

Univerzita Karlova
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra analytické chemie



Vývoj vícerozměrné spektrální analýzy pro kationty těžkých kovů
pomocí dithizonu

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vedoucí diplomové práce: doc. PharmDr. Hana Sklenářová, Ph.D.

Konzultant: doc. Burkhard Horstkotte, M.Sc., Dr.

Hradec Králové 2024

Denisa Mátlová

PROHLÁŠENÍ

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

PODĚKOVÁNÍ

Mé největší poděkování patří především paní doc. PharmDr. Haně Sklenářové, Ph.D. a panu doc. Burkhardovi Horstkotte, Dr., M.Sc kteří měli se mnou neskutečnou trpělivost. Bez jejich pomoci, rad, oprav a věcných postřehů by tato práce nikdy nevznikla. Toho si velmi vážím. Dále bych chtěla poděkovat mé rodině, hlavně mamce, která byla vždy optimistická při mém studiu a dodávala mi sílu studium dokončit.

Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Kandidát: Denisa Mátlová

Školitel: doc. PharmDr. Hana Sklenářová, Ph.D.

Konzultant: doc. Burkhard Horstkotte, Dr., M.Sc.

Název diplomové práce: Vývoj vícerozměrné spektrální analýzy pro kationty těžkých kovů pomocí dithizonu

Tato experimentální práce se zabývá základní studií vícerozměrné spektrální analýzy kationtů těžkých kovů. Jako modelové analyty byly vybrány kationty kobaltu, niklu, olova, železa (železité), zinku, kadmia, mědi a manganu vzhledem k jejich obecnému výskytu v pitné vodě a jejich potenciální toxicitě pro lidský organismus při jejich zvýšených koncentracích. Kovy byly testovány s použitím komplexotvorného činidla dithizonu (rozpuštěného v isopropanolu) v rozmezí pH 3 až pH 10 v analytickém systému Lab-In-Syringe doplněném autosamplerm. Pro registraci spekter byl použit miniaturní spektrofotometr v kombinaci s halogenovým a deuteriovým zdrojem světla a 10 cm detekční průtokovou celou. Extrakce do nemísitelného rozpouštědla, jak je typické pro analytické použití dithizonu, nebyla provedena z důvodu rychlosti a složitosti, tj. vyhnutí se optimalizaci dalších parametrů. Na začátku práce byla spektra měřena v přebytku kovů bez použití vakua - měření vykazovala vysoký šum a nižší rozlišení. To bylo vyřešeno vytvořením částečného vakua v systému pístového čerpadla, které napomohlo odplynění roztoku a obalením detekční cely alobalem, aby se snížila propustnost světla. Spektra poté byla měřena při přebytku dithizonu s použitím těchto změn a tříděna podle jednotlivých kovů pro jednu hodnotu pH i podle jednotlivých hodnot pH pro všechny kovy. Spektra byla porovnána se spektrem nevázaného dithizonu. Výsledky měření při přebytku dithizonu ukázaly, že komplexy kadmia se tvoří už při nejkyseljším testovaném pH (pH 3) a ve spektru je viditelný pouze jeden absorpční pás při 440 nm. U všech ostatních kovů začala komplexace mezi pH 4 a byla dokončena při pH 8 s rozdíly ve spektrech. To dokazuje, že spolehlivost metody vícerozměrné spektrální analýzy by mohla být zvýšena získáním spekter nejen při jedné, ale při různých hodnotách pH. Jako možné interferenty byly v práci zvažovány kationty železa a manganu, které měly velmi podobná spektra jako samotný dithizon, takže by bylo vhodné provést další studie s využitím extrakce rozpouštědlem. Pro srovnání komplexů kovů při stejném pH se ukázalo, že kationty kadmia, zinku a kobaltu lze od sebe odlišit.

Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of analytical chemistry

Candidate: Denisa Mátlová

Supervisor: assoc. prof. PharmDr. Hana Sklenářová, Ph.D.

Consultant: assoc. prof. Burkhard Horstkotte, Dr., M.Sc.

Title of the diploma thesis: Development of multivariant spectrum analysis for heavy metal cations using dithizone

This experimental work deals with a basic study of multidimensional spectral analysis of heavy metal cations. Cobalt, nickel, lead, iron (ferric), zinc, cadmium, copper, and manganese cations were chosen as model analytes due to their general occurrence in drinking water and their potential toxicity to the human body at elevated concentrations. The metals were tested using the complexing agent dithizone (dissolved in isopropanol) in the range of pH 3 to pH 10 in a Lab-In-Syringe analytical system completed by an autosampler. A miniature spectrophotometer in combination with a halogen and deuterium light source and a 10 cm detection flow cell was used for spectrum registration. Extraction into an immiscible solvent, as typical for the analytical use of dithizone, was not done for speed and simplicity, i.e. avoiding additional parameters to be optimized. At the beginning of the work, spectra were measured in metal excess without the use of vacuum - the measurements showed high noise and lower resolution. This was resolved by creating a partial vacuum in the syringe pump system to aid solution degassing and by wrapping the detection cell with aluminium foil to reduce light transmission. Spectra were then measured in excess of dithizone applying these changes and sorted by the individual metals for one pH value as well as by the individual pH value for all metals. The spectra were compared to the spectrum of the unbonded dithizone. The results of the measurements at excess of dithizone showed that cadmium complexes formed even at the most acidic pH tested (pH 3) and only one absorption band is visible in the spectrum at 440 nm. For all other metals, complexation started between pH 4 and was completed at pH 8 with differences in spectrum. This proves that the reliability of a multivariant spectrum analysis method could be improved by spectrum acquisition not only at one but various pH values. Ferrous and manganese cations were considered as possible interferents in the work and had very similar spectra to dithizone itself, so that further studies using solvent extraction would be recommendable. For comparison of metal complexes at the same pH, it was shown that cadmium, zinc, and cobalt cations can be distinguished from each other.

Obsah

1. Úvod	9
2. Cíl a popis zadání práce	10
3. Teoretická část	11
3.1 Těžké kovy	11
3.1.1 Kobalt.....	11
3.1.2 Nikl.....	12
3.1.3 Olovo	13
3.1.4 Železo.....	14
3.1.5 Zinek	15
3.1.6 Kadmium.....	16
3.1.7 Měď	17
3.1.8 Mangan.....	18
3.2 Možnosti stanovení kovů	19
3.2.1 Atomová absorpční spektrometrie (AAS).....	19
3.2.2 Voltametrie.....	19
3.2.3 Spektrofotometrie s využitím komplexačních činidel.....	20
3.3 Dithizon	22
3.4 Spektrofotometrie a multispektrální analýza.....	23
3.5 Lab-In-Syringe.....	25
3.6 Rešerše dříve publikovaných prací s využitím DTZ.....	26
4. Experimentální část.....	29
4.1 Popis systému.....	29
4.2 Použité chemikálie.....	32
4.3 Příprava roztoků	33
4.4 Postup měření a jeho parametry	35
5. Výsledky a diskuze.....	36
5.1 Výběr vhodného rozpouštědla	36
5.2 Výběr vhodných pufrů.....	36
5.3 Měření při nadbytku kovů a DTZ bez využití vakua.....	37
5.3.1 DTZ.....	37
5.3.2 Kobalt-DTZ.....	38

5.4	Měření kovů v nadbytku DTZ s využitím vakua.....	39
5.4.1	DTZ.....	39
5.4.2	Kadmium-DTZ.....	40
5.4.3	Kobalt-DTZ.....	41
5.4.4	Měď-DTZ.....	42
5.4.5	Železo-DTZ (ve formě Fe ³⁺).....	43
5.4.6	Mangan-DTZ.....	44
5.4.7	Nikl-DTZ.....	45
5.4.8	Olovo-DTZ.....	46
5.4.9	Zinek-DTZ.....	47
5.4.10	Shrnutí spekter kov-DTZ.....	48
5.5	Možnosti rozlišení kovů při různém pH.....	49
5.6	Porovnání kovů a DTZ při pH 8.....	53
5.7	Vliv pH na tvorbu komplexu.....	54
6.	Závěr.....	55
7.	Seznam použité literatury.....	56
8.	Přílohy.....	59

Seznam použitých zkratk

AAS	atomová absorpční spektrometrie
AMPSO	N-(1,1-dimethyl-2-hydroxyethyl)-3-amino-2-hydroxypropansulfonová kyselina
BES	N,N-bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethanesulfonová kyselina
CAPS	3-(cyklohexylamino)-1-propanesulfonová kyselina
DTZ	dithizon
LIS	Lab-In-Syringe
MES	2-morpholinoethanesulfonová kyselina monohydrát
NEK-NPK	norma environmentální kvality vyjádřená jako nejvyšší přípustná hodnota, která je limitní
NEK-RP	norma environmentální kvality vyjádřená jako celoroční průměrná hodnota
PAR	(4-(2-pyridylazo)resorcinol
pH	aktivita oxoniových kationtů vyjádřena zápornou logaritmickou hodnotou
PTFE	polytetrafluorethylen – teflon
PVDF	polyvinylidenfluorid – tekaflon
TRIS	trisaminomethan

1. Úvod

Těžké kovy ve vodě téměř nerozpoznáme, jsou totiž bez chuti a bez zápachu a nemají vliv na zabarvení vody. Toto platí pouze při jejich nízké koncentraci. Železo při koncentraci 0,5 mg/l může měnit barvu i chuť vody [1]. Patří mezi ně například chrom, kadmium, měď, stříbro, olovo, nikl, selen, antimon a rtuť. Řadí se sem také některé esenciální kovy (železo a zinek v našem případě) – tím se rozumí takové kovy, které mají důležité biologické funkce a jsou součástí biomasy organismů, i když některé mohou být ve vyšších koncentracích toxické. K výskytu těžkých kovů přispívají také staré olověné rozvody vody či mosazné a bronzové spojky. Těžké kovy nejsou rozložitelné, jsou karcinogenní, a i v nízkých dávkách mohou být některé z nich smrtelné. Přítomnost těžkých kovů v těle minimálně vždy oslabuje tkáň. Přispívají také k předčasnému stárnutí a vzniku nejen rakoviny, ale i řady dalších onemocnění. Vážou se na jiné látky (bílkoviny, nukleové kyseliny, enzymy), ze kterých se skládají živé organismy. Ve tkáních pak mohou nahrazovat esenciální minerály. Působí stejným mechanismem jako oxidativní stres a fungují jako enzymatické jedy. Vedou k chronickým onemocněním. Narušují jednotlivé složky imunitního systému. Např. olovo ve vodě se může ukládat do kostí, ohrožovat ledviny či centrální nervovou soustavu. Proto je důležité tyto kovy ve vodě detekovat a snažit se zamezit jejich výskytu. Detekce těchto těžkých kovů je proto tématem této diplomové práce. [2].

2. Cíl a popis zadání práce

Hlavním cílem této práce bude shromáždit spektrální data potřebná pro vývoj metody stanovení kationtů těžkých kovů ve vzorku vody na základě multispektrální analýzy s využitím komplexace s dithizonem (DTZ) a vzniku barevné reakce. Za tímto účelem bude vyhodnocena komplexace kationtů kovů s DTZ při dvou různých koncentracích, a to v nadbytku kationtu kovu a v nadbytku DTZ. Kromě toho budou data spekter porovnávána, aby bylo možné identifikovat oblasti spektra s významným rozdílem a nalézt rozdíl v závislosti na pH komplexačního chování. Tyto studie budou provedeny bez extrakce, s vodnými standardními roztoky v přítomnosti isopropanolu, aby byla zajištěna rozpustnost vzniklého komplexu. Budou testovány kationty těžkých kovů, které nejčastěji můžeme najít v pitné vodě. Celkem bude použito 8 analytů. A to kationty měďnaté, olovnaté, kadmennaté, kobaltnaté, železité, manganaté, zinečnaté a nikelnaté. Železité a manganaté kationty budou testované kvůli potenciální interferenci z pohledu možné tvorby komplexů s DTZ.

Konkrétní cíle tedy jsou:

- Nastavení systému a metody Lab-In-Syringe pro studium komplexace a potenciálně umožňující spektrofotometrickou kvantifikaci těžkých kovů dithizonem včetně testování metod a překonání provozních problémů
- Výběr proveditelného počtu analytů kovů na základě jejich typické přítomnosti ve vzorcích vody
- Výběr a příprava pufrů pro měření roztoků kovů a roztoku DTZ při různém pH
- Volba mezi extrakcí nebo neextrakcí
- Měření spekter pro DTZ a komplexů DTZ pro každý kov při různém pH v přebytku kovu pro vyhodnocení čistého komplexního spektra a vlnových délek maxim.
- Měření spekter pro DTZ a komplexů kovů s DTZ při různém pH v přebytku DTZ a vyhodnocení vlnových délek maxim.
- Diskuze o změřených spektrech
- Výběr hodnot pH a vlnových délek, které by bylo možné použít pro vícerozměrnou separaci ve smyslu rozlišení jednotlivých kovů komplexovaných DTZ
- Pokus o vyhodnocení hodnoty pH, kde je 50 % každého kovu v komplexu, jako základ pro multivariantní spektrální analýzu
- Diskuze o možných vylepšeních a proveditelnosti metody

3. Teoretická část

3.1 Těžké kovy

Těžké kovy patří k nejdéle známým toxickým látkám. Ke kovům patří cca 80 prvků periodické soustavy a jako kovy toxické, případně těžké, je označováno přibližně 30 z nich. Mezi těžké kovy řadíme ty, které mají hustotu vyšší než 5 g.cm^{-3} (olovo, rtuť, kadmium). Kovy dělíme podle vlivu na lidský organismus na esenciální a toxické. Některé kovy mohou být zároveň toxické i esenciální v závislosti na množství nebo formě. Esenciální jsou nezbytné pro život většiny organismů. Vyskytují se jako složky enzymů a proteinů. Mezi esenciální řadíme například měď, železo, mangan, zinek, nikl, kobalt. Toxické kovy jsou charakteristické vysokou nebezpečností pro organismus. Jejich původ může být založen na působení člověka či přirozený. Do této skupiny patří kadmium, rtuť, olovo a arsen. Specifickou vlastností těžkých kovů je to, že se nerozkládají, zůstávají v životním prostředí a pouze mění formy, ve kterých jsou přítomny. Těžké kovy se shromažďují zejména v půdě, rostlinách a vodě, a z těchto složek je nelze odstranit. Kovy se ve složkách životního prostředí vyskytují v několika formách (volné kovy, jednoduché komplexy s anorganickými ligandy, cheláty s více vazebnými organickými ligandy). Ve složkách životního prostředí je sledován zejména výskyt olova a kadmia, neboť se jedná o vysoce toxické kovy, které mají negativní dopad jak na člověka, tak na životní prostředí. Jsou přítomny ve všech složkách životního prostředí a přirozeně se vyskytují ve stopových koncentracích [3]. Dále budou popsány vybrané těžké kovy, které byly analyzovány v rámci této diplomové práce.

3.1.1 Kobalt

Kobalt (Co) je chemický prvek s číslem 27 a atomovou hmotností 58,9, který má důležité místo jak v lidském organismu, tak v průmyslu. Je to feromagnetický kov nacházející se v VIII. B skupině periodické soustavy prvků. Je tvrdší a pevnější než ocel. V čistém stavu je kujný a tažný.

Výskyt

Nachází se rozptýlený v zemské kůře (0,001%), vyskytuje se společně s niklem, nejčastěji však ve sloučeninách s arsenem. Ve vodě se nachází v kales biologického čištění odpadních vod. Kobalt je prvek, který se přirozeně vyskytuje v životním prostředí jako součást ovzduší, vody, půdy, skal, těl rostlin a živočichů. Pro vodné prostředí je to toxická látka. Zdrojem mohou být odpadní vody z metalurgického průmyslu a povrchových úprav. Malé množství kobaltu se uvolňuje do ovzduší ze spalování uhlí, těžby a zpracování rud s obsahem kobaltu a během výroby. Může reagovat s jinými částicemi, nebo se adsorbovat na půdní částice. Většina kobaltu obsaženého v životním prostředí končí v půdách a sedimentech. Rozpustnost kobaltu je závislá na pH. V kyselých půdách je více rozpustný (a tím pádem se může lépe šířit), než v alkalických půdách [4].

Toxicita

Kobalt má největší toxicitu na kůži a dýchací cesty. Může způsobit alergickou dermatitidu, rýmu a astma. Zejména bývá absorbován z plicního a gastrointestinálního traktu. V těle se nekumuluje, vylučuje se především močí. Sloučeniny, ve kterých kobalt vystupuje v oxidačním stavu II, způsobují nádory u zvířat a mají pravděpodobné karcinogenní účinky i na člověka [5].

Kobalt vázaný ve formě vitamínu B12 má zásadní vliv na lidský organismus, podporuje významné syntetické reakce při metabolismu a je také nezbytný pro tvorbu červených krvinek [4].

Všechny limity kovů v této práci vycházejí z Přílohy č. 1 zákona č. 254/2001 Sb., o vodách [6].

Limity pro různé typy vzorků vody:

Povrchová a pitná voda - 3 µg/l

Odpadní vody - 1 mg/l

Podzemní vody - 4,7 µg/l

3.1.2 Nikl

Nikl je leskle bílý, tvrdý, feromagnetický kov odolný proti korozi s číslem 28 v periodické tabulce prvků a atomovou hmotností 58,6. Je součástí řady minerálů, především společně se sírou, arzenem a antimonem. Tento těžký kov je toxický pro vodní organismy. Pro člověka není v podstatě příliš toxický [7].

Výskyt ve vodách

Ve vodě je zastoupen nejčastěji v oxidačním stupni II a především v anorganických formách. Výjimkou jsou vody s vyšší koncentrací huminových látek. Ve vodách v alkalickém prostředí se kromě jednoduchých iontů Ni^{2+} objevují také hydroxokomplexy $[\text{NiOH}]^+$ až $[\text{Ni}(\text{OH})_4]^{2-}$, dále pak karbonátokomplex a sulfokomplex. V odpadních vodách z galvanického pokovování se nikl vyskytuje obvykle jako kyanokomplexy $[\text{NiCN}]^+$ až $[\text{Ni}(\text{CN})_4]^{2-}$ nebo amminkomplexy $[\text{NiNH}_3]^{2+}$ až $[\text{Ni}(\text{NH}_3)_6]^{2+}$. Významným zdrojem tohoto prvku jsou odpadní vody jdoucí z povrchových úpraven kovů a dále odpadní vody z barevné metalurgie. V pitné vodě je však přítomen hlavně v důsledku louhování z materiálů, které jsou s vodou v kontaktu (vodovodní trubky) [8].

Toxicita

Z důvodu účinných homeostatických regulačních mechanismů je toxické působení niklu, které by ohrožovalo život velmi nepravděpodobné. Karcinogenní účinek u lidí vykazují inhalované soli niklu. Při akutní náhodné expozici vodou, která byla kontaminována rozpustnými sloučeninami niklu (7-35 mg/kg tělesné hmotnosti) byly pozorovány u zasažených osob projevy otravy, a to zejména zvracení, nevolnost, potíže s dechem, průjem, závratě a bolesti hlavy. Nikl patří mezi nejčastější celosvětové původce kontaktních alergií.

Z této alergie se může vyvinout i alergie na potravu obsahující nikl. Mezi první afektovaná místa patří pokožka hlavy, krk, ramena, prsa, ruce nebo nohy. K dalším symptomům patří střevní dyskomfort, vypadávání vlasů, bolesti kloubů, záněty dásní, únava a migréna [9].

Limity pro různé typy vzorků vody [6]

Pitná voda - do 20 µg/l

Povrchové vody - NEK-RP: 4 µg/l, NEK-NPK: 34 µg/l

Podzemní vody - 300 µg/l

3.1.3 Olovo

Olovo je nejrozšířenější těžký prvek v zemské kůře. V periodické tabulce se nachází s číslem 82 a atomovou hmotností 207,2. Olovo se v elementární podobě vyskytuje v přírodě velmi vzácně. Mezi nejdůležitější olověnou rudu patří galenit (PbS), dále minerály jako jsou verusit (PbCO₃) a anglesit (PbSO₄). Olovo často doprovází rudy zinku a stříbra. Jde o velmi měkký, těžký, nízkotající kov modrošedé barvy. Jeho sloučeniny jsou velmi toxické. Z chemického hlediska jde o poměrně odolný materiál [10].

Výskyt ve vodách

Výskyt olova ve vodě je závažným problémem, jelikož je toxické jak pro člověka, tak i pro vodní organismy. Přirozeně se tento kov do vod uvolňuje málo, protože jeho nejvíce zastoupená ruda (galenit) nepodléhá chemické nebo biochemické oxidaci. Olovo má velmi vysoký akumulární koeficient, a proto se lehce hromadí v sedimentech a kalcích. V dnešní době jsou zdrojem olova v povrchových vodách především odpadní vody ze zpracování rud, z výroby akumulátorů a z barevné metalurgie. V menším množství se olovo může vyluhovat do vody i z různých spojek a slitinových armatur, pájených spojů měděných rozvodů a starších typů PVC potrubí. Množství vyluhovaného olova závisí na řadě faktorů, ovlivňujících agresivitu vody, jako je přítomnost chloridů a rozpuštěného kyslíku, pH, teplota a tvrdost vody, obsah CO₂ a zejména doba stagnace vody v trubkách [11,12].

Toxicita

Olovo je kumulativní jed s chronickým toxickým účinkem. Akutní toxicita olova je nízká. Podstatou toxického účinku je narušení funkce důležitých enzymatických systémů v organismu vazbou olova na SH skupiny proteinů nebo na esenciální kovové ionty enzymů. Olovo též interferuje s metabolismem vápníku. V závislosti na dávce a délce expozice vyvolává olovo u člověka širokou škálu toxických účinků. Negativně ovlivněny mohou být funkce červených krvinek a mohou nastat i poruchy nervového systému. U dětí může olovo podmiňovat mentální retardaci, epilepsii, či poruchu očního nervu [12].

Limity pro různé typy vzorků vody [6]

Pitná voda - 10 µg/l

Podzemní voda - 10 µg/l

Povrchové vody - 10 µg/l - 50 µg/l dle cílového využití

3.1.4 Železo

Železo je měkký, světlešedý až bílý magnetický kov, málo odolný vůči korozi. V periodické tabulce má číslo 26 a atomovou hmotnost 55,8. Na vlhkém vzduchu se pomalu oxiduje za vzniku rzi - hydratovaný oxid železitý. Tomu se dá zabránit výrobou slitin s jinými kovy za vzniku oceli. Železo je důležitým prvkem v tělech všech organismů. Podílí se na přenosu elektronů při buněčném dýchání. Krev vděčí za svou červenou barvu komplexu železa s porfyrinem (hem). Jde o komplex, který v krvi přenáší kyslík [13].

Výskyt

Železo se nejčastěji vyskytuje v železných rudách - pyrit, magnetovec, siderit a v malém množství je obsaženo v řadě přírodních hlinitokřemičitanů. Výskyt rozpuštěného a nerozpuštěného železa ve vodě závisí na hodnotě pH. Trojmocná neboli oxidovaná forma zbarvuje vodu do červenohnědé barvy a usazuje se na dně nádob. Dvojmocná neboli rozpuštěná forma se projevuje v podobě usazeniny jen po kontaktu vody se vzduchem. Nejvyšší koncentrace železa lze nalézt v důlních vodách obsahující kyselinu sírovou, která vzniká oxidací pyritu. Antropogenní zdroje tvoří odpadní vody z mořiren kovů, válcoven, drátoven a korozní procesy z vodovodního potrubí. Při vyšších koncentracích (>0,5 mg/l) negativně ovlivňuje barvu, chuť a způsobuje zákal vody [14].

Toxicita

Vyšší obsah železa může poškodit organismus. Tkáně a vnitřní orgány ho kumulují a při dosažení konkrétních koncentrací kovu dochází k jejich postupnému poškození. Může dojít k zasažení tkání (hemochromatóza), onemocnění ledvin, jater, k únavě, snížené imunitě, může způsobit suchou pokožku, lámání vlasů a alergické reakce. Voda se zvýšeným množstvím železa může poškodit i majetek: koroze sanitární techniky a ohřívacích přístrojů, rezavé skvrny na prádle a kovových plochách [15].

Limity pro různé typy vzorků vody [6]

Pitná voda - 0,2 mg/l

Odpadní vody - 2-5 mg/l

3.1.5 Zinek

Zinek je měkký lehce tavitelný kov s číslem 30 v periodické tabulce a atomovou hmotností 65,4. Za normálních teplot je křehký. Kujný je v teplotním rozmezí od 100 do 150 °C. Vede elektrický proud a má vysoký redukční potenciál. Ve sloučeninách se vyskytuje ve stavu Zn^{2+} . Elementární zinek nachází významné uplatnění jako antikorozi ochranný materiál především pro železo a jeho slitiny. Zinek je důležitý biogenní prvek, vyskytující se v tělesných tekutinách ve stopovém množství [16].

Výskyt

Zinek se vyskytuje v přírodě přirozeně jako součást sulfidických rud, jako je sfalerit a smithsonit. Z nich se snadno dostává do podzemních vod. Dalšími zdroji zinku jsou například odpadní vody z povrchové úpravy kovů, srážkové vody smývající pozinkované povrchy (okapy, střechy), čistírenské kaly, či hnojiva. Zinkem pokovované oceli se hojně používají v automobilovém průmyslu, zejména při výrobě karoserií [11].

Toxicita

Toxicita zinku je nízká. Intoxikace zinkem je popsána jako choroba z povolání. Může tedy vzniknout při vdechování par nebo prachu kovového Zn. Projevuje se kašlem, třesavkou, malátností, bolestí hlavy, laboratorně proteinurií, glykosurií a leukocytózou. Perorální požití solí Zn vede k iritaci zažívacího traktu s bolestmi břicha, zvracením, průjmami, krvácením ze slizničních erozí a dalšími komplikacemi. Dlouhodobý nadměrný příjem zinku může vést ke snížení absorpce fosfátů a mědi, což se může projevit anémií. Zinek je značně toxický pro ryby a jiné vodní organismy. Zvláště citlivé jsou lososovité ryby [17].

Limity pro různé typy vzorků vody [6]

Pitná a kojenecká voda - není limit, při koncentraci nad >5 mg/l dochází ke změnám organoleptických vlastností vody

Povrchové vody (pro vodní organismy) - 0,3 mg/l

3.1.6 Kadmium

Kadmium patří do 12. skupiny periodické tabulky prvků s číslem 48 a atomovou hmotností 112,4. Jedná se o lesklý, tažný a velmi toxický těžký kov. Chemickými vlastnostmi se podobá zinku. Na vzduchu je stálý, při vyšších teplotách hoří za vzniku CdO. Ve sloučeninách má oxidační stav II [18].

Výskyt ve vodě

Kadmium se ve vodě vyskytuje jako jednoduchý iont, ve formě hydroxokomplexů, karbonátokomplexů, případně i jako sulfokomplex. Snadno se akumuluje v biomase, sedimentu i v půdě, ze které pak může přecházet do rostlinných produktů. Má vysoký akumulační koeficient. Během zpracování rud, kde se kadmium nachází společně se zinkem a olovem, dochází ke znečišťování odpadních vod a atmosféry. Do odpadních vod se kadmium dostává z půdy při užívání fosforečnanových hnojiv nebo při aplikaci čistírenských kalů v zemědělství. Dalším významným zdrojem kadmia jsou odpadní vody pocházející z průmyslové výroby. Jedná se zejména o procesy galvanického pokovování, kde se kadmium využívá jako ochrana proti korozi [11].

Toxicita

Kadmium vstupuje do lidského organismu skrze zažívací nebo dýchací trakt. Tento prvek spadá do skupiny silně toxických látek, a to i v případě nízkých koncentrací vyznačujících se teratogenními a karcinogenními účinky. Může způsobit dekalifikaci kostí, anémii, pigmentaci zubů či poškození ledvin. Má negativní vliv na reprodukci savců. Je značně toxický i pro vodní organismy, a to už i při nízkých koncentracích jednotek $\mu\text{g/l}$ [11].

Limity pro různé typy vzorků vody [6]

Pitná voda - 5 $\mu\text{g/l}$

Podzemní vody - 6,9 $\mu\text{g/l}$

Povrchové vody - závisí na třídách tvrdosti vody

3.1.7 Měď

Měď patří do 11. skupiny periodické soustavy prvků s číslem 29 a atomovou hmotností 63,5. Jedná se o přirozeně se vyskytující načervenalý kov, který výborně vede teplo a elektrickou energii. Tvoří velké množství slitin, např. bronz (slitina mědi a cínu), nebo mosaz (slitina mědi a zinku). Měď se nejčastěji nachází v oxidačních stavech I a II.

Výskyt

Měď se nejčastěji váže na jiné prvky a vytváří různé sloučeniny - například sulfidy - chalkosin, chalkopyrit, kuprit, malachit nebo azurit. Velké množství mědi se do přírody uvolňuje metalurgií a hutnickým průmyslem, dále také spalováním fosilních paliv. Ve vodních tocích se může měď přenášet do velkých vzdáleností nebo může být ukotvena v sedimentech. Bylo zjištěno prosakování mědi do podzemních vod ze sedimentů půd. V pitné vodě se měď může nacházet v důsledku uvolnění z kovových součástí vodovodů [18].

Toxicita

Měď patří mezi stopové prvky živých organismů. Nepřiměřeně vysoký příjem mědi může vést ke vzniku závažných zdravotních problémů - poškození jater a ledvin, nebo vznik anemie. Extrémně vysoké dávky mědi mohou způsobit i smrt. Naopak nedostatek mědi, zapříčiněný nevhodným složením stravy, může způsobit zpomalení duševního vývoje, zhoršení metabolismu cukrů, ztrátu pigmentů a vypadávání vlasů, poruchu tvorby a zhoršení kvality kostí a vaziva. Při zvýšené koncentraci mědi ve vodě může docházet ke zvracení, průjmům, žaludečním křečím nebo závratím. Naštěstí zvýšenou koncentraci mědi v pitné vodě lze poměrně dobře rozpoznat díky typické kovové pachuti, a proto se dá požití kontaminované vody snadno předejít [19].

Limity pro různé typy vzorků vody [6]

Pitná voda - 1 mg/l

Povrchové vody - 30 µg/l

Podzemní vody - 620 µg/l

3.1.8 Mangan

Mangan je elektropozitivní přechodný prvek vyskytující se v periodické tabulce s číslem 25 a atomovou hmotností 54,9. Má šedou barvu a vyskytuje se ve třech modifikacích (α – mangan, β – mangan a γ – mangan). Prášková forma je pyroforická (samozápalná na vzduchu). Se zvyšujícím se oxidačním číslem klesá jeho zásaditost a stoupá jeho kyselost. Nejstálejšími sloučeninami jsou sloučeniny s oxidačním číslem Mn^{2+} . Mangan je i důležitým biogenním prvkem [3].

Výskyt ve vodě

Téměř vždy se vedle manganu objevuje ve vodě i železo ve vysokém množství. Mangan se dostává do vody spolu s tekoucí vodou a podzemními toky. Dopomáhá tomu zvětrávání minerálů a vyluhování feromanganových rud, jakož i proces rozkladu rostlinných organismů. Rovněž se mangan dostává do vody i důsledkem použití speciálních hnojiv na rostliny. Jeho reakce využívá chemický průmysl, a dokonce i ocelářský průmysl, odkud se spolu s odpadními vodami podniků i továren dostává do podzemních a povrchových vod. Mangan obvykle vytváří tmavohnědou nebo černou sraženinu, voda získává tmavý odstín a dochází k ucpávání vodovodního potrubí.

Toxicita

Mangan je esenciální prvek, který ovlivňuje krvetvorbu. V koncentracích, ve kterých se vyskytuje v přírodních vodách, je zdravotně nezávadný. Toxicita jeho sloučenin závisí na oxidačním stavu - zejména je toxický v oxidačním stupni VII. Jeho vysoké hodnoty zpomalují nervový systém - což může vést k rozvoji Parkinsonovy choroby. Mangan - jako jed - může mít velmi škodlivý dopad na plíce i kardiovaskulární systém. Předávkování manganem je obzvláště ohrožující pro těhotné ženy. Jeho hromadění může vést k ucpávání cév a močových kanálků [20].

Limity pro různé typy vzorků vody [6]

Pitná voda - 0,05 mg/l

Podzemní voda - 320 μ g/l

3.2 Možnosti stanovení kovů

Ke stanovení těžkých kovů je možno použít celou řadu metod, které se od sebe liší mezí detekce (limitem detekce a kvantifikace), náročností na provedení analýzy a instrumentálním vybavením. Běžně jsou aplikovány dvě skupiny stanovení (metody atomové spektrometrie a metody voltametrické), výjimečně se používají i metody další, jako spektrofotometrické rozlišení s využitím odlišných vlastností barevných komplexů, které vznikají s komplexačními činidly.

3.2.1 Atomová absorpční spektrometrie (AAS)

Tato spektrometrická analytická metoda slouží ke stanovení obsahu stopových i vyšších koncentrací jednotlivých prvků v analyzovaném vzorku. Touto technikou lze analyzovat přes 60 prvků periodické tabulky (převážně kovových) s citlivostí od setin do stovek ppm, podle daného prvku. Princip této metody spočívá v tom, že analyzovaný vzorek je zmlžěn a vzniklý aerosol zaveden do plamene nebo grafitového atomizátoru. Zde se roztok okamžitě odpaří a rozruší se chemické vazby v molekulách přítomných sloučenin. Podmínky atomizace jsou přitom voleny tak, aby co největší množství měřených atomů zůstalo v neutrálním stavu a nedocházelo k ionizaci za vzniku nabitých částic typu Me^+ . Plamenem prochází paprsek světla ze speciální výbojky, jehož fotony jsou při setkání s atomy analyzovaného prvku absorbovány a atom prvku přechází do excitovaného stavu. Dochází tak k úbytku intenzity procházejícího světla a tento úbytek je změřen. Podle Lambert-Beerova zákona je pak tento úbytek přímo úměrný koncentraci daného prvku [21].

Výhodou je velká selektivita, protože zdroj záření odpovídá čarovému spektru daného prvku, takže ostatní složky stanovení vůbec neovlivňují. Proto není nutná speciální úprava vzorku (vztaženo na vodu) a je možno měřit vzorky komplexní matrice, kde se očekává nižší příměs daného měřeného prvku. Další výhodou je citlivost AAS stanovení, která využívá toho, že téměř 99% prvku záření absorbuje, zatímco zbylé 1% dokáže při návratu do základní stavu záření emitovat - čehož se využívá v atomové emisní spektrometrii.

3.2.2 Voltametrie

Voltametrie je metoda, při které je proud měřen jako funkce elektrodového potenciálu. Na pracovní elektrodu, která je ponořena do analyzovaného roztoku, je vložen elektrický potenciál z vnějšího zdroje. Je sledována závislost proudu procházejícího pracovní elektrodou na elektrodovém potenciálu. Tuto závislost lze měřit buď v ustáleném stavu, nebo ve stavu neustáleném za nestacionárních podmínek. Tato metoda je široce využívána k měření a detekci těžkých kovů. Měří se jejich stopové množství a dosahuje se velmi nízkého detekčního limitu – nanomolárních až pikomolárních koncentrací. Voltametrie není instrumentálně a ekonomicky náročná ve srovnání s AAS. Hlavní nevýhodou je měření nižšího spektra kovů - není tak univerzální jako AAS. Pro zvýšení elektrochemické citlivosti této metody se při detekci iontů těžkých kovů využívají různé nanomateriály, které mohou měřený analyt zakoncentrovat [22]. Dále pro zvýšení citlivosti metody se používají různé obměny voltametrie např. rozpouštěcí voltametrie.

Rozpouštěcí voltametrie je známá jako anodická nebo katodická „stripping“ voltametrie. Je to nejcitlivější elektrochemická metoda, která je vhodná zejména k analýze těžkých kovů jako je olovo, zinek či měď. Principem této metody je vyloučení stanovované látky na povrchu elektrody (= prekoncentrace, k analýze je tak k dispozici větší množství analytu), které se pak elektrolyticky rozpouští, přičemž se měří proud obdobnými technikami jako při polarografii. Rozpouštěcí voltametrie probíhá v následujících fázích: 1. depozice - redukce stanovované látky na elektrodě při elektrolytickém nahromadění. Provádíme ji při konstantním potenciálu, který odpovídá limitnímu proudu stanovované látky, a za intenzivního míchání. Konvekcí se ionty dostávají k povrchu elektrody, a proto je limitní proud vyšší než v nemíchaném roztoku. 2. ustálení - dojde k vypnutí míchání, ale na elektrodu je stále vkládán potenciál depozice. 3. - rozpouštění, což je rozpouštění nahromaděných produktů vzniklých při elektrolýze na povrchu pracovní elektrody, kdy dochází ke změně polarizace elektrody [23].

3.2.3 Spektrofotometrie s využitím komplexačních činidel

Komplexační spektrofotometrická činidla jsou organické látky, které ve spojení s kovovými ionty tvoří rozpustné komplexy, které lze měřit a analyzovat pomocí spektrofotometrických metod. Jako komplexační činidla, která tvoří s kationty kovů většinou barevné komplexy se nejčastěji využívají DTZ, diethyldithiokarbamát sodný nebo monosodná sůl (4-(2-pyridylazo)resorcinolu (PAR). Stanovení založená na barevných reakcích se liší vlnovou délkou detekce, citlivostí a samozřejmě i selektivitou, protože za stejných podmínek (poměr činidlo: analyt, pH reakčního prostředí apod.) může komplex tvořit více kationtů.

Další komplexační činidla pro kovy testované v této práci jsou kromě DTZ např. [24]:

Pb: diethyldithiokarbamát sodný - max. absorpance při vlnové délce 440 nm

Co: 1-nitroso-2-naftol - 410 nm, 2-nitroso-1-naftol - 530 nm

Cu: neokuproin - 460 nm, diethyldithiokarbamát sodný - 440 nm, 2,2-bichinolin - 540 nm

Fe: bathofenantrolin - 535 nm, 2,4,6-tri-(2-pyridyl)-1,3,5-triazin - 595 nm

Mn: formaldoxim - 450 nm, diethyldithiokarbamát sodný - 500 nm

Ni: dimetylglyoxim - 450 nm, diethyldithiokarbamát sodný - 325 nm

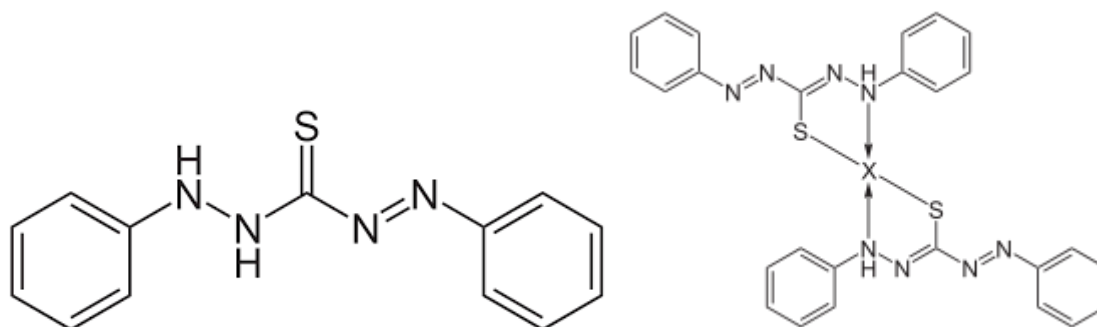
Zn: zinkon - 625 nm

Všechna tato komplexační činidla poskytují volný elektronový pár, kterým vážou daný kov. Nejčastěji se tyto volné elektronové páry nacházejí na dusíku nebo síře. Činidla se dělí podle toho, jestli se komplexují pouze s určitou skupinou prvků (selektivní) nebo jsou univerzální (DTZ, PAR). K činidlům se mohou přidávat maskovací činidla, které slouží k citlivější detekci kovů - to jsou např. kyanáty, thiokyanáty nebo thiosírová kyselina s kyanátem [25].

Jako detekční technika je použita spektrofotometrie většinou ve viditelné oblasti spektra, jednotlivé kationty jsou rozlišeny právě různými reakčními podmínkami (např. Zn^{2+} tvoří komplexy při rozsahu pH 6,5-9,5 a jako rozpouštědlo pro DTZ je použit tetrachlormethan), případně také rychlostí tvorby daného barevného komplexu [24].

3.3 Dithizon

DTZ, chemicky 1,5-difenyylthiokarbazon (Obr. č. 1) je krystalický prášek, barvou od zelené - tmavě fialové - tmavě hnědé - až po černou. Molekulová hmotnost je 256,33 g/mol a pKa 4,47. Je bez zápachu a s bodem tání 168°C [26]. Je citlivý na sluneční záření - může docházet k jeho oxidaci. Je hořlavý, ale není snadno zápalný. Při pH vody <7 je prakticky nerozpustný. Při alkalickém pH>7 je snadno rozpustný za tvorby žlutého zbarvení. Je snadno rozpustný v chloroformu, tetrachlormethanu, hexanu či ethanolu. Je to organická sloučenina obsahující síru. Lze ho připravit reakcí fenyylhydrazinu s disulfidem uhlíku a následnou reakcí s hydroxidem draselným. Je dobrým ligandem a tvoří barevné komplexy s mnoha toxickými kovy, jako je olovo, rtuť, kadmium dále například zinek, měď, železo, kobalt, nikl a mnoho dalších. DTZ může darovat 2 páry elektronů, které se nacházejí na síře a dusíku. Vytvořený koordinační komplex se skládá ze 2 molekul DTZ obklopujících jeden kovový iont. Kationty mohou být rozděleny při extrakci s DTZ na 2 skupiny: 1. skupina reaguje s DTZ v kyselém pH (4,5) – např. Ag^+ , Hg^{2+} , Bi^{3+} , Cu^{2+} a 2. skupina reaguje až při pH 7.5 – např. Zn^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} . Mimo tyto dvě skupiny je možné izolovat jednotlivé kationty díky různým aditivům tzv. maskovací činidla (CN^- , SCN^- , Titriplex III). DTZ se také používá k hodnocení čistoty preparátů lidských pankreatických ostrůvků používaných k transplantaci pacientům s diabetem 1. typu. DTZ váže ionty zinku přítomné v beta buňkách ostrůvků, a proto je zbarví do červena. Exokrinní tkáň, která je rovněž přítomna v preparátech, neváže DTZ, a proto se nebarví [24,26].



Obr. č. 1: Vzorec DTZ (vlevo) a vzorec DTZ vázající kov (vpravo)

3.4 Spektrofotometrie a multispektrální analýza

Spektrofotometrie je metoda ze všech optických metod nejpoužívanější. Principem je měření intenzity zeslabeného prošlého monochromatického záření na základě absorpce různých vlnových délek světla analytem. Pro měření se využívá jak ve viditelné, tak i v ultrafialové oblasti spektra. Spektrofotometrické měření je založeno na Lambertově – Beerově zákoně. Spektrofotometr se skládá ze zdroje světla, monochromátoru, vzorku v kyvetě a detektoru [26].

Měřená spektra se skládají z absorpčních spekter jednotlivých složek přítomných ve vzorku. Pouze několik látek ve vzorcích vody může významně přispívat k absorpanci ve viditelné oblasti, což jsou především huminové kyseliny a příbuzné sloučeniny. Ty by představovaly signál pozadí. V této práci byla spektra registrována pomocí vodných standardů, takže absorpční spektrum je složeno ze spekter přítomných kationtů tvořících barevné komplexy s DTZ i volného DTZ činidla a pozadí lze zanedbat. Spektrum každé jednotlivé složky musí být vztaženo ke koncentraci dané látky, při které bylo toto spektrum měřeno. Každé spektrum lze chápat jako vektor hodnot absorpance (A), který vznikne vynásobením koncentrace látky (c), optické délky kyvety (l) a molárního koeficientu absorpance (ϵ) pro každou vlnovou délku (λ). Lambertův Beerův zákon $A = c \cdot l \cdot \epsilon$.

V ideálním případě je vždy zajištěn přebytek činidla a spektra jednotlivých složek jsou dostatečně odlišná, aby bylo možné je jasně mezi sebou rozlišit. Toto je problém, protože mnoho DTZ komplexů je červených a neliší se tedy vlnou délkou maxima ve spektru. Navíc pokud je jeden kationt kovu přítomen v malém množství vedle kationtu přítomného ve vysoké koncentraci, je rozlišení náchylné k chybám.

Proto se předpokládalo, že měření spektra při nejméně dvou, případně více hodnotách vlnové délky nebo pH by poskytlo další informace o tom, že při nejkyseljším pH budou tvořit komplexy pouze některé kationty kovů, zatímco při nejvyšší zvolené hodnotě pH téměř všechny. Případně, že při měření ve více vlnových délkách bude možné komplexy kovů rozlišit. Cílem této práce proto bylo vybrat hodnoty pH a vlnových délek, které by bylo možné použít pro takovou vícerozměrnou separaci ve smyslu rozlišení jednotlivých kovů komplexovaných DTZ.

Kromě předchozích tvrzení je dalším problémem skutečnost, že DTZ analýza se obvykle provádí ve spojení s extrakcí komplexu, což však zahrnuje potřebu zajistit, aby extrakce byla vždy kvantitativní nebo ve stále stejné rovnováze. Kromě toho je DTZ sám rozpustný v chloroformu při kyselém pH, zatímco při zásaditém pH zůstává ve vodné fázi.

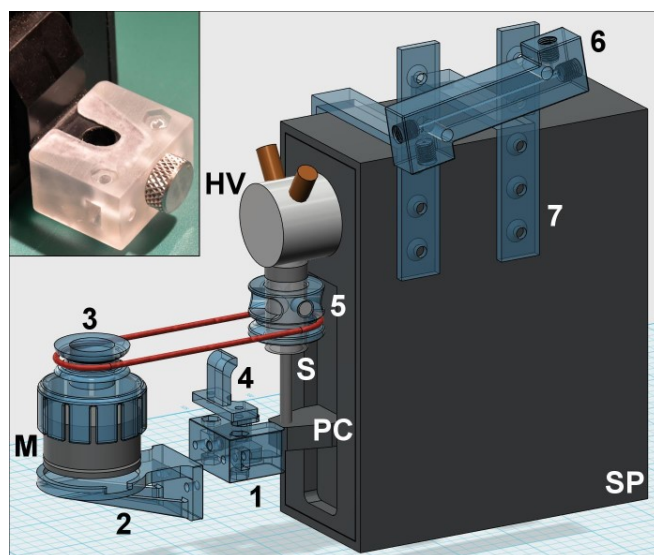
Podobně jsou potenciálně přítomné huminové látky také částečně extrahovány do organické fáze, takže vyčištění od tohoto možného příspěvku k signálu pozadí by nebylo účinné při kyselém pH, ale pouze pro zásadité prostředí. Okyselením vzorku by se mohly huminové kyseliny oddělit pravděpodobně filtrací, alespoň z velké části a kovy by byly rozpuštěné v roztoku. Proto bychom u vzorku vody očekávali pouze nízké rušení, i když nedochází k extrakci.

Aby se předešlo problémům spojeným s extrakcí, nebyla v této práci provedena žádná extrakce, ale všechny reakce byly provedeny ve vodném prostředí a pro zajištění rozpustnosti komplexů kov-DTZ byl přidán isopropanol v konstantní koncentraci.

3.5 Lab-In-Syringe

Termín „Lab-In-Syringe“ (LIS) popisuje dvě analytické techniky. Obě techniky využívají pístové čerpadlo k provádění postupů přípravy vzorků (Obr. č. 2). V prvním případě se k usnadnění manuálních postupů používá jedna nebo dvě jednorázové injekční stříkačky (bez ovládání počítačem), zatímco druhý přístup se vztahuje k automatické technice, tj. k použití automatického pístového čerpadla řízeného počítačem. Tento druhý přístup byl použit v této práci. Mezi výhody použití pístového čerpadla jako míchací, reakční a extrakční komory patří fakt že rezervoár pístového čerpadla je v trvale uzavřeném prostoru, takže uživatel není vystaven působením činidel a nedochází ke kontaminaci vzorku během jeho zpracování. Dále je LIS systém snadno přenosný a nevyžaduje velký prostor. Umístění magnetického míchadla do rezervoáru čerpadla umožňuje použití mnohem vyšší rychlosti míchání než v otevřeném systému, kde by mohlo dojít ke ztrátě míchaného roztoku. Rezervoár pístového čerpadla je obvykle skleněný, což umožňuje jeho použití jako kyvety pro fotometrickou detekci. Nevýhodou je čištění pístového čerpadla oproti jiným průtokovým technikám kvůli velkému mrtvému objemu. Toto vyžaduje čištění po každém použití [27].

LIS se používá k integraci různých analytických extrakčních kroků uvnitř čerpadla. Na příklad, plně automatizovaná disperzní mikroextrakce kapalina-kapalina (DLLME) se provádí v injekční stříkačce za použití velmi jednoduchého přístrojového vybavení. Dispergace se dosáhne co nejrychlejší aspirací organické fáze a poté vodné fáze do rezervoáru. Po agregaci kapiček rozpouštědla je organická fáze vytlačena směrem k detektoru, což umožňuje vysoce citlivou spektrofotometrickou nebo fluorimetrickou detekci. Tato extrakční technika je velmi užitečná nejen pro prekoncentraci analytu, ale také pro eliminaci interference matrice vzorku [28].



Obr. č. 2: LIS systém [27] - pístové čerpadlo (SP), motor (M), „head“ ventil s 2 porty (HV), univerzální adaptér (1), držák na motor (2), řemenové kolečko (3), zvedací koncovka (4), míchadlo + řídicí magnetický kroužek (5), detekční průtoková cela (6), univerzální adaptér (7)

3.6 Rešerše dříve publikovaných prací s využitím DTZ

Pro rešerši byly vybrány práce, které obsahují podobnou metodu, stejné komplexační činidlo nebo stejné analyzované vzorky nebo kovy.

Tabulka č. 1: Výsledky rešerše dříve publikovaných prací s využitím DTZ

Typ a matrice vzorku/objem	Analyzované kationty	Způsob komplexace	Rozpouštědlo/vlnové délky	pH/extrakce	Citace
Léčivé přípravky	Bi^{3+} , Zn^{2+}	DTZ	voda, aceton, n-propanol / 400, 600 nm	pH 5/bez extrakce	[29]
Pitná a odpadní voda	Pb^{2+} , Cu^{2+}	modifikovaný hlinitý adsorbent s náplní DTZ	ethanol	kyselý hlinitý adsorbent (pH 4,5), neutrální (pH 7), zásaditý (pH 9,5)/adsorpce	[30]
Pitná voda	Pb^{2+}	DTZ	chloroform / 512, 608 nm	pH 6,5-10/extrakce(toluen-hexanol) - automatizace LIS metodou	[31]
Dentální slitina rozpuštěna v HClO_4 /1 ml	Co^{2+} , Ni^{2+}	DTZ	tetrahydrofuran / 620 nm - 740 nm	pH 12/bez extrakce	[32]
Roztok vzorku s obsahem zinku/50 μl	Zn^{2+}	DTZ, chelatační činidla – kyselina ethylendiaminte traocťová (EDTA),N,N,N,O,N	methanol / 530, 570 nm 540, 590 nm	pH 4,5 pH 5,5-7,5	[33]

		0-tetrakis(2-pyridylmethyl)-1,2-ethylenediamine (TPEN).			
Průmyslové odpadní vody, vodovodní voda	Hg ²⁺ , Pb ²⁺	DTZ na agarósově membráně	ethanol/425 nm	pH 2,5 (Hg), 5,2 (Pb)/bez extrakce	[34]
Voda	Hg ²⁺	DTZ v nanomembráně	aceton/485 nm	pH 2,8/ s extrakcí	[35]
Roztok vzorku s obsahem rtuti	Hg ²⁺	DTZ na triacetylcellulosové membráně	methanol, voda/610 nm	pH 2/ bez extrakce	[36]
Lidské sérum/3 ml	Pb ²⁺	DTZ	tetrachlormethan/538 nm	pH 8,2/ s extrakcí	[37]

Nejčastěji se DTZ používá pro stanovení Pb^{2+} , Hg^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} kationtů. Některé metody využívají rozlišení spekter při různém pH, např. rozlišení Hg^{2+} a Pb^{2+} [34]. Jindy je naopak využito rozlišení pomocí různých vlnových délek – $\text{Bi}^{3+}/\text{Zn}^{2+}$ [29]. Řada prací se snaží vyhnout extrakčnímu kroku, ale pokud to není možné, byla využita extrakce do chloroformu nebo tetrachlormethanu [31,37], které nejsou příliš v souladu s principem zelené chemie. Pokud se dají využít alternativní rozpouštědla nebo postupy, tak je vyvinutá metoda ekologicky příznivější. Často je pak využito zakoncentrování pomocí pevných adsorbentů a membrán [30, 34-36]. Tím je prakticky zabezpečeno zakoncentrování, ale může přetrvávat vliv dalších složek vzorku, které mohou interferovat tím, že také tvoří komplex s DTZ.

4. Experimentální část

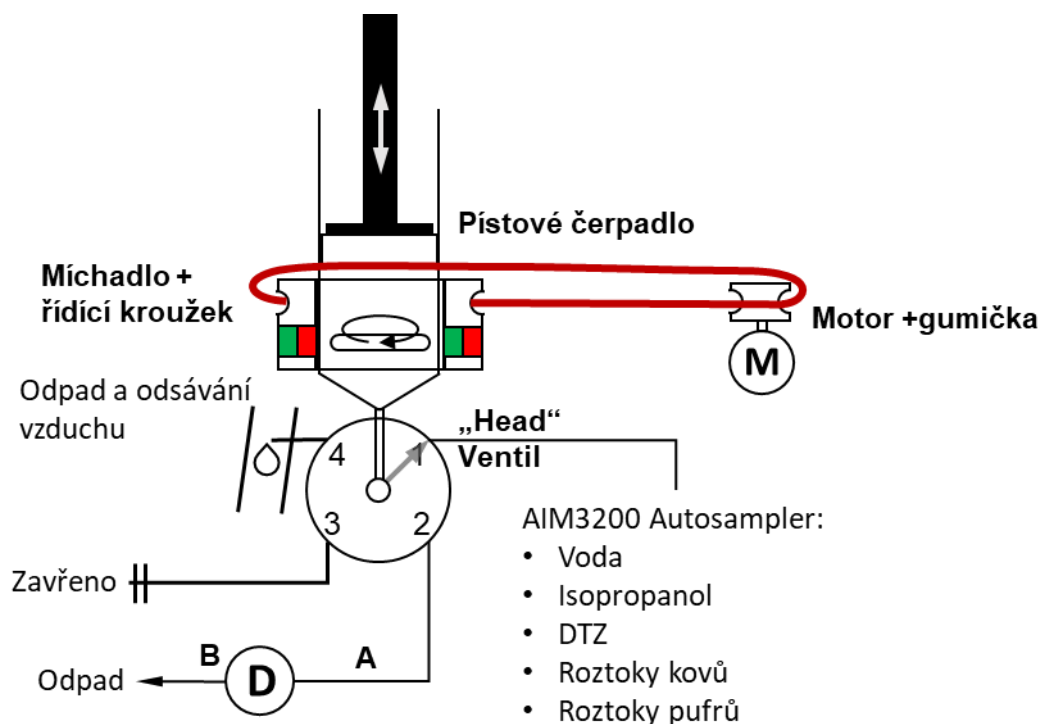
4.1 Popis systému

Použité pístové čerpadlo pro LIS techniku je schématicky znázorněno na Obrázku č. 3 s vyznačenými rozměry hadiček. Fotografie systému je uvedena na Obrázku č. 4. Systém se skládal z automatického pístového čerpadla Cavro XC4+ od společnosti Tecan (Männedorf, Švýcarsko) vybavené čtyřportovým vícepolohovým ventilem bez použití kovových materiálů - stator z tekaflonu (PVDF), rotor z teflonu (PTFE), který umožňoval připojení k dalším součástem systému. Pístové čerpadlo bylo vybaveno skleněnou stříkačkou o objemu 2,5 ml a délce zdvihu 3 cm a byla používána v obrácené orientaci. Do vstupu pístu byl vložen kousek teflonové hadičky o průměru 0,8 mm, aby byl snížen mrtvý objem.

Uvnitř rezervoáru bylo umístěno magnetické míchadlo o délce 10 mm a průměru 3 mm, které umožnilo homogenní promíchání obsahu rezervoáru. Rotace míchadla byla vyvolána řídicím kroužkem. Jedná se o plastový kroužek se dvěma neodýmiovými magnety. Otáčení kroužku vynucovalo synchronní rotaci míchadla. Toho bylo dosaženo pomocí gumičky a stejnosměrného motoru, který byl vybaven ventilátorem s pulzně šířkovou modulací počítače a řízen softwarovými instrukcemi prostřednictvím mikroprocesoru Trinket M0.

Port 1 "head" ventilu byl připojen k průtokové cele o délce 10 cm s geometrií průtokového kanálu Z z teflonu (společnost FIALab, Bellvue, Seattle, WA). Všechny pufovací roztoky, standardy, čistící roztoky a DTZ byly umístěny v autosampleru AIM 3200 od společnosti AIM (City, Austrálie), který byl připojen k portu 1 "head" ventilu pomocí trubičky z teflonu o vnitřním průměru 0,8 mm. Port 3 byl uzavřen, aby bylo možné vytvořit podtlak nebo přetlak, který byl zkoumán za účelem odstranění bublinek vznikajících při odplynování roztoku. Port 4 sloužil jak k odstraňování odpadu, tak k odsávání vzduchu. K tomuto účelu bylo pístové čerpadlo připojeno přes krátkou polyéteréterketonovou kapiláru (PEEK) kapiláru s malým mrtvým objemem (0,8 mm, délka cca 5 cm) k odtokové hadičce, která odváděla všechny vypouštěné roztoky do odpadní láhve.

K detekci byl použit halogenový + deuteriový zdroj světla a spektrofotometr s diodovým polem USB2000 od společnosti OceanOptics (Dunedin, FL, USA). Detekční cela byla dlouhá 10 cm a obalena alobalem, za účelem snížení propustnosti pro vnější světlo (Obr. č. 5). Absorpční spektra byla zaznamenána v rozsahu od 350 nm do 700 nm vybráno z celkového rozsahu 250-900 nm. Referenční vlnová délka 700 nm byla zvolena pro kompenzaci nespecifického zeslabení světla, např. vzduchovými bublinami atd. Další vlnové délky odpovídaly absorpčním maximům zkoumaného komplexu kov-DTZ. Byly použity integrační parametry: integrační čas 5 ms, průměrování 50 měření s využitím hodnoty "boxcar 5", tj. průměrování ± 5 pixelů diody spektrofotometru.

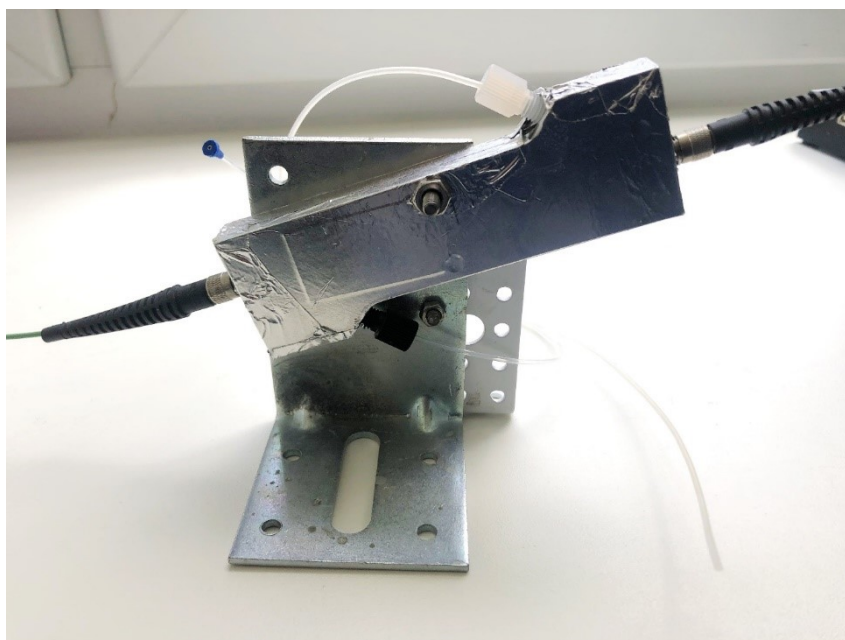


Hadička A – od pístu k detektoru: 30 cm, 0.8 mm i.d.
 Hadička B – cívka proti zpětnému tlaku vedena do odpadu: 40 cm, 0.5 mm i.d.

Obr. č. 3: Schéma pístového čerpadla

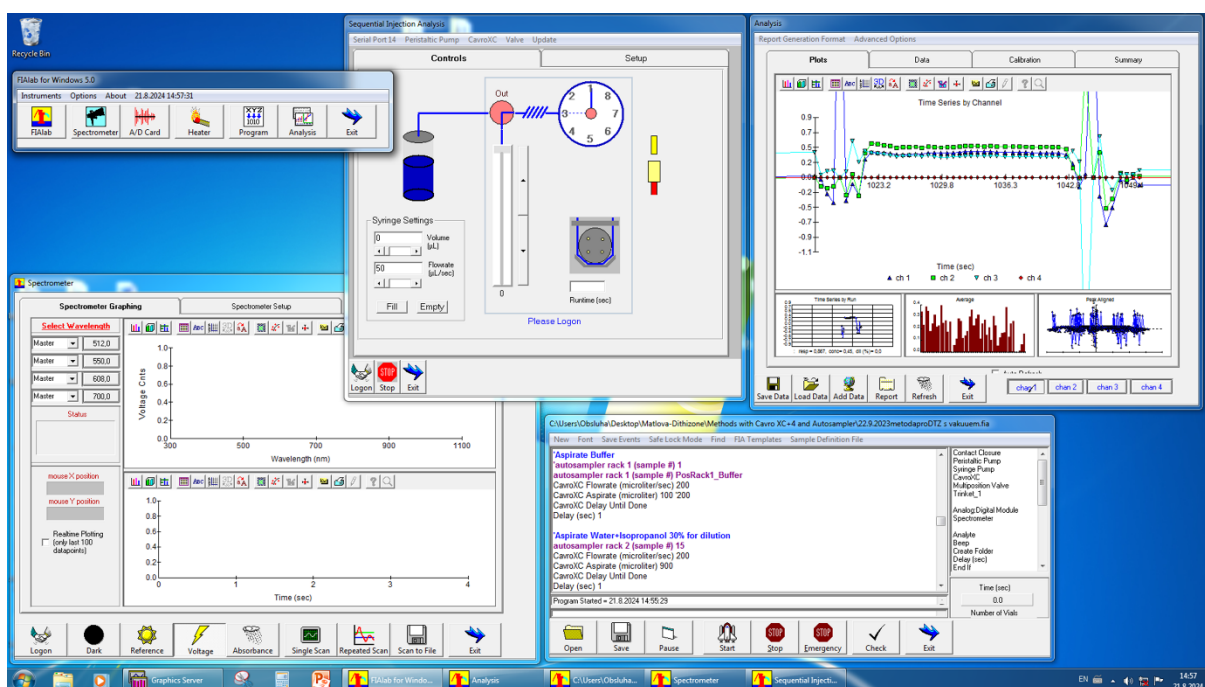


Obr. č. 4: Fotografie systému (autosampler, pístové čerpadlo a detekční cela s detektorem)



Obr. č. 5: Fotografie detekční cely obalené alobalem

Řízení analyzátoru a sběr dat byly prováděny prostřednictvím softwaru FIALab® (FIALab® Instrument Systems Inc., USA), verze 5.9.312 (Obr. č. 6). Laserový tachometr (DT-2234C) od společnosti Micronix Co. LTD. (Praha, Česká republika) byl použit pro stanovení otáček míchadla.



Obr. č. 6: Fotografie softwaru – okna konfigurace systému, spektrofotometru, ovládacího programu, analýzy dat

4.2 Použité chemikálie

Acetonitril, dodavatel Honeywell Riedel-de-Haën, Fisher Scientific s.r.o., Pardubice, ČR

AMPSO, čistota 99% (titration), dodavatel Sigma Aldrich, Praha, ČR

BES, čistota 99% (titration), dodavatel Sigma Aldrich, Praha, ČR

CAPS, čistota 99%, dodavatel Aldrich, Praha, ČR

Dithizone, čistota 85% ACS činidlo, dodavatel Sigma Aldrich, Praha ČR

Dusičnan kademnatý tetrahydrát, p.a, dodavatel Penta s.r.o., Praha, ČR

Dusičnan kobaltnatý hexahyrát, p.a, dodavatel Penta s.r.o., Praha, ČR

Dusičnan mědnatý trihydrát, p.a, dodavatel Penta s.r.o., Praha, ČR

Dusičnan nikelnatý hexahyrát, p.a, dodavatel Penta s.r.o., Praha, ČR

Dusičnan olovnatý, p.a, dodavatel Penta s.r.o., Praha, ČR

Dusičnan zinečnatý hexahyrát, p.a, dodavatel Penta s.r.o., Praha, ČR

Dusičnan železitý nonahyrát, p.a, dodavatel Penta s.r.o., Praha, ČR

Hydroxid sodný, čistota GPR Rectapur, dodavatel VWR Chemicals, Stříbrná Skalice, ČR

Chlorid manganatý tetrahydrát, p.a, dodavatel Penta s.r.o., Praha, ČR

Chloroform, čistý p.a. stabilizován ethanolem, dodavatel Penta s.r.o., Praha, ČR

Isopropanol, čistota HyperSolv for HPLC, dodavatel VWR Chemicals, Stříbrná Skalice, ČR

Kyselina mravenčí, čistota 98% p.a., dodavatel Penta s.r.o., Praha, ČR

Kyselina octová, čistota 99,8%, pro LC-MS, dodavatel VWR Chemicals, Stříbrná Skalice, ČR

Kyselina sírová, čistota 96%, dodavatel Penta s.r.o., Praha, ČR

MES, čistota > 99%, dodavatel Sigma Aldrich, Praha, ČR

Methanol, company Honeywell Riedel-de-Haën, Fisher Scientific s.r.o., Pardubice, ČR

TrisMa baze, čistota 99%, dodavatel Sigma Aldrich, Praha, ČR

4.3 Příprava roztoků

Příprava zásobních roztoků kovů

Pro přípravu zásobního roztoku pro detekci kobaltu byl využit dusičnan kobaltnatý. Bylo naváženo 72,76 mg sloučeniny do 25 ml odměrné baňky, přidáno 1 ml kyseliny dusičné a doplněno demineralizovanou vodou po rysku. Výsledná koncentrace byla 10 mmol/l. Zásobní roztoky byly uchovávány v chladu ve skleněných lahvičkách. Takto byly připraveny i ostatní zásobní roztoky kovů:

Nikl – dusičnan nikelnatý hexahydrát – 72,70 mg, výsledná koncentrace byla 10 mmol/l

Olovo – dusičnan olovnatý – 82,80 mg, výsledná koncentrace byla 10 mmol/l

Železo – dusičnan železitý nonahydrát – 101,00 mg, výsledná koncentrace byla 10 mmol/l

Zinek – dusičnan zinečnatý hexahydrát – 74,37 mg, výsledná koncentrace byla 10 mmol/l,

Kadmium – dusičnan kademnatý tetrahydrát – 77,11 mg, výsledná koncentrace byla 10 mmol/l

Měď – dusičnan mědnatý trihydrát – 60,40 mg, výsledná koncentrace byla 10 mmol/l

Mangan – chlorid manganatý tetrahydrát – 49,47 mg, výsledná koncentrace byla 10 mmol/l

Příprava pracovních roztoků kovů

- Měření při nadbytku kovů než DTZ: ze zásobního roztoku kovu bylo odpipetováno 250 μ l do 50 ml odměrné baňky a doplněno destilovanou vodou po rysku. Výsledná koncentrace byla 50 μ mol/l. Takto to bylo připraveno pro každý kov zvlášť.
- Měření při nadbytku DTZ než kovu: ze zásobního roztoku kovu bylo odpipetováno 25 μ l do 50 ml odměrné baňky a doplněno demineralizovanou vodou po rysku. Výsledná koncentrace byla 5 μ mol/l.

Příprava pufrů

Jednotlivé pufrы o pH 3-10 byly připravovány za použití pH metru smísením kyselin a zásad pro získání výsledného pH. Všechny pufrы byly uchovávány v lednici.

Pro pufr o pH 3 a 4 byla použita kyselina mravenčí. Do kádinky bylo napipetováno 3,85 ml kyseliny, přidána destilovaná voda a změřeno pH. Podle změřeného pH se poté přidával hydroxid sodný do požadovaného pH. Konečné roztoky byly uchovávány ve 100 ml odměrných baňkách v lednici. Výsledná koncentrace byla 1 mol/l.

Pufr pH 5: použita kyselina octová - 5,72 ml - do požadovaného pH byl přidáván hydroxid sodný. Výsledná koncentrace byla 1 mol/l ve 100 ml odměrné baňce.

Pufir pH 6: použit MES - 1,2200 g - do požadovaného pH byl přidáván hydroxid sodný. Výsledná koncentrace ve 25 ml odměrné baňce byla 0,25 mol/l.

Pufir pH 7: použit BES - 1,3325 g - do požadovaného pH byl přidáván hydroxid sodný. Výsledná koncentrace ve 25 ml odměrné baňce byla 0,25 mol/l.

Pufir pH 8: použit TRIS - 12,1140 g - do požadovaného pH byla přidávána kyselina chlorovodíková. Výsledná koncentrace ve 100 ml odměrné baňce byla 1 mol/l.

Pufir pH 9: použit AMPSO - 1,5911 g - do požadovaného pH byl přidáván hydroxid sodný. Výsledná koncentrace ve 25 ml odměrné baňce byla 0,25 mol/l.

Pufir pH 10: použit CAPS - 1,3833 g - do požadovaného pH byl přidáván hydroxid sodný. Výsledná koncentrace ve 25 ml odměrné baňce byla 0,25 mol/l.

Příprava zásobního roztoku DTZ

0,05 g DTZ (Sigma Aldrich, činidlo ACS, $\geq 85\%$) bylo rozpuštěno v 50 ml chloroformu a extrahováno do 100 ml 0,1 mol/l NH_4OH . Vodná fáze byla poté přečištěna extrakcí 2 ml chloroformu. Poté byla vodná fáze oddělena a okyselená 5 ml 5 mol/l kyseliny sírové a DTZ byl zpětně extrahován do 50 ml chloroformu. Organická fáze byla poté promyta vodou. Výsledná organická fáze byla smaragdově zelená. Byla překryta kyselinou sírovou o koncentraci 1 mol/l a skladována při 4°C ve tmě. Konečná koncentrace přibližně 5,0 mmol/l byla vypočítána pomocí molárního absorpčního koeficientu.

Příprava pracovního roztoku DTZ

Ze zásobního roztoku DTZ bylo odpipetováno 1500 μl do 100 ml odměrné baňky. Baňka byla poté vložena do velké kádinky s horkou vodou. S odměrnou baňkou bylo krouženo v horké vodě pro dosažení odpaření chloroformu. Po odpaření chloroformu byl DTZ doplněn isopropanolem po rysku a přidáno 100 μl 0,1M HNO_3 - pro stabilizaci roztoku a snížení rizika oxidace. Baňka byla vložena na pár minut do ultrazvukové lázně, aby se dosáhlo rozpuštění nerozpuštěných shluků DTZ. Odměrná baňka byla uchovávána ve tmě. Výsledná koncentrace DTZ byla 150 $\mu\text{mol/l}$.

4.4 Postup měření a jeho parametry

Postup měření spočíval nejprve v přípravě roztoků a jejich následném přelití do zkumavek, které byly vloženy do autosampleru. Zkumavka s DTZ byla obalena tmavou páskou neprůchodnou pro světlo, kvůli snížení rizika oxidace. Pomocí softwaru FIALab byl spuštěn a zkontrolován systém a spektrofotometr (deuteriová+halogenová lampa). Detekce byla zaznamenávána v celkovém rozsahu vlnových délek od 250 nm - 900 nm. Dále byl spuštěn ovládací program (viz. Příloha č.1). Nejprve došlo k promytí celého systému -destilovanou vodou a poté isopropanolem. Poté bylo nasáto do pístového čerpadla 1200 μ l roztoku kovu, poté 200 μ l pufru. Průtoková rychlost byla 200 μ l/s. Bylo spuštěno míchadlo pro míchání uvnitř rezervoáru pístového čerpadla. Dále došlo k přidání 400 μ l DTZ v isopropanolu a k promíchání uvnitř pístového čerpadla po dobu cca 30 s. Poté byl aspirován vzduch, vytvořeno vakuum a vypnuto míchadlo. Takto promíchaný komplex byl nadávkován do detekční cely až za 20 s, kde došlo k měření absorbance. Poté byl roztok z detekční cely vyprázdněn do odpadní láhve a celý systém znovu promyt. Každý jednotlivý kov byl měřen v pH 3-10 s využitím připravených pufrů. Měření bylo opakováno 3x, pro každé měření byly získány 3 záznamy. Mezi každým měřením byl systém promyt. Ze tří opakování byl vybrán nejlepší výsledek - spektrum s nejnižším šumem.

5. Výsledky a diskuze

Uvedené výsledky byly získány ze dvou až třech opakovaných měření spekter se stejnými roztoky. Jako kovy, které byly testovány s ohledem na tvorbu komplexu kov-DTZ byly využity kovové prvky ve formě solí - kademnaté, kobaltnaté, měďnaté, nikelnaté, olovnaté a zinečnaté. Železité a manganaté kationty byly testovány jako potenciální interferenty (z pohledu možné společné reakce s DTZ) při využití této metody pro rozlišení jednotlivých iontů ve vodovodní vodě.

5.1 Výběr vhodného rozpouštědla

Jako rozpouštědlo pro DTZ byl vybrán isopropanol. Snažili jsme se vyhnout extrakci, kvůli typicky toxickým rozpouštědlům, která jsou při této metodě používána (chloroform, tetrachlormethan). Dále mezi hlavní důvody patří jednoduchost a rychlost operace - dochází pouze k míchání. Dále bylo možné se vyhnout problémům s registrací dat a vyhodnocením hodnot pH ovlivněným např. neúplnou extrakcí, nízkou reprodukovatelností použití směsi rozpouštědel, manipulací nebo nárůstem tlaku v důsledku částečného odplynění uvnitř rezervoáru pístového čerpadla apod.

5.2 Výběr vhodných pufrů

Výběr pufrů byl ovlivněn hlavně tím, aby daný pufr neinteragoval se stanovovaným kovem. U klasických pufrů (fosfátový, citrátový) je možné, že by mohli s daným kovem tvořit komplex či dokonce kov vysrážet. Proto byly vybrány pufrů s daným pKa, které by neměly významně zasahovat do komplexace, pouze ovlivnit pH (Tabulka č. 2).

Tabulka č. 2: Vybrané pufrů, jejich pKa a pH [38]

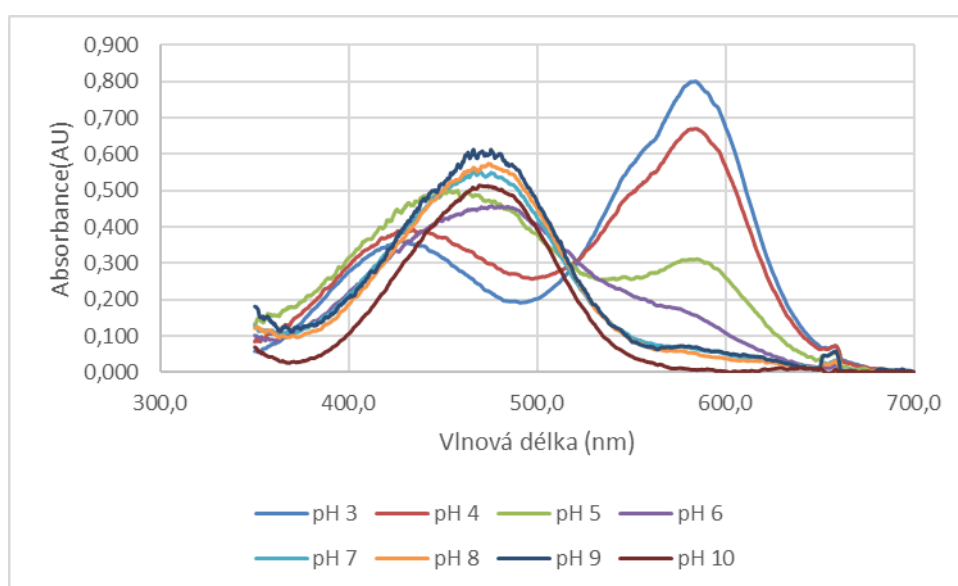
Pufr	pKa	pH
Kyselina mravenčí	3,7	3
Kyselina mravenčí	3,7	4
Octová kyselina	4,7	5
MES	6,1	6
BES	7,1	7
TRIS	8,2	8
AMPSO	9,0	9
CAPS	10,4	10

5.3 Měření při nadbytku kovů a DTZ bez využití vakua

Měření v nadbytku kovu (koncentrace 50 $\mu\text{mol/l}$) bylo provedeno s ohledem na co nejnižší vliv samotného DTZ (koncentrace 150 $\mu\text{mol/l}$), který může svým absorpčním spektrem překrývat spektrum komplexu kov-DTZ. Při kontrole naměřených spekter, bylo zjištěno, že při měření dochází k poměrně velkému šumu. Tento šum mohl být způsoben průchodem vnějšího světla přes detekční celou nebo bublinami vznikajícími při míchání vzorku v pístovém čerpadle a rychlém nástřiku vzorku do detekční cely. Jako příklad uvádím samotný DTZ a spektrum komplexu kobalt-DTZ. Spektra ostatních kovů vypadala podobně - vykazovala velký šum a nebylo možné je přesně vyhodnotit. Byla proto využita pouze jako prvotní informace o spektrech komplexů vybraných kovů s DTZ.

5.3.1 DTZ

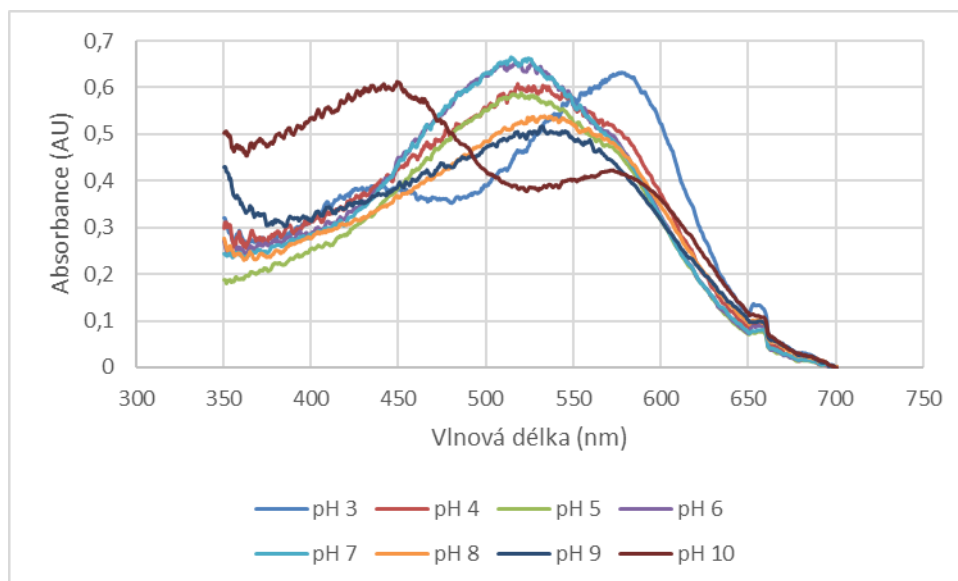
Spektrum samotného DTZ bylo změřeno při pH 3-10. I přes viditelný šum jsou patrná dvě maxima, která leží při 582 a 474 nm a odpovídají změně spektra při disociaci DTZ (Obr. č. 7).



Obr. č. 7: Spektrum samotného DTZ bez využití vakua při pH 3-10 v koncentraci 150 $\mu\text{mol/l}$

5.3.2 Kobalt-DTZ

Spektrum komplexu kobaltu s DTZ vykazuje opět poměrně velký šum, ale i tak jsou vidět odlišnosti od spektra samotného DTZ, při pH 4-9 je patrný posun maxima do vlnové délky 525 nm, která odpovídá maximu komplexu Co-DTZ (Obr. č. 8).



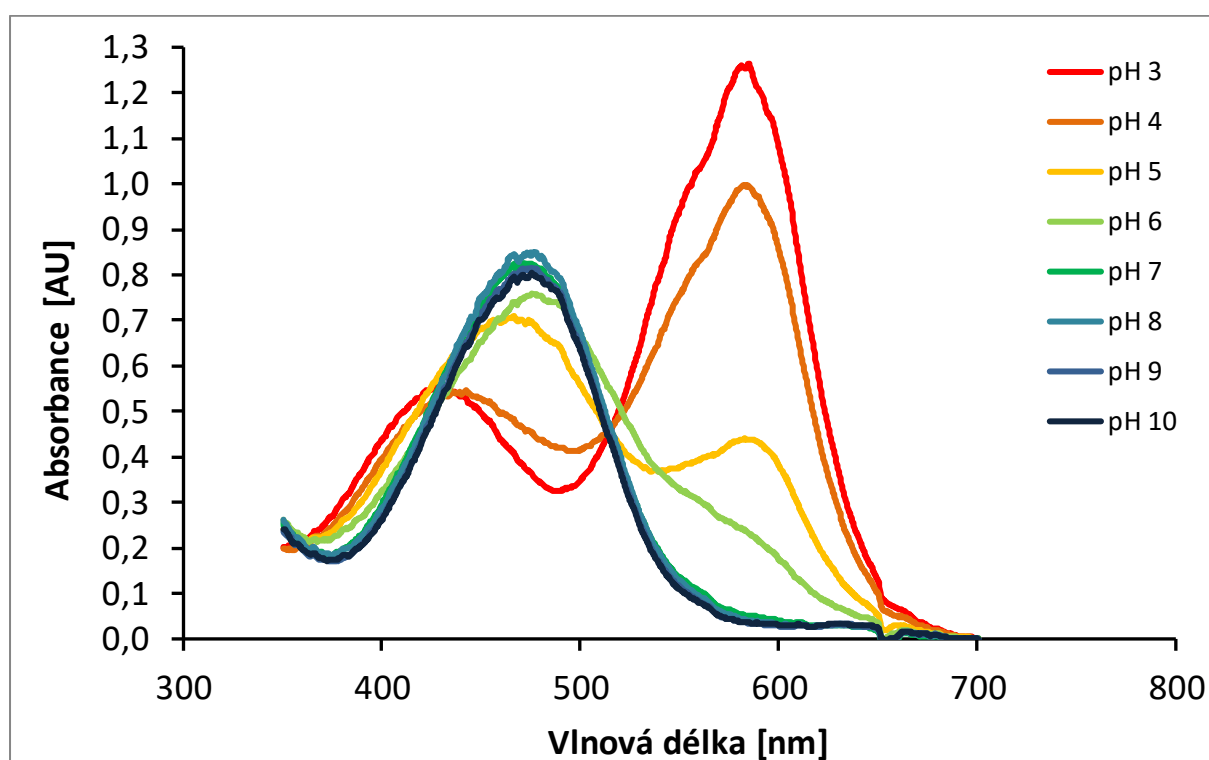
Obr. č. 8: Spektrum komplexu kobalt-DTZ při pH 3-10 v koncentraci 50 $\mu\text{mol/l}$ (kobalt) a 150 $\mu\text{mol/l}$ (DTZ)

5.4 Měření kovů v nadbytku DTZ s využitím vakua

Pro odstranění vysokého šumu původních spekter bylo při měření vytvořeno vakuum, obalena detekční cela alobalem a zároveň snížena koncentrace kovů v roztoku. Změna koncentrace roztoku (z původní koncentrace kovů 50 $\mu\text{mol/l}$ na 5 $\mu\text{mol/l}$) měla sloužit pro měření s využitím tvorby co největšího množství komplexu (co nejbližší rovnovážnému stavu) i s tím rizikem, že DTZ (150 $\mu\text{mol/l}$) bude přítomný v nadbytku. Spektra jsou lépe rozlišitelná. Udávám spektra všech kovů včetně samotného DTZ.

5.4.1 DTZ

Samotný DTZ při využití vakua vykazuje tato absorpční maxima - při pH 3: 586 nm a 430 nm, pH 4: 586 nm a 430 nm, pH 5: 460 nm a 586 nm, pH 6: 480 nm, pH 7: 475 nm, pH 8: 475 nm, pH 9: 475 nm, pH 10: 475 nm (Obr. č. 9). Toto spektrum bylo využito pro porovnání tvorby komplexu kov-DTZ, kdy by měly být ve spektru patrné změny a posun vlnové délky maxima komplexu.

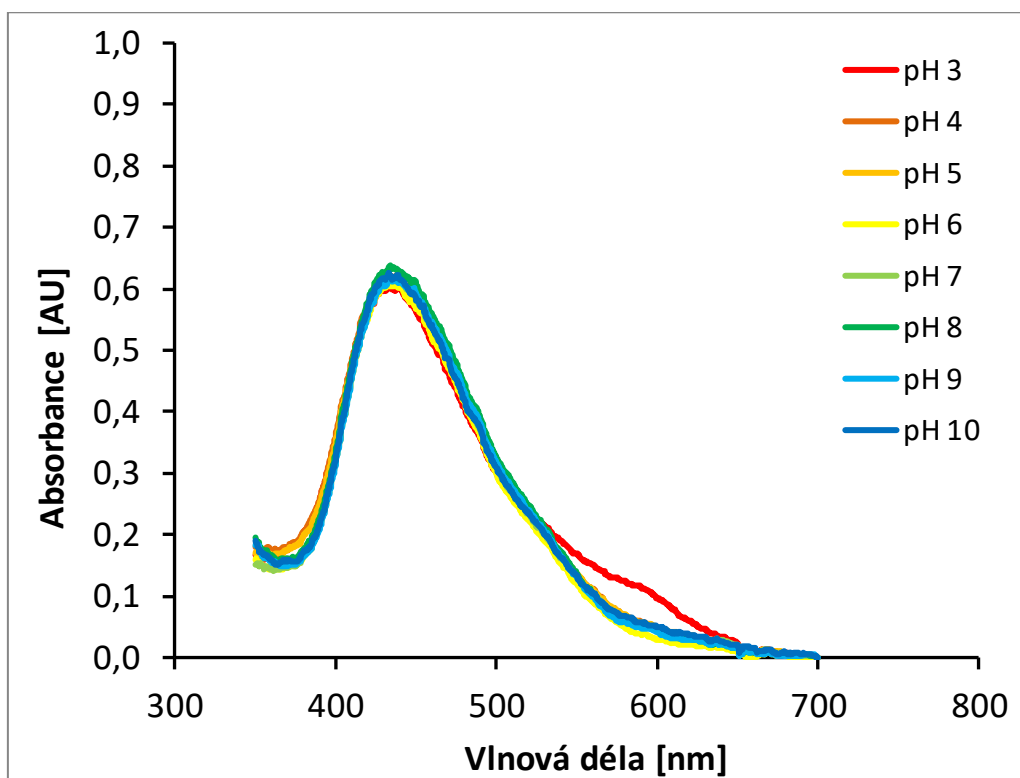


Obr. č. 9: Spektrum samotného DTZ s využitím vakua při pH 3-10 v koncentraci 150 $\mu\text{mol/l}$

5.4.2 Kadmium-DTZ

Spektrum komplexu kadmia s DTZ vykazuje jedno maximum při 440 nm. Lze usuzovat na velmi brzkou komplexaci, částečně už při pH 3, kdy je patrný malý absorpční pás při vlnové délce maxima DTZ. Při pH 4 je viditelný pouze absorpční pás komplexu kadmium-DTZ, který zůstává ve spektru až do pH 10 (Obr. č. 10).

Podle literatury [24] by mělo kadmium vykazovat maximum absorbance při vlnové délce 520 nm v rozmezí pH 6-14. Bylo ale použito jiné rozpouštědlo (tetrachlormethan). V našem případě dochází k úplné komplexaci v rozmezí pH 4-10.

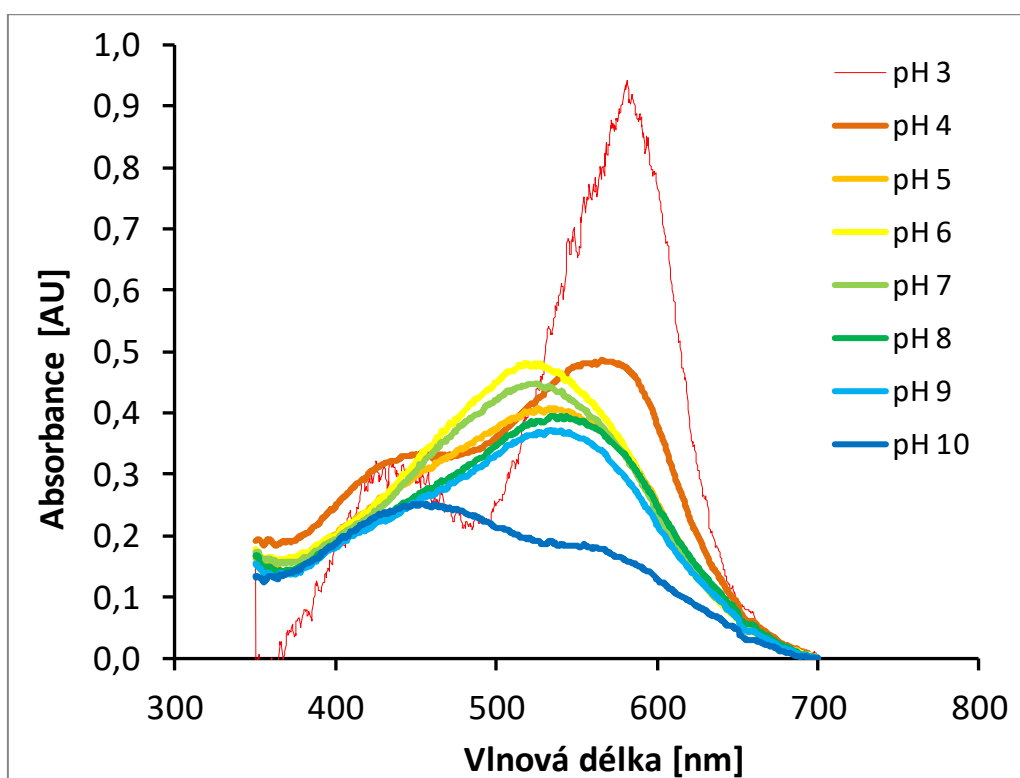


Obr. č. 10: Spektrum komplexu kadmium-DTZ při pH 3-10 v koncentraci 5 $\mu\text{mol/l}$ a koncentrace DTZ 150 $\mu\text{mol/l}$

5.4.3 Kobalt-DTZ

Viditelná změna, která začíná od pH 5 do pH 9. Dochází k posunu vlnové délky oproti DTZ při vyšším pH až na 530 nm. Při pH 3 spektrum odpovídá samotnému DTZ - nejspíše došlo ke komplexaci při vyšších hodnotách pH (Obr. č. 11). Dále můžeme na spektru nalézt tzv. izosbestický bod, kdy se spektra DTZ a komplexu kobalt-DTZ protínají. Protože nejintenzivnější tvorbě komplexu odpovídá spektrum při pH 6, bude izosbestickému bodu odpovídat vlnová délka cca 540 nm (průsečík žluté a oranžové křivky na Obr. č. 11).

Podle literatury [24] by měl kobalt vykazovat maximum absorpance při vlnové délce 542 nm v rozmezí pH 6,5-10,5. Bylo ale opět použito jiné rozpouštědlo (tetrachlormethan).

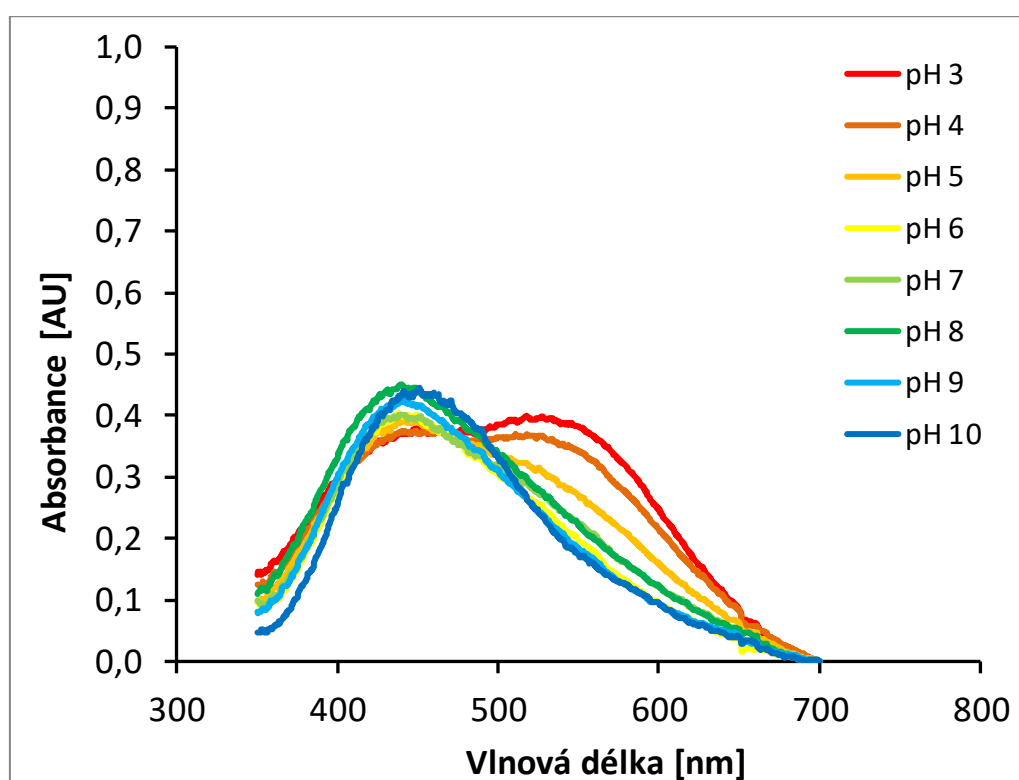


Obr. č. 11: Spektrum komplexu kobalt-DTZ při pH 3-10 v koncentraci 5 $\mu\text{mol/l}$ a koncentrace DTZ 150 $\mu\text{mol/l}$

5.4.4 Měď-DTZ

Ke komplexaci dochází už při velmi nízkém pH (3). Při pH 3 a 4 došlo k posunu vlnové délky z 586 nm na 530 nm. Při vyšších pH se vlnové délky oproti DTZ posunuly na cca 450 nm. Od pH 5 je patrný pouze jeden absorpční pás odpovídající komplexu měď-DTZ (Obr. č. 12). Izosbestický bod v tomto případě leží při vlnové délce 490 nm.

Podle literatury [24] by měla měď vykazovat maximum absorbance při vlnové délce 550 nm v rozmezí pH 2-5 a max. absorbance při vlnové délce 450 nm v rozmezí pH 7-14. Bylo ale použito jiné rozpouštědlo (tetrachlormethan). Vlnová délka 450 nm se v tomto rozmezí shoduje se získanými výsledky.

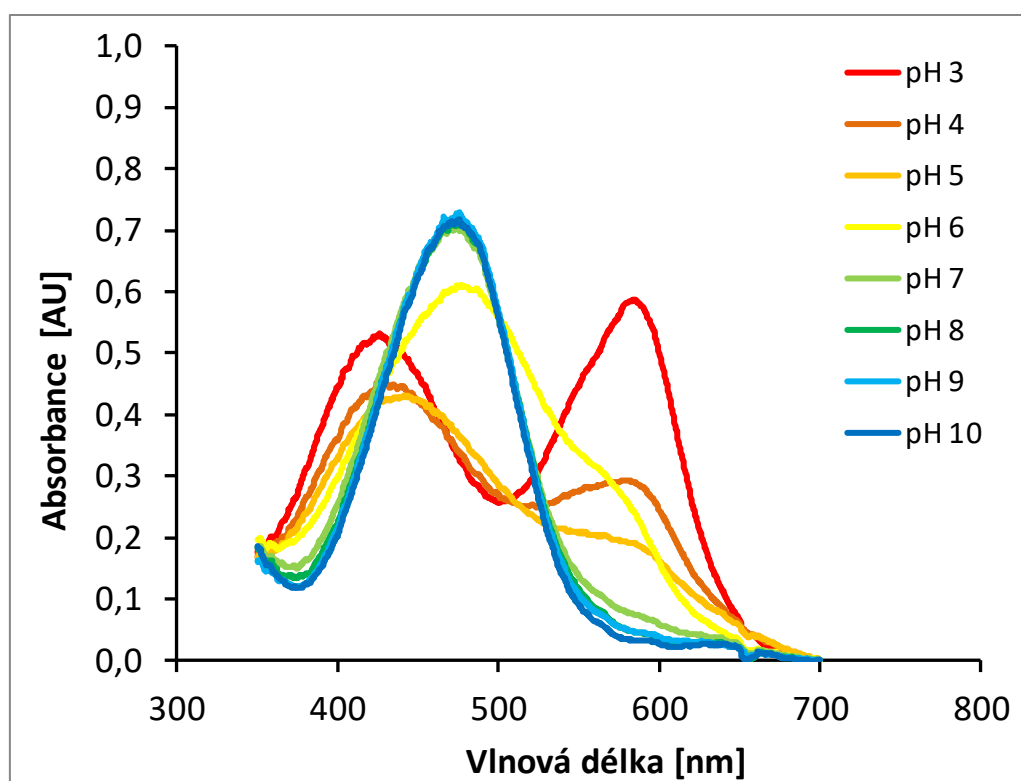


Obr. č. 12: Spektrum komplexu měď-DTZ při pH 3-10 v koncentraci 5 $\mu\text{mol/l}$ a koncentrace DTZ 150 $\mu\text{mol/l}$

5.4.5 Železo-DTZ (ve formě Fe^{3+})

Vlnové délky se proti spektru DTZ viditelně nemění (Obr. č. 13). Železité kationty jsou nerozlišitelné od DTZ, což vyhovuje předpokladu, že se komplex železo-DTZ netvoří tak ochotně jako s ostatními testovanými kovy. Při splnění tohoto tvrzení nebude nutné maskovat přítomnost železa ve vodovodní vodě, kde lze očekávat jeho poměrně vysoký obsah.

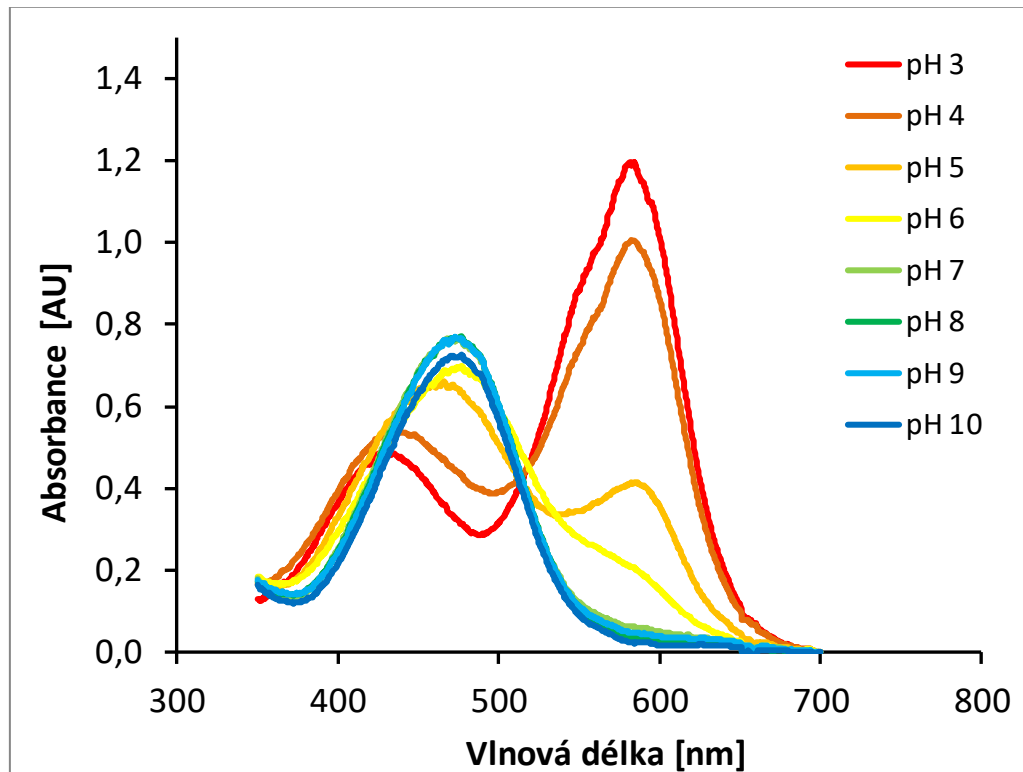
V přítomnosti kationtu Fe^{3+} spektra naznačují, že komplexace s DTZ nastává nevýznamně při pH 3, ale je dokončena při pH 7, protože pro vyšší hodnoty pH se spektra dále nemění. To znamená, že železo lze kvantifikovat pomocí DTZ při pH > 7, ale absorpční spektra DTZ a DTZ- Fe^{3+} jsou velmi podobná, takže pro jasné potvrzení, zda skutečně vznikl komplex, by měla být vyzkoušena extrakce komplexu do organického nemísitelného rozpouštědla. Další možností odlišení železa od jiných kovů by byla redukce na Fe^{2+} např. kyselinou askorbovou s přihlédnutím k tomu, že Fe^{2+} netvoří tak silné komplexy jako Fe^{3+} .



Obr. č. 13: Spektrum komplexu železo-DTZ při pH 3-10 v koncentraci 5 $\mu\text{mol/l}$ a koncentrace DTZ 150 $\mu\text{mol/l}$

5.4.6 Mangan-DTZ

Spektrum velmi podobné DTZ a také železitým kationtům, odlišitelné od Fe^{3+} pouze při pH 4. Od DTZ viditelně neodlišitelné - stejné vlnové délky maxim a stejný předpoklad jako u železitých iontů, opět by obsah manganu neměl rušit stanovení ostatních kovů ve vzorcích vodovodní vody (Obr. č. 14).

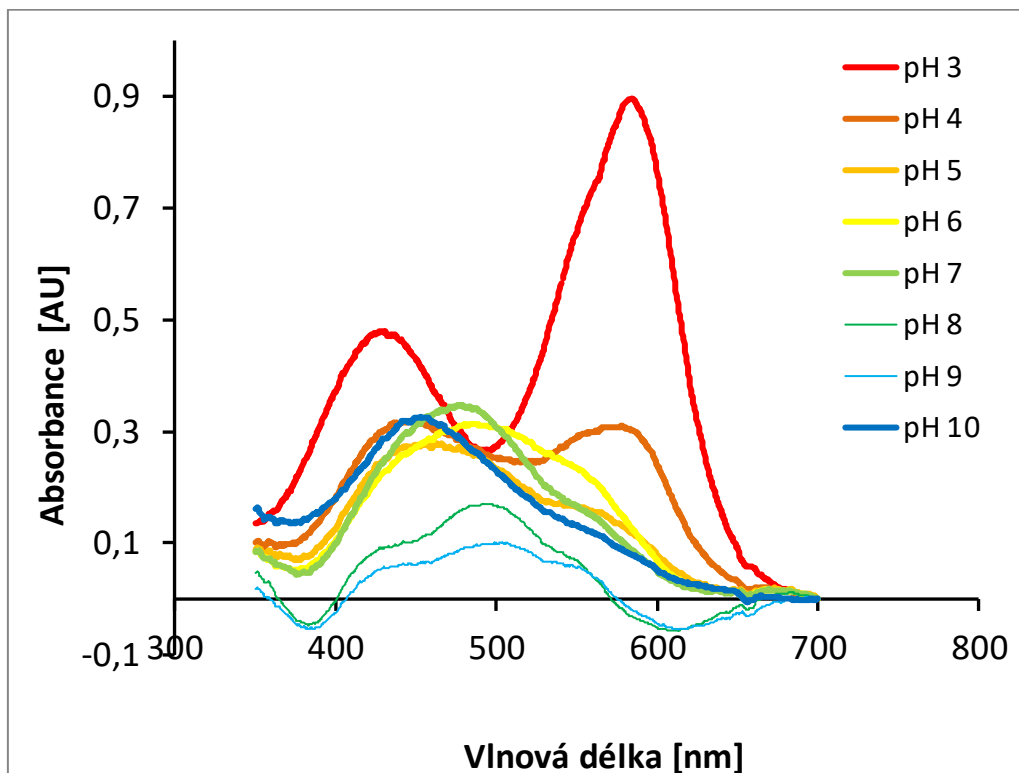


Obr. č. 14: Spektrum komplexu mangan-DTZ při pH 3-10 v koncentraci 5 $\mu\text{mol/l}$ a koncentrace DTZ 150 $\mu\text{mol/l}$

5.4.7 Nikl-DTZ

Od DTZ se nikelnaté kationty liší při pH 10. Dochází k posunu vlnové délky na 450 nm. pH 8 a 9 vycházelo takto v záporných hodnotách při každém měření - při těchto pH také dochází k posunu vlnové délky na 500 nm. Byla pravděpodobně přítomna bublina v roztoku při měření (Obr. č. 15). U komplexu nikl-DTZ je izosbestický bod při 510 nm (průsečík červené a zelené křivky).

Podle literatury [24] by měl nikl vykazovat maximum absorbance při vlnové délce 665 nm v rozmezí pH 6-9. Bylo ale použito jiné rozpouštědlo (chloroform).

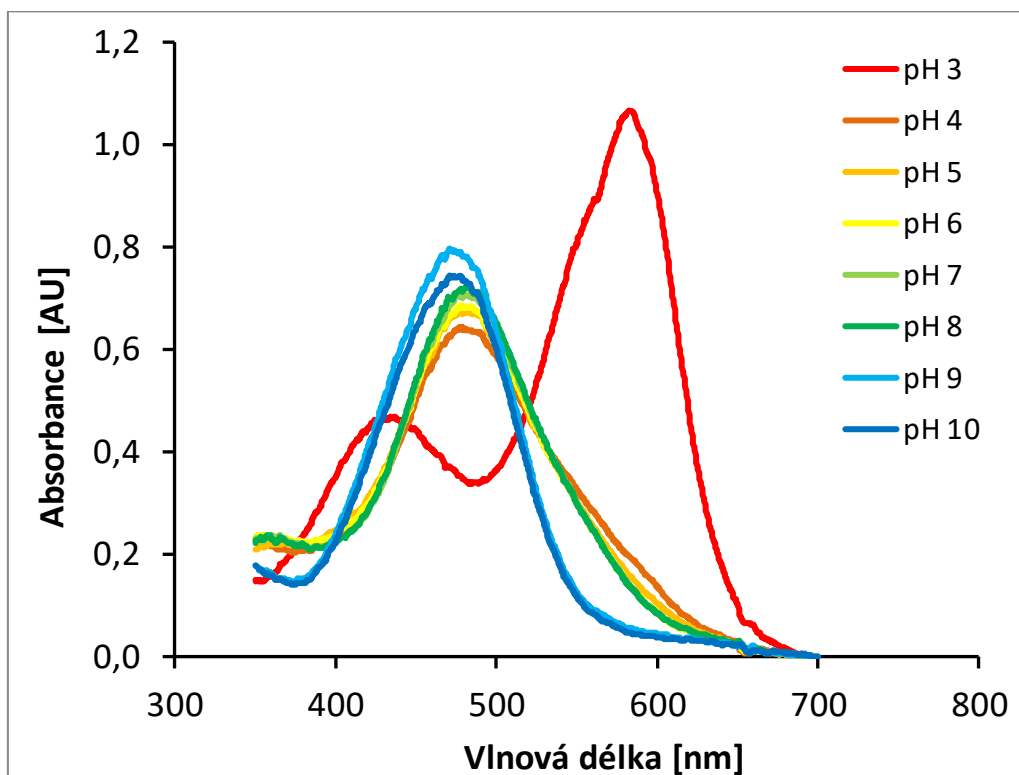


Obr. č. 15: Spektrum komplexu nikl-DTZ při pH 3-10 v koncentraci 5 $\mu\text{mol/l}$ a koncentrace DTZ 150 $\mu\text{mol/l}$

5.4.8 Olovo-DTZ

U olova dochází ke komplexaci už při velmi nízkém pH. Od DTZ se liší zejména při pH 4, kdy olovnaté kationty mají pouze jedno absorpční maximum při vlnové délce 480 nm. Zde také došlo k posunu oproti samotnému DTZ (Obr. č. 16). Pro komplex olovo-DTZ je opět velmi dobře patrný izosbestický bod při 510 nm.

Podle literatury [24] by mělo olovo vykazovat maximum absorpce při vlnové délce 520 nm v rozmezí pH 6,5-10,5. Bylo ale použito jiné rozpouštědlo (tetrachlormethan).

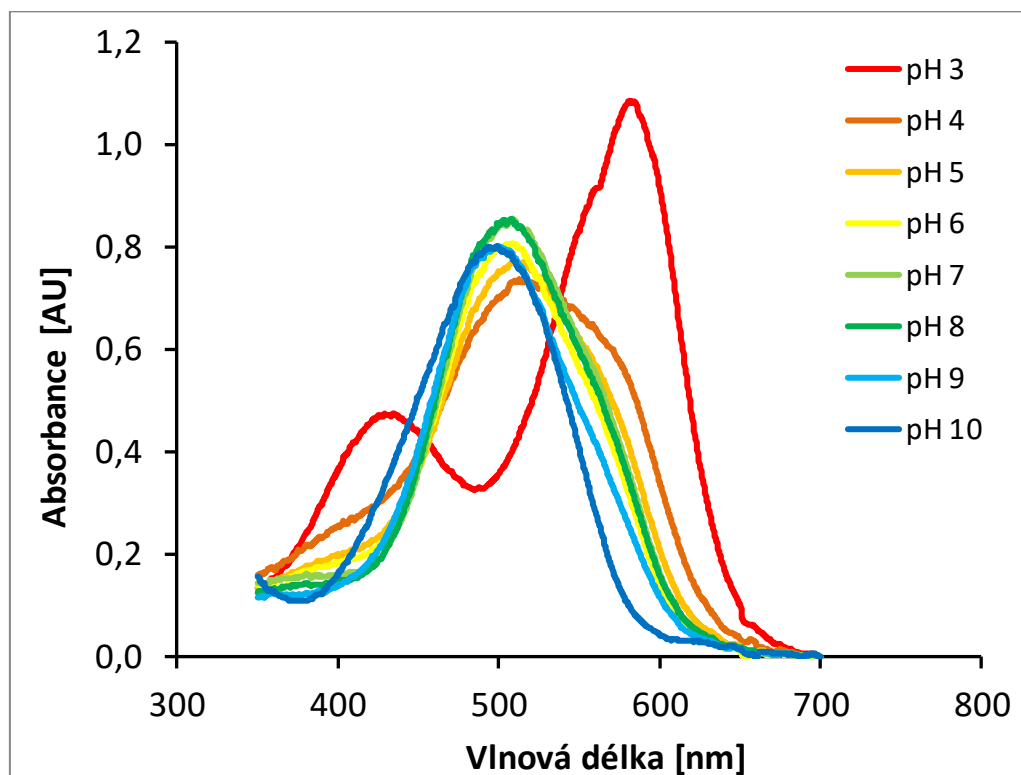


Obr. č. 16: Spektrum komplexu olovo-DTZ při pH 3-10 v koncentraci 5 $\mu\text{mol/l}$ a koncentrace DTZ 150 $\mu\text{mol/l}$

5.4.9 Zinek-DTZ

Zinečnaté a olovnaté kationty mají velmi podobná spektra. Liší se už při pH 4. Kdy zinečnatý kationt má větší rozsah vlnové délky než olovnatý. Došlo také k posunu vlnových délek oproti DTZ při vyšším pH (od 6) na 500 nm (Obr. č. 17). Pro komplex zinek-DTZ je izosbestický bod posunutý k vyšší vlnové délce cca 530 nm.

Podle literatury [24] by měl zinek vykazovat maximum absorpance při vlnové délce 538 nm v rozmezí pH 6,5-9,5. Bylo ale použito jiné rozpouštědlo (tetrachlormethan).



Obr. č. 17: Spektrum komplexu zinek-DTZ při pH 3-10 v koncentraci 5 $\mu\text{mol/l}$ a koncentrace DTZ 150 $\mu\text{mol/l}$

5.4.10 Shrnutí spekter kov-DTZ

V Tabulce č. 3 jsou shrnuty vlnové délky maxim (v nm) komplexů všechny kovů, které jsou odlišitelné od spektra samotného DTZ při určitém pH. Železité a manganaté kationty neuvádím, protože byly testovány pouze jako intereferenty a jejich spektra se od DTZ neliší.

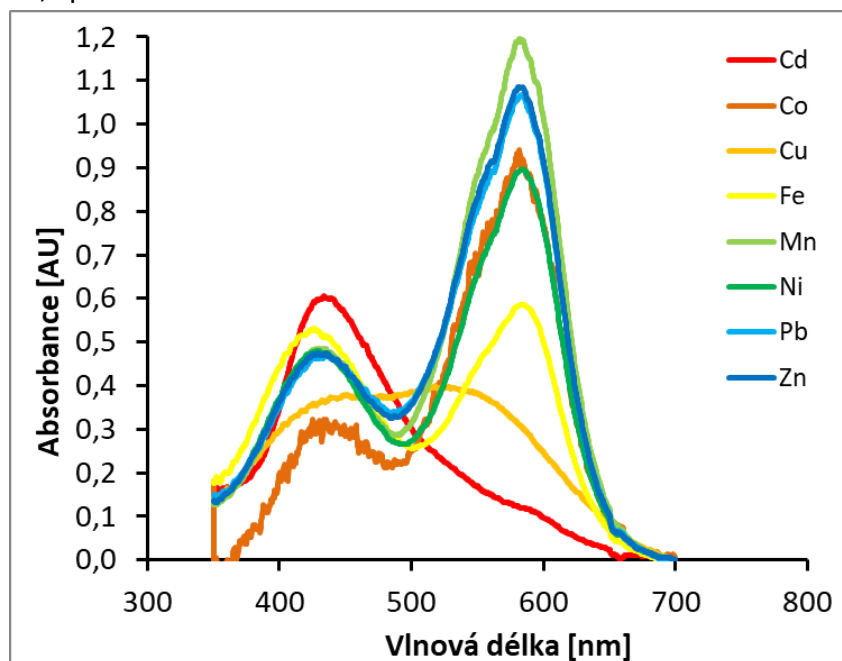
Tabulka č. 3: Vlnové délky maxim komplexů kov-DTZ

Vlnové délky komplexu kov-DTZ (nm)								
pH/komplex	3	4	5	6	7	8	9	10
DTZ	586, 430	586, 430	460, 586	480	475	475	475	475
Cd-DTZ	440	440	440	440	440	440	440	440
Co-DTZ	-	-	530	530	530	530	530	-
Cu-DTZ	530,	530,	450	450	450	450	450	450
Ni-DTZ	-	-	-	-	-	500	500	450
Pb-DTZ	-	480	480	480	487	480	477	477
Zn-DTZ	-	-	-	500	500	500	500	500

5.5 Možnosti rozlišení kovů při různém pH

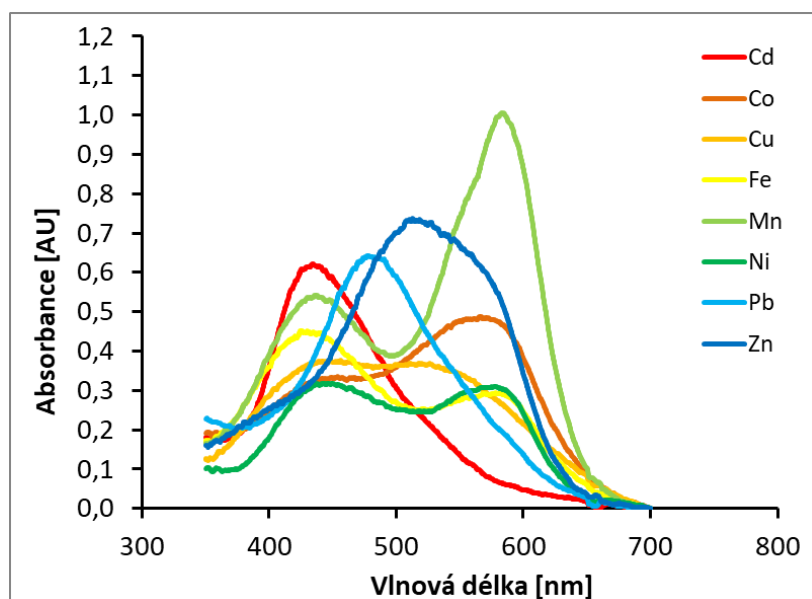
Další grafy poukazují na odlišitelnost jednotlivých kovů mezi sebou navzájem vždy ve stejném pH a v koncentraci 5 $\mu\text{mol/l}$ (kovy) a 150 $\mu\text{mol/l}$ (DTZ)

pH 3 - při tomto pH mají všechny kovy podobné spektra. Viditelně odlišitelné od ostatních jsou pouze kadmátové a měďnaté kationty (Obr. č. 18). Spektrum kobaltu je nepoužitelné, kvůli vysokému šumu, způsobeném bublinou.



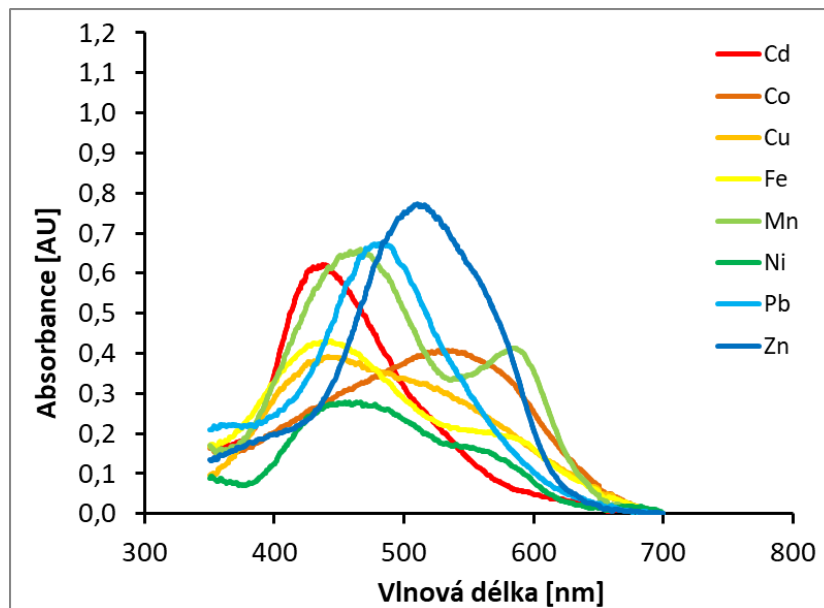
Obr. č. 18: Spektrum všech kovů při pH 3

pH 4 – velmi dobře odlišitelné od sebe jsou kadmátové, olovnaté, zinečnaté a manganátové kationty (Obr. č. 19).



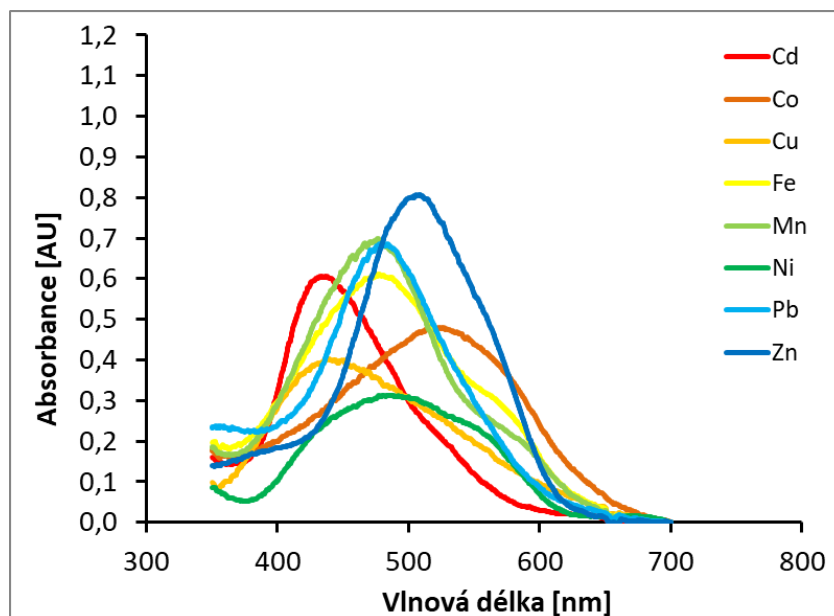
Obr. č. 19: Spektrum všech kovů při pH 4

pH 5 – od sebe odlišitelné jsou kationty kademnaté, zinečnaté, kobaltnaté a olovnaté (Obr. č. 20).



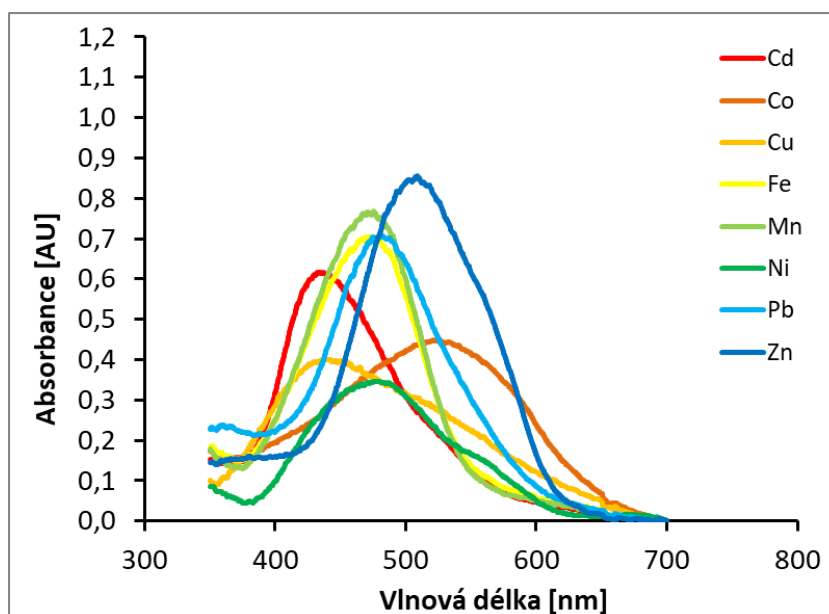
Obr. č. 20: Spektrum všech kovů při pH 5

pH 6 – odlišitelné od sebe jsou kationty kademnaté, zinečnaté a kobaltnaté (Obr. č. 21).



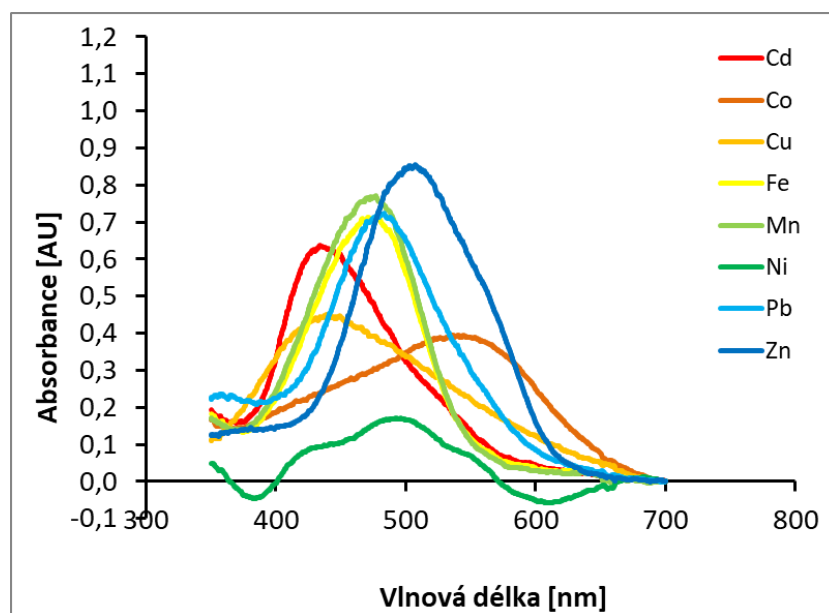
Obr. č. 21: Spektrum všech kovů při pH 6

pH 7 – odlišitelné od sebe jsou kationty kadmnaté a zinečnaté (Obr. č. 22)



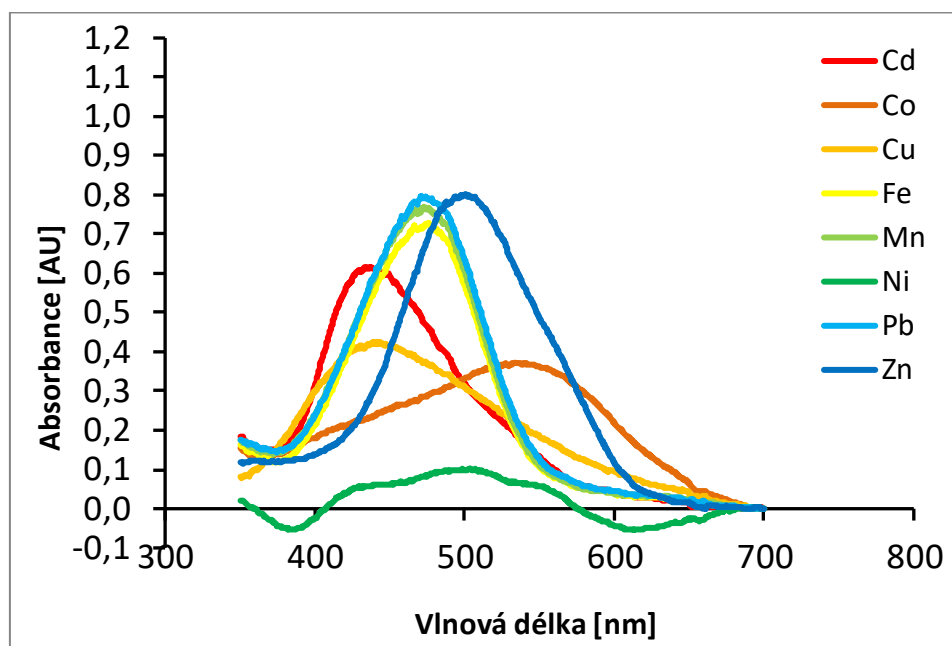
Obr. č. 22: Spektrum všech kovů při pH 7

pH 8 – odlišitelné od sebe jsou kationty kadmnaté, zinečnaté, kobaltnaté (Obr. č. 23)



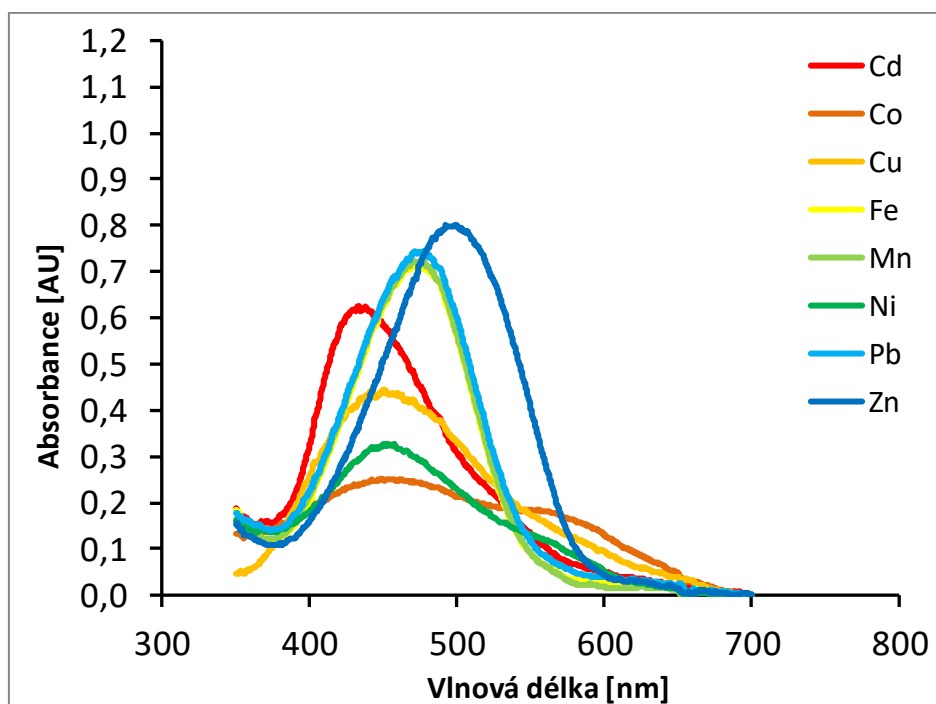
Obr. č. 23: Spektrum všech kovů při pH 8

pH 9 – odlišitelné od sebe jsou kationty kademnaté, zinečnaté, měďnaté a kobaltnaté (Obr. č. 24)



Obr. č. 24: Spektrum všech kovů při pH 9

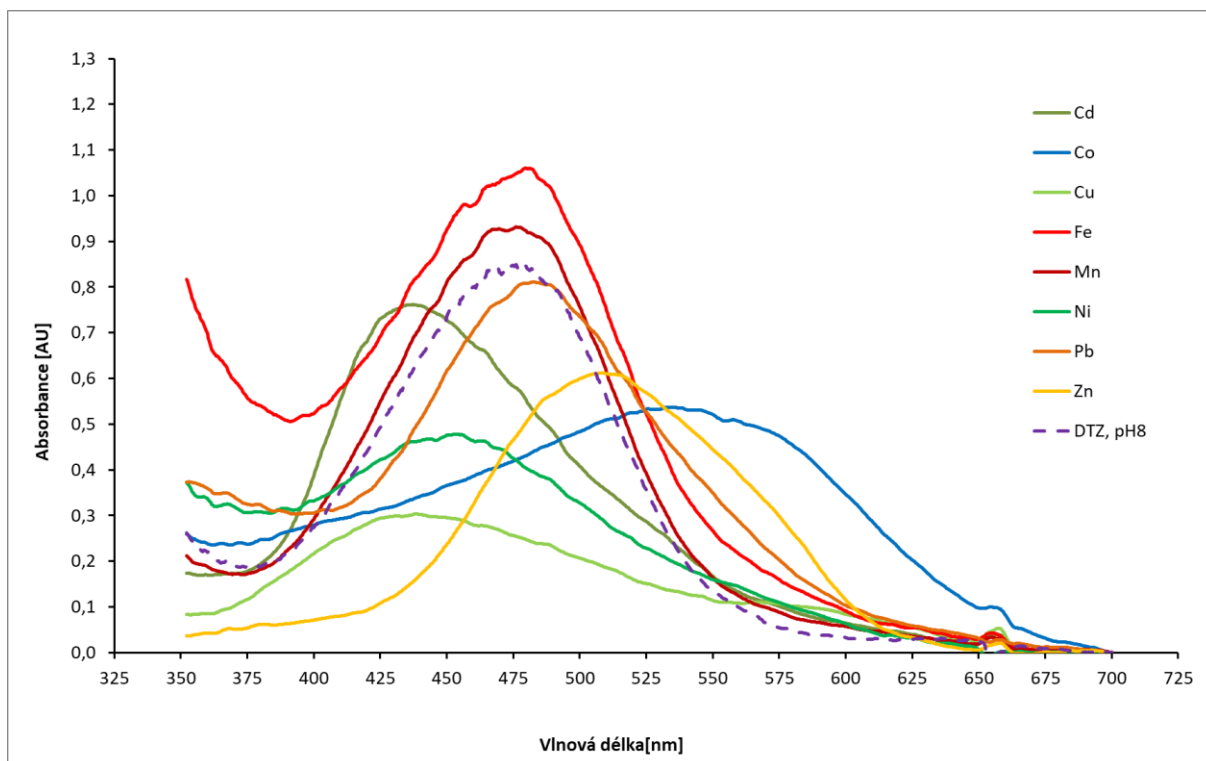
pH 10 – odlišitelné jsou od sebe kationty kademnaté, zinečnaté, kobaltnaté (Obr. č. 25)



Obr. č. 25: Spektrum všech kovů při pH 10

5.6 Porovnání kovů a DTZ při pH 8

Na obrázku č. 26 je uvedeno shrnutí všech kovů a DTZ při pH 8 (pouze nikl při pH 10 - kvůli záporným hodnotám při pH 8). Koncentrace kovů je 50 $\mu\text{mol/l}$ a koncentrace DTZ je 150 $\mu\text{mol/l}$. Dobře odlišitelné kationty od DTZ jsou měďnaté, zinečnaté, kobaltnaté, kadmennaté, nikelnaté. Kationty železité, manganaté i olovnaté mají velmi podobná absorpční maxima ve stejné vlnové délce cca 475 nm.

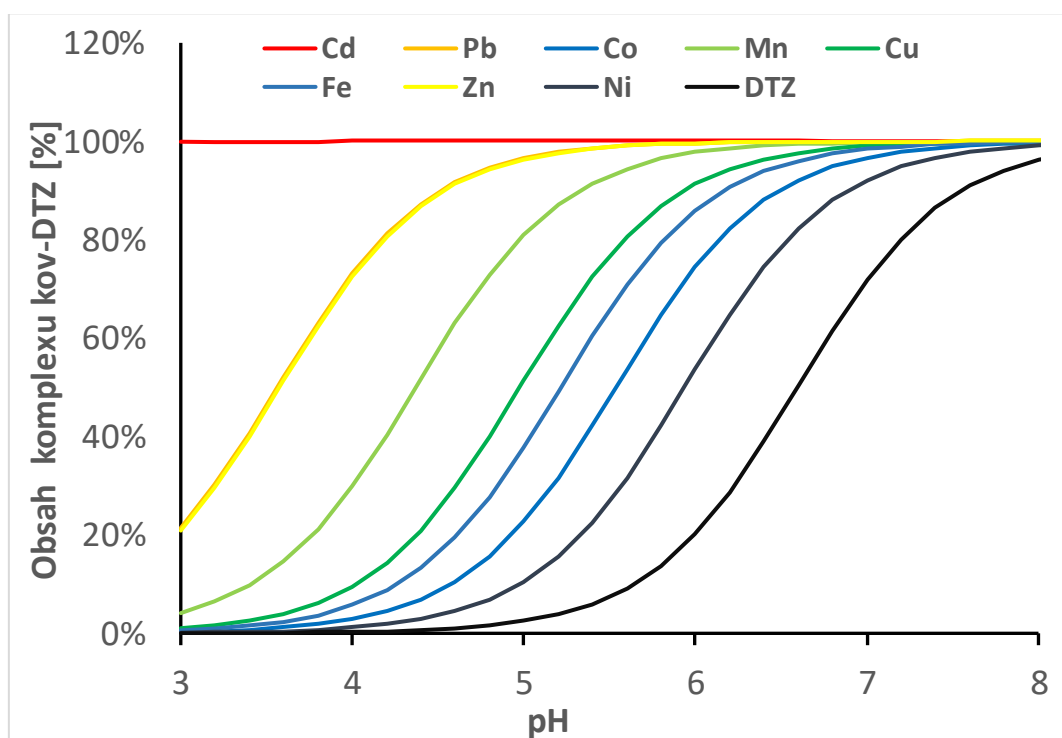


Obr.č.26: Spektrum všech kovů a DTZ při pH 8

5.7 Vliv pH na tvorbu komplexu

Na obrázku číslo 27 jsou křivky komplexů všech kovů z pohledu jejich vzniku při daném pH. Tyto křivky byly vytvořeny pomocí absorbance při vlnové délce, kde komplexy vykazují při pH8 své maximum. Byla použita Hahnsova metoda k vyhodnocení pH, kde se tento signál zvýšil nejvíce. Jedná se o hrubý odhad komplexace. Zde uvedené údaje jsou jen simulací. U některých kovů (např. měď) byly odečteny údaje: absorbance v maximu alkalické formy minus absorbance v maximu kyselé formy, tj. volný DTZ (aby byla data jasnější). Neuvažovala se spektra při pH 9 a 10 (kromě spekter volného DTZ), protože alkalická forma DTZ by se příliš překrývala, což vysvětluje „posun“ maxima pro nejvyšší hodnoty pH u mnoha testovaných kovů. Je zde možné porovnat, při kterém pH daný komplex kov-DTZ vzniká a je v roztoku stabilní. Z obrázku lze vyčíst, že olovnaté a zinečnaté kationty jsou z 50% komplexovány už při pH 3,5. Manganaté kationty se komplexují při pH 4,5 - tato hodnota ale není očekávaná, jelikož se Mn silně nekomplexuje. Měďnaté, železnaté, kobaltnaté a nikelnaté kationty se komplexují z 50% při pH 5-6. Kadmennaté kationty se komplexují už ze 100 % při pH 3.

Pro pozdější studii by bylo možné zvolit pH 3,5 => kyselina mravenčí, pH 5-6 a pH 8, jelikož většina kovů se z 50% komplexuje v kyselém pH. Výsledky pro hodnoty pH 9 a 10 byly často odlišné, protože spektrum bylo výrazně změněno překrytím samotným DTZ. Abychom zvýraznili rozdíl v barvě komplexu kov-DTZ a vyšší hodnoty pH, bylo by nejspíše nutné provést extrakci.



Obr. č. 27: Vliv pH na komplexaci kovů ve formě komplexu kov-DTZ

6. Závěr

Cílem této práce bylo vyvinout metodu založenou na LIS technice pro podrobné testování vzniku komplexů kov-DTZ v různých pH podmínkách a nalézt takové podmínky, při kterých je možné spektrofotometricky odlišit komplex kov-DTZ od samotného činidla a případně komplexů jednotlivých kovů mezi sebou. Výběr testovaných kovů byl proveden na základě jejich typické přítomnosti ve vodě a také kvůli jejich častému použití při výrobě vodovodních trubek (Cu, Pb, Fe, Zn). Pufry byly vybrány na základě toho, aby nezasahovaly do komplexace, pouze ovlivňovaly pH. Bylo dokázáno, že se vybrané kovy komplexují s DTZ již při nízkých hodnotách pH, tudíž jsou méně odlišitelné mezi sebou a pro jejich selektivní rozlišení by bylo potřeba doplnit extrakční krok. Ze získaných výsledků vyplývá, že snadněji lze od sebe odlišit kationty kademnaté, zinečnaté, kobaltnaté, které mají v testovaném rozmezí pH odlišné vlnové délky maxima absorpčního pásu komplexu proti ostatním kovům a nepřekrývají se s jejich spektry komplexů kov-DTZ. Dále by bylo možné od sebe odlišit např. kadmium a nikel - mají podobná spektra, ale rozdílné pH, při kterém bude komplex kov-DTZ 50%, takže zde by rozdílné pH pomohlo rozlišení.

7. Seznam použité literatury

- [1] ŠEFC, Jakub. *Eliminace železa ve vodovodní síti*. Diplomová práce. Praha: ČVUT Praha, Fakulta stavební, katedra zdravotního a ekologického inženýrství, 2017.
- [2] <https://www.profivoda.cz/tezke-kovy-a-pesticidy-ve-vode/> (září 2024)
- [3] KACOVSKÁ, Andrea. Stanovení vybraných těžkých kovů elektrochemickými metodami. Plzeň, 2019. Bakalářská práce. ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI. Pedagogická fakulta
- [4] PIVONKOVÁ, Eliška. Koncentrace kobaltu v odpadních vodách a jeho odstraňování za využití umělého mokřadu. Č. Budějovice, 2016. bakalářská práce (Bc.). JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH. Zdravotně sociální fakulta
- [5] <https://arnika.org/toxicke-latky/databaze-latek/kobalt> (duben 2024)
- [6] <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2001-254#f2216962> (září 2024)
- [7] KOŽÍŠEK, František, Hana JELIGOVÁ a Vladimíra NĚMCOVÁ. HODNOCENÍ ZDRAVOTNÍCH RIZIK NIKLU V PITNÉ VODĚ. *Hygiena*. 2010, 55(2), 40-45.
- [8] <https://voda.tzb-info.cz/vlastnosti-a-zdroje-vody/10071-ucinnost-sorpcnich-materialu-na-odstraneni-niklu-i-jinych-kovu-z-vody> (duben 2024)
- [9] HOLEČEK, Jaroslav. Nikl z pohledu léčebné výživy. Brno, 2020. Bakalářská práce. Masarykova univerzita, Lékařská fakulta.
- [10] <https://www.chemickeprvky.cz/prvek/pb/> (duben 2024)
- [11] LANGHAMMEROVÁ, Lenka. Těžké kovy v Botiči: Porovnání současného stavu s minulostí. Praha, 2021. Bakalářská práce. ČVUT Praha, Fakulta stavební, Katedra zdravotního a ekologického inženýrství.
- [12] HAVEL, Bohumil. Riziko olova z pitné vody ve školských zařízeních Pardubického kraje. *Hygiena*. 2015, 60(2), 40-47.
- [13] <https://www.chemickeprvky.cz/prvek/fe/> (duben 2024)
- [14] DVOŘÁKOVÁ HAMPLOVÁ, Lenka. Problematika těžkých kovů v povrchových vodách na Blanensku. Brno, 2016. Bakalářská práce. Mendelova univerzita, Agronomická fakulta.
- [15] <https://www.upravvodu.cz/blog/zelezo-ve-vode> (duben 2024)
- [16] https://www.irz.cz/latky-v-irz/zinek-a-slouceniny-jako-zn#field_content_zakladni_informace (duben 2024)
- [17] <https://www.nextlab.cz/biolabkt-laboratorni-metodiky/HVEZDAABCO.htm> (duben 2024)

- [18] DAŇKOVÁ, Viktorie. Stanovení kontaminace vod těžkými kovy ve vybrané lokalitě. Zlín, 2021. Bakalářská práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta logistiky a krizového řízení, ochrana obyvatelstva.
- [19] <https://arnika.org/toxicke-latky/databaze-latek/med> (duben 2024)
- [20] <https://www.cistavoda.cz/blog/mangan-ve-vode-1/> (duben 2024)
- [21] http://hydrobiologie.upol.cz/uploads/files/05_metody_stanoveni_obsahu_kovu.pdf (duben 2024)
- [22] NAVRÁTILOVÁ, Adriana. Možnosti elektrochemické detekce těžkých kovů v potravinách. Zlín, 2019. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická, Ústav technologie potravin.
- [23] KABÁTOVÁ, Adriana. *Voltametrické techniky v praxi z analytické chemie*. Bakalářská práce. Brno: Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, 2020.
- [24] FRIES, J. a GETROST, H. Organic Reagents for Trace Analysis. E.Merck, Darmstadt, 1977.
- [25] SAVVIN, S.B. Organic Reagents in Spectrophotometric Analysis. Russian Chemical Reviews, 54 (11), 1985
- [26] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Dithizone#section=Related-Compounds> (září 2024)
- [27] HORSTKOTTE, Burkhard a SOLICH, Petr. The Automation Technique Lab-In-Syringe: A Practical Guide. Molecules 25(7) (2020) 1612.
- [28] ČÁSLAVSKÝ, Josef a ŠEVČÍK, Jiří. Organická analýza. Český Těšín: 2 THETA, 2022. ISBN 978-80-88279-17-4.
- [29] GUMUS, G.; FILIK, H. a DEMIRATA, B. Determination of bismuth and zinc in pharmaceuticals by first derivative UV–Visible spectrophotometry. Anal. Chim. Acta 547 (2005) 138–143.
- [30] MAHMOUD, Mohamed E.; OSMAN, Maher M. a HAFEZ, Osama F. Removal and preconcentration of lead (II) and other heavy metals from water by alumina adsorbents developed by surface-adsorbed-dithizone. Desalination 251 (2010) 123–130.
- [31] ŠRÁMKOVÁ, Ivana H. ;HORSTKOTTE, Burkhard. Direct-immersion single-drop microextraction and in-drop stirring microextraction for the determination of nanomolar concentrations of lead using automated Lab-In-Syringe technique. Talanta 184 (2018) 162–172.

- [32] OZTURK, Birsen Demirata; FILIK, Hayaty; TUTEM, Esmá. Simultaneous derivative spectrophotometric determination of cobalt(II) and nickel(II) by dithizone without extraction. *Talanta* 53 (2000) 263–269.
- [33] CATAPANO, Maria Carmen a TVRDÝ, Václav. A simple, cheap but reliable method for evaluation of zinc chelating properties. *Bioorganic Chemistry* 77 (2018) 287–292.
- [34] ZARGOOSH, Kiomars a BABADI, Fatemeh Farhadian. Highly selective and sensitive optical sensor for determination of Pb²⁺ and Hg²⁺ ions based on the covalent immobilization of dithizone on agarose membrane. *Spectrochim. Acta Part A: Mol. Biomol. Spectrosc.* 137 (2015) 105–110.
- [35] YIN, Changhai. Sensitive determination of trace mercury by UV–visible diffuse reflectance spectroscopy after complexation and membrane filtration–enrichment. *J. Hazard. Mater.* 233–234 (2012) 207–212.
- [36] SAFAVI, Afsaneh a BAGHERI, M. Design and characteristics of a mercury (II) optode based on immobilization of dithizone on a triacetylcellulose membrane. *Sensors and Actuators B* 99 (2004) 608–612.
- [37] SHAYESTEHEH, Tavakol Heidari; KHAJAVI, Farzad a KHOSROSHAHI, Abolfazl Ghafuri. Development and validation of a novel, simple, and accurate spectrophotometric method for the determination of lead in human serum. *Environ. Monit. Assess.* 188 (2016) 7.
- [38] https://www.chemicalbook.com/CASDetailList_29600_EN.htm (září 2024)

8. Přílohy

Příloha č.1: Ovládací program pro měření spektra komplexu kov-DTZ

CavroXC Command (?) K0R

Hardware Settings Wavelength 1 (nm) 512
Hardware Settings Wavelength 2 (nm) 550
Hardware Settings Wavelength 3 (nm) 608
Hardware Settings Wavelength 4 (nm) 700
Hardware Settings Integration Time (msec) 5
Hardware Settings Samples to Average 50
Hardware Settings Detectors to Average 5
Hardware Settings Scan Rate (Hz) 10
Hardware Settings Use Wavelength 4 as Reference

'Head valve: OUT - Waste / Middle (O2R) - Detection cell / IN: Autosampler

'Autosampler rack 1:

'1: 1: Needle wash / 2: - / 3: - / 4-12: Buffer

'Autosampler rack 2:

'1: Needle wash / 2: Water / 3: DTZ / 4: Isopropanol / 5-XY: Sample

Contact Closure Off

Autosampler rack 2 (sample #) 1

autosampler Up

Variable Define New PosRack1_Buffer

Variable Define New PosRack1_Sample

Variable Define New PosRack2

Variable Define New **PosRack2_Sample**

'Emptying syringe to waste

CavroXC Command (?) O4R

CavroXC Flowrate (microliter/sec) 250

CavroXC Valve Out

CavroXC Empty

CavroXC Delay Until Done

PosRack2 = 2

Insert File C:\Users\Obsluha\Desktop\Matlova-Dithizone\Methods with Autosampler\Routine_CleanDetectorWithRefV4.fia

'Cleaning of syringe pump and detector with isoPrOH

PosRack2 = 4

Insert File C:\Users\Obsluha\Desktop\Matlova-Dithizone\Methods with Autosampler\Routine_CleanSyringe_from_Rack_2V4.fia

Insert File C:\Users\Obsluha\Desktop\Matlova-Dithizone\Methods with Autosampler\Routine_CleanDetectorV4.fia

'Cleaning of Syringe and detection cell with water and reference measurement

PosRack2 = 2

Insert File C:\Users\Obsluha\Desktop\Matlova-Dithizone\Methods with Autosampler\Routine_CleanSyringe_from_Rack_2V4.fia

Insert File C:\Users\Obsluha\Desktop\Matlova-Dithizone\Methods with Autosampler\Routine_CleanDetectorV4.fia

Insert File C:\Users\Obsluha\Desktop\Matlova-Dithizone\Methods with Autosampler\Routine_CleanDetectorWithRefV4.fia

PosRack2_Sample = 5

PosRack1_Sample = 2

Loop Start (#) 3

PosRack1_Buffer = 4

Loop Start (#) 8

Loop Start (#) 2

'Cleaning of syringe pump with isoPrOH

PosRack2 = 4

Insert File C:\Users\Obsluha\Desktop\Matlova-Dithizone\Methods with Autosampler\Routine_CleanSyringe_from_Rack_2V4.fia

'Cleaning of syringe pump with water

PosRack2 = 2

Insert File C:\Users\Obsluha\Desktop\Matlova-Dithizone\Methods with Autosampler\Routine_CleanSyringe_from_Rack_2V4.fia

'Aspirate Standard/Sample

autosampler rack 1 (sample #) 1

'autosampler rack 1 (sample #) PosRack1_Sample

autosampler rack 2 (sample #) PosRack2_Sample

CavroXC Command (?) O1R

CavroXC Flowrate (microliter/sec) 200

CavroXC Aspirate (microliter) 600 '1200

CavroXC Pump Delay Until Done

Delay (sec) 2

'Aspirate Buffer

autosampler rack 1 (sample #) 1

autosampler rack 1 (sample #) PosRack1_Buffer

CavroXC Flowrate (microliter/sec) 200

CavroXC Aspirate (microliter) 100 '200

CavroXC Delay Until Done

Delay (sec) 1

'Aspirate Water+Isopropanol 30% for dilution

autosampler rack 2 (sample #) 15

CavroXC Flowrate (microliter/sec) 200

CavroXC Aspirate (microliter) 900

CavroXC Delay Until Done

Delay (sec) 1

'Stirring on

Contact Closure On

'Aspirate Dithizone with IsoPrOH

autosampler rack 1 (sample #) 1

'autosampler rack 1 (sample #) 3

autosampler rack 2 (sample #) 3

Contact Closure On

CavroXC Flowrate (microliter/sec) 200

CavroXC Aspirate (microliter) 200 '400

CavroXC Delay Until Done

Delay (sec) 1

'Aspirate Air

autosampler Up

Contact Closure On

CavroXC Flowrate (microliter/sec) 100

CavroXC Aspirate (microliter) 400

CavroXC Delay Until Done

'Create vakuum

CavroXC Command (?) O3R

CavroXC Flowrate (microliter/sec) 100

CavroXC Aspirate (microliter) 400

CavroXC Delay Until Done

Delay (sec) 30

'Stirring off

Contact Closure Off

Delay (sec) 20

'Equilibrate pressure

CavroXC Flowrate (microliter/sec) 100

CavroXC Aspirate (microliter) 350

CavroXC Delay Until Done

'Emptying syringe to detection cell

CavroXC Command (?) O2R

CavroXC Flowrate (microliter/sec) 80

CavroXC Empty

Analyte New Sample

Spectrometer Absorbance Scanning

Delay (sec) 15

Spectrometer Spectra to File C:\Users\Obsluha\Desktop\Spectrum.fia

Delay (sec) 2

Spectrometer Spectra to File C:\Users\Obsluha\Desktop\Spectrum.fia

Delay (sec) 2

Spectrometer Spectra to File C:\Users\Obsluha\Desktop\Spectrum.fia

CavroXC Pump Delay Until Done

Spectrometer Stop Scanning

Loop End

PosRack1_Buffer += 1

Loop End

PosRack2_Sample += 1

Loop End

'Cleaning of syringe pump with isoPrOH

PosRack2 = 5

Insert File C:\Users\Obsluha\Desktop\Matlova-Dithizone-Methods with
Autosampler\Routine_CleanSyringe_from_Rack_2V4.fia

'Cleaning of syringe pump with water

PosRack2 = 2

Insert File C:\Users\Obsluha\Desktop\Matlova-Dithizone-Methods with
Autosampler\Routine_CleanSyringe_from_Rack_2V4.fia

autosampler Up

Procedure for cleaning of detector

autosampler rack 2 (sample #) PosRack2

Partially filling of syringe pump

CavroXC Command (?) O1R
CavroXC Flowrate (microliter/sec) 300
Contact Closure On
CavroXC Pump Aspirate (microliter) 1500
CavroXC Pump Delay Until Done

Aspiration of air

autosampler Up
Contact Closure On
CavroXC Flowrate (microliter/sec) 100
CavroXC Pump Aspirate (microliter) 400
CavroXC Pump Delay Until Done

Emptying syringe to waste

Contact Closure Off
CavroXC Command (?) O2R
CavroXC Pump Empty
CavroXC Pump Delay Until Done

Procedure for cleaning with a solution on the autosampler

autosampler rack 2 (sample #) PosRack2

Partially filling of syringe pump

CavroXC Command (?) O1R
CavroXC Flowrate (microliter/sec) 300
Contact Closure On
CavroXC Aspirate (microliter) 1000
CavroXC Delay Until Done

Aspiration of air

autosampler Up
Contact Closure On
CavroXC Flowrate (microliter/sec) 100
CavroXC Aspirate (microliter) 400
CavroXC Delay Until Done

Emptying syringe to waste

CavroXC Valve Out
Contact Closure Off
CavroXC Flowrate (microliter/sec) 300
CavroXC Empty
CavroXC Delay Until Done