemanově korekci je v poli elektromagnetu umístěn atomizátor. Přístroj ještě obsahuje pevný nebo rotační polarizátor. Měření je prováděno tak, že absorbance je střídavě odečítána při vypnutém a zapnutém magnetickém poli. Na detektoru je registrován rozdíl obou absorpcí, který odpovídá absorpci čistého analytu.

Korekce pozadí systémem Smith – Hieftje je založena na rozšíření profilu čáry a samozvratu čáry výbojky s dutou katodou, ke kterému dochází vlivem samoabsorpce při přezhavení výbojky s dutou katodou. Výbojka s dutou katodou je napájena v určitém cyklu. Střídají se fáze normálního zhavení, vysokoproudový puls a fáze uklidňovací. [26, 34, 35]

2.2.2.1.2 Použití modifikátorů

Modifikátory matrice jsou látky, které dokáží svou přítomností ve vzorku ovlivnit průběh termické úpravy nebo vlastní atomizační mechanismus. Rozlišuje se několik mechanismů působení modifikátorů:

1. Modifikátor reaguje s analytem za vzniku těkavější sloučeniny. Výsledkem je buď zvýšení citlivosti stanovení nebo přednostní reakce s analytem zabrání vzniku termicky stabilní sloučeniny (vliv fluoridů na stanovení Al).
2. Modifikátor reaguje s interferující látkou za vzniku těkavější sloučeniny. Důsledkem je odstranění interferující látky během termické úpravy (použití NH_4OH nebo NH_4NO_3 na odstranění NaCl, který se převede na NH_4Cl . Ten odtéká již při $355\text{ }^\circ\text{C}$).
3. Modifikátor stabilizuje analyt v atomizátoru do vyšších teplot. Poté se zvýší teplota atomizace a odstraní se tak těkavější složky matrice. Často se tento typ modifikátoru nazývá stabilizátorem ($\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$, Pd, Ni, $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$,...)
4. Modifikátory působí řadou specifických mechanismů, jako je například ovlivnění atomizačního mechanismu (askorbová kyselina zvyšuje redukční podmínky v atomizačním prostředí).
5. Modifikátor reaguje přednostně s interferující látkou za vzniku termicky stabilní sloučeniny. Dochází k přednostní atomizaci analytu. (reakce Li s chloridy při stanovení Tl).
6. Modifikátor dokáže ovlivnit vlastnosti vzorku, které vedou k zajištění reprodukovatelnosti sušení a dávkování vzorku. Příkladem může být použití kyselin (HNO_3), povrchově aktivních látek (Triton X-100), nebo látek, které zvyšují viskozitu (glycerol).

Modifikátor nesmí obsahovat stanovovaný prvek a jeho použití má smysl pouze ve vyšších koncentracích. Pro účely této diplomové práce byl použit modifikátor $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ v koncentraci 10 mg/l. [36]

2.2.2.2 Atomová absorpční spektrometrie s atomizací v plameni (F AAS)

Principem této metody je převedení roztoku na aerosol ve zmlžovači a zavádění tohoto aerosolu do laminárního předmíchávaného plamene. Kapalný vzorek je nasáván do zmlžovače, kde dochází ke vzniku aerosolů analytu. Aerosol analytu naráží na tzv. nárazovou kuličku, kde dojde záchytem k odstranění kapek přesahující určitou velikost a dochází ke smíchání aerosolu s proudem oxidovadla a paliva. Vzniklá směs je promíchána a vedena do hořáku tak, aby bylo zachováno laminární proudění. Tento proces se odehrává v mlžné komoře. Ke zmlžování vzorku se používají běžně pneumatické zmlžovače, méně pak vysokotlaké zmlžovače.

Hořáky se nejčastěji používají šterbinové. Mezi nejpoužívanější oxidovadla patří vzduch a oxid dusný, mezi nejčastější paliva pak acetylen, vodík a propan.

V tabulce č. 2 jsou uvedeny charakteristiky nejběžnější kombinací oxidovadla a paliva.

Tabulka č. 2: Charakteristiky běžně používaných typů plamene

Plamen	Průtok plynu		Teplota	Rychlost hoření
typ	dm ³ /min		K	cm/min
	Palivo	Oxidovadlo		
Vzduch - propan	0,3 - 0,45	8	2200	45
Vzduch - acetylen	1,2 - 2,2	8	2450	160
Vzduch - vodík	6	8	2300	320
N ₂ O - propan	4	10	2900	250
N ₂ O - acetylen	3,5 - 4,5	10	3200	285
N ₂ O - vodík	10	10	2900	380

Tato metoda je použitelná pro stanovení kobaltu v pitné, mořské, povrchové, odpadní vodě i ve výluzích z půd. Stanovení kobaltu se provádí při vlnové délce 240,7 nm. V této diplomové práci byl použit systém acetylen-vzduch.[36, 37]

2.2.2.3 Atomová absorpční spektrometrie s elektrotermickou atomizací (ET AAS)

Při atomové absorpci s elektrotermickou atomizací je kapalný vzorek zaváděn do speciální odporově vyhřívané kyvety. Vhodným materiálem těchto kyvet je pyrolytický grafit, wolfram nebo molybden. Kyveta je opatřena platformou, na kterou se vzorek nanáší. Tato platforma je malá tenká destička, která je vložena do kyvety. Při použití kyvety s platformou přechází analyt do plynné fáze později než při nástřiku vzorku na stěnu kyvety. Celá atomizace probíhá v ochranné atmosféře argonu, aby se zabránilo přístupu kyslíku do atomizátoru.

Po nadávkování vzorku je teplota zvyšována v několika krocích. V první fázi dochází k odpaření rozpouštědla a vzorek se vysuší. V dalším kroku dochází k pyrolýze. Zde se odstraní největší část matrice vzorku (anorganické soli, organické zbytky matrice). Následuje ohřev na teplotu atomizace, vzniká oblak plynných atomů sledovaného analytu v základním energetickém stavu a k absorpci primárního záření. Následuje krátkodobé zahřátí nad teplotu atomizace a kyveta se tím vyčistí. Poté se kyveta ochladí na původní teplotu a je připravena pro další použití.

Stanovení kobaltu metodou ET AAS se provádí při vlnové délce 240,7 nm a šířce šterbiny 0,2 nm na přístroji běžné konstrukce se Zeemanovým štěpením. Napětí na výbojce s dutou katodou je různé podle výrobce. Atomizace se provádí v grafitových kyvetách vybavených platformou. detekční limit činí až 1,7 ng/l. [38]

2.2.3 Stanovení kobaltu metodou ICP-OES

Plazma se definuje jako ionizovaný plyn obsahující dostatečnou koncentraci elektricky nabitých částic, přičemž počet kladných a záporných nábojů je stejný. Celá soustava je elektricky vodivá, ale celkově nevykazuje žádný elektrický náboj (je quasi neutrální).

Vysokofrekvenční indukčně vázané plazma excituje molekuly vzorku. Metoda je založena na měření intenzity emitovaného záření, které vzniká při přechodu valenčního elektronu z vyšší energetické hladiny na hladinu nižší. Měření probíhá na vybraných emisních čarách určitých vlnových délek.

Metoda ICP OES je jednou z nejpoužívanějších metod pro stanovení stop kobaltu. Měření probíhá při 228,616 nm. Po prekoncentraci vzorku může mít detekční limit až 100 ng/l a aplikuje se pro stanovení kobaltu v pitných vodách. [39]

Ve spojení s indukčně vázanou plazmou se v současné době hojně využívá technika hmotnostní spektrometrie. ICP-MS představuje techniku ultrastopové multielementární analýzy. Technika je založena na ionizaci prvků ve vzorku přítomných v argonovém indukčně vázaném plazmatu. Vzniklé ionty jsou přes interface vedeny do hmotnostního spektrometru a tam jsou analyzovány.[34]

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Přístroje a zařízení

Absorpční spektrofotometr UNICAM UV 500, vyráběný firmou Thermo Spectronic je dvoupraprskový skenovací spektrofotometr klasické konstrukce. Detektorem je fotonásobič. Měření probíhalo ve skleněných kyvetách o optické dráze 1 cm.

Atomový absorpční spektrometr AAS ZEEnit 60 od firmy AnalytikJena AG s elektrotermickou atomizací klasické konstrukce a Zeemanovou korekcí pozadí a autosamplerem. Jako zdroj záření byla použita kobaltová výbojka s dutou katodou SpectrAA Lamp od firmy Varian. Pomocí autosampleru byl nanášen do grafitové kyvety s modifikátorem.

Atomový absorpční spektrometr s atomizací v plameni AAS SpectrAA 30 od firmy Varian. Zdrojem záření je výbojka s dutou katodou SpectrAA Lamp od firmy Varian. Vzorek byl nasáván kapilárou přímo z roztoku.

Analytické digitální váhy SCALTEC SPB 32 od firmy Scaltex Instruments GmbH.

Magnetická míchačka s ohřevem Fischer Scientific, spol. s. r. o.

Pro přesně měření pH byl použit pH metr InoLab pH level 3 od firmy WTW se zapojenou kombinovanou elektrodou typu SenTix také od firmy WTW.

Membránové filtry PRAGOPOR od společnosti Pragochemia, spol. s.r.o., o velikosti pórů 0,4 μm .

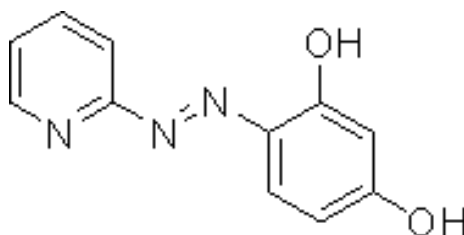
3.2 Roztoky a chemikálie

Všechny použité chemikálie byly čistoty p. a. (pro analýzu)

3.2.1 Analytická činidla a standard

4-(2-pyridylazo)rezorcinol

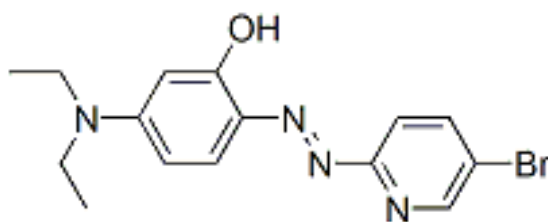
4-(2-pyridylazo)rezorcinol pro tuto diplomovou pochází od firmy Lachema, Brno, ČR. Zásobní roztok o koncentraci $1 \cdot 10^{-3}$ mol/l byl připraven rozpuštěním vypočítané navážky v destilované vodě. Roztok byl skladován ve tmě maximálně 2 dny. Vzorec 4-(2-pyridylazo)rezorcinolu je znázorněn na obrázku č. 3.



Obrázek č. 3: 4-(2-pyridylazo)rezorcinol

2-(5-Brom-2-pyridylazo)-5-diethylaminofenol

2-(5-Brom-2-pyridylazo)-5-diethylaminofenol pro potřebu této diplomové práce byl vyroben ve firmě Sigma-Aldrich, SRN. Zásobní roztok o koncentraci $1,25 \cdot 10^{-3}$ mol/l byl připraven rozpuštěním vypočtené navážky v čistém dimethylformamidu. Vzorec 2-(5-Brom-2-pyridylazo)-5-diethylaminofenol je zobrazen na obrázku č. 4.



Obrázek č. 4: 2-(5-Brom-2-pyridylazo)-5-diethylaminofenol

Standardní roztok Co (II) $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ v čisté H_2O , vyráběný firmou Analytika spol. s. r. o., Praha, ČR, koncentrace $1 \pm 0,002$ g/l.

3.2.2 Chemikálie pro přípravu roztoků iontů

Síran železnato-amonný, hexahydrát	$\text{FeSO}_4(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4) \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	Lachema, Brno, ČR
Hydrogenuhličitan sodný	$\text{Na}(\text{HCO}_3)$	Lachema, Brno, ČR
Fluorid sodný	NaF	Lachema, Brno, ČR
Dusičnan sodný	NaNO_3	Lachema, Brno, ČR
Dusičnan hořečnatý, hexahydrát	$\text{Mg}(\text{NO}_3) \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	Lachema, Brno, ČR
Dihydrogenfosforečnan sodný	NaH_2PO_4	Lachema, Brno, ČR
Chlorid železitý	FeCl_3	Sigma-Aldrich, SRN
Chlorid vápenatý, dihydrát	$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	Merck, SRN
Chlorid sodný	NaCl	Penta, Chrudim, ČR
Chlorid manganatý, dihydrát	$\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	Lachema, Brno, ČR
Chlorid hořečnatý, hexahydrát	$\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	Lachema, Brno, ČR
Chlorid hlinitý, hexahydrát	$\text{AlCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	Lachema, Brno, ČR
Chlorid draselný	KCl	Lachema, Brno, ČR
Chlorid amonný	NH_4Cl	Lachema, Brno, ČR
Bromid sodný	NaBr	Merck, SRN

3.2.3 Další použitá rozpouštědla a chemikálie

Kyselina chlorovodíková 35%	HCl	Penta, Chrudim, ČR
Kyselina dusičná 65%	HNO_3	Penta, Chrudim, ČR
Kyselina octová 99%	CH_3COOH	Penta, Chrudim, ČR
Kyselina citrónová	$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$	Onex, Vigantice, ČR
Kyselina askorbová	$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$	Sigma-Aldrich, SRN
Ethylendiamintetraoctová kyselina, disodná sůl, dihydrát	$\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	Lachner, Neratovice, ČR
Hydroxid sodný	NaOH	Penta, Chrudim, ČR
Dimethylformamid	$\text{C}_6\text{H}_7\text{NO}$	Penta, Chrudim, ČR
Disiřičitan/hydrogensiřičitan sodný	$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5/\text{NaHSO}_3$	Sigma-Aldrich, SRN
Hydrazin dihydrochlorid	$\text{N}_2\text{H}_4 \cdot 2 \text{HCl}$	Sigma-Aldrich, SRN
Octan sodný, trihydrát	$\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$	Penta, Chrudim, ČR
Octan amonný	$\text{C}_2\text{H}_7\text{NO}_2$	Penta, Chrudim, ČR
Zephyramin	$\text{C}_{23}\text{H}_{42}\text{ClN}$	Sigma-Aldrich, SRN
Fluorid sodný	NaF	Lachema, Brno, ČR
Tetraboritan sodný	$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$	Lachema, Brno, ČR
Septonex	$\text{C}_{21}\text{H}_{44}\text{BrNO}_2$	TAMDA, Olomouc, ČR
Thiomočovina	$\text{CS}(\text{NH}_2)_2$	Ciba, Basilej, CH

Dodecylhydrogensulfát sodný	$C_{12}H_{25}NaO_4S$	Merck, SRN
Triton X-100	$C_{14}H_{22}O(C_2H_4O)_n$	Calbiochem, USA
Peroxid vodíku	H_2O_2	Penta, Chrudim, ČR
Peroxodisíran amonný	$NH_4S_2O_8$	Penta, Chrudim, ČR
Peroxodisíran sodný	NaS_2O_8	Penta, Chrudim, ČR
Stlačený argon (99,995 %)	Ar	SIAD, Braňany, ČR
Stlačený acetylén	C_2H_2	SIAD, Braňany, ČR

3.3 Charakteristika vzorků

Vzorky byly po odebrání skladovány v ledničce při cca 8 °C. Před stanovením byly přefiltrovány přes membránový filtr o velikosti pórů 0,45 µm. Roztok vitamínu B12 byl připraven rozpuštěním ampulí kyanokobalaminu v destilované vodě.

3.3.1 Minerální voda

Vzorek minerální vody Mattonni neperlivá byl zakoupen v obchodě a před stanovením byl přefiltrován přes membránový filtr o velikosti pórů 0,45 µm.

3.3.2 Povrchová voda

Vzorek povrchové vody byl odebrán do tmavé plastové PET lahve o objemu 1,5 dm³. Z lokality Brno- Bystr, levý břeh řeky Svatka, u zastávky tramvaje č. 1: ZOO byl odebrán jednorázový vzorek. Podmínky odběru: 26. 3. 2012, 21:00, polojasno, bezvětří, vzduch 6 °C, voda 4 °C.

3.3.3 Podzemní voda

Vzorek byl odebrán do tmavé plastové PET lahve o objemu 1,5 dm³ z lokality Rusava (okres Kroměříž, Hurbanova studánka). Vývod pramene: železná trubka, voda je zhodnocena jako pitná. Podmínky odběru: 1.4. 2012, 12:00, Jasno, mírný západní vítr, teplota vzduchu 10 °C, teplota vody 9 °C.

3.3.4 Odpadní voda

Odpadní voda byla odebrána do tmavé plastové lahve o objemu 1 dm³ z prostorů čistírny odpadních vod při VFU Brno. Voda byla odebrána z odtoku, tedy po vyčištění, nechlorovaná.

3.3.5 Vitamin B12

Vitamin B12 ve formě kyanokobalaminu byl dodán prof. Sommerem v baleních po 5 ampulích. Ampule vitamínu B12 (1 mg/ml B12) byla rozřezána a byl připraven zásobní roztok v destilované vodě.

3.4 Metodika vyhodnocení výsledků

Naměřené hodnoty byly proloženy lineární spojnicí trendu a kalibrační závislost poté byla statisticky zpracována. Statistické zpracování experimentálních dat bylo provedeno v souladu s českou státní normou ČSN ISO 8466-1. Tato norma popisuje všechny nezbytné kroky nutné pro hodnocení statistických charakteristik lineární kalibrační funkce.

3.4.1 Hodnocení kalibrace

Lineární kalibrační závislost popisující závislost absorbance roztoku y na koncentraci analytu x je vyjádřena rovnicí $y = a + bx$. Sada naměřených dat byla zpracována funkcí lineární regrese v programu Microsoft Excel a byly získány hodnoty koeficientů a a b . Směrodatná odchylka s_{y_1} reprezentuje poměr rozptylu hodnot kolem kalibrační křivky a numericky vyjadřuje skutečnost, že rovnice kalibrační křivky je vždy omezena určitým rozptylem hodnot.

Pro každou hodnotu x existuje interval spolehlivosti (tzv. konfidenční interval), který pokrývá skutečnou hodnotu y . Meze intervalu spolehlivosti jsou dva hyperbolické oblouky mezi nimiž lze očekávat skutečnou kalibrační funkci pro úroveň významnosti α , která se určí pomocí kvantilu – rozdělení podle Studenta. [49]

Interval spolehlivosti má horní a dolní mez. Horní mez popisuje rovnice (10). Dolní mez intervalu spolehlivosti pak rovnice (11). Kde výraz t je kvantil t-rozdělení podle Studenta. [42]

$$UCL = \frac{y-a}{b} + \left(\frac{s_{y_1} \cdot t}{b} \cdot \sqrt{\frac{1}{N} + \frac{1}{n} + \frac{(y-\bar{y})}{b^2 \cdot \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}} \right) \quad (10)$$

$$LCL = \frac{y-a}{b} - \left(\frac{s_{y_1} \cdot t}{b} \cdot \sqrt{\frac{1}{N} + \frac{1}{n} + \frac{(y-\bar{y})}{b^2 \cdot \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}} \right) \quad (11)$$

3.4.2 Test homogenity rozptylů

Měření prvního a posledního bodu rozsahu kalibrace bylo provedeno desetkrát pro ověření homogenity rozptylů. Bylo tedy získáno deset naměřených hodnot $y_{i,j}$ a oba soubory dat byly použity k výpočtu hodnot rozptylů s_1^2 a s_2^2 podle rovnice (12), kde výraz n je počet opakování měření a \bar{y}_i je průměr naměřených hodnot, který je vyjádřen vztahem (13), kde $i = 1$ nebo 10.

$$s_i^2 = \frac{\sum_{j=1}^{10} (y_{i,j} - \bar{y}_i)^2}{n_i - 1} \quad (12)$$

$$\bar{y}_i = \frac{\sum_{j=1}^{10} y_{i,j}}{n_i} \quad (13)$$

F-test se používá pro zjištění významnosti odchylky rozptylu v mezních hodnotách kalibrace. Principem F-testu je porovnání vypočtené hodnoty PG_1 s tabelovanou hodnotou F-rozdělení. Princip F testu je vyjádřen vztahy (14) pro $s_{10}^2 > s_1^2$ a (15) pro $s_1^2 < s_{10}^2$.

$$PG_1 = \frac{s_{10}^2}{s_1^2} \quad (14)$$

$$PG_1 = \frac{s_1^2}{s_{10}^2} \quad (15)$$

Rozdíl mezi rozptyly s_1^2 a s_2^2 není významný jestliže platí podmínka $PG_1 \leq F_{f_1, f_2; 0,99}$. Pakliže $PG_1 \geq F_{f_1, f_2; 0,99}$ je rozdíl mezi rozptyly s_1^2 a s_2^2 významný. [42]

3.4.3 Test linearity

Aby byly výsledky relevantní, je potřeba ověřit zda daná kalibrační funkce nemá jiný než lineární trend. Podle normy ČSN ISO 8466-2 byla linearita testována porovnáním reziduálních směrodatných odchylek lineární i nelineární kalibrační funkce pomocí rozdílů hodnot rozptylů DS^2 jak vyjadřuje rovnice (16), kde N je počet bodů kalibrační křivky.

$$PG_2 = \frac{DS^2}{s_{y_2}^2} DS^2 = (N-2) \cdot s_{y_1}^2 - (N-3) \cdot s_{y_2}^2 \quad (16)$$

Reziduální směrodatná odchylka lineární kalibrační funkce je dána vztahem (17).

$$s_{y_1} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N [y_i - (a + bx_i)]^2}{N-2}} \quad (17)$$

Reziduální směrodatná odchylka nelineární kalibrační funkce je dána vztahem (18).

$$s_{y_1} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N [y_i - (a + bx_i + cx_i^2)]^2}{N-3}} \quad (18)$$

Jestli je kalibrační funkce lineární či nikoliv se určí porovnáním testované hodnoty PG_2 s tabelovanými hodnotami F-testu. Testovaná hodnota PG_2 se vypočte podle vztahu (19).

$$PG_2 = \frac{DS^2}{s_{y_2}^2} \quad (19)$$

Jestliže platí $PG_2 \leq F_2$ kalibrační funkce je lineární. Je-li $PG_2 \geq F_2$, kalibrační funkce není lineární a nelineární kalibrační funkce vede k významně lepší těsnosti a je třeba zúžit pracovní rozsah.

3.4.4 Mez detekce

Mez detekce je definována jako absolutní množství nebo koncentrace analytu, které poskytuje signál rovný trojnásobku směrodatné odchylky signálu pozadí. Detekční limit se vypočítá podle vztahu (20), kde S je citlivost udávaná směrnici kalibrační křivky a s_B je směrodatná odchylka blanku.

$$MD = \frac{3 \cdot s_B}{S} \quad (20)$$

Pro stanovení detekčního limitu je nutno proměřit signál blanku desetinásobně. Takto vypočtená mez detekce se označuje jako $X_{3\sigma}$. [43, 44]

3.4.5 Mez stanovitelnosti

Mez stanovitelnosti je definována jako nejnižší koncentrace nebo množství analytu, jež se může danou metodou stanovit s určitou pravděpodobností. Stejně jako mez detekce $X_{3\sigma}$ se i hodnota meze stanovitelnosti získá z desetinásobného proměření blanku a poté se vypočítá vztahem (21)

$$MS = \frac{10 \cdot s_B}{S} \quad (21)$$

3.4.6 Výpočet detekčního limitu Millerovou metodou

Millerova metoda výpočtu detekčního limitu využívá informace získané z kalibrace, bez dalších doplňujících měření. Při výpočtu detekčního limitu touto metodou je výhodou, že není nutno proměřovat desetkrát blank.

Nejdříve se vypočítá regresní rovnice z kalibrační přímky. Z této rovnice je odečten úsek, který kalibrační přímka protíná na ose y . K tomuto úseku je poté přičten trojnásobek směrodatné odchylky rozptylu bodů kolem kalibrační křivky, která může být vypočítána podle vzorce (22). Celkový vzorec pro výpočet úseku na ose y zobrazuje vztah (23).

$$s_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum (y_i - y_i')}{n - 2}} \quad (22)$$

$$y = y_B + 3 \cdot s_{y/x} \quad (23)$$

Tento vypočítaný úsek je poté dosazen zpět do regresní rovnice a po vyjádření x je možno vypočítat detekční limit příslušné metody X_m . [45]

3.4.7 Výpočet detekčního limitu podle Grahama

Grahamova metoda umožňuje vypočítat detekční limit z kalibrační křivky podle normy ČSN 8466. Základním předpokladem je lineární odezva přístroje až k „nulové koncentraci“ analytu v měřeném vzorku. Tato podmínka ale nemusí vždy platit. Pro zajištění dostatečné věrohodnosti výsledků je tedy třeba změřit odezvu ve vzorcích s nejnižší možnou koncentrací analytu.

Detekční limit metody X_D představuje koncentraci analytu, která nemůže být statisticky rozlišena od nulové koncentrace. Detekční limit X_D lze najít jako koncentraci, jejíž dolní mez intervalu spolehlivosti na dané hladině statistické významnosti je právě rovna nule. Takto nalezený bod je označován X_D^α a chrání před chybou prvního druhu, tedy přijetí hypotézy, že analyt je přítomen, když ve skutečnosti přítomen není. Hodnota X_D^α lze vypočítat z rovnice (24).

$$LCL(X_D^\alpha) = 0 = X_D^\alpha - \left(\frac{s_{Y_1} \cdot t}{b} \cdot \sqrt{\frac{1}{N} + \frac{1}{n} + \frac{(y - \bar{y})}{b^2 \cdot \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}} \right) \quad (24)$$

Chyba druhého druhu je přijetí hypotézy že analyt je nepřítomen, když ve skutečnosti přítomen je. Ochranu před chybou druhého druhu poskytuje detekční limit metody označovaný jako X_D^β , pro nějž platí, že jeho dolní mez intervalu spolehlivosti je totožná s horní mezí intervalu spolehlivosti X_D^α , lze ho vypočítat podle rovnice (25). [42, 46]

$$LCL(X_D^\alpha) = 0 = X_D^\alpha + \left(\frac{s_{Y_1} \cdot t}{b} \cdot \sqrt{\frac{1}{N} + \frac{1}{n} + \frac{(y - \bar{y})}{b^2 \cdot \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}} \right) \quad (25)$$

3.4.8 Metoda standardních přídavků

Pro stanovení neznámé koncentrace kobaltu ve vzorku se dá použít metody kalibrační křivky či metody standardních přídavků. Pro účely této diplomové práce byla použita metoda standardních přídavků. Nejprve byl proměřen vzorek bez přídávku standardu A_x , poté byly proměřeny vzorky s různými přídávky standardů. Neznámá koncentrace kobaltu ve vzorku byla vypočítána z regresní rovnice kalibrační přímky s přídávky standardů. Regresní rovnice $y = ax + b$ byla upravena, za podmínek, že $y = A_{x+s}$ a $x = (c_s + c_x)$, jak ukazují vztahy (26). Každé měření bylo provedeno třikrát a pomocí programu Microsoft Excel a funkce SMODCH byla vypočítána směrodatná odchylka. [47]

$$A_{x+s} = a(c_s + c_x) + b \Rightarrow A_{x+s} = ac_s + ac_x + b \Rightarrow c_x = \frac{A_{x+s} - ac_s - b}{a} \quad (26)$$

3.4.9 Určení stechiometrie komplexu

Pro určení stechiometrie komplexů lze použít metodu kontinuálních variací (Jobova metoda) nebo metodou látkových poměrů. Metoda kontinuálních variací je založena na měření absorpance roztoků kovu (M) a ligandu (L). Součet analytických koncentrací je stálý, ale mění se jejich poměr v závislosti na látkovém zlomku kovu.

Látkový zlomek x se mění od 0 po 1. Jobova metoda se používá pro zjištění molárního poměru složek v komplexu. Metoda se provádí tak, že se mísí ekvimolární roztoky kationtu kovu M a ligandu L v různých poměrech. Měřený roztok musí mít vždy konstantní konečný objem. Celková koncentrace je konstantní, ale mění se molární zlomek x . Schéma vzniku komplexu uvádí rovnice (27)



Pro výpočet neznámé n platí vztahy (28), (29) a (30).

$$n - x_{\max} \cdot (1 + n) = 0 \quad (28)$$

$$[L]_0 = c_0 \cdot x_L - [ML_n] \quad (29)$$

$$\beta'_n = \frac{[ML_n]}{[M]_0 \cdot [L]_0^n} \quad (30)$$

Po derivaci rovnic (28), (29) a (30) podle x_L a zavedením podmínky pro maximum (31) vzejde vztah (32), ze kterého po úpravě vznikne výsledný vztah (33), kde n je počet molekul ligandu, které připadají na jednu molekulu kovu.

$$\frac{d[ML_n]}{dx_L} = 0 \quad (31)$$

$$n - x_{\max} \cdot (1 + n) = 0 \quad (32)$$

$$n = \frac{x_{\max}}{1 - x_{\max}} \quad (33)$$

Metoda kontinuálních variací je vhodná i pro méně stabilní komplexy, čili komplexy s malou hodnotou konstanty stability. Pro stechiometrický koeficient $n > 3$ jsou však výsledky této metody nepřesné. [48]

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Spektrofometrické studium tvorby komplexu Co(III)-PAR

4.1.1 Vliv komponent na samotné činidlo PAR

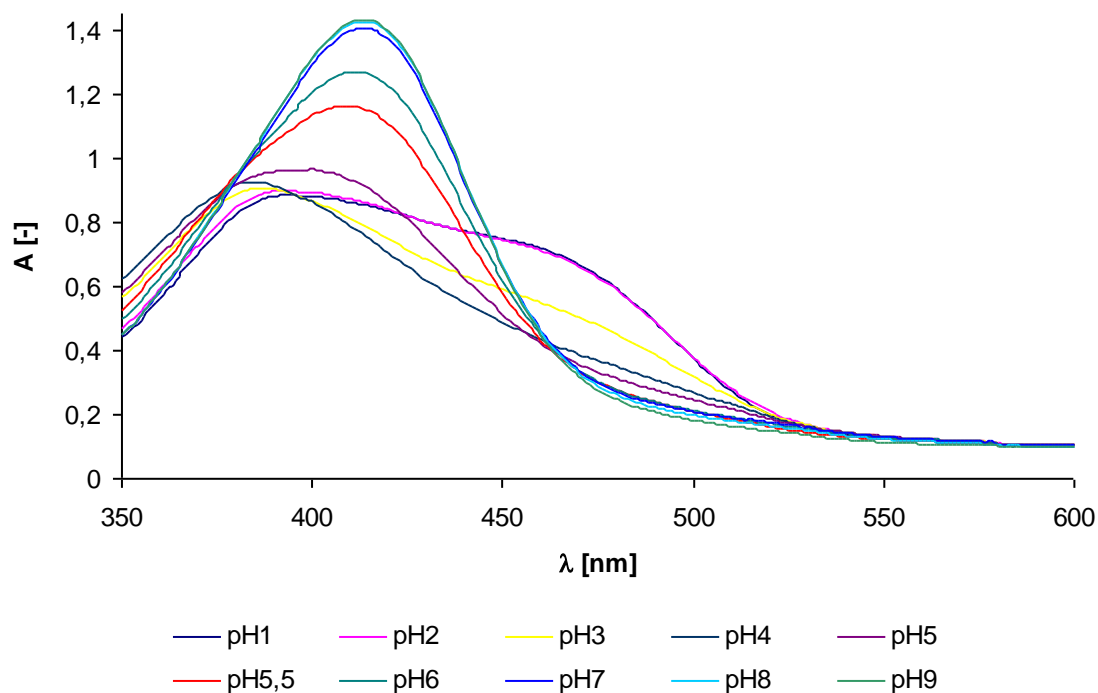
4.1.1.1 Vliv teploty a časový vývoj

Byl studován vliv teploty a času na absorpční spektrum činidla. Po zahřátí činidla na 50 °C bylo naměřeno stejné absorpční spektrum jako spektrum činidla za laboratorní teploty. Bylo zjištěno že činidlo PAR nevykazuje žádný časový vývoj ani po 2 hodinách stání na světle.

4.1.1.2 Vliv pH

Hodnota pH má významný vliv na disociační formy a na naměřené spektrum činidla, na intenzitu absorpce a na polohu absorpčního maxima. Přesná hodnota pH byla upravena pomocí různě zředěných roztoků NaOH a HCl a změřena na pH-metru.

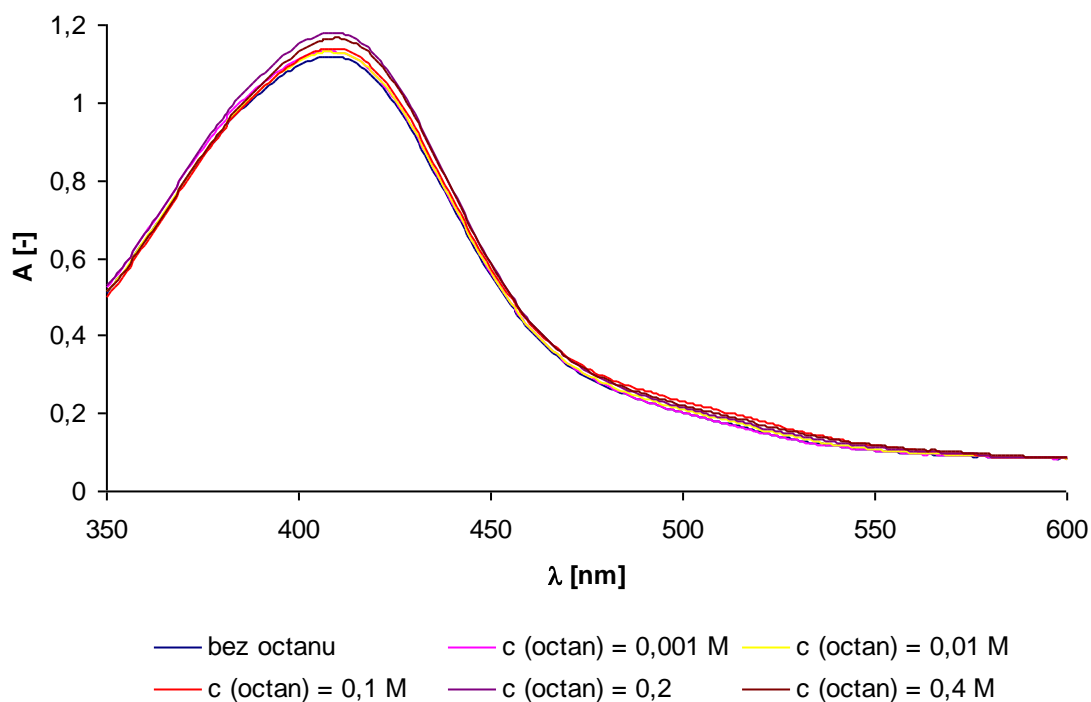
Samotné činidlo PAR je v rozmezí pH 1 – 9 zbarveno žlutě. Při pH 1 – 2 má činidlo dvě nevýrazné maxima při 400 nm a při 470 nm. Při pH 3 – 4 se absorpční maximum činidla posouvá k menším vlnovým délkám na 380 nm. Od hodnoty pH 5 se zvyšujícím se pH dochází k bathochromnímu posunu a k hyperchromickému efektu. Nejvyšší absorbanci má činidlo při pH 8 a 9 při 415 nm. Absorpční spektra činidla PAR v závislosti na pH jsou znázorněna na obrázku č. 5.



Obr. č. 5: Absorpční křivky PAR při různých hodnotách pH; $c(\text{PAR}) = 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$

4.1.1.3 Vliv acetátového pufru

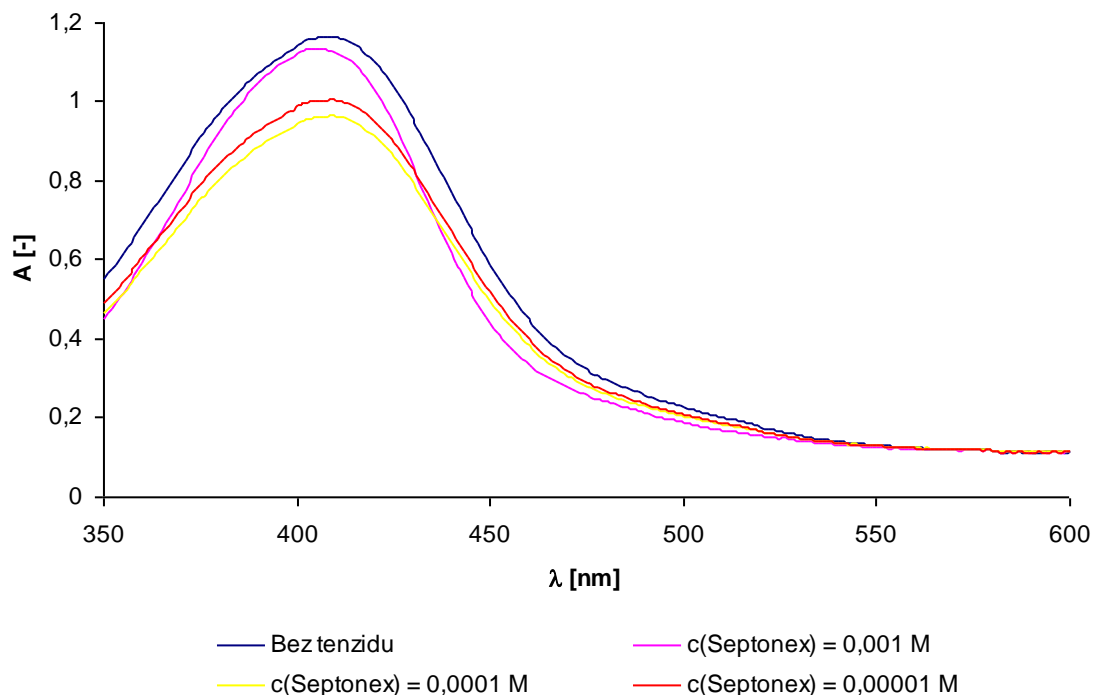
Obrázek č. 6 zobrazuje vliv různých koncentrací acetátového pufru na činidlo. Všechny studované koncentrace acetátového tlumiče způsobují zvýšení intenzity absorpce. Nejvíce zvyšuje intenzitu absorpce činidlo s přítomností acetátového pufru o koncentraci $0,2 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Nejméně ovlivňuje intenzita absorpce činidlo s octanem amonným o koncentraci $0,01 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.



Obr. č. 6: Vliv přítomnosti acetátového pufru v různých koncentracích na spektra činidla PAR, $c(\text{PAR}) = 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, pH 5,5

4.1.1.4 Vliv kationtového tenzidu Septonexu

Byl studován vliv různých koncentrací tenzidu Septonexu na spektra samotného činidla PAR při pH 5,5. Septonex ve všech koncentracích snižuje absorbanci roztoku činidla oproti roztoku činidla bez tenzidu. V případě roztoku činidla s tenzidem v koncentraci $10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ dochází nejen ke snížení absorpce (hypochromní efekt), ale i k posunu absorpčního maxima k nižším vlnovým délkám (hypsochromní efekt). Při nižších koncentracích tenzidu dochází pouze ke snížení intenzity absorpce. Naměřená absorpční spektra činidla s různými koncentracemi kationtového tenzidu Septonexu jsou znázorněna na obrázku č. 7.



Obr. č. 7: Vliv neiontového tenzidu Septonexu na absorpční spektra PAR, $c(\text{PAR}) = 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, pH 5,5

4.1.2 Vliv komponent na komplex Co(III)-PAR

Při diskuzi výsledků se vycházelo z diferenčních spekter komplexu Co(III)-PAR. Diferenční spektrum komplexu vznikne tak, že se od naměřeného spektra komplexu odečte naměřené spektrum samotného činidla, změřeného za stejných podmínek jako komplex (koncentrace činidla, pH, přidané komponenty, čas, atd.).

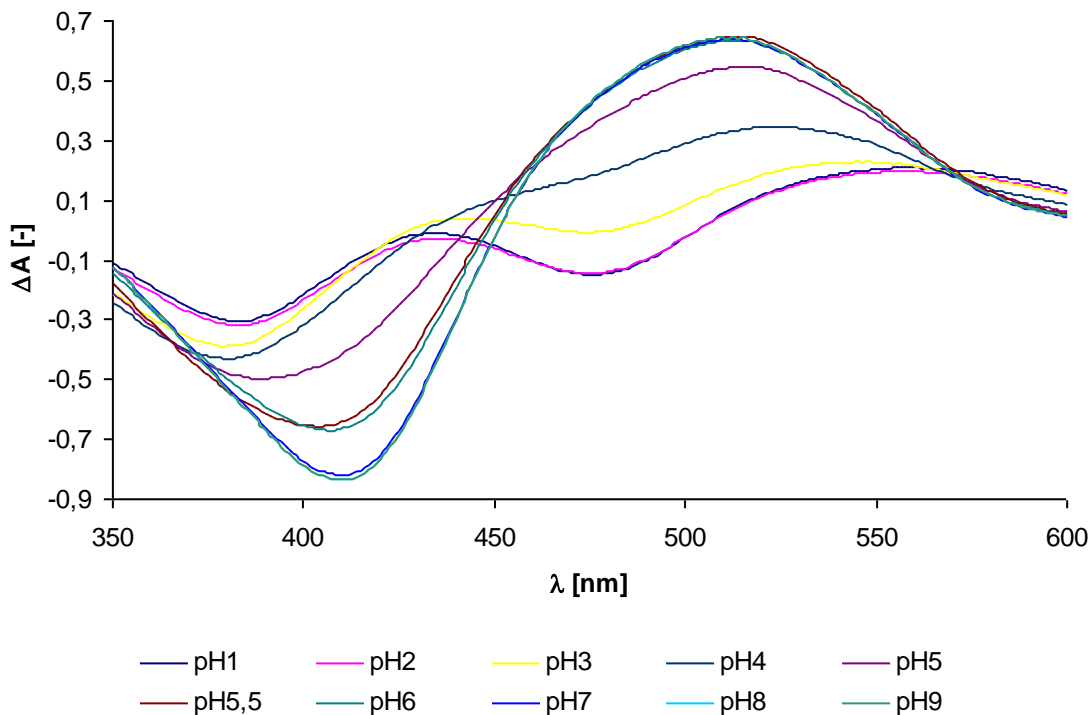
4.1.2.1 Vliv teploty a časový vývoj

Byl studován vliv teploty na komplex Co(III)-PAR. Kobalt tvoří s činidlem PAR komplex ihned po přidání činidla za laboratorní teploty. Po zahřátí komplexu na 50 °C nevykazuje komplex žádnou změnu absorpční křivky proti komplexu změřenému za laboratorní teploty. Zvýšení teploty tedy nemá žádný vliv na tvorbu komplexu.

Dále byl studován vliv času na tvorbu komplexu. Ukázalo se, že komplex Co(III)-PAR nevykazuje žádný časový vývoj ani po 2 hodinách stání komplexu na světle.

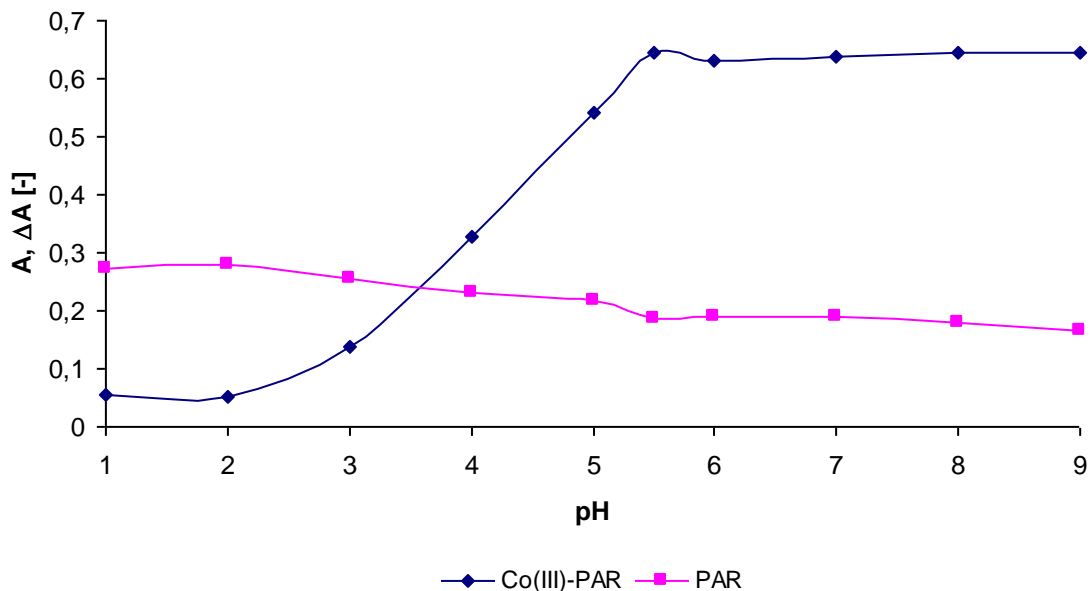
4.1.2.2 Vliv pH

Hodnota pH má nezanedbatelný vliv na absorpční spektra komplexu Co(III)-PAR. Na obrázku č. 8 jsou znázorněna diferenční spektra komplexu Co(III)-PAR. Při pH < 3 má komplex dvě absorpční maxima, jedno při 430 – 440 nm a druhé při cca 550 nm. Při hodnotách pH > 5 má již komplex zřetelné absorpční maximum při 510 nm. V rozmezí hodnot pH 5,5 - 9 se již absorpční maximum komplexu nemění.



Obr. č. 8: Vliv pH na diferenční spektra komplexu Co(III)-PAR, $c(\text{Co}) = 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $c(\text{PAR}) = 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$

Na obrázku č. 9 je znázorněn průběh absorpce komplexu a činidla v závislosti na pH naměřených při absorpčním maximu komplexu $\lambda = 510 \text{ nm}$.



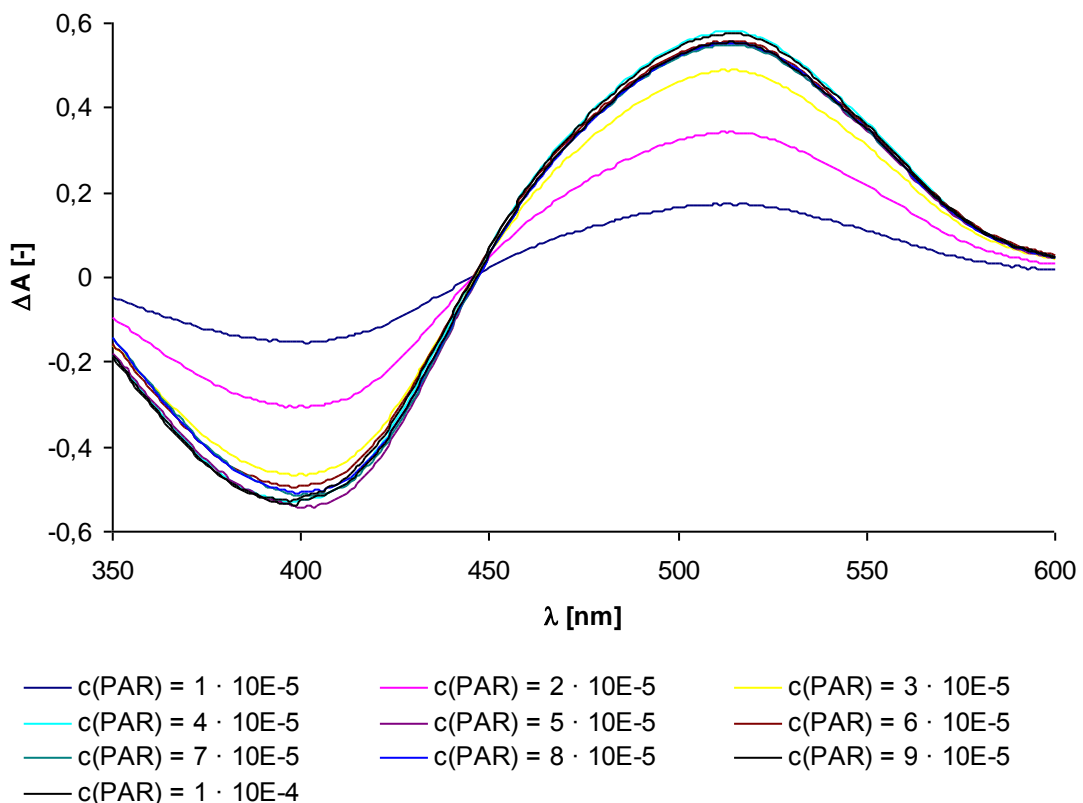
Obr. č. 9: Průběh absorpce komplexu a činidla PAR v závislosti na pH, $c(\text{Co}) = 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $c(\text{PAR}) = 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, pH 5,5; $\lambda = 510 \text{ nm}$

4.1.2.3 Vliv koncentrace kovu a činidla

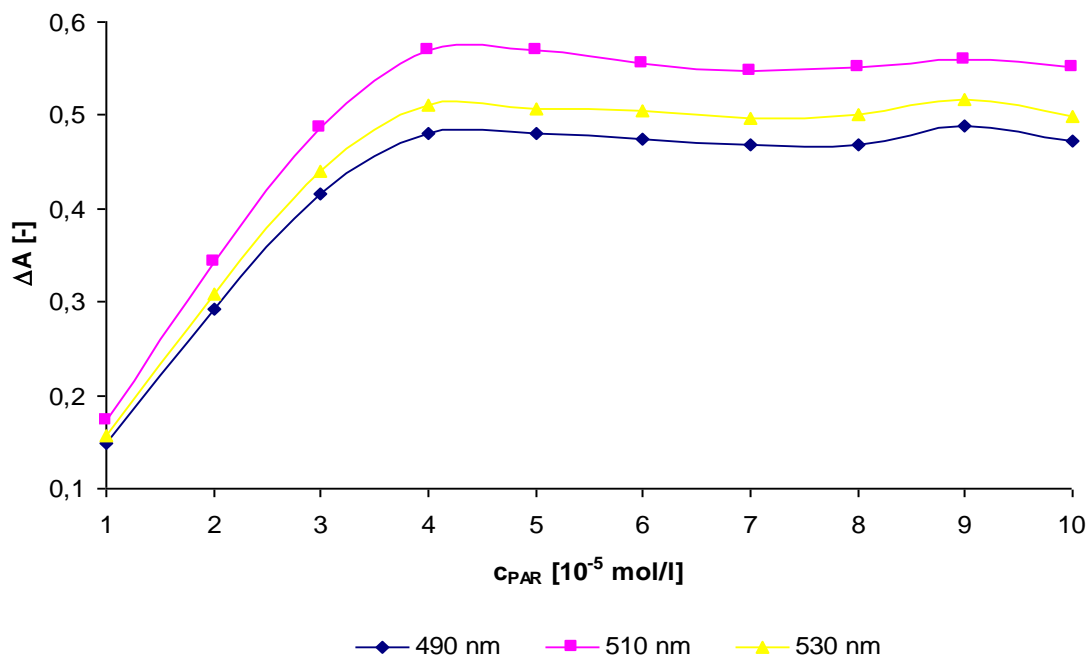
Při pH 5,5 byl studován vliv koncentrace kovu na absorpční spektra komplexu. V rozmezí koncentrací kovu $10^{-5} - 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ byla naměřena totožná absorpční spektra. V rozmezí těchto koncentrací tedy nemá koncentrace kovu na tvorbu komplexu žádný vliv. Absorpční maximum komplexu je 510 nm.

Při pH 5,5 byl studován vliv koncentrace činidla na absorpční spektra komplexu. Absorpční spektra jsou znázorněna na obrázku č. 10. Jako nejvhodnější koncentrace činidla PAR pro stanovení kobaltu se jeví koncentrace $4 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Při nižších koncentracích je naměřená absorbance menší, jelikož komplex ještě není dostatečně vytvořen. Při vyšších koncentracích činidla naopak již stanovení ruší nadbytek činidla, který má intenzivnější zabarvení než komplex.

Na obrázku č. 11 je znázorněn vliv koncentrace činidla na naměřenou absorbanci. Absorbance byla odečítána při třech vlnových délkách: 490 nm, $\lambda_{\text{max}} = 510 \text{ nm}$ a při 530 nm.



Obr. č. 10: Absorpční spektra komplexu Co(III)-PAR v závislosti na koncentraci činidla, $c(\text{Co}) = 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, pH 5,5



Obr. č. 11: Vliv koncentrace činidla PAR na absorbanci komplexu, $c(\text{Co}) = 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $\text{pH} 5,5$; $\lambda = 510 \text{ nm}$

4.1.2.4 Vliv tenzidů

Při $\text{pH} 5,5$ byly studovány komplexy o koncentraci kobaltu $c_{\text{Co}} = 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a koncentraci činidla $c_{\text{PAR}} = 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Byly studovány vlivy Septonexu, Zephyraminu, dodecylhydrogensíranu sodného a Brij 35. Všechny zmíněné tenzidy nezvyšují absorbanci komplexu ani v jedné z proměřených koncentrací (10^{-3} , 10^{-4} a $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$).

Aniontový tenzid dodecylhydrogensíran sodný o koncentraci $10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ snižuje absorbanci komplexu. V koncentracích 10^{-4} a $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ nemá dodecylhydrogensíran sodný na absorpční spektrum vliv.

Kationtový tenzid Zephyramin snižuje absorbanci komplexu ve všech proměřených koncentracích stejně. Zephyramin snižuje koncentraci komplexu nejvíce ze zkoušených tenzidů.

Neiontový tenzid Brij 35 snižuje absorbanci komplexu ve všech proměřených koncentracích. Nejméně ovlivňuje stanovení Brij 35 o koncentraci $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

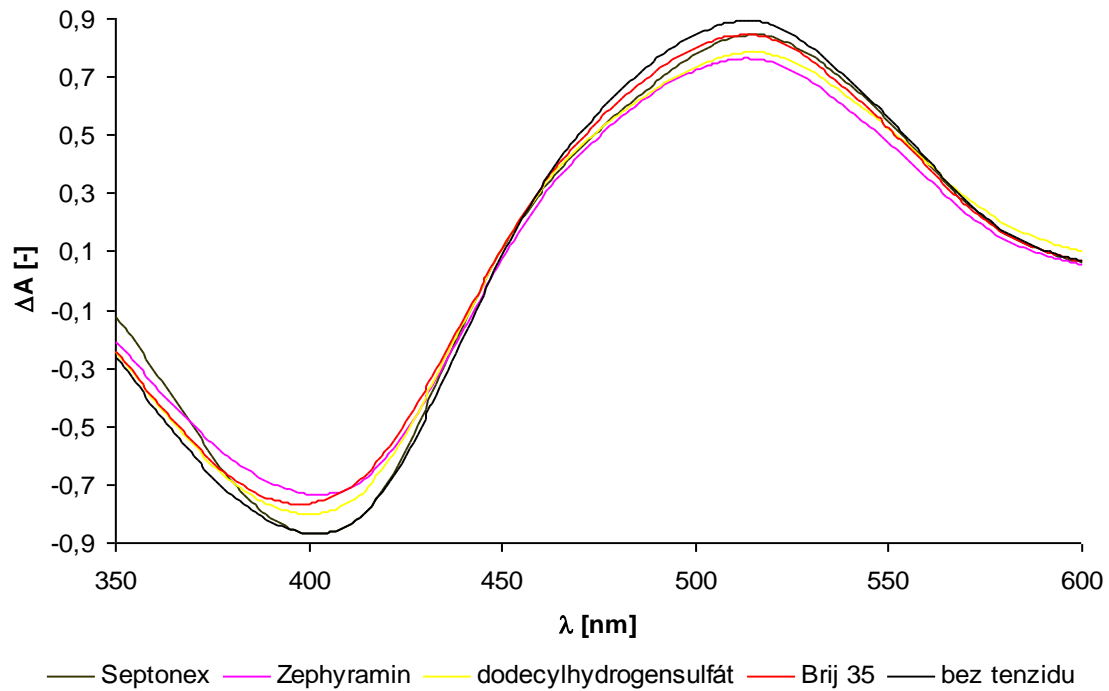
Absorpční křivky komplexů s jednotlivými tenzidy o koncentraci $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ jsou znázorněny na obrázku č. 12. Žádný ze studovaných tenzidů neovlivňuje pozitivně stanovení, pro praktické stanovení kobaltu ve vodách tedy není žádoucí použití tenzidu.

4.1.2.4.1 Vliv Septonexu

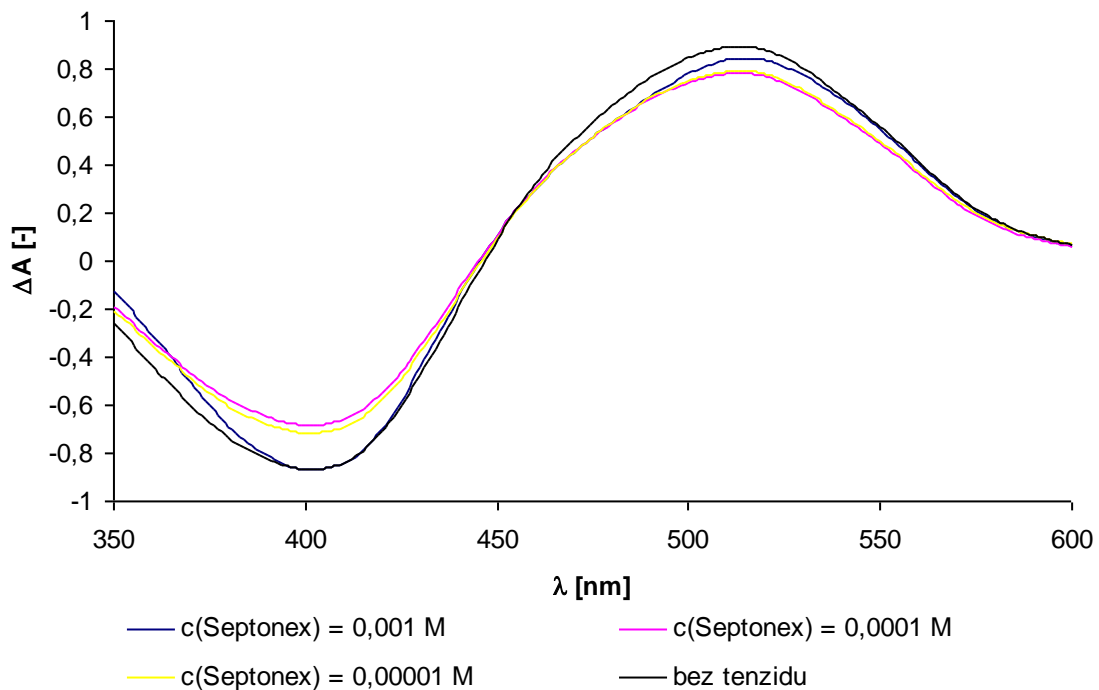
Byl studován vliv kationtového tenzidu Septonexu na komplex o koncentraci kobaltu $c_{\text{Co}} = 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a koncentraci činidla $c_{\text{PAR}} = 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ při $\text{pH} 5,5$. Septonex o koncentraci $10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ snižuje absorbanci komplexu a posouvá absorpční maximum k vyšším vlnovým délkám na 515 nm . Nižší proměřené koncentrace Septonexu pouze snižují absorbanci komplexu. Absorpční spektra komplexu s různými koncentracemi Septonexu jsou zobrazeny na obrázku č. 13.

Dále byl studován vliv pH na komplex o výše zmíněných koncentracích kobaltu a kovu a koncentraci Septonexu $10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. S rostoucím pH se zvyšuje i absorbance systému

až do pH 5. V rozmezí pH 5 – 6 se nachází absorpční maximum systému a od pH 6 dochází k poklesu absorpance.



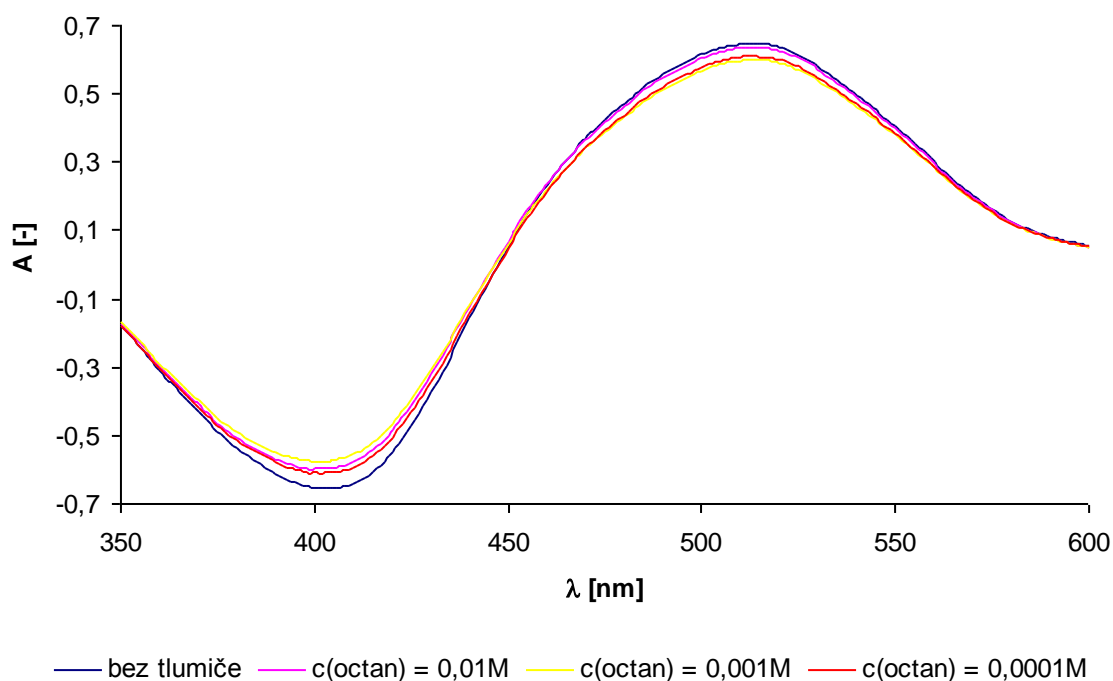
Obr. č. 12: Absorpční spektra komplexu Co(III)-PAR s jednotlivými tenzidy, pH 5,5; $c(\text{Co}) = 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $c(\text{PAR}) = 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $c(\text{tenzid}) = 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$



Obr. č. 13: Absorpční spektra komplexu Co(III)-PAR se Septonexem $c(\text{Co}) = 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $c(\text{PAR}) = 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, pH 5,5

4.1.2.5 Vliv acetátového pufru

Pro praktické měření je potřeba použití pufrů pro udržení konstantního pH. Pro optimální pH 5,5 lze použít jako tlumivý roztok octan amonný. Na obrázku č. 14 je znázorněn vliv octanu amonného na komplex o koncentraci kobaltu $c_{Co} = 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a koncentraci činidla $c_{PAR} = 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ při pH 5,5. Jak je patrné z obrázku č. 14, všechny proměřené koncentrace octanu amonného snižují absorpční spektrum komplexu. Nejméně ovlivňuje absorpční spektrum octan sodný o koncentraci $0,01 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, tato koncentrace tlumivého roztoku tedy byla zvolena pro praktické aplikace stanovení kobaltu ve vodách.



Obr. č. 14: Vliv acetátového pufru na absorpční spektra komplexu $c(Co) = 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $c(PAR) = 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, pH 5,5.

4.1.2.6 Vliv oxidačních a redukčních činidel

Při pH 5,5 byl studován vliv peroxidu vodíku a peroxodisíranu amonného jako oxidačních činidel a vliv hydrazindihydrochloridu a askorbové kyseliny jako redukčních činidel na komplex o koncentraci kobaltu $c_{Co} = 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a koncentraci činidla $c_{PAR} = 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Obrázek č. 15 zobrazuje vliv jednotlivých oxidačních a redukčních činidel na absorpční spektrum komplexu vyjádřených v procentech proti roztoku samotného komplexu při pH 5,5.

Redukční činidla není žádoucí používat pro reálné stanovení kobaltu protože pomocí metody UV-VIS se stanovuje kobalt v oxidačním stavu (+III). Jejich použití by přicházelo v úvahu pouze pro redukci vysoce interferujících na méně interferující ionty o nižším oxidačním čísle, na které by poté bylo možné aplikovat maskovací činidlo, např. citrát.

Hydrazindihydrochlorid snižuje absorpční spektrum ve všech proměřených koncentracích, nejméně snižuje absorpční spektrum komplexu hydrazindihydrochloridu o koncentraci $10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Tato koncentrace by tedy byla použitelná pro eventuelní redukci Fe^{3+} iontů. Dále byl zkoumán vliv pH na absorpční křivky komplexu s hydrazindihydrochloridem o koncentraci

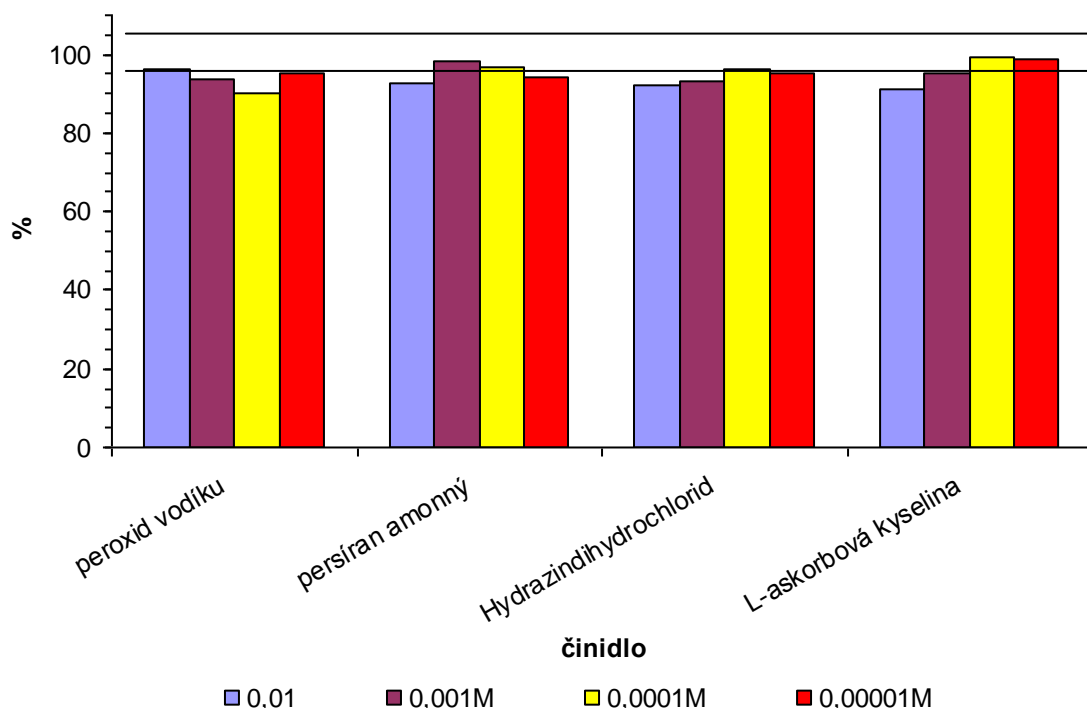
$10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Nejvyšší absorbance dosahuje komplex s hydrazindihydrochloridem o této koncentraci při hodnotách pH 7 a 8.

Askorbová kyselina také snižuje absorbanci komplexu ve všech studovaných koncentracích. Askorbová kyselina o koncentraci $10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ovlivňuje stanovení nejméně.

Oxidační činidla také není nezbytné používat pro stanovení kobaltu, jelikož kobalt po reakci s organickými činidly ihned přechází z dvojmocného stavu do trojmocného.

Peroxid vodíku absorbanci komplexu nezvyšuje ani v jedné z proměřených koncentrací. Nejméně snižuje absorbanci komplexu peroxid vodíku o koncentraci $0,01 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Dále byl studován vliv pH na komplex s peroxidem vodíku o koncentraci $0,01 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Nejvyšší absorbance komplexu s peroxidem vodíku byla naměřena v rozmezí pH 7 – 9.

Peroxodisíran amonný o koncentracích $0,001 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a $0,0001 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ má nejmenší vliv na absorpční spektra komplexu. Peroxodisíran o koncentracích $0,01 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a $0,00001 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ již snižuje absorbanci o víc jak 5 %. Nejvyšší absorbance komplexu s peroxodisíranem amonným je dosaženo v rozmezí hodnot pH 6 – 9.



Obr. č. 15: Vliv oxidačních a redukčních činidel na komplex Co(III)-PAR při 510 nm
 $c(\text{Co}) = 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $c(\text{PAR}) = 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, pH 5,5

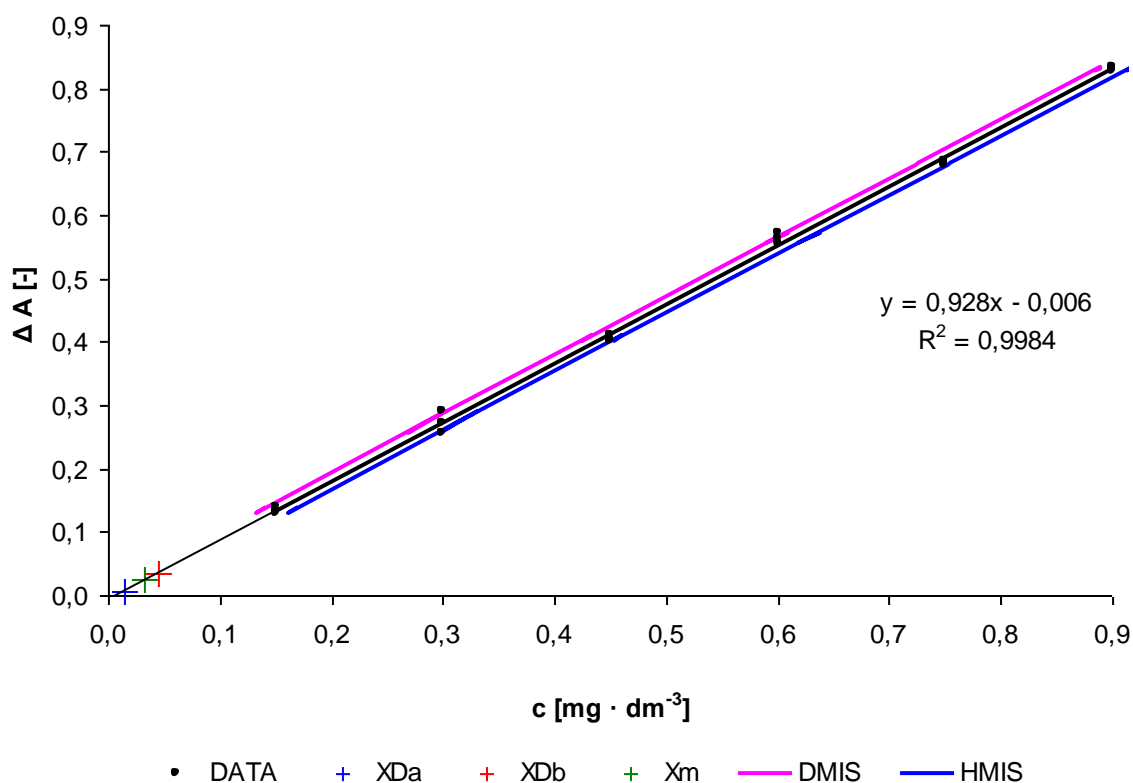
4.1.2.7 Kalibrace

Lineární rozsah metody UV-VIS pro činidlo PAR je do hodnoty koncentrace kobaltu $0,9 \text{ mg/l}$. Kalibrační přímka sestává z šesti ekvidistantních bodů v celém lineárním rozsahu ($0,15$; $0,3$; $0,45$; $0,6$; $0,75$ a $0,9 \text{ mg/l}$) jak je vidět na obrázku č. 16. Každý bod byl proměřen třikrát, první a poslední bod kalibrace desetkrát a blank byl proměřen desetkrát pro statistické vyhodnocení kalibrace podle IUPAC a ČSN 8366.

Molární absorpční koeficient byl vypočítán ze směrnice rovnice kalibrační přímky (ϵ_s) a z každého bodu kalibrace (ϵ) podle Lambert-Beerova zákona, který uvádí vztah (6).

Detekční limity byly vypočítány třemi různými způsoby. Metodou tří sigma $X_{3\sigma}$ podle IUPAC, Millerovou metodou X_m a Grahamovou metodou X_D^α a X_D^β .

Rozptyl mezi testovanými hodnotami není významný, jelikož jak je uvedeno v tabulce č. 3, hodnota PG_1 je menší než hodnota F_1 . Jelikož je splněna tato podmínka, rozptyly jsou homogenní a pro vyhodnocení dat lze použít regresní analýzu. Dále byl s naměřenými daty proveden test linearitu, kde bylo zjištěno, že hodnota PG_2 je nižší než hodnota F_2 , z čehož vyplývá že nelineární funkce je méně vhodná pro naměřené body kalibrace než funkce lineární.



Obr. č. 16: Kalibrační přímka komplexu Co(III)-PAR s intervaly spolehlivosti, $c(\text{PAR}) = 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $\lambda = 510 \text{ nm}$, $\text{pH } 5,5$

Tabulka č. 3: Hodnoty vypočtené z kalibrační křivky

X_D^α	$\text{mg} \cdot \text{dm}^{-3}$	0,014 7
X_D^β	$\text{mg} \cdot \text{dm}^{-3}$	0,044 1
$X_{3\sigma}$	$\text{mg} \cdot \text{dm}^{-3}$	0,010 4
X_m	$\text{mg} \cdot \text{dm}^{-3}$	0,032 3
ϵ	$\text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{dm}^3$	$53\,725 \pm 890$
ϵ_s	$\text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{dm}^3$	$54\,693 \pm 541$
PG_1	-	1,5
F_1	-	4,03
PG_2	-	0,000 2
F_2	-	2,15

4.1.2.8 Vliv cizích iontů

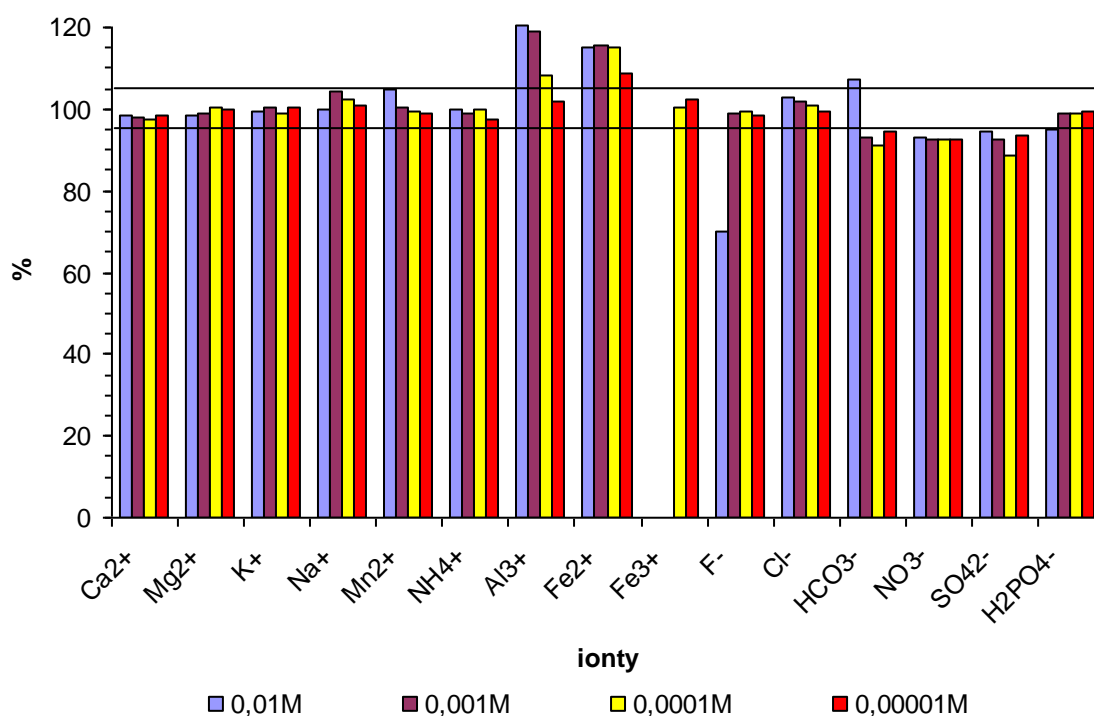
Jelikož činidlo PAR netvoří komplexy pouze s kobaltem ale i jinými kovy, byl zkoušen i vliv cizích iontů na absorpci komplexu. Základním předpokladem přednostní reakce činidla PAR právě s kobaltem je pH. V případě, že i při pH 5,5 se tvoří komplexy i s jinými ionty je potřeba vliv těchto interferentů odstranit, třeba maskovacími činidly nebo je převést do méně interferující formy např. redukcí či oxidací.

Byl studován vliv iontů, které se běžně vyskytují v přírodních vodách nebo iontů, které by mohly ovlivňovat stanovení na komplex o koncentraci kobaltu $c_{Co} = 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a koncentraci činidla $c_{PAR} = 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Za rušivý vliv iontů bylo považováno snížení nebo zvýšení absorbance o 5 % proti absorbanci komplexu bez přídavku iontu.

Bylo zjištěno že kationty Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ , Na^+ , Mn^{2+} a NH_4^+ neovlivňují stanovení ani v jedné proměřené koncentraci (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} a $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$). Hlinité ionty neovlivňují absorbanci pouze o koncentraci $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Vyšší koncentrace hlinitých iontů zvyšují absorbanci. V případě vysoké koncentrace hlinitých iontů lze aplikovat kyselinu citrónovou jako maskovací činidlo.

Železnaté ionty ovlivňují stanovení ve všech proměřených koncentracích. Železité ionty o koncentraci 10^{-2} a $10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ vytváří při pH 5,5 v roztoku červenohnědou sraženinu. Koncentrace železitých iontů 10^{-4} a $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ v roztoku komplexu neovlivňuje stanovení.

Z aniontů neruší stanovení pouze Cl^- a H_2PO_4^- ani v jedné ze studovaných koncentrací. Fluoridové ionty způsobují snížení absorbance komplexu v koncentraci $0,01 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, nižší koncentrace stanovení neovlivňují. Dusičnanové, síranové a hydrogenuhličitanové ionty ruší stanovení ve všech proměřených koncentracích.



Obr. č. 17: Vliv různých koncentrací interferujících iontů na komplex Co(III)-PAR
 $c(\text{Co}) = 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $c(\text{PAR}) = 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $\lambda = 510 \text{ nm}$, pH 5,5

4.1.2.9 Metoda kontinuálních variací komplexu Co(III)-PAR

Stechiometrie komplexu Co(III)-PAR byla určena metodou kontinuálních variací (MKV). Metoda spočívá ve smíchávání ekvimolárních roztoků činidla a kovu v různých poměrech, za konstantního objemu, ale s měnícím se látkovým zlomkem. Roztoky činidla a komplexu byly míchány podle tabulky č. 4.

Tabulka č. 4: Poměry objemů pro přípravu roztoků pro metodu kontinuálních variací

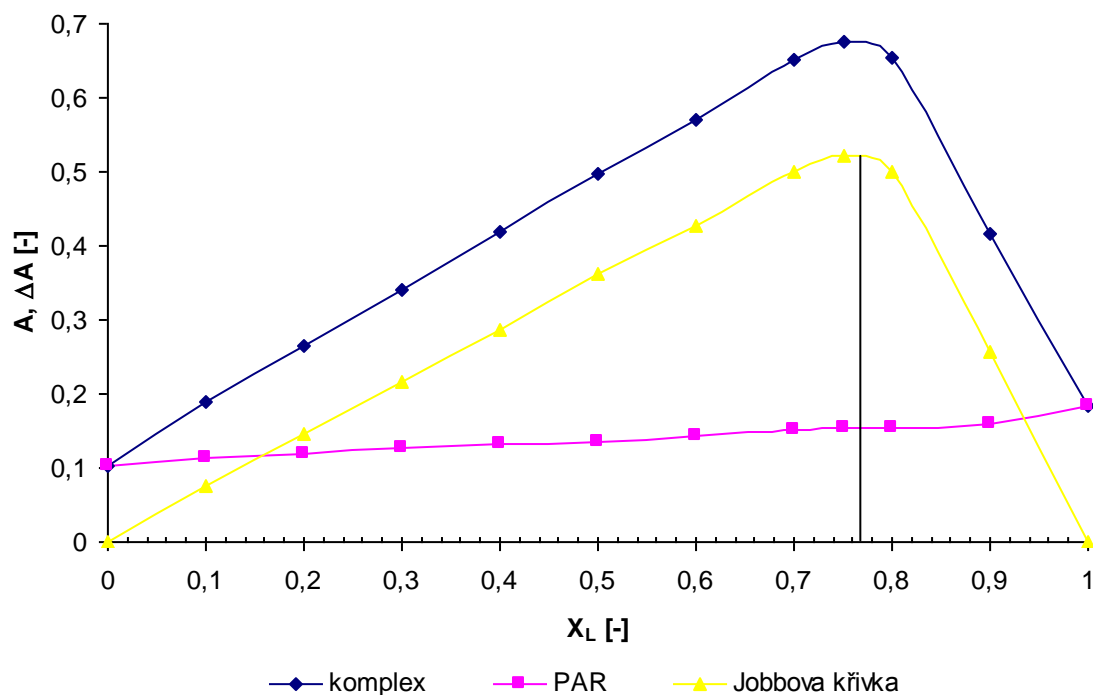
x_L	-	1	0,9	0,8	0,75	0,7	0,6	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1	0
V(PAR)	ml	10	9	8	7,5	7	6	5	4	3	2	1	0
V(Co)	ml	0	1	2	2,5	3	4	5	6	7	8	9	10

Stechiometrický koeficient n byl vypočítán podle vztahu (33).

$$\text{při pH 5,5: } n = \frac{x_{\max}}{1 - x_{\max}} \Rightarrow \frac{0,77}{1 - 0,77} \doteq 3$$

$$\text{při pH 9: } n = \frac{x_{\max}}{1 - x_{\max}} \Rightarrow \frac{0,75}{1 - 0,75} \doteq 3$$

Z rovnice (33) vyplývá, že stechiometrický koeficient $n = 3$. Komplex se tedy při pH 5,5 a při pH 9 tvoří v poměru 1:3. Na obrázku č. 18 jsou znázorněny křivky pro vyhodnocení metody kontinuálních variací pro pH 5,5.



Obr. 18: Metoda kontinuálních variací pro komplex Co(III)-PAR,

$$c(\text{Co}) = c(\text{PAR}) = 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}, \lambda = 510 \text{ nm}, \text{pH } 5,5$$

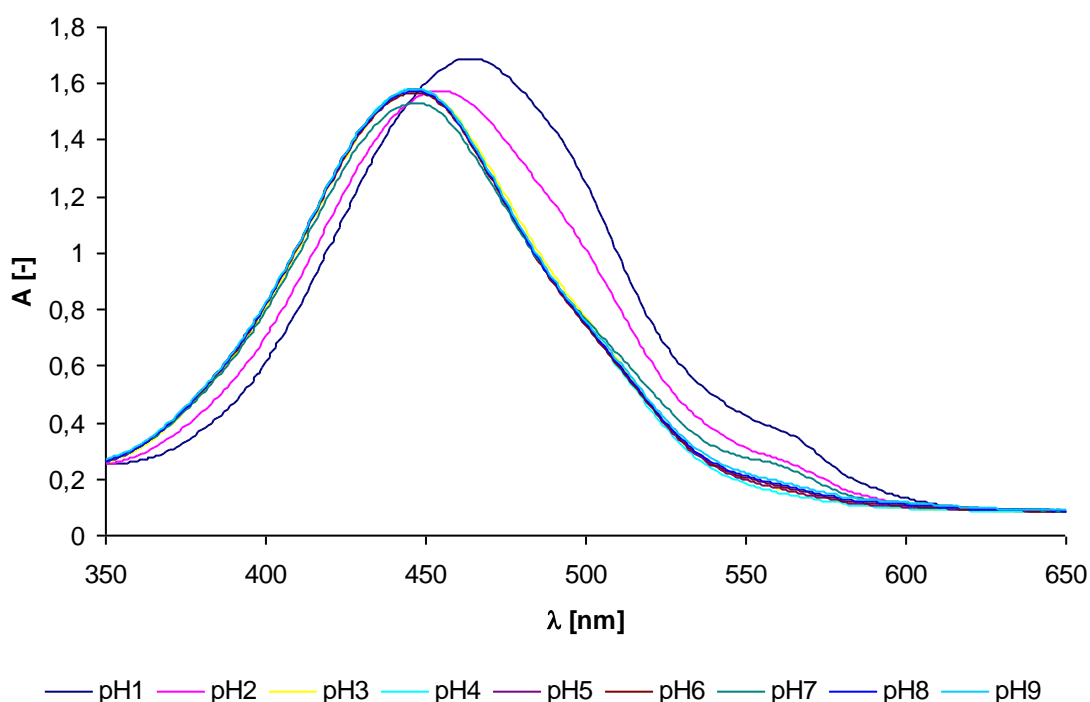
4.2 Spektrofometrické studium tvorby komplexu Co(III)-PADAP

4.2.1 Vliv komponent na samotné činidlo PADAP

Činidlo PADAP není rozpustné ve vodě. Pro účely této diplomové práce byla navážka činidla rozpuštěna v čistém dimethylformamidu. Měřený roztok byl doplňován na požadovaný objem vodou. Výsledná koncentrace dimethylformamidu v měřeném roztoku je 4 obj. %. K roztoku bylo nutné přidat tenzid Triton X-100 jako stabilizátor činidla a komplexu ve vodné fázi, aby nedošlo ke zpětnému vysrážení činidla.

4.2.1.1 Vliv pH

Samotné činidlo o koncentraci $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ s tenzidem Triton X-100 o koncentraci 0,1 % je v rozmezí pH 1 – 9 zbarveno oranžově. Absorpční křivky při různém pH jsou znázorněny na obrázku č. 19. Absorpční maximum se nachází v rozmezí pH 3 – 9 při 448 nm. Při pH 2 je absorpční maximum činidla posunuto k vyšším vlnovým délkám na 454 nm. Při pH 1 dochází k bathochromnímu a hyperchromnímu posunu maxima komplexu na 465 nm. Hodnota pH byla nastavena pomocí zředěných roztoků NaOH a HCl a odečtena na pH-metru.

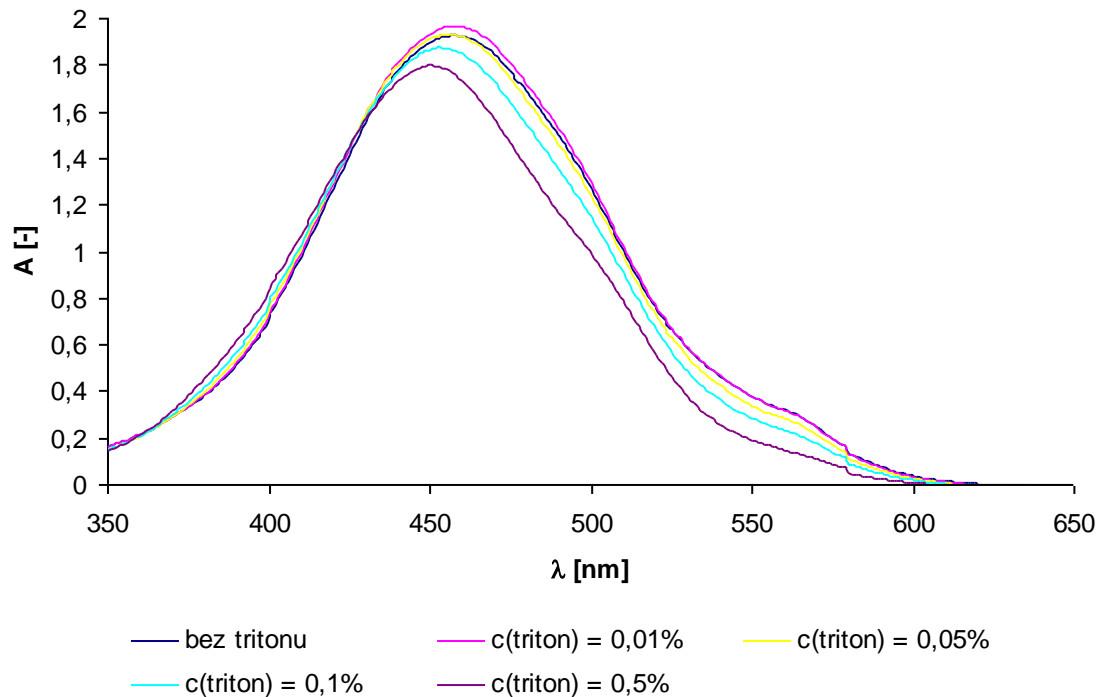


Obr. č. 19: Absorpční křivky činidla PADAP při různém pH, $c(\text{PADAP}) = 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $c(\text{Triton X-100}) = 0,1 \%$

4.2.1.2 Vliv neiontového tenzidu Tritonu X-100

Neiontový tenzid Triton X-100 je nutný pro správnou funkci činidla, jelikož zabraňuje zpětnému vysrážení činidla po přidání vody k systému. Byl studován vliv Tritonu X-100 ve 4 různých koncentracích na absorpční spektra činidla o koncentraci $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ při pH 6,

jak je uvedeno na obrázku č. 20. Triton X-100 v koncentracích nižších než 0,05 % nesnižuje absorpční činnosti. V koncentracích vyšších než 0,1 % snižuje absorpční činnosti a mírně posouvá absorpční maximum k nižším vlnovým délkám na hodnotu 450 nm. Pro správnou funkci tenzidu v případě stanovení byla zvolena koncentrace 0,1 %, nižší koncentrace jsou nedostačující.



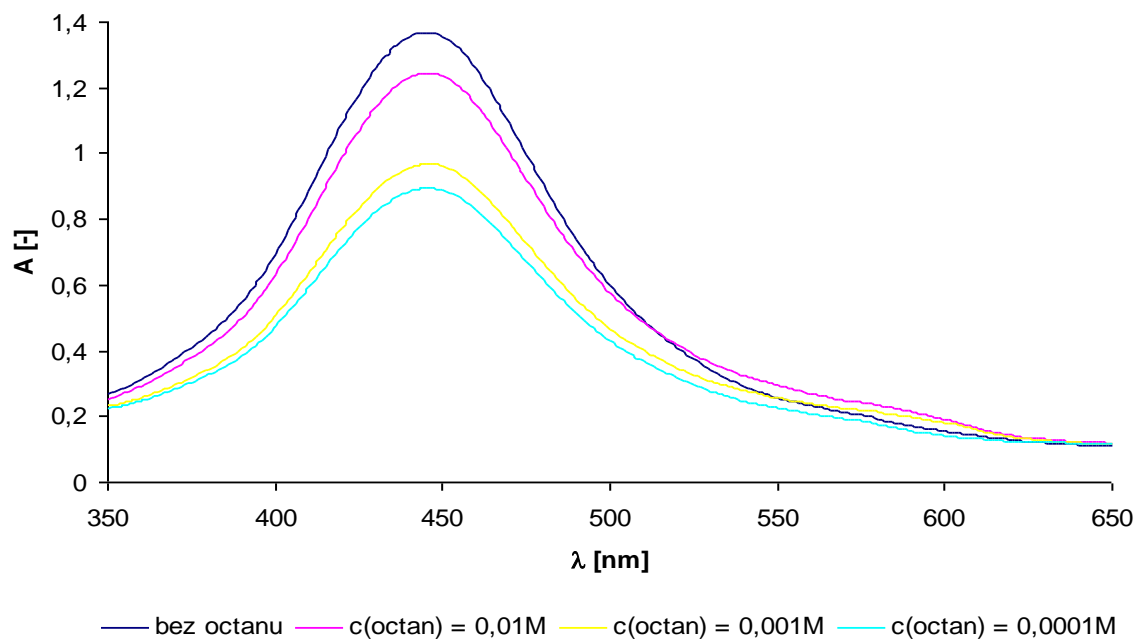
Obr. č. 20.: Vliv Tritonu X-100 na absorpční spektra činnosti PADAP,
 $c(\text{PADAP}) = 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, pH 6

4.2.1.3 Vliv acetátového pufru

Byl studován vliv octanu sodného, jako součásti acetátového pufru na komplex o koncentraci kobaltu $c_{\text{Co}} = 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, koncentraci činnosti $c_{\text{PADAP}} = 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a koncentraci Tritonu X-100 0,1 % při pH 6.

Pro praktickou aplikaci na reálných vzorcích vod jsou použitelné koncentrace tlumivých roztoků do $0,0001 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Koncentrace octanu sodného $10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ velmi snižují absorpční činnosti komplexu. Koncentrace $0,01 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, která by byla využitelná pro stanovení kobaltu na reálných vzorcích vod, snižuje absorpční činnosti roztoku nejméně z proměřených koncentrací octanu amonného při absorpčním maximu činnosti.

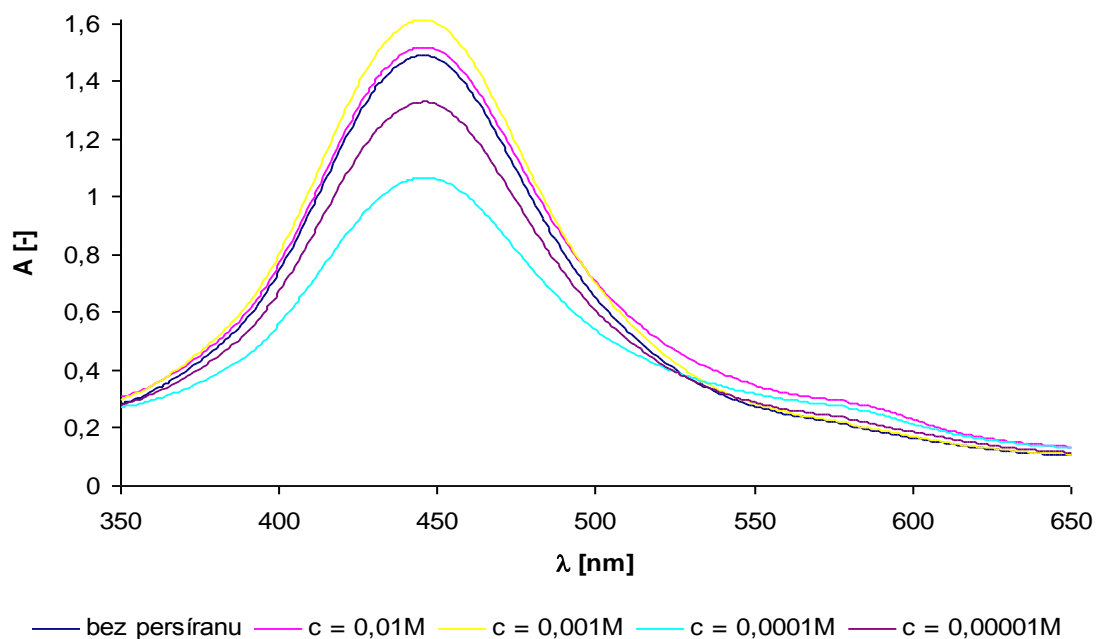
Absorpční spektra činnosti s různými koncentracemi octanu amonného jsou uvedeny na obrázku č. 21.



Obr. č. 21: Vliv octanu sodného na absorpční spektra činidla PADAP, $c(\text{PADAP}) = 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, pH 6

4.2.1.4 Vliv peroxodisíranu amonného

Peroxodisíran amonný ovlivňuje při pH 6 a při absorpčním maximu činidla absorbanci činidla ve všech měřených koncentracích. Vyšší koncentrace peroxodisíranu, $0,01 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a $0,001 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, zvyšují absorbanci činidla. Nižší koncentrace peroxodisíranu amonného (10^{-4} a $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) absorbanci činidla snižují.



Obr. č. 22: Vliv peroxodisíranu amonného na absorpční spektra činidla PADAP, $c(\text{PADAP}) = 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, pH 6

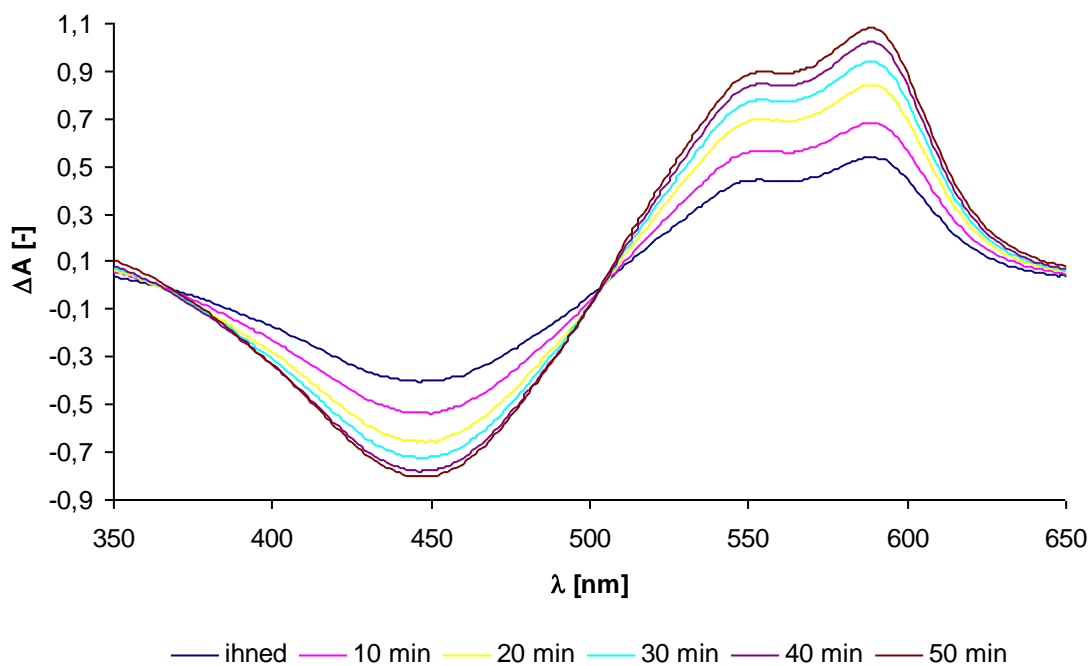
4.2.2 Vliv komponent na komplex Co(III)-PADAP

4.2.2.1 Časový vývoj

Samotný komplex o koncentraci kobaltu $c_{\text{Co}} = 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, koncentraci činidla $c_{\text{PADAP}} = 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a koncentraci Tritonu X-100 0,1 % je při pH 6 časově stabilní a po 50 minutách nedochází k žádné změně absorpční křivky.

Přídavek peroxidisíranu amonného o různých koncentracích způsobuje časový vývoj absorbance komplexu. Byl zkoumán časový vývoj komplexu o složení jež bylo uvedeno výše s peroxidisíranem amonným o koncentraci $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Roztok systému byl ponechán na světle a v desetiminutových intervalech byla změřena absorpční spektra. Při absorpčním maximu (587 nm) docházelo k pravidelnému nárůstu absorbance komplexu. Po 70 minutách došlo k relativnímu ustálení absorbance. K minimálnímu nárůstu absorbance docházelo ještě i po 120 minutách ale pro stanovení již tento nárůst nebyl relevantní. Nárůst absorbance mezi 70. a 120. minutou představoval pouze 2,5 %. Obrázek č. 23 zobrazuje časový vývoj daného komplexu při pH 6.

Všechna další měření s přídavkem peroxidisíranu amonného musela být prováděna po určitém časovém intervalu. Z experimentálních (dosažení co nejvyšší absorbance komplexu) a časových důvodů byla zvolena kompromisní doba 30 min.



Obr. č. 23: Časový vývoj komplexu Co(III)-PADAP, $c(\text{Co}) = 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $c(\text{PADAP}) = 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $c(\text{Triton}) = 0,1 \%$, $c((\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8) = 5 \cdot 10^{-4}$, pH 6

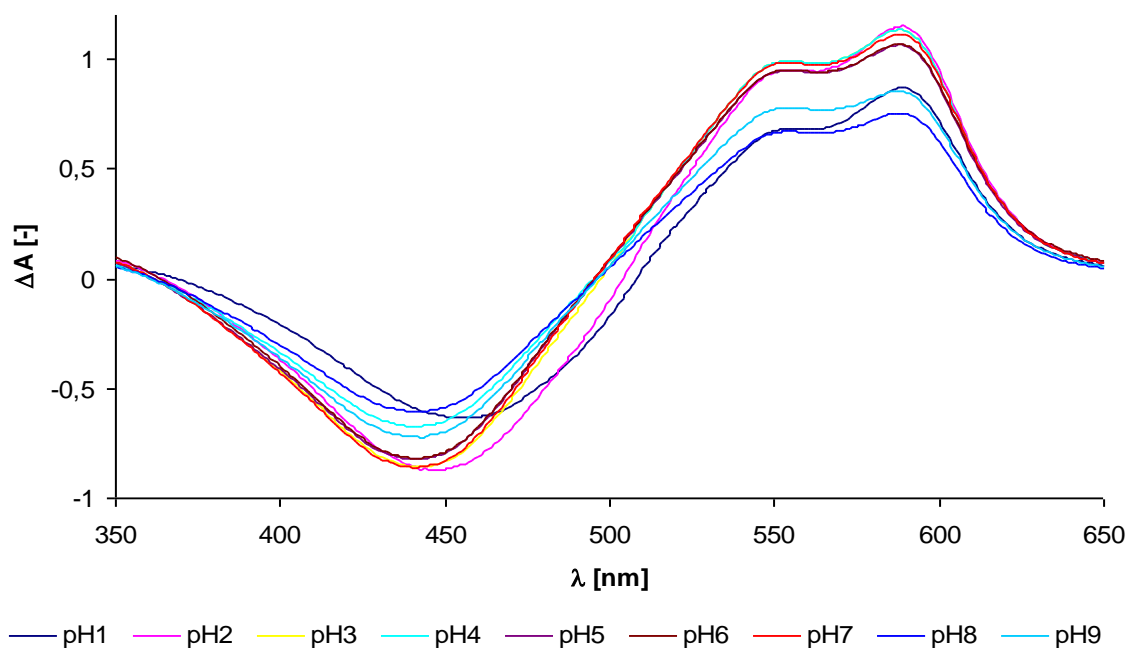
4.2.2.2 Vliv pH

Hodnota pH má nezanedbatelný vliv na tvorbu komplexu a jeho absorpční spektrum. Byl studován vliv pH na komplex o koncentraci kovu $c_{\text{Co}} = 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, koncentraci činidla $c_{\text{PADAP}} = 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, koncentraci Tritonu X-100 $c_{\text{Triton}} = 0,1 \%$ a koncentraci peroxidisíranu amonného $c_{\text{peroxidisíran}} = 5 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Absorpční maximum komplexu Co(III)-PADAP se nachází při 587 nm a to v rozsahu pH 1 – 9. Hodnota pH má tedy vliv pouze na velikost absorbance komplexu, nikoliv na polohu absorpčního maxima. Všechny roztoky byly proměřeny po 30 minutách vyvíjení komplexu.

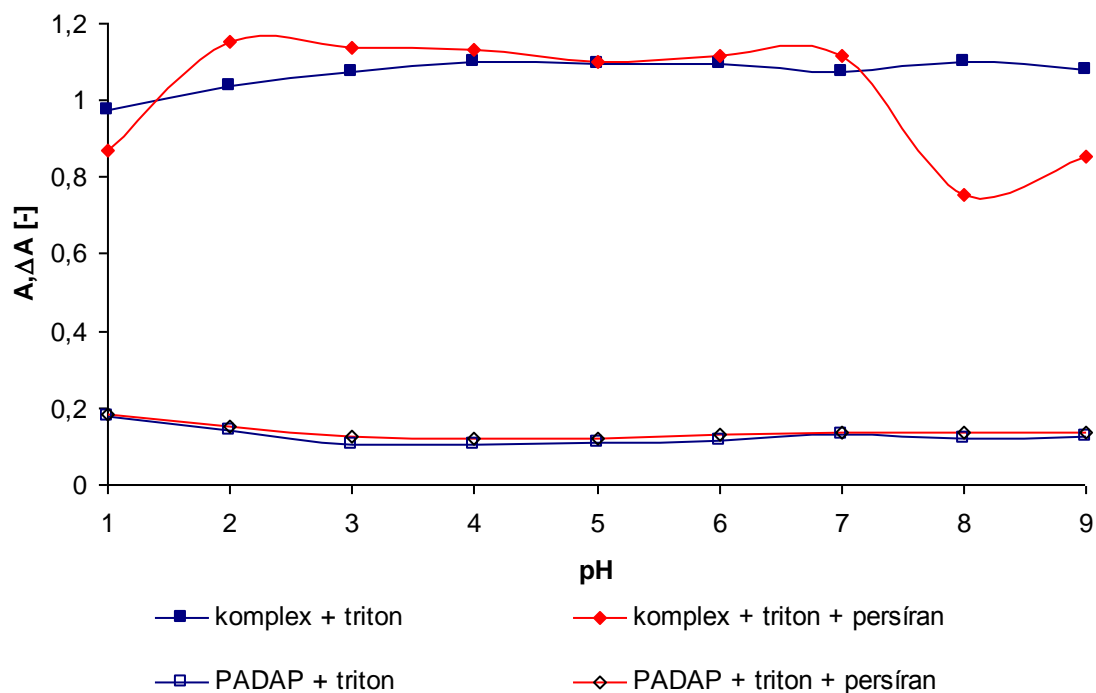
Obrázek č. 24 zobrazuje vliv pH na absorpční křivky daného komplexu. V grafu jsou patrné 2 oblasti absorpčních křivek při 587 nm. V první oblasti o nižší absorbanci se nacházejí komplexy jejichž pH činí 1, 8 a 9. V druhé oblasti o vyšší absorbanci se nacházejí komplexy o pH 2 – 7.

Obrázek č. 25 zobrazuje průběh absorbancí komplexů změřených při 587 nm v závislosti na pH roztoku systému. Z obrázku č. 25 je patrné že komplex s přidavkem peroxidisíranu amonného má vyšší absorbanci než komplex bez peroxidisíranu amonného při hodnotě pH v rozmezí 2 – 9.

Optimální pH pro další postup optimalizace je tedy v rozmezí 2 – 7. Pro další studium komplexu Co(III)-PADAP byla vybrána hodnota pH 6. Pro aplikaci stanovení na reálné vzorky vod bylo zvoleno pH 6 s ohledem na pracovní rozsah acetátového pufru.



Obr. č. 24: Vliv pH na absorpční křivky komplexu Co(III)-PADAP, $c(\text{Co}) = 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $c(\text{PADAP}) = 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $c(\text{Triton X-100}) = 0,1 \%$, $c((\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8) = 5 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$

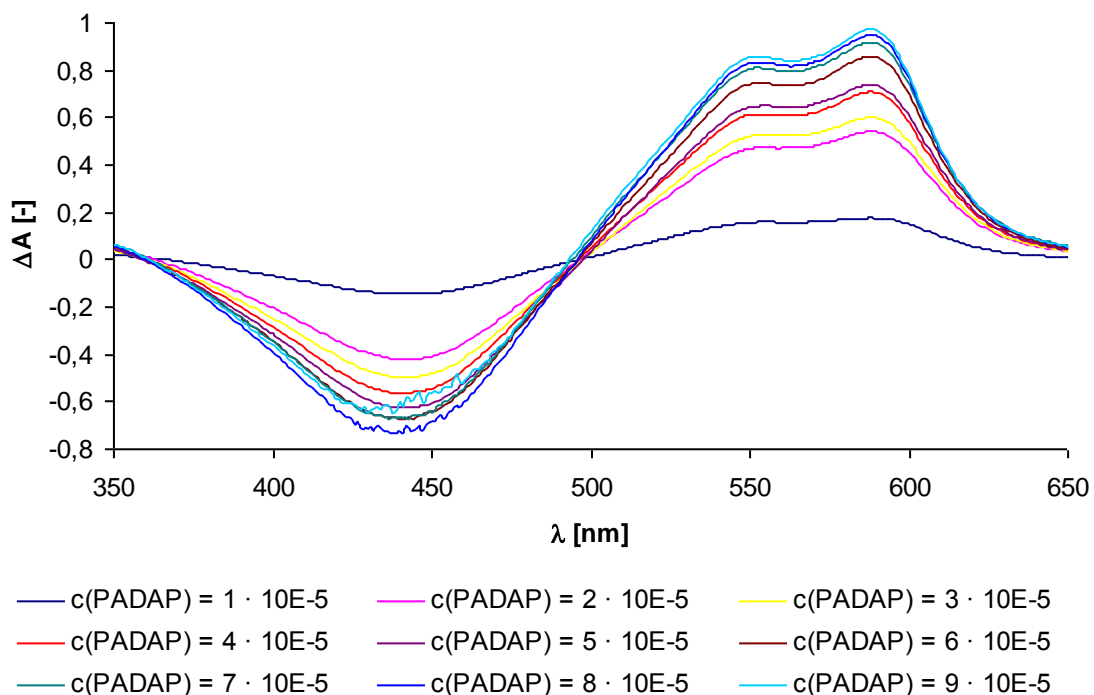


Obr. č. 25: Absorbance komplexu Co(III)-PADAP v závislosti na pH při 587 nm, $c(\text{Co}) = 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $c(\text{PADAP}) = 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $c(\text{Triton X-100}) = 0,1 \%$, $c((\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8) = 5 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$

4.2.2.3 Vliv koncentrace činidla a koncentrace kovu

Při pH 6 a konstantní koncentraci kobaltu $c_{\text{Co}} = 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a koncentraci Tritonu X-100 $c_{\text{Triton}} = 0,1 \%$ byl studován vliv koncentrace činidla na absorpční křivky. Byly proměřeny koncentrace činidla od $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ (v poměru 1:1 ke kobaltu) až do $9 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ (v poměru 1:9), jak ukazuje obrázek č. 26.

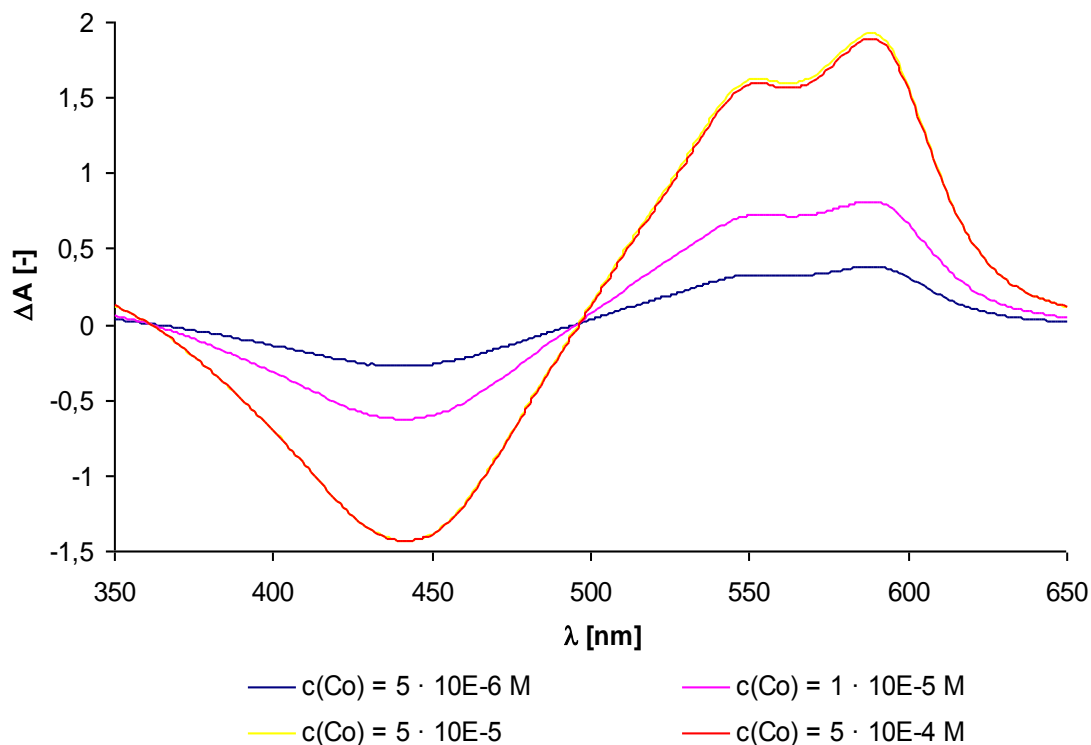
Nejvhodnější pro danou koncentraci kobaltu je koncentrace činidla $4 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Nižší koncentrace mají nízkou absorbanci, jelikož ještě nedošlo ke kvantitativnímu vytvoření komplexu. Z hlediska spotřeby činidla nebyly zvoleny vyšší koncentrace činidla, které navíc mají vysokou absorbanci při jiných vlnových délkách.



Obr. č. 26: Absorpční křivky komplexu Co(III)-PADAP v závislosti na koncentraci činidla, $c(\text{Co}) = 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $c(\text{Triton X-100}) = 0,1 \%$, pH 6.

Byl studován vliv koncentrace kobaltu na absorpční spektra. K různým koncentracím kobaltu byla přidávána konstantní koncentrace činidla $c_{\text{PADAP}} = 4 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a konstantní koncentraci Tritonu X-100 $c_{\text{Triton}} = 0,1 \%$.

Jak ukazuje obrázek č. 27, se zvyšující se koncentrací kovu stoupá i absorbance komplexu při pH 6 a při 587 nm. Od koncentrace kovu $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ se již absorbance komplexu se zvyšující se koncentrací kovu nezvyšuje.



Obr. č. 27: Vliv koncentrace kobaltu na absorpční spektra komplexu Co(III)-PADAP, $c(\text{PADAP}) = 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $c(\text{Triton X-100}) = 0,1 \%$, pH 6

4.2.2.4 Vliv oxidačních a redukčních činidel

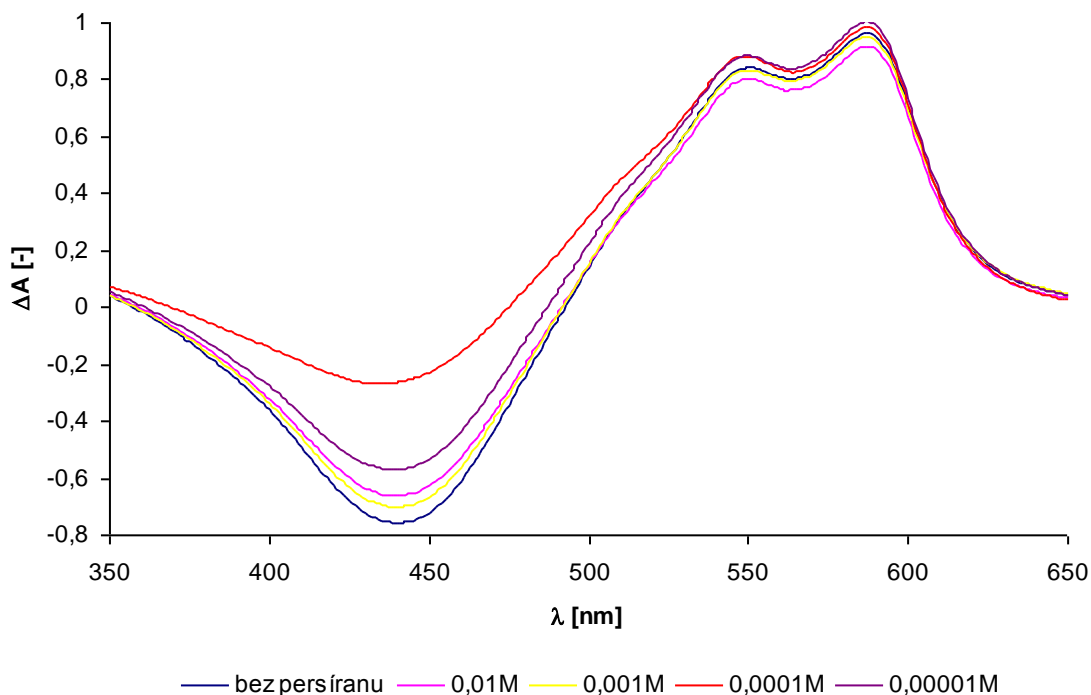
Byl studován vliv askorbové kyseliny, peroxidu vodíku a peroxodisíranu amonného na komplex o koncentraci kobaltu $c_{\text{Co}} = 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, koncentraci činidla $c_{\text{PADAP}} = 4 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a koncentraci Tritonu X-100 $c_{\text{Triton}} = 0,1 \%$ při pH 6.

Askorbová kyselina o vyšších koncentracích ($0,01$ a $0,001 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) způsobuje snížení absorpce komplexu. Nižší koncentrace askorbové kyseliny (10^{-4} a $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) způsobují mírné zvýšení absorpce komplexu. Není potřeba používat askorbovou kyselinu pro přímé stanovení kobaltu, jelikož se stanovuje trojmocný kobalt. Askorbová kyselina se použije pouze pro redukce některých vysoce interferujících iontů.

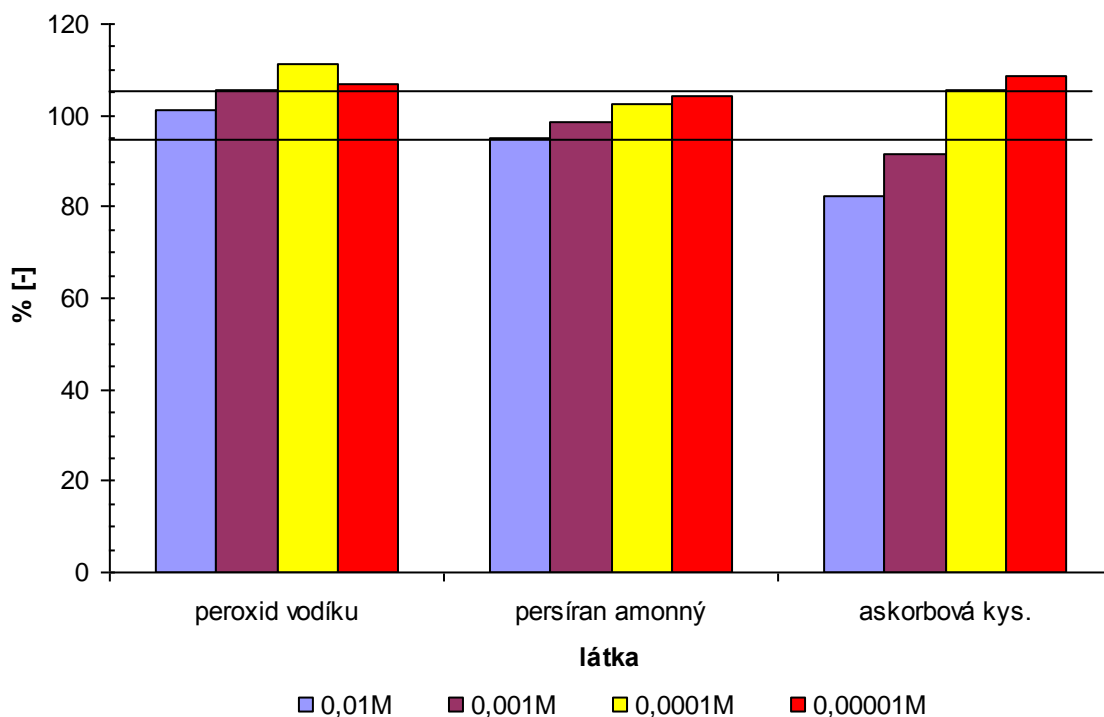
Peroxid vodíku způsobuje ve všech koncentracích navýšení absorpce proti roztoku bez přítomnosti peroxidu. Peroxid vodíku o koncentraci $0,01 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ovlivňuje absorpenci jen minimálně. Komplex a daném složení s přidavkem peroxidu vodíku nezpůsobuje po 30 minutách nárůst absorpce.

Přídavek peroxodisíranu amonného v jakékoliv koncentraci vyšší než $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ způsobuje zvyšování absorpce v čase. Byl studován vliv peroxodisíranu amonného na absorpční křivky komplexu o koncentraci kobaltu $c_{\text{Co}} = 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, koncentraci činidla $c_{\text{PADAP}} = 4 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a koncentraci Tritonu X-100 $c_{\text{Triton}} = 0,1 \%$ při pH 6. Časový vývoj absorpce komplexu zobrazuje již obrázek č. 23. Obrázek č. 28 zobrazuje vliv jednotlivých koncentrací peroxodisíranu amonného na komplex. Všechny vzorky byly ponechány po přípravě 30 minut na světle pro vývoj komplexu. Po 30 minutách byly změřeny absorpční křivky každého systému. Peroxodisíran amonný o vyšších koncentracích ($0,01$ a $0,001 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) snižuje absorpenci roztoku systému proti samotnému komplexu bez peroxodisíranu amonného. Naopak o nižších koncentracích (10^{-4} a $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) zvyšuje absorpenci.

Obrázek č. 29 ukazuje rušivý vliv jednotlivých činidel o proměřených koncentracích na komplex při pH 6 a při 587 nm. Za rušivý vliv oxidačního nebo redukčního činidla se považuje změna absorbance o 5 % proti absorbanci komplexu bez přídavku těchto činidel.



Obr. č. 28: Vliv peroxidisíranu amonného na absorpční spektra komplexu Co(III)-PADAP, $c(\text{Co}) = 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $c(\text{PADAP}) = 4 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $c(\text{Triton X-100}) = 0,1 \%$, pH 6



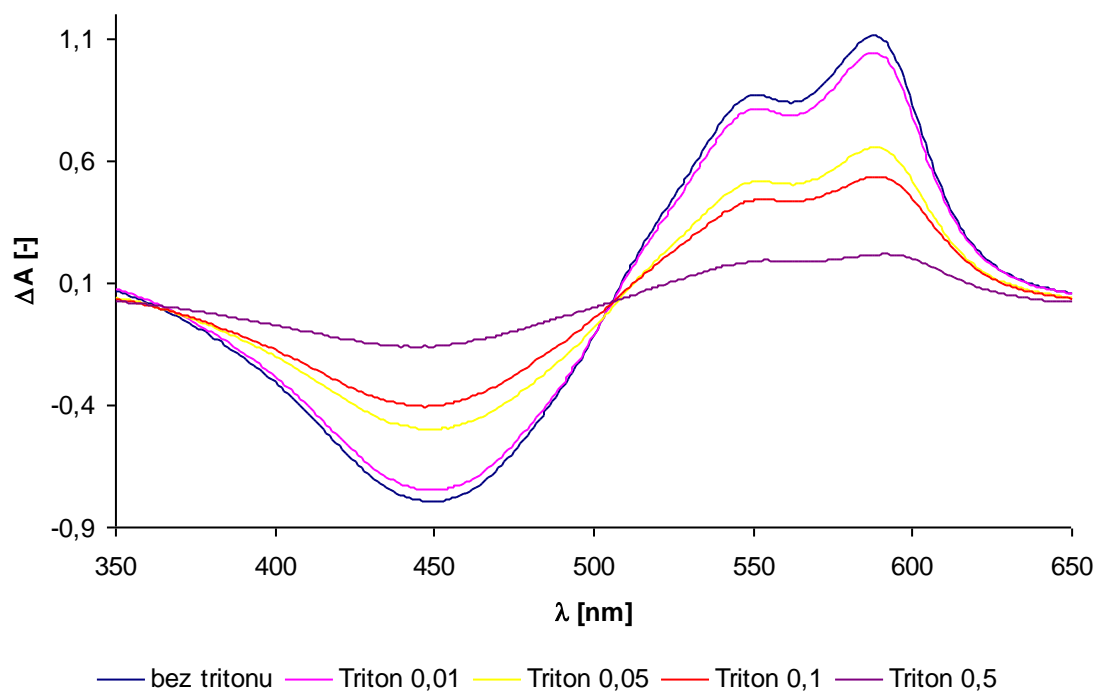
Obr. č. 29: Vliv oxidačních a redukčních činidel na komplex Co(III)-PADAP při 587 nm $c(\text{Co}) = 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $c(\text{PADAP}) = 4 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $c(\text{Triton X-100}) = 0,1 \%$, pH 6

4.2.2.5 Vliv neiontového tenzidu Tritonu X-100

Byl studován vliv neiontového tenzidu Tritonu X-100 na komplex o koncentraci kobaltu $c_{Co} = 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a koncentraci činidla $c_{PADAP} = 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ při pH 6.

Neiontový tenzid Triton X-100 o koncentraci 0,5 % mění absorpční křivku komplexu tak, že už není zřetelné absorpční maximum. Pro správnou funkci Tritonu X-100 je nutná koncentrace minimálně 0,1 %.

Obrázek č. 30 zobrazuje vliv Tritonu X-100 na absorpční křivky komplexu.

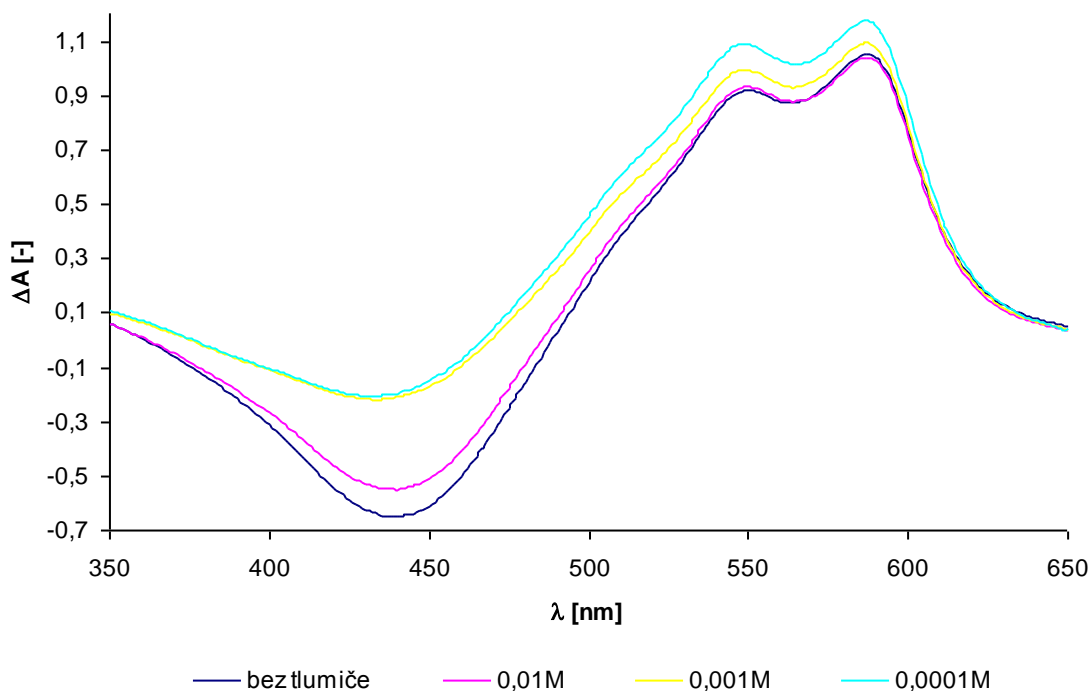


Obr. č. 30: Vliv Tritonu X-100 na absorpční křivky komplexu $Co(III)$ -PADAP, $c(Co) = 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $c(PADAP) = 4 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, pH 6.

4.2.2.6 Vliv acetátového pufru

Byl zkoumán vliv různých koncentrací octanu sodného, jakožto součásti acetátového pufru na komplex o koncentraci kobaltu $c_{Co} = 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, koncentraci Tritonu X-100 $c_{Triton} = 0,1 \%$ a koncentraci činidla $c_{PADAP} = 4 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ při pH 6. Absorpční křivky daných systémů jsou znázorněny na obrázku č. 31.

Octan sodný o koncentracích 10^{-3} a $10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ zvyšuje absorpenci komplexu při absorpčním maximu. Octan sodný o koncentraci $0,01 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ prakticky neovlivňuje absorpenci při 587 nm a proto byla tato koncentrace zvolena jako koncentrace tlumivého roztoku pro stanovení kobaltu v reálných vzorcích.



Obr. č. 31: Vliv octanu sodného na absorpční křivky komplexu Co(III)-PADAP, $c(\text{Co}) = 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $c(\text{PADAP}) = 4 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $c(\text{Triton X-100}) = 0,1 \%$, pH 6

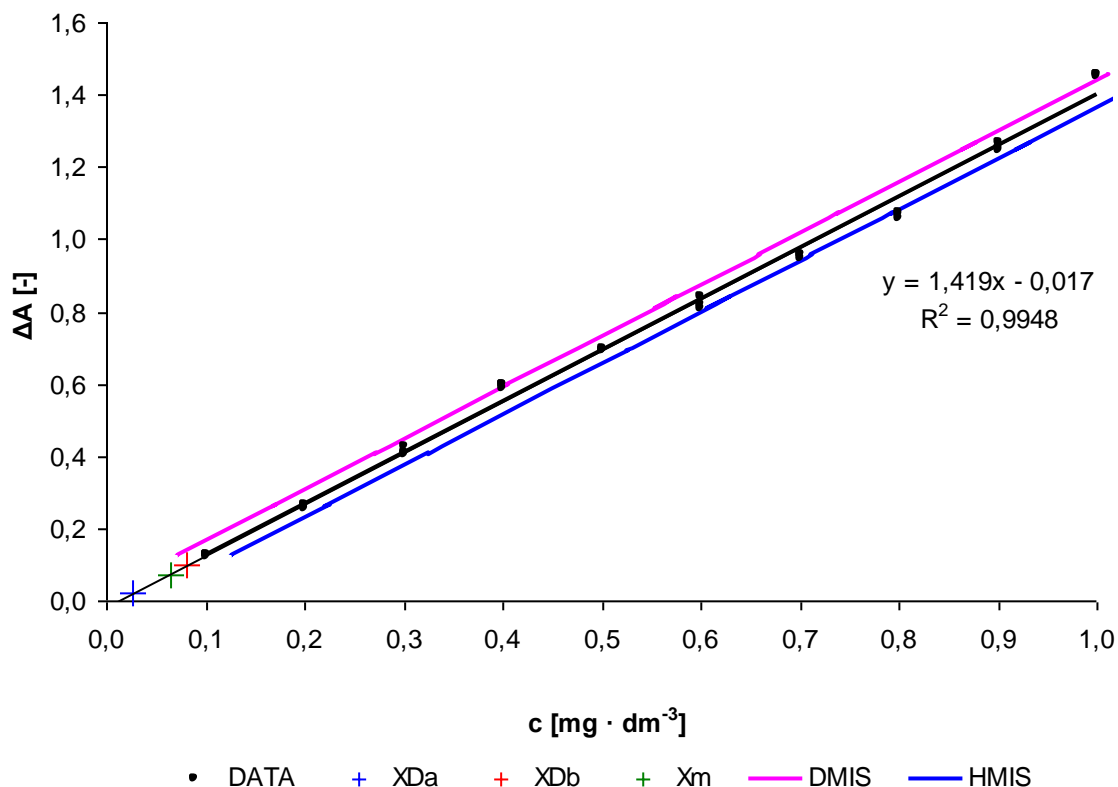
4.2.2.7 Kalibrace

Lineární rozsah metody UV-VIS pro činidlo PADAP je do hodnoty koncentrace kobaltu 1,0 mg/l. Kalibrační přímka sestává z deseti ekvidistančních bodů v celém lineárním rozsahu (0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9 a 1,0 mg/l) jak je vidět na obrázku č. 32. Každý bod byl proměřen třikrát, první a poslední bod kalibrace desetkrát a blank byl proměřen desetkrát pro statistické vyhodnocení kalibrace podle IUPAC a ČSN 8366. Byly vypočítány horní a dolní intervaly spolehlivosti.

Molární absorpční koeficient byl vypočítán ze směrnice rovnice kalibrační přímky (ϵ_s) a z každého bodu kalibrace (ϵ) podle Lambert-Beerova zákona, který uvádí vztah (6). Detekční limity byly vypočítány třemi různými způsoby. Metodou tří sigma $X_{3\sigma}$ podle IUPAC, Millerovou metodou X_m a Grahamovou metodou X_D^α a X_D^β .

Rozptyl mezi testovanými hodnotami není významný, jelikož jak je uvedeno v tabulce č. 5, hodnota PG_1 je menší než hodnota F_1 . Jelikož je splněna tato podmínka, rozptyly jsou homogenní a pro vyhodnocení dat lze použít regresní analýzu. Dále byl s naměřenými daty proveden test linearity, bylo zjištěno, že hodnota PG_2 je nižší než hodnota F_2 , z čehož vyplývá že nelineární funkce je méně vhodná pro naměřené body kalibrace než funkce lineární.

Sytém obsahoval standardní roztok kobaltu, Triton X-100 o koncentraci 0,1 %, činidlo PADAP o koncentraci $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a peroxidisíran amonný o koncentraci $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Roztoky byly proměřeny při pH 6.



Obr. č. 32: Kalibrační přímka komplexu Co(III)-PAR s intervaly spolehlivosti, $c(\text{PADAP}) = 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $c(\text{Triton X-100}) = 0,1 \%$, $c((\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8) = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $\lambda = 587 \text{ nm}$, pH 6

Tabulka č. 5: Hodnoty vypočtené z kalibrační křivky

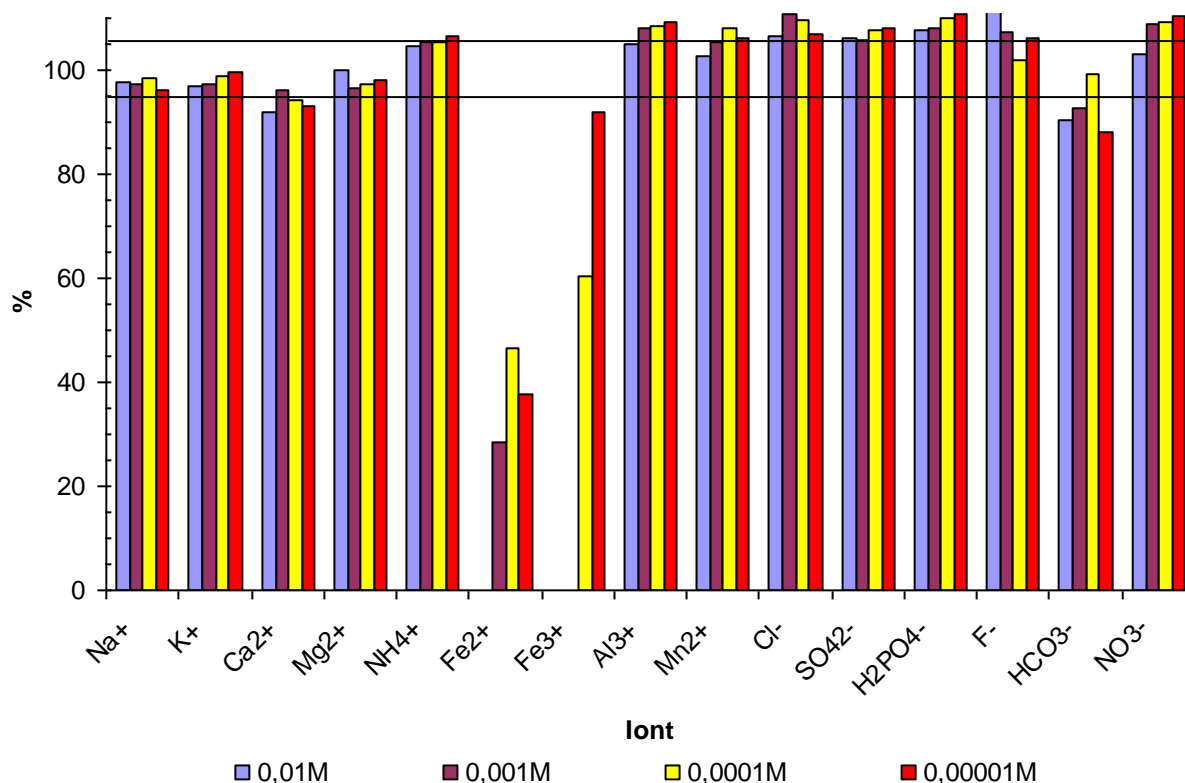
X_D^α	$\text{mg} \cdot \text{dm}^{-3}$	0,027 2
X_D^β	$\text{mg} \cdot \text{dm}^{-3}$	0,081 8
$X_{3\sigma}$	$\text{mg} \cdot \text{dm}^{-3}$	0,007 8
X_m	$\text{mg} \cdot \text{dm}^{-3}$	0,064 2
ε	$\text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{dm}^3$	$80\,834 \pm 3\,849$
ε_s	$\text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{dm}^3$	$83\,669 \pm 1\,138$
PG_1	-	0,59
F_1	-	4,03
PG_2	-	2,15
F_2	-	2,94

4.2.2.8 Vliv cizích iontů

Při pH 7 byl studován vliv cizích iontů na stanovení komplexu o koncentraci kobaltu $c_{\text{Co}} = 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, koncentraci činidla $c_{\text{PADAP}} = 4 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, koncentraci Tritonu X-100 $c_{\text{Triton}} = 0,1 \%$ a koncentraci peroxodisíranu amonného $c_{\text{persíran}} = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Roztoky cizích iontů byly přidávány do roztoku komplexu tak, že byly přítomny ve 4 koncentracích, $10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Obrázek č. 33 zobrazuje interference jednotlivých prvků na komplex Co(III)-PADAP.

Z kationtů zvyšují absorpenci o více jak 5 % pouze hlinité ionty o koncentracích menších než $10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, manganaté ionty o koncentracích vyšších jak $10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a amonné ionty o koncentraci $10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Vápenaté ionty o koncentraci $10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ neovlivňují absorpenci komplexu, ostatní studované koncentrace vápenatých iontů snižují absorpenci. Po přidání železitých a železnatých iontů k roztoku samotného činidla se okamžitě barva roztoku mění z oranžové na červenou. V případě železnatých a železitých iontů dochází k poklesu absorpence komplexu o více jak 5 % ve všech proměřených koncentracích. Železité ionty o koncentracích 10^{-2} a 10^{-3} a železnaté ionty o koncentraci $10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ po úpravě nad pH 4 vytváří hnědou sraženinu. Nižší koncentrace železnatých iontů již sraženinu netvoří ale stále snižují absorpenci o více jak 50 %. Další proměřené koncentrace železitých iontů netvoří sraženinu, ale stále ruší stanovení.

Z aniontů zvyšují absorpenci komplexu chloridy, sírany, dihydrogenfosforečnan o všech proměřených koncentracích. Fluoridy o koncentraci 10^{-3} neovlivňují absorpenci komplexu, ostatní studované koncentrace fluoridů zvyšují absorpenci. Hydrogenuhličitanu o koncentraci $10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ neovlivňují stanovení, ostatní koncentrace hydrogenuhličitanů snižují absorpenci komplexu. Dusičnany o koncentraci $10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ neruší stanovení, ale v ostatních koncentracích zvyšují absorpenci komplexu.



Obr. č. 33: Vliv různých koncentrací interferujících iontů na komplex Co(III)-PADAP
 $c(\text{Co}) = 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $c(\text{PADAP}) = 4 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $\lambda = 587 \text{ nm}$, $\text{pH } 6$

Pro minimalizaci interferencí cizích iontů se dají aplikovat maskovací činidla. Mezi nejznámější patří EDTA, citrónová kyselina, fluorid sodný a thiomocovina.

EDTA snižuje absorpenci komplexu při 587 nm ve všech proměřených koncentracích. Pro správné maskování pomocí EDTA je ale potřeba systém zahřát.

Železité a železnaté ionty lze maskovat pomocí fluoridu sodného.

Jako vhodná maskovací činidla pro činidlo PADAP se jeví citrónová kyselina (např. o koncentraci $10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) a thiomocovina. Tyto dvě činidla ovlivňují absorpenci činidla při

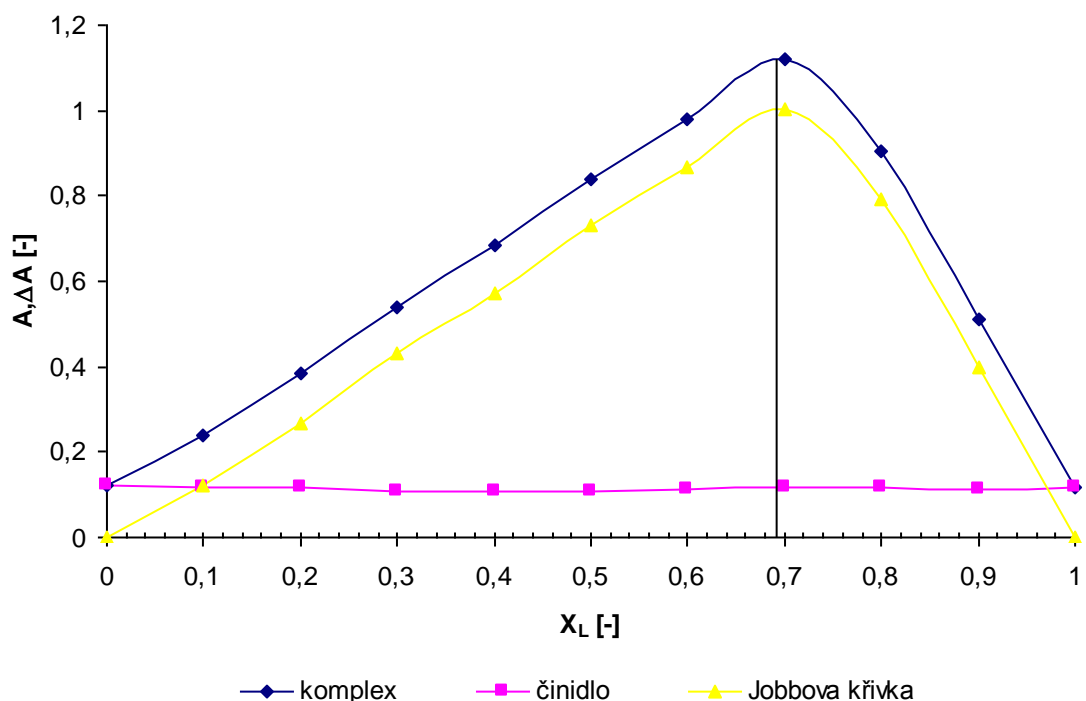
587 nm a pH 6 minimálně při všech proměřených koncentracích. Citrónová kyselina například účinně maskuje interference hlinitých iontů.

4.2.2.9 Metoda kontinuálních variací

Stechiometrie komplexu Co(III)-PADAP byla určena metodou kontinuálních variací (MKV). Měření probíhalo analogicky jako u činidla PAR. Byl určen stechiometrický koeficient blízký dvěma. Komplex se tedy tvoří v poměru 1:2.

Určení stechiometrického koeficientu n :

$$n = \frac{0,69}{1 - 0,69} \doteq 2$$



Obr. č. 34: Určení stechiometrie komplexu Co(III)-PADAP metodou kontinuálních variací, $c(\text{Co}) = c(\text{PADAP}) = 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, pH 6, $\lambda = 587 \text{ nm}$.

4.3 Optimalizace stanovení kobaltu metodou ET AAS

4.3.1 Optimalizace parametrů přístroje, lampy a teplotního programu

Teplotní program sestává z fáze sušení, pyrolýzy, atomizace a čištění. Fáze sušení probíhá ve 3 krocích, při prvním kroku se zvýší teplota na 90, 105 a 110 °C a dochází k odpařování rozpouštědla. Tato fáze není potřeba optimalizovat. Následuje fáze pyrolýzy a fáze atomizace, které je nutné optimalizovat. Teplota čištění je na přístroji AAS ZEE nit 60 od firmy AnalytikJena AG je 2400 °C.

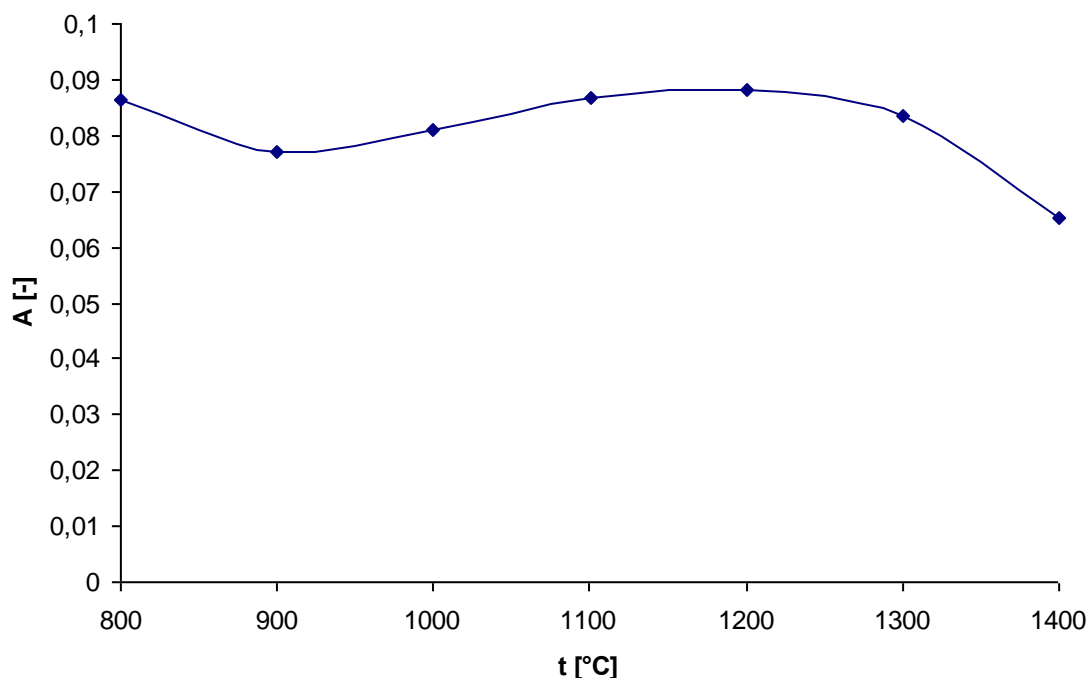
Optimální teplota pyrolýzy byla určena podle tvaru a plochy píků. Optimální teplota pyrolýzy byla určena 1400 °C. V rozmezí teplot 800 – 1300 °C sice měly píky velkou absorpční plochu, ale byly zdvojené, při teplotě 1400 °C již byl pík jednoduchý.

Teplota atomizace byla určena 2100 °C. Při optimalizaci teploty atomizace byly píky při všech zkoušených teplotách jednoduché, ale při teplotách 2200 – 2300 °C již byly rozštěpené. Teplota atomizace tedy byla určena pouze na základě absorpční plochy píků. Diagram průběhu teplot pyrolýzy a atomizace je zobrazen na obrázku č. 35, resp. 36.

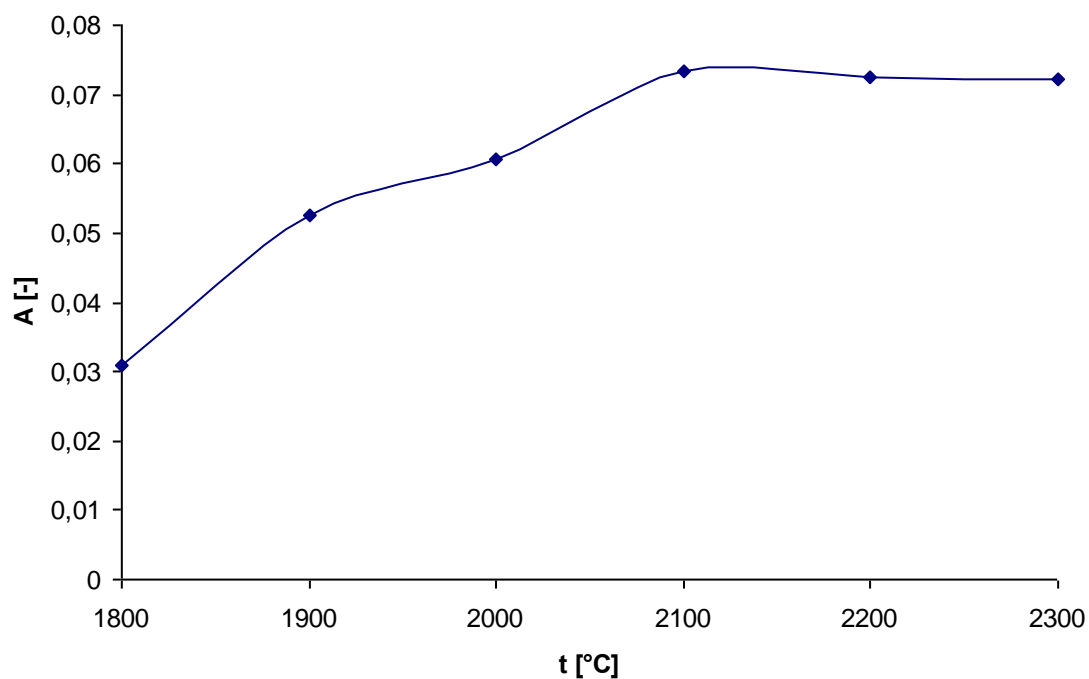
Dále byla určena nejmenší možná šířka štěrbin 0,2 nm. Při zvětšování šířky štěrbin dochází ke snížení absorpční plochy píků.

Proud přiváděný na lampu je 5 mA. Při zvyšování přiváděného proudu na lampu dochází opět k poklesu absorbance.

Optimalizované parametry metody stanovení kobaltu pomocí ET AAS jsou uvedeny v tabulce č. 6. Teplotní program metody je uveden v tabulce č. 7.



Obr. č. 35: Absorpční plocha píků při různých teplotách pyrolýzy, $c(\text{Co}) = 5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$



Obr. č. 35: Absorpční plocha píků při různých teplotách atomizace, $c(\text{Co}) = 5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$

Tabulka č. 6: Parametry měření

kyveta	grafitová s platformou
objem nástřiku	5 μl
šířka štěrbin	0,2 nm
proud na lampu	5 mA
vlnová délka	240,7 nm

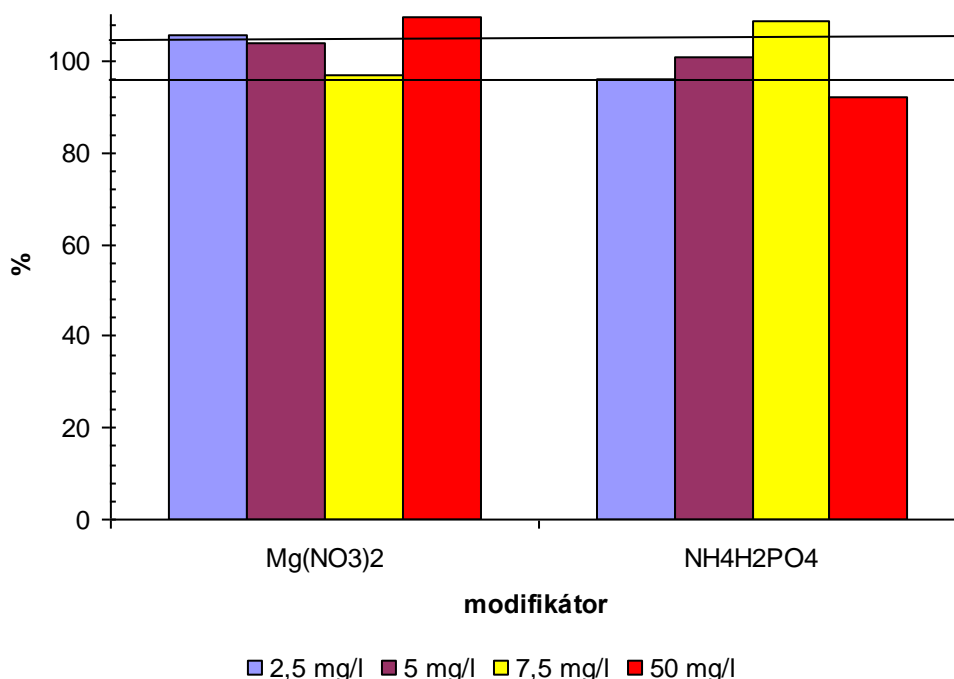
Tabulka č. 7: Teplotní program

	Krok	Teplota	Ramp	Doba držení
č.	Fáze	°C	°C/s	s
1	Sušení	90	5	20
2	Sušení	105	3	20
3	Sušení	110	2	10
4	Pyrolýza	1400	250	10
5	AZ	1400	0	5
6	Atomizace	2100	1300	4
7	Čištění	2400	500	4

4.3.2 Vliv modifikátoru

Modifikátor je látka, která se přidává ke vzorku aby potlačila nežádoucí vlivy matrice, které by ovlivňovaly stanovení. Mezi nepoužívanější modifikátory patří Pd, dusičnan hořečnatý a dihydrogenfosforečnan draselný.

Byl studován vliv dusičnanu hořečnatého a dihydrogenfosforečnanu draselného na tvar a plochu píků. Z obrázku č. 36 je zřejmé, že oba ze studovaných modifikátorů ovlivňují absorpční plochu píků jen velmi málo. Použitím modifikátorů ani nedochází k deformaci píků.

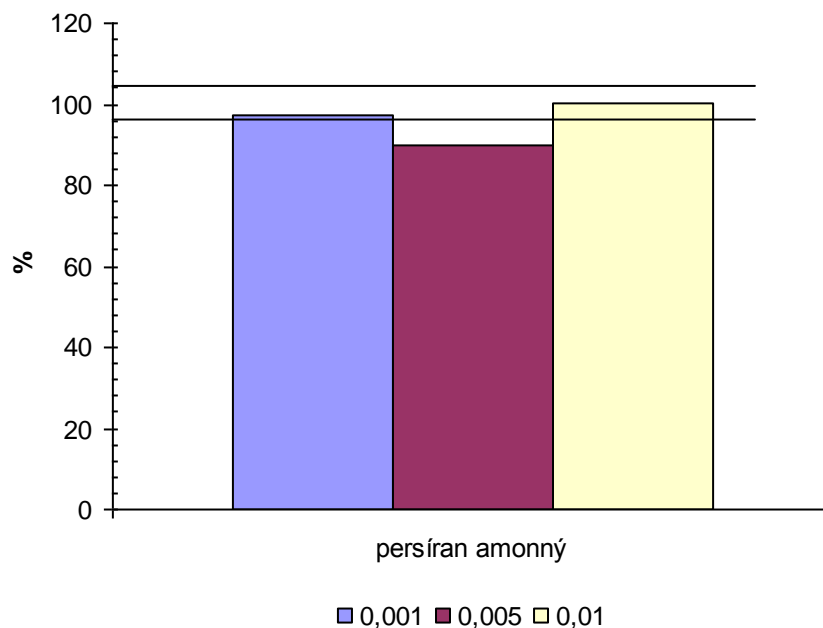


Obr. č. 36: Vliv modifikátorů na absorpční plochu píků, $c(\text{Co}) = 5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$

4.3.3 Vliv peroxodisíranu amonného

Peroxodisíran amonný se používá jako oxidační činidlo pro převedení kobaltnatých iontů na kobaltité. V přírodních vodách se kobalt vyskytuje nejčastěji v oxidačním stavu +II. Oxidační činidlo se používá pro stanovení celkového kobaltu jako Co(III). Byl zkoušen vliv persíranu amonného na tvar a plochu píků. Obrázek č. 37 zobrazuje vliv jednotlivých koncentrací peroxodisíranu amonného na absorbanci roztoku.

Peroxodisíran o koncentraci 10^{-3} snižuje absorbanci plochy píku o 4%. Peroxidisíran o koncentraci $0,005 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ snižuje absorbanci o 10%. Koncentrace peroxodisíranu amonného 0,01 nemá na naměřenou absorbanci prakticky žádný vliv. Bylo zjištěno, že persíran amonný o koncentraci $10^{-3} - 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ nemá na absorbance plochy píků pozitivní vliv. Není tedy nezbytné peroxodisíran amonný použít pro stanovení kobaltu ve vzorcích reálných vod.



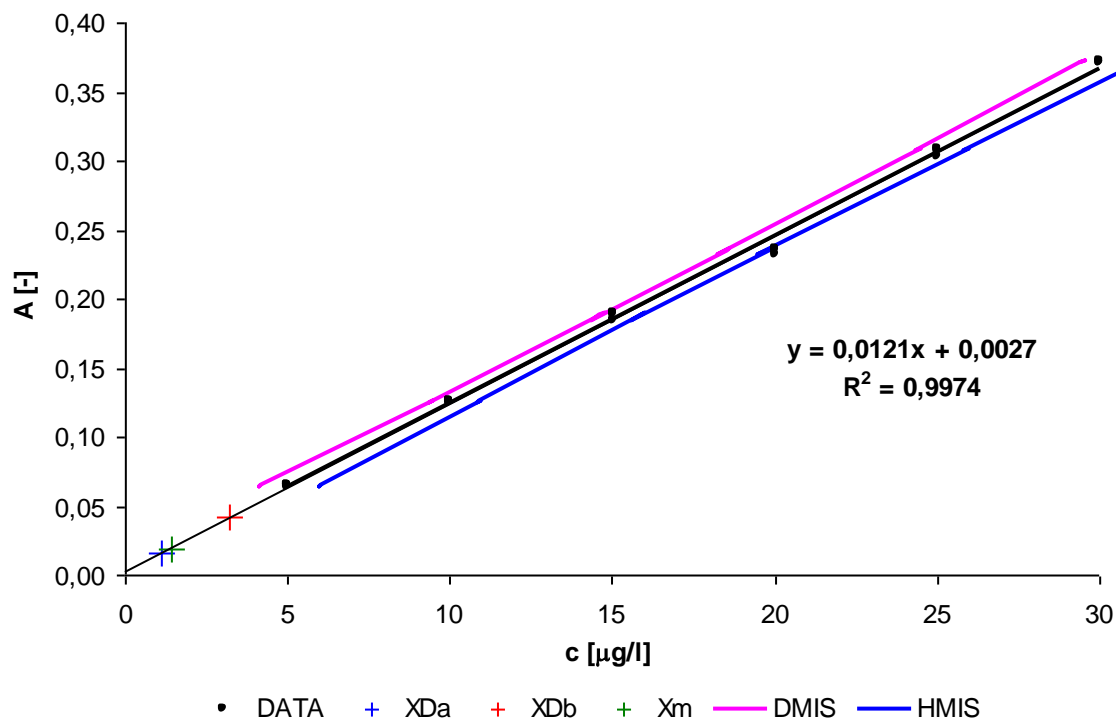
Obr. č. 37: Vliv různých koncentrací peroxidisíranu amonného na absorpční plochu píků Co v %, $c(\text{Co}) = 5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

4.3.4 Kalibrace

Kalibrační přímka sestává z šesti ekvidistantních bodů v celém lineárním rozsahu (5, 10, 15, 20, 25 a 30 $\mu\text{g/l}$) jak je vidět na obrázku č. 38. Každý bod byl proměřen třikrát, první a poslední bod kalibrace desetkrát a blank byl proměřen desetkrát pro statistické vyhodnocení kalibrace podle IUPAC a ČSN 8366. Byly vypočítány horní a dolní intervaly spolehlivosti.

Detekční limity byly vypočítány třemi různými způsoby. Metodou tří sigma $X_{3\sigma}$ podle IUPAC, Millerovou metodou X_m a Grahamovou metodou X_D^α a X_D^β .

Rozptyl mezi testovanými hodnotami není významný, jelikož jak je uvedeno v tabulce č. 8, hodnota PG_1 je menší než hodnota F_1 . Jelikož je splněna tato podmínka, rozptyly jsou homogenní a pro vyhodnocení dat lze použít regresní analýzu. Dále byl s naměřenými daty proveden test linearity, bylo zjištěno, že hodnota PG_2 je nižší než hodnota F_2 , z čehož vyplývá že nelineární funkce je méně vhodná pro naměřené body kalibrace než funkce lineární.



Obr. č. 38: Kalibrační příjímka a intervaly spolehlivosti pro Co.

Tabulka č. 8: Statistické parametry vypočítané z kalibrační závislosti

X_D^a	$\mu\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$	1,0943
X_D^b	$\mu\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$	3,1888
$X_{3\sigma}$	$\mu\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$	0,1254
X_m	$\mu\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$	1,3888
$MS_{3\sigma}$	$\mu\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$	0,418
PG_1	-	0,91
F_1	-	4,03
PG_2	-	2,08
F_2	-	2,15

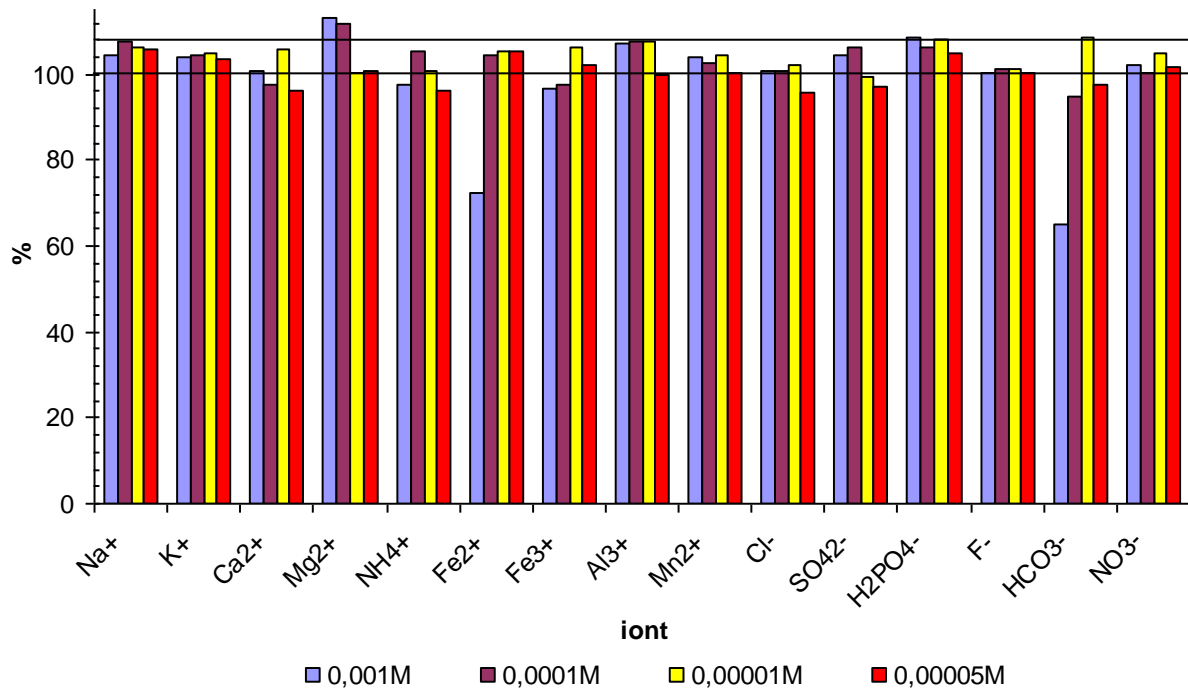
4.3.5 Vliv cizích iontů

Ze zkoušených kationtů zvyšují absorpční plochy píků a více než 5 % Na^+ ionty o všech koncentracích, Mg^{2+} ionty o koncentracích 10^{-3} a 10^{-4} $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a Al^{3+} ionty o koncentracích 10^{-3} – 10^{-5} $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. K výraznějšímu snížení absorpce dochází pouze v přítomnosti Fe^{2+} iontů o koncentraci 10^{-3} $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

Ze zkoušených aniontů zvyšují absorpční plochy píků H_2PO_4^- o všech proměřených koncentracích dihydrogenfosforečnanové ionty a hydrogenuhličitanové ionty o koncentraci 10^{-4} $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. K rapidnímu snížení absorpce plochy píku dochází v přítomnosti HCO_3^- o koncentraci 10^{-3} $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. K mírnému snížení koncentrace dochází u HCO_3^- iontů o koncentraci 10^{-4} $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a u Cl^- iontů o koncentraci $5 \cdot 10^{-5}$ $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

Obrázek č. 39 zobrazuje vliv různých koncentrací vybraných kationtů a aniontů na absorpční plochy píků Co. Jelikož nedochází k rapidnímu zvýšení absorpce v přítomnosti

jiných iontů, lze říci že žádný ze zkoušených iontů nemá absorpční maximum blízké k absorpčním pásům kobaltu.



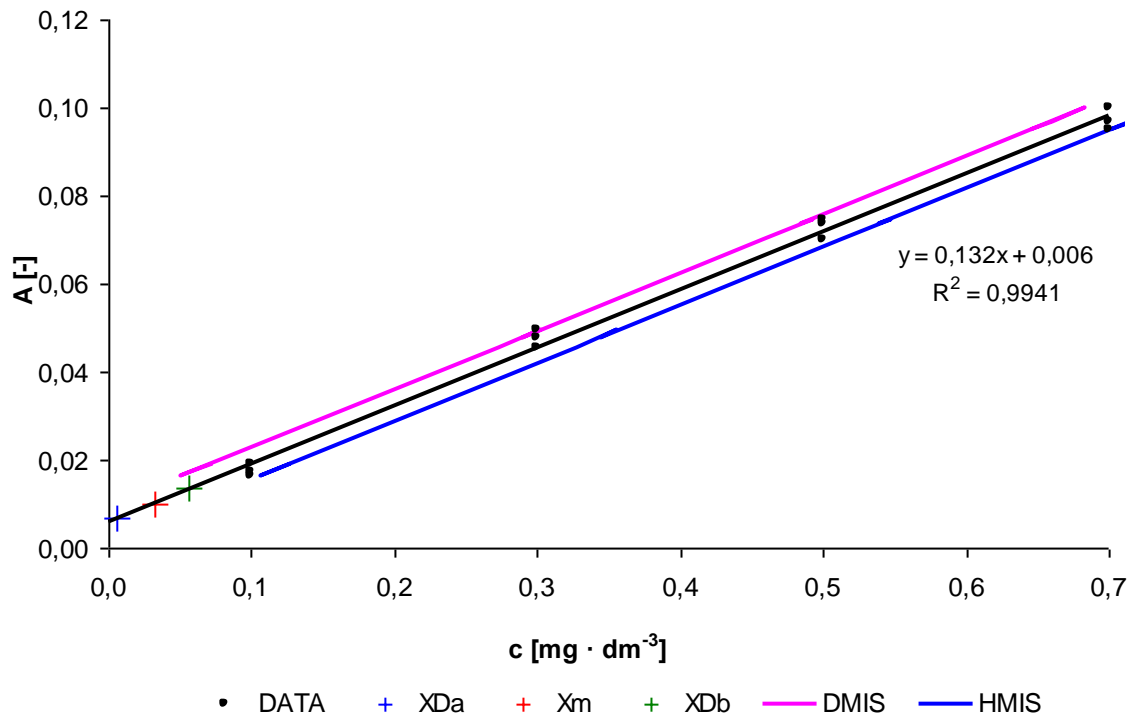
Obr. č. 38: Vliv různých koncentrací cizích iontů na absorpční plochy píků Co v %, $c(\text{Co}) = 5 \cdot 10^{-6}$.

4.4 Kalibrační křivka pro stanovení kobaltu metodou F AAS

Kalibrační přímka sestává z pěti ekvidistantních bodů v celém lineárním rozsahu (0,1; 0,3; 0,5; 0,7 a 0,9 mg/l) jak je vidět na obrázku č. 39. Každý bod byl proměřen třikrát, první a poslední bod kalibrace desetkrát a blank byl proměřen desetkrát pro statistické vyhodnocení kalibrace podle IUPAC a ČSN 8366. Byly vypočítány horní a dolní intervaly spolehlivosti. K roztokům byl přidán modifikátor $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ o koncentraci 10 mg/l.

Detekční limity byly vypočítány třemi různými způsoby. Metodou tří sigma $X_{3\sigma}$ podle IUPAC, Millerovou metodou X_m a Grahamovou metodou X_D^α a X_D^β .

Rozptyl mezi testovanými hodnotami není významný, jelikož jak je uvedeno v tabulce č. 9, hodnota PG_1 je menší než hodnota F_1 . Jelikož je splněna tato podmínka, rozptyly jsou homogenní a pro vyhodnocení dat lze použít regresní analýzu. Dále byl s naměřenými daty proveden test linearity, bylo zjištěno, že hodnota PG_2 je nižší než hodnota F_2 , z čehož vyplývá že nelineární funkce je méně vhodná pro naměřené body kalibrace než funkce lineární.



Obrázek č. 39: Kalibrační křivka a intervaly spolehlivosti, $c(\text{Mg}(\text{NO}_3)_2) = 10 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$

Tabulka č. 9: Statistické parametry vypočítané z kalibrační závislosti

X_D^α	$\mu\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$	14,5230
X_D^β	$\mu\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$	56,9750
$X_{3\sigma}$	$\mu\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$	12,5400
X_m	$\mu\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$	39,358
$MS_{3\sigma}$	$\mu\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$	15,186
PG_1	-	0,18
F_1	-	4,03
PG_2	-	0,52
F_2	-	2,15

4.5 Analýza reálných vzorků vod a vitamínu B12

Reálné vzorky vod a vitamínu B12 byly upraveny a stanoveny třemi způsoby:

1. Metodou atomové absorpční spektrometrie s elektrotermickou atomizací za optimalizovaných podmínek
2. Metodou atomové absorpční spektrometrie s atomizací v plameni s modifikátorem $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ o koncentraci 10 mg/l
3. Metodou UV-VIS spektrofotometrie reakcí s 4-(2-pyridylazo)rezorcinolem za optimalizovaných podmínek

4. Metodou UV-VIS spektrofotometrie reakcí s 2-(5-Brom-2-pyridylazo)-5-diethylaminofenolem po oxidaci peroxodisíranem amonným za optimalizovaných podmínek.

4.5.1 Stanovení metodou ET AAS

Vzorek byl přefiltrován přes membránový filtr o velikosti pórů 0,45 μm . Do 5 vialek o objemu 1 ml bylo odpipetováno 500 μl přefiltrovaného vzorku vody. Dále bylo přidáno takové množství zásobního roztoku standardu Co(II), aby výsledná koncentrace byla 5, 10, 15, a 20 $\mu\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$. V jedné vialce tedy zůstal roztok vzorku bez přídatku standardu. Obsah nádobek byl doplněn miliQ vodou a promíchán. Vialky s připravenými roztoky byly vpraveny do autosampleru. Postupně byla u každého vzorku třikrát změřena jeho absorpční plocha při vlnové délce 240,7 nm proti miliQ vodě.

V případě vitamínu B12 bylo ke stanovení pipetováno 5 μl zásobního roztoku o koncentraci 10^{-4} g/l.

Tímto způsobem byly připraveny a proměřeny všechny 4 vzorky vod a vzorek vitamínu B12. Výpočet neznáme koncentrace byl proveden podle vztahu (26). Bylo získáno 12 hodnot koncentrace kobaltu ve vzorku. Tyto hodnoty byly zprůměrovány a byla vypočítána směrodatná odchylka podle studenta. Výsledné hodnoty koncentrací a rovnic regrese metody standardního přídatku jsou uvedeny v tabulce č. 10.

Tabulka č. 10: Stanovený obsah kobaltu ve vzorcích metodou ET AAS

Typ vzorku	Specifikace vzorku	Rovnice regrese	koncentrace [$\mu\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$]	chyba stanovení
Podzemní voda	Hurbanova studánka	$y = 0,0096x + 0,0030$	0,1757	$\pm 0,0002$
Balená voda	Mattoni neperlivá	$y = 0,0098x + 0,0021$	0,3503	$\pm 0,0003$
Povrchová voda	Svratka	$y = 0,0163x + 0,0043$	0,1566	$\pm 0,0004$
Odpadní voda	VFU	$y = 0,0154x + 0,0079$	0,0746	$\pm 0,0001$
Vitamin	Vitamin B12	$y = 0,0159x + 0,0108$	0,2300	$\pm 0,001$

4.5.2 Stanovení kobaltu metodou F AAS

Vzorek byl přefiltrován přes membránový filtr o velikosti pórů 0,45 μl . Do pěti odměrných baněk o objemu 25 ml bylo odpipetováno 10 ml přefiltrovaného vzorku vody. Poté bylo přidáno takové množství zásobního roztoku standardu Co, aby výsledná koncentrace standardních přídatků byla 0,1; 0,3; 0,5 a 0,7 $\text{mg} \cdot \text{dm}^{-3}$. Dále bylo přidáno takové množství modifikátoru $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$, aby výsledná koncentrace činila 10 mg/l. Baňka poté byla doplněna miliQ vodou na objem 25 ml a obsah byl řádně promíchán.

V případě vitamínu B12 bylo pipetováno pouze 0,1 ml zásobního roztoku o koncentraci 10^{-3} mol $\cdot \text{dm}^{-3}$.

Tímto způsobem byly připraveny a proměřeny všechny 4 vzorky vod a vzorek vitamínu B12. Výpočet neznáme koncentrace byl proveden podle vztahu (26). Bylo získáno 12 hodnot koncentrace kobaltu ve vzorku. Tyto hodnoty byly zprůměrovány a byla vypočítána směrodatná odchylka podle studenta. Výsledné hodnoty koncentrací a rovnic regrese metody standardního přídatku jsou uvedeny v tabulce č. 11.

Tabulka č. 11: Stanovený obsah kobaltu ve vzorcích metodou F AAS

Typ vzorku	Specifikace vzorku	Rovnice regrese	koncentrace [$\mu\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$]	chyba stanovení
Podzemní	Hurbanova studánka	$y = 0,0954x + 0,0127$	2,8347	$\pm 0,9$
Balená	Mattoni neperlivá	$y = 0,2068x + 0,0245$	6,8907	$\pm 2,1$
Povrchová	Svratka	$y = 0,1476x + 0,0031$	5,0031	$\pm 2,6$
Odpadní	VFU	$y = 0,2228x + 0,0333$	2,7562	$\pm 1,7$
Vitamin B12	Vitamin B12	$y = 0,1480x + 0,0369$	5,5141	$\pm 1,2$

4.5.3 Stanovení kobaltu metodou UV-VIS po reakci s činidlem PAR

Vzorek byl přefiltrován přes membránový filtr o velikosti pórů 0,45 μl . Do pěti odměrných baněk o objemu 25 ml bylo odpipetováno 10 ml přefiltrovaného vzorku vody. Poté bylo přidáno takové množství zásobního roztoku standardu Co, aby výsledná koncentrace standardních přídavek byla 0,1; 0,3; 0,5 a 0,7 $\text{mg} \cdot \text{dm}^{-3}$. Dále byl přidán takový objem zásobního roztoku činidla PAR, aby výsledná koncentrace činidla byla $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Poté byl přidán 1 ml roztoku acetátového pufru o pH 5,5 o koncentraci 0,25 $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Běha poté byla doplněna destilovanou vodou na objem 25 ml a obsah byl řádně promíchán. Absorpční spektrum takto připravených roztoků bylo změřeno v rozmezí vlnových délek 350 – 600 nm, ze kterého poté byla vybrána hodnota absorbance při absorpčním maximu komplexu Co(III)-PAR (510 nm). Od absorpčních spekter komplexu bylo vždy odečteno absorpční spektrum blanku a všechna měření probíhala proti destilované vodě.

Tímto způsobem byly připraveny a proměřeny všechny 4 vzorky vod. Výpočet koncentrace kobaltu byl proveden podle vztahu (26). Výsledkem bylo 15 hodnot koncentrace kobaltu ve vzorku, které byly zprůměrovány a z nich byla vypočítána směrodatná odchylka podle Studenta. Hodnoty výsledných koncentrací jsou uvedeny v tabulce č. 12.

Tabulka č. 12: Stanovený obsah kobaltu ve vzorcích metodou UV-VIS jako Co(III)-PAR

Typ vzorku	Specifikace vzorku	Rovnice regrese	koncentrace [$\mu\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$]	chyba stanovení
Podzemní voda	Hurbanova studánka	$y = 1,0952x - 0,0145$	2,9523	-
Balená voda	Mattoni neperlivá	$y = 0,5707x + 0,0434$	5,3560	$\pm 1,2$
Povrchová voda	Svratka	$y = 0,9678x + 0,0199$	5,0801	$\pm 1,6$
Odpadní voda	VFU	$y = 1,1027x + 0,0218$	3,6276	$\pm 1,3$
Vitamin	Vitamin B12	$y = 0,9695x + 0,0126$	6,7389	$\pm 1,2$

4.5.4 Stanovení kobaltu metodou UV-VIS po reakci s činidlem PADAP

Vzorek byl přefiltrován přes membránový filtr o velikosti pórů 0,45 μl . Do pěti odměrných baněk o objemu 25 ml bylo odpipetováno 10 ml přefiltrovaného vzorku vody. Poté bylo přidáno takové množství zásobního roztoku standardu Co, aby výsledná koncentrace standardních přídavek byla 0,1; 0,3; 0,5 a 0,7 $\text{mg} \cdot \text{dm}^{-3}$. Dále bylo přidáno 0,5 ml roztoku Tritonu X-100, 0,5 ml roztoku peroxidisíranu amonného a 1 ml roztoku acetátového pufru

o pH 6 o koncentraci $0,25 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Poté byl přidán takový objem zásobního roztoku činidla PADAP, aby výsledná koncentrace činidla byla $4 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Baňka poté byla doplněna destilovanou vodou na objem 25 ml a obsah byl řádně promíchán. Absorpční spektrum takto připravených roztoků bylo změřeno po 30 minutách vyvíjení každého komplexu v rozmezí vlnových délek 350 – 650 nm, ze kterého poté byla vybrána hodnota absorbance při absorpčním maximu komplexu Co(III)-PADAP (587 nm). Od absorpčních spekter komplexu bylo vždy odečteno absorpční spektrum blanku a všechna měření probíhala proti destilované vodě.

Tímto způsobem byly připraveny a proměřeny všechny 4 vzorky vod. Výpočet koncentrace kobaltu byl proveden podle vztahu (26). Výsledkem bylo 15 hodnot koncentrace kobaltu ve vzorku, které byly zprůměrovány a z nich byla vypočítána směrodatná odchylka podle Studenta. Hodnoty výsledných koncentrací jsou uvedeny v tabulce č. 13.

Tabulka č. 13: Stanovený obsah kobaltu ve vzorcích metodou UV-VIS jako Co(III)-PADAP

Typ vzorku	Specifikace vzorku	Rovnice regrese	koncentrace [$\mu\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$]	chyba stanovení
Podzemní voda	Hurbanova studánka	$y = 1,6015x + 0,0061$	3,6945	$\pm 0,2$
Balená voda	Mattoni neperlivá	$y = 0,8225x + 0,0851$	5,9777	$\pm 2,3$
Povrchová voda	Svratka	$y = 1,5220x + 0,0164$	4,5992	$\pm 1,5$
Odpadní voda	VFU	$y = 1,7388x + 0,0104$	2,9234	$\pm 1,6$
Vitamin	Vitamin B12	$y = 1,6198x + 0,0066$	4,9902	$\pm 0,2$

4.5.5 Shrnutí výsledků stanovení kobaltu v reálných vzorcích

Naměřené koncentrace kobaltu pro každý reálný vzorek každou metodou jsou uvedeny v tabulce č. 14. Pro každý vzorek byla uvedena průměrná koncentrace kobaltu v $\mu\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$. Do výpočtu průměrné koncentrace nebyly zahrnuty výsledky získané metodou ET AAS, které jsou na první pohled odlišné od ostatních tří koncentrací. Tato odlehlost může být způsobena špatnou optimalizací postupu jako je například teploty pyrolýzy či teplota atomizace.

Tabulka č. 14: Výsledné koncentrace kobaltu v reálných vzorcích

Typ vody	c (ET AAS)	c (FAAS)	c (PAR)	c (PADAP)	Průměr
	$\mu\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$	$\mu\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$	$\mu\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$	$\mu\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$	$\mu\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$
podzemní	0,1757	2,8347	2,9523	3,6945	3,1605
Balená	0,3503	6,8907	5,3560	5,9777	6,0748
Povrchová	0,1566	5,0031	5,0801	4,5992	4,8941
Odpadní	0,0746	2,7562	3,6276	2,9234	3,1024
B 12	0,2300	5,5141	6,7389	4,9902	5,7477

5 ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo optimalizovat a zhodnotit podmínky pro stanovení kobaltu metodami molekulové a atomové spektrometrie. Pro metodu molekulové spektrometrie byly vybrány dvě činidla, 4-(2-pyridylazo)rezorcinol a 2-(5-Brom-2-pyridylazo)-5-diethylaminofenol. Činidla PAR a PADAP patří mezi necitlivější činidla pro stanovení kobaltu a proto byly optimalizovány podmínky stanovení právě pro tato činidla. Z metod atomové absorpční spektrometrie byla vybrána technika s elektrotermickou atomizací a technika s atomizací v plameni.

Kobalt se v přírodních vodách vyskytuje zejména v oxidačním stavu +II, v oxidačním stavu +III se nachází jen zřídka, zejména v komplexech s organickými molekulami. Kobalt se tedy ihned po přidání organického činidla samovolně oxiduje ze stavu +II na +III, proto není potřeba přidávat oxidační činidla pro účel oxidace na oxidační číslo +III.

Jako optimální pH pro stanovení kobaltu spektrofotometricky po reakci s činidlem PAR bylo zvoleno pH 5,5. Při tomto pH je hodnota absorbance nejvyšší a s rostoucím pH až do hodnoty 9 se již nemění. Pro stanovení byla vybrána koncentrace činidla $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, nižší koncentrace činidla vede ke snížení směrnice absorpční přímky, tedy k horší citlivosti. Při reakci kobaltu s činidlem PAR se veškerý kobalt oxiduje z dvojmocného na trojmocný, proto není třeba používat oxidační činidla. Pro stanovení kobaltu v reálných roztocích se používá tlumivých roztoků. Pro pH 5,5 je vhodný acetátový pufr, případně pro vyšší pH (např. pro pH 9) se dá použít borátový pufr. Oba tyto pufrы o koncentraci $0,01 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ovlivňují absorpční spektrum komplexu jen minimálně. V této diplomové práci byl použit acetátový pufr o koncentraci $0,01 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ pro udržení konstantní hodnoty pH 5,5. Přítomnost tenzidů v roztoku nijak pozitivně neovlivňuje stanovení, naopak dochází k nežádoucím změnám absorpčních křivek. Tenzidy tedy nebyly použity pro stanovení kobaltu ve vodách s činidlem PAR. Z cizích iontů nejvíce ruší stanovení kobaltu hlinité ionty a ionty železa. Železité ionty o vysokých koncentracích dokonce vytváří sraženinu. V případě vysokého obsahu železitých iontů je třeba provést redukci na méně interferující železnaté ionty, které se poté zamaskují pomocí kyseliny citronové nebo se použije fluoridu sodného pro maskování železitých iontů. Poměr Co : PAR byl vypočítán metodou kontinuálních variací 1:3, což je v rozporu s údaji v literatuře.

Spektrofotometrické činidlo PADAP je citlivější než PAR a dovoluje stanovit nižší koncentrace kobaltu a má větší lineární rozsah až do 1,0 mg/l. PADAP není rozpustný ve vodě a proto se jako rozpouštědlo používá dimethylformamid. Obsah dimethylformamidu v měřeném roztoku v této diplomové práci činil 4 obj. %. Je nutné přidávat neiontový tenzid Triton X-100 minimálně o koncentraci 0,1 % za účelem zabránění zpětného vysrážení činidla ve vodě. Komplex Co-PADAP s přídatkem Tritonu X-100 a peroxodisíranu draselného vykazuje časovou nestabilitu. S rostoucím časem roste i absorbance komplexu, proto byl v této práci používán peroxodisíran amonný pro zvýšení absorbance komplexu. Byl zvolen časový interval pro dostatečné vyvíjení komplexu 30 minut na světle. Pro stanovení kobaltu v reálných vzorcích bylo zvoleno pH 6, kterého se docílí acetátovým pufrem o koncentraci $0,01 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Tato koncentrace tlumivého roztoku ovlivňuje absorpční spektrum jen minimálně. Pro stanovení kobaltu byla zvolena ideální koncentrace činidla $4 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Nižší koncentrace vedou k nedokonalé tvorbě komplexu a k nižší směrnici kalibrační křivky, čili k horší citlivosti. Ionty železa způsobují větší interference stanovení než je tomu u činidla PAR. Tyto interference se vyruší maskovacími činidly, velmi účinný je fluorid sodný. Jako maskovací činidlo pro stanovení kobaltu činidlem PADAP se používá kyselina citrónová, která nijak nesnižuje absorbanci komplexu. Stechiometrie komplexu byla určena metodou kontinuálních variací Co : PADAP = 1:2.

Při optimalizaci stanovení kobaltu metodou atomové absorpční spektrometrie s elektrotermickou atomizací bylo zjištěno, že vyšší teplotě pyrolýzy se tvoří čisté jednoduché píky na úkor absorpce. Při nižších teplotách pyrolýzy je sice absorpce vyšší ale píky jsou zdvojené. Teplota atomizace ovlivňuje pouze intenzitu absorpce a nikoliv tvar píků. Metoda ET AAS poskytuje neuspokojivé výsledky a do výpočtu koncentrace kobaltu v reálných vzorcích vod nebyla zahrnuta.

Pro stanovení kobaltu metodou F AAS byl použit plamen o složení acetylen-vzduch o teplotě atomizace 2 500 K. Jelikož je vliv pozadí větší než u jiných metod, byl přidáván k měřenému roztoku modifikátor, který měl výslednou koncentraci $10 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$.

Nalezené optimalizované podmínky byly aplikovány na reálné vzorky vod a vitamínu B12. Byly proměřeny všechny druhy vod, povrchová, podzemní, balená a odpadní. Koncentrace kobaltu ve vzorcích byla zjišťována metodou standardních přídavek. Výsledné koncentrace byly zjištěny výpočtem z regresních rovnic pro metodu standardních přídavek.

Výsledné hodnoty koncentrací kobaltu ve vzorcích byly získány zprůměrováním zjištěných hodnot koncentrací ze stanovení metodou F AAS a metodou UV-VIS po reakci s PAR a PADAP.

Výsledné koncentrace kobaltu v jednotlivých vzorcích vod a vitamínu B12 jsou uvedeny v tabulce č. 14 na straně 72. Bylo zjištěno, že z proměřených vzorků vod nejvíce kobaltu obsahuje balená neperlivá minerální voda Mattoni. Nejnižší koncentrace kobaltu byla nalezena ve vzorku odpadní vody odebrané z čistírny odpadních vod při VFU Brno, nechlorovaný odtok, čili po vyčištění. Potvrdilo se, že koncentrace kobaltu ve vodě se pohybují v řádu jednotek $\mu\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$.

6 SEZNAM LITERATURY

- [1] *online*, <<http://www.britannica.com/EBchecked/topic/123235/cobalt>>, citováno 25. 2. 2012
- [2] CARR, H., M., TUREKIAN, K., K.: *The geochemistry of cobalt*, *Geochemica et cosmochimica acta*, 23, London 1961, p. 9-60
- [3] GREENWOOD, N., N., EARNSHAW, A.: *Chemie prvků* 2. díl, 1. vydání, Informatorium, Praha 1993, p.1375-1415 ISBN 80-85427-38-9
- [4] PITTER, P.: *Hydrochemie*, 3.vydání, vydavatelství VŠCHT, Praha 1999, p. 145, ISBN 80-7080-340-1
- [5] REMY, H.: *Anorganická chemie* 2, SNTL, Praha, 1971, p. 304
- [6] HOLLEMAN, A., F., WIBERG, E., WIBERG, N.: *Lehrbuch der Anorganischen Chemie*, 102nd ed. de Gruyter, Berlin 2007, p. 1146 – 1152, ISBN 9783110177701
- [7] HAMILTON E., I.: *The geobiochemistry of cobalt*, *The science of the total environment* 150, Dunterton 1994, p. 7 – 11
- [8] ROSSOF, I., S.: *Encyklopedia of clinical toxicology*, 1. vydání, New York 2002, p. 283 – 284, ISBN 1-84214-101-5
- [9] KENDRICK, M., J., MAY, M., T., , PLISHKA, M., J., ROBINSON, K., D.: *Metals in biological systems*, 2. vydání, Chichester 1992, p. 70 – 75, ISBN 0-13-577727-5
- [10] *online*, <<http://ods.od.nih.gov/factsheets/vitaminb12.asp#ref>>, citováno 19.3.2012
- [11] *online*, citováno 19.3.2012, <<http://www.celostnimediceina.cz/co-to-jsou-vitaminy-a-jaka-je-jejich-funkce.htm>, >
- [12] CRICHTON, R., R., BOEALERT, J., R.: *Inorganic Biochemistry of iron Metabolism: from molecular mechanism to clinical consequences*, 2. vydání, Chichester 2001, Wiley, p. 300 – 301, ISBN 0-471-49223-X
- [13] LOEFFLER, G., VOET, D.: *Basiswissen biochemie*, 6. vydání, Heidelberg 2005, p. 606, ISBN 540-23885-9
- [14] ČEGAN, A., KORECKÁ, L.: *Biochemie pro bakalářské studium*, Univerzita Pardubice, skriptum, Pardubice 2008, p.16 – 17
- [15] VOET, J. G., VOET, D.: *Biochemistry*, New York 1995, J. Wiley & sons, p. 675, ISBN 0-471-58651-X
- [16] COLLINS, R., N., KINSELA, A., S.: *The aqueous phase speciation and chemistry of cobalt in terrestrial environments*, *Chemosphere*, 79, Sydney 2010, p. 763 – 771]
- [17] HAMILTON, E.I.: *The geobiochemistry of cobalt*, *The science of the total environment*, 150, Phoenix 1994, p. 7-39
- [18] YOUNG, R., S.: *Cobalt in biology and biochemistry*, Academic press, New York 1979, p. 4
- [19] JADHAV, S., B., TANDEL S., P., MALVE, S., P.: *Extraction and spectrophotometric determination of cobalt(II) with isonitroso-5-methyl-2-hexanone*, *Talanta* 55, Mumbai 2001, p. 1059 - 1064
- [20] GHAEDI, M., SHOKROLLAHI, A., AHMADI, F.: *Simultaneous preconcentration and determination of copper, nickel, cobalt and lead ions content by flame atomic absorption spectrometry*, *J. Hazard. Mater.*, 142, Yasouj 2007 p. 272–278

- [21] GHAEDI, M., AHMADI, F., SOYLAK, M.: *Preconcentration and separation of nickel, copper and cobalt using solid phase extraction and their determination in some real samples*, Journal of hazardous Materials, 147, Yasouj 2007, p. 226 - 231
- [22] LEMOS, V., a., da FRANCA, R., S., MOREIRA, B., O.: *Cloud point extraction for Co and Ni determination in water samples by flame atomic absorption spectrometry*, Separation and purification technology, 54, Bahia 2007, p. 349 – 354
- [23] CHEN, J., TEO, K., C.: *Determination of cobalt and nickel in water samples by flame atomic absorption spectrometry after cloud point extraction*, Analytica chimica acta, 434, Singapore 2001, p.325 -330
- [24] LEMOS, V., A., da FRANCA, R., S., MOREIRA, B., O.: *Cloud point extraction for Co and Ni determination in water by flame atomic absorption spectrometry*, Separation and purification technology, 54, Jequié 2007, p. 349 – 354
- [25] GIL, R., A., GÁSQUEZ, J., A., OLSINA, R., MARTINEZ, L., D., CERRUTTI, S.: *Cloud point extraction for cobalt preconcentration with online phase separation in a knotted reactor followed by ET AAS determination in drinking waters*, Talanta, 76, San Luis 2008, p. 669-673
- [26] NĚMCOVÁ, I., ČERMÁKOVÁ, L., RYCHLOVSKÝ, P.: *Spektrometrické analytické metody I.*, Praha 2004, p. 9 - 145, ISBN 80-246-0776-X]
- [27] online, <http://www.vscht.cz/anl/lach1/5_Foto.pdf, 9.4.2012>, citováno 20.3. 2012
- [28] MIERTUŠ, S. a kol.: *Atomová a molekulová spektroskopie*, Bratislava 1992, p. 141 – 144, ISBN 80-05-00946-1
- [29] ZBÍRAL, J., SOMMER, L.: *Spectrophotometric determination of cobalt with some heterocyclic azodyes*, Scripta. Fac. Sci. Nat. Univ. Purk. Brun., Brno 1982, 12, p. 291 - 297
- [30] SOMMER, L., et all.: *4-(2-pyridylazo)resorcin as spectrophotometric reagent for cobalt, copper, nickel and zinc*, Scripta. Fac. Sci. Nat. Univ. Purk. Brun., Brno 1984, 14, p. 135 - 138
- [31] ZBÍRAL, J., SOMMER, L.: *Spektralphotometrische bestimmung von kobalt mit 2-(5-Brom-2-pyridylazo)-5-diethylaminophenol*, Frezenius Z. Anal. Chem., Brno 1981, 306, p. 129 – 135
- [32] WATANABE, H.: *Spectrophotometric determination of cobalt with 1-(2-pyridylazo)-2-naphthol and surfactants*, Talanta, 21, 1974, p. 295 – 302
- [33] BUSEV, A., I., IVANOV, V., M., NEMTSEVA, Zh., I.: *Spectrophotometric study of complex formation between cobalt and 4-(2-thiazolylazo)-resorcinol*, Žur. Anal. Chim., 14, Moskva 1969, p. 414 – 421
- [34] ČERNOHORSKÝ, T., JANDERA, P.: *Atomová spektroskopie*, Univerzita Pardubice, Pardubice 1997, p. 40 – 81, ISBN 80-7194-114-X
- [35] SLAVIN, W., MANNING, D., C., CARNICK, G., R.: *The stabilized temperature platform furnace*, The Perkin-Elmer Corporation, American Chemical Society, Norwalk 1981, p. 137 – 145
- [36] ČERNOHORSKÝ, T.: *Atomová absorpční spektrometrie II: Kurz pro pokročilé*, Spektroskopická společnost Jana Marka Marci, Praha 2000, p. 21 – 23
- [37] LAJUNEN, L., H., J.: *Spectrochemical analysis by atomic absorption and emission*, The Royal society of chemistry, Oulu 1992, p. 55, ISBN 0-85186-873-8
- [38] SPERLING, M., YIN, X., WELZ, B.: *Flow injection On-line separation and preconcentration for electrothermal Atomic absorption Spectrometry, determination*

- of ultra-trace amounts of cobalt in water*, Journal of analytical atomic spectrometry, 6, Überlingen 1991, p. 615 – 621
- [39] FARIAS, G., M., MOYANO, S., GÁSGUEZ, J., A., et al: *Determination of cobalt by ICP-AES in drinking water samples using a knotted reactor with flow injection on-line*, The Journal of the Argentine chemical society, 90, San Luis 2002, p. 77 – 86
- [40] VEGA, M., van den BERG, C., M., G.: *Determination of cobalt in seawater by catalytic adsorptive cathodic stripping voltametry*, Anal. Chem., 69, Liverpool 1997, p. 874 - 881
- [41] ELLWOOD, M., J., van den BERG, C., M., G.: *Determination of complexation of cobalt in seawater by cathodic stripping voltametry*, Marine Chemistry, 75, Liverpool 2001, p. 33 – 47.
- [42] ČSN ISO 8466: *Kalibrace a hodnocení analytických metod a určení jejich charakteristik*, Český normalizační institut 1993, Ev. č. # 01 75 7031
- [43] IUPAC, *Guidelines for data acquisition and data quality evaluation in environmental chemistry*, Analytical Chemistry, 52, 2242
- [44] LONG, L., G.: *The limit of detection is the lowest concentration level that can be determined to be statistically different from an analytical blank significant problems have been encountered in expressing these values because of the various approaches to the term statistically different*, Analytical Chemistry, 1983, 55, 713A
- [45] MILLER, J., N., MILLER, J., C.: *Statistics and chemometrics for analytical chemistry*, Person education limited, 2005, p. 107 – 124
- [46] GRAHAM, R., C.: *Measures of performance of analytical methods*, Analysis for the chemical sciences, 1993, p.261 – 273, ISBN 1-56081-048-3
- [47] SÝKORA, V., PTÁKOVÁ, H.: *Analytika vody*, VŠCHT, Praha 2003, p. 55 – 59, ISBN 80-7080-520-X
- [48] SOMMER, L., KUBÁŇ, V., HAVEL. L.: *Spectrophotometric studies of the complexation in solution*, Universita J. E. Purkyně Brno, Brno 1970, p. 87-91
- [49] DOERFEL, K., ECKSCHLAGER, K.: *Optimální postup chemické analýzy*, SNTL, 2. vydání, Praha 1988 p. 36
- [50] NONOVA, D., EVTMOVA, B.: *Complex formation of nickel (II) and cobalt (III) with 4-(2-pyridylazo)-resorcinol*, Anal. Chim. Acta, 62, Sofia 1972, p.456 - 460

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

UV-VIS	ultrafialová a viditelná oblast
ETA AAS	atomová absorpční spektrometrie s elektrotermickou atomizací
DNA	deoxyribonukleonová kyselina
RNA	ribonukleonová kyselina
pK	rovnovážná konstanta
A	absorbance
τ	transmitance
ϕ	zářivý tok
ϵ	molární absorpční koeficient
c	molární koncentrace
l	optická dráha
λ	vlnová délka
NMR	nukleární magnetická rezonance
MS	hmotnostní spektrometrie
R	plynová konstanta, $8,314 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$
T	termodynamická teplota [K]
PAR	4-(2-pyridylazo)rezorcinol
PADAP	2-(5-brom-2-pyridylazo)-5-diethylaminofenol
F AAS	atomová absorpční spektrometrie s atomizací v plameni
ICP-OES	optická emisní spektrometrie s buzením v indukčně vázaném plazmatu
ICP-MS	hmotnostní spektrometrie s buzením v indukčně vázaném plazmatu
VFU	veterinární a farmaceutická univerzita Brno
MD	mez detekce
MS	mez stanovitelnosti