

**SPEKTROFOTOMETRICKÉ STABOVENÍ SO<sub>4</sub> VE VODÁCH****Pracovní úkol**

1. **Vytvořte 2 kalibrační řady** pro stanovení šestimocného SO<sub>4</sub> a to v rozsahu koncentrací **5-40 mg/l** (po 5 mg/l).
2. **Na základě absorpční křivky SO<sub>4</sub> určete vhodnou vlnovou délku ( $\lambda$ ) s maximální absorbancí ( $A_{\max}$ )** pro kalibraci s kalibračním roztokem o střední hodnotě koncentrace (tj. pro první kalibrační řadu tj. 20 mg/l) jako „**blank**“ použijte roztok s koncentrací 0,0 mg/l (tj. jen destilovaná voda s přidanými činidly). Absorbanci proměřte v rozmezí vlnových délek **od 400 nm do 440 nm (po 10 nm tj.  $\lambda$  = 400; 410; 420; 430 a 440 nm)**. V programu Microsoft Office Excel vytvořte **absorpční křivku SO<sub>4</sub>**.
3. Proveďte **kalibraci přístroje** pro koncentrační rozsah SO<sub>4</sub> 5-40 mg/l, přičemž přímky neprochází počátkem!!!
4. Na základě kalibrace **stanovte koncentraci SO<sub>4</sub> v pitné a povrchové vodě**.
5. Na základě kalibrace **stanovte koncentraci SO<sub>4</sub> v modelovém vzorku**, který si sami připravíte podle zadané hodnoty vedoucím cvičení. Na základě změřené hodnoty **vypočtete chybu měření**.
6. V programu Microsoft Office Excel vytvořte **kalibrační přímkou** na základě zjištěných hodnot absorbance (A) a přímkou **proložte lineární regresi**, v grafu proto bude uvedena i **rovnice přímky**.
7. **V závěru** proveďte diskusi, zda jste správně provedli kalibraci přístroje pro stanovení SO<sub>4</sub> (viz statistické údaje kalibrační přímky); rovněž stanovíte chybu měření pro modelový vzorek. Hodnotu reálného vzorku posuďte podle platné legislativy!!
8. V protokolu musí být uvedeny veškeré výpočty pro přípravu jednotlivých roztoků a oba grafy.

**Reagencie:**

1. **Klimatizační činidlo:**  
V 1 000 ml odměrné baňce se smíchá 30 ml konc. HCl (POZOR ŽÍRAVINA), 300 ml destilované vody, 100 ml 95% ethanolu, 75 g NaCl a 50 ml glycerolu a promíchá se. **NEDOPLŇUJTE NA OBJEM 1000 ml!!!**
2. **Chlorid bárnatý**, BaCl<sub>2</sub>, krystalky o zrnitosti 20 - 30 mm.
3. **Zásobní roztok síranu o koncentraci 1000 mg/l:**  
V odměrné baňce o objemu 1 000 ml se rozpustí 1,7426 g bezvodého K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> v destilované vodě a doplní se destilovanou vodou po značku. (Slouží **PŘÍMO** pro přípravu **KALIBRAČNÍCH ROZTOKŮ!!!!**).
4. **Modelový vzorek s daným obsahem SO<sub>4</sub>** student si připraví sám z pracovního roztoku. Příslušná koncentrace bude zadána vedoucím cvičení (**výpočet uvést v protokolu**).
5. **Vzorek pitné vody** – dostupný na J218, případně si může student donést vlastní vzorek. Pozor, odběr vzorku nesmí být starší 24 h!!!!
6. **Sorpcí kolona s aktivovaným sorbentem**

**SPEKTROFOTOMETRICKÉ STABOVENÍ SO<sub>4</sub> VE VODÁCH***Teorie a princip*

**Ultrafialová (UV) a viditelná (Vis) spektrometrie** patří mezi fyzikálně chemické instrumentální metody analýzy. Podstatou UV a Vis spektrometrie je absorpce UV a Vis záření (200 - 800 nm) zředěnými roztoky. Při absorpci dochází k excitaci valenčních elektronů. Tato spektra proto nazýváme elektronová a spektrometrii elektronovou spektrometrii. Nejnáročnější jsou přechody mezi elektronovými energetickými hladinami. K těmto přechodům dochází při absorpci UV (190 až 400 nm) a Vis záření (400 až 800 nm).

Absorpční spektrální analýza v UV a Vis oblasti se může rozdělit na několik částí, podle využití přístrojové techniky:

- Spektrofotometrie (UV, Vis oblast);
- Fotometrie (Vis oblast);
- Kolorimetrie (Vis oblast).

**Spektrofotometrie** je založena na interakci mezi elektromagnetickým zářením a molekulou stanovované látky, kterou dané elektromagnetické záření prošlo. Pokud měřená látka je schopná absorbovat elektromagnetické záření, bude se prošlý tok lišit od vstupního. Úkolem spektrofotometrie je studovat, při jakých vlnových délkách a k jak intenzivnímu pohlcení došlo.

Molekuly mají schopnost pohlcovat elektromagnetické záření pouze určitých vlnových délek. Je to dáno tím, že mohou existovat jen v určitých kvantových stavech, které se liší obsahem energie. Jestliže má molekula přejít ze stavu s nižší energií do stavu s energií vyšší musí absorbovat záření o frekvenci  $\nu$ , která právě odpovídá rozdílu energií mezi energetickými hladinami  $E_p$  a  $E_q$  obou kvantových stavů podle **Planckovy podmínky**:

$$\Delta E = E_p - E_q = h \cdot \nu = \frac{h \cdot c}{\lambda}$$

kde je:

$c$  rychlost světla,

$\lambda$  vlnová délka,

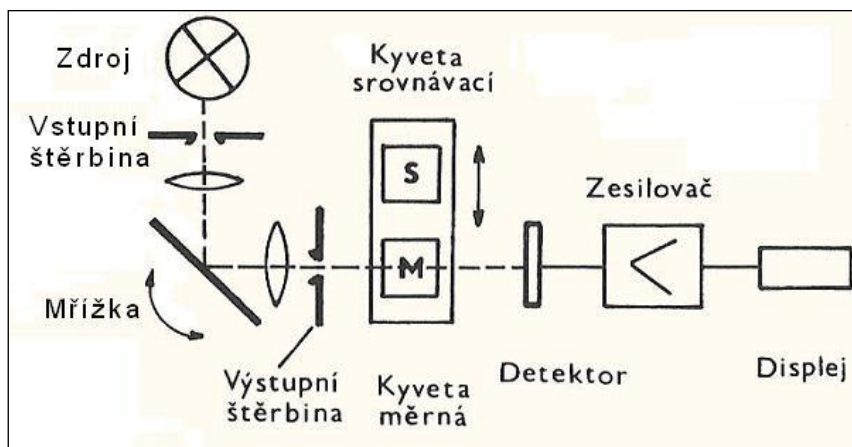
$h$  Planckova konstanta ( $6,626 \cdot 10^{-34}$  J/s);

Podle konvence je excitovaná hladina označována indexem  $p$  (horní hladina), základním indexem  $q$  (spodní hladina).

**Absorpce záření se měří** na přístrojích, které se nazývají **absorpční spektrofotometry**. **Spektrofotometr** je jen **jednopaprskový** a měří jen vystupující tok záření. Proto je třeba provést dvě měření, kdy **vedle měření vlastního vzorku  $\Phi$ , měříte ještě slepý** (srovnávací pokus)  $\Phi_0$ , u kterého nedochází k absorpci (tzn. prošlý tok  $\Phi$  je stejný jako dopadající tok  $\Phi_0$ ).

Při absorpčním měření se pro stanovenou vlnovou délku porovnává tok záření  $\Phi$  prošlý měrnou kyvetou s tokem záření  $\Phi_0$ , prošlým kyvetou s čistým rozpouštědlem nebo slepým pokusem. Vstupující tok záření  $\Phi_0$ , jehož hodnota není pro měření významná, je vždy absolutně vyšší o podíl odraženého nebo rozptýleného záření  $\Phi_A$ .



**SPEKTROFOTOMETRICKÉ STABOVENÍ SO<sub>4</sub> VE VODÁCH**

Obrázek č. 1: Složení absorpčního spektrofotometru

Síranový ion lze převést na suspenzi síranu barnatého. Výsledný zákal je pak určen pomocí spektrofotometrického stanovení na základě vytvořené kalibrační přímky. Pokud je vzorek zakalen nebo zabarven, spektrofotometrické stanovení nelze použít, protože je zatíženo chybou měření.

Metoda stanovení koncentrace síranů je použitelná pro pitnou a povrchovou vodu, ale také domácí a průmyslové odpady. Metoda je vhodná pro všechny koncentrační rozsahy síranů v koncentračním rozsahu, který nepřesahuje koncentraci 40 mg SO<sub>4</sub>/l. minimální detekovatelná hodnota koncentrace SO<sub>4</sub> ve vodách je 1 mg/l.

**Postup****Úkol č. 1: Příprava kalibrační řady SO<sub>4</sub> v koncentračním rozmezí 5-40 mg/l**

- Pro přípravu kalibrační řady **použijte PŘÍMO ZÁSOBNÍ ROZTOK O KONCENTRACI 100 mg/l!!!** Vypočítejte si objemy ( $V_{ZR}$ ), které máte odpipetovat ze zásobního roztoku pro zadanou kalibrační řadu tj. o koncentraci 0,0 mg/l; 5 mg/l; 10 mg/l; 15 mg/l; 20 mg/l, 25 mg/l, 30 mg/l, 35 mg/l a 40 mg/l. Pro výpočet použijte následující rovnici:

$$V_{PR} \cdot \rho_{PR} = V_{KR} \cdot \rho_{KR} \quad (1)$$

kde je:

$V_{PR}$  pipetovaný objem pracovního roztoku **ml** (chceme vypočítat, bude se pipetovat);

$\rho_{PR}$  koncentrace zásobního roztoku **mg/l** ( $\rho_{PR} = 100$  mg/l);

$V_{KR}$  konečný objem kalibračního roztoku **ml**; (spočítat na objem,  $V_{KR} = 50$  ml)

$\rho_{KR}$  koncentrace kalibračního roztoku **mg/l** (v našem případě tj. postupně 0,0-40,0 mg/l).

**Výpočet pro přípravu kalibračního roztoku o koncentraci 5 mg/l:**Tabulka č. 1: Kalibrační řada v koncentračním rozsahu SO<sub>4</sub> 0,0-40 mg/l

$\rho_{KR}$ mg/l	$V_{PR}$ ml
0,0	
5	
10	

**SPEKTROFOTOMETRICKÉ STABOVENÍ SO<sub>4</sub> VE VODÁCH**

15	
20	
25	
30	
35	
40	

**Úkol č. 2: Vznik zákalu síranu barnatého**

1. Do odměrné baňky o objemu 100 ml odpipetujte vypočtené množství pro příslušné koncentrace vypočtené, viz úkol č. 1. Pro **SLEPÉ STABOVENÍ** tzv. **BLANK** se místo SO<sub>4</sub> použije jen destilovaná voda a činidla!!!! doplníme po rysku destilovanou vodou na objem 100 ml. Pak se přidá 5,0 ml klimatizačního činidla (činidlo 1) a promícháme. Takto upravené roztoky přelijeme do malých Ehrlenmayerových baněk a dáme míchat na magnetickou míchačku po dobu 4 min.. Během míchání se přidá k míchajícímu se roztoku do každého vzorku 2 odměrné lžičky chloridu barnatého (BaCl<sub>2</sub>) a dobře rozpustíme. Vzorek se měří po 5 min. jako zákal.

**Úkol č. 3: Volba vhodné vlnové délky pro kalibraci**

1. Z připravené kalibrační řady (po 4 min. míchání) vyberte kalibrační roztok o koncentraci **0 mg/l** (bude „blank“) a **20 mg/l SO<sub>4</sub>** a **proměřte absorbanci při vlnových délkách od 400 do 440 nm** (postupně po 10 nm) v **malé kulaté kyvetě**. Vzorek se měří po 5 min. jako zákal. Viz úkol č. 2.
2. **Vyberte vlnovou délku, při které má kalibrační roztok o koncentraci 20 mg/l NEJVYŠŠÍ ABSORBANCI.** Tuto maximální vlnové délky ( $\lambda_{\max}$ ) použijte pro další vlastní měření kalibrační křivky a stanovení SO<sub>4</sub> ve vzorcích.

Tabulka č. 2: Volba vhodné vlnové délky pro kalibraci SO<sub>4</sub> v koncentračním rozsahu 5 – 40 mg/l

$\lambda$ nm	Absorbance
400	
410	
420	
430	
440	

**Úkol č. 4: Kalibrace spektrofotometru pro stanovení SO<sub>4</sub>**

1. Postupně (od nejmenšího obsahu SO<sub>4</sub> tj. 5-40 mg/l) budete **nalévat kalibrační roztoky do malé kulaté kyvety** (vždy víčko zašroubujte a přešetěte čistým hadříkem, aby byla kyveta dokonale průhledná a nebyla tak zkreslena absorbance měřeného roztoku) a vkládat do spektrofotometru, kde budete proměřovat kalibrační roztoky při vlnové délce, kterou jste si určili v úkolu č. 3. Nejdříve vždy před měřením propláchněte kyvetu kalibračním roztokem, který budete měřit. Kyvetu stačí naplnit do  $\frac{3}{4}$ . Vzorek se měří po 5 min. jako **zákal**.
2. Pro vynulování spektrofotometru použijte slepý pokus tzv. blank (tj. destilovaná voda + všechna použitá činidla!!!!)

**SPEKTROFOTOMETRICKÉ STABOVENÍ SO<sub>4</sub> VE VODÁCH**

- Naměřené hodnoty zapište do Tabulky č. 3.
- Z naměřených hodnot koncentrace SO<sub>4</sub> (osa x) a absorbance (osa y) vytvořte pomocí programu Microsoft Excel graf kalibrační přímky, a to včetně jejich statistických parametrů.

Tabulka č. 3: Naměřené hodnoty absorbance a koncentrace SO<sub>4</sub> při λ=DOPLNIT nm

$\rho_{KR}$ mg/l	Absorbance
5	
10	
15	
20	
25	
30	
35	
40	

**Úkol č. 5: Úprava zrnitostní třídy, sorpce síranu**

- Pomocí přiložených sít vytvořte jednotlivé **zrnitostní třídy (0-0,5; 0,5-1; 1-2)** pro každý aktivovaný sorbent (**HCl a NaOH**) hydratovaného kalcium silikátu.
- Zrnitostně upravené sorbenty navažte na predvážkách na 35 g, 75 g a 100 g a nasypete do připravených filtračních kolon.
- Pres takto připravené filtrační kolony prolívejte modelový roztok síranu (1000 mg/l). Pro navážku 35 g prolívejte 1750 ml roztoku, pro 75 g navážku 3750 ml roztoku a pro 100 g navážku 5000 ml roztoku. Roztoky zachytáváme do suché kádinky.

**Úkol č. 6: Stanovení SO<sub>4</sub> v roztoku dané koncentrace a výpočet chyby měření**

- Budete používat kalibrační přímku, kterou jste si proměřili.
- Dle zadané koncentrace si do **100 ml odměrné baňky** odpipetuje vždy 1 ml zachycené vody s obsahem SO<sub>4</sub> a doplníte odměrnou baňku destilovanou vodou po rysku. Přelejeme do Ehrlenmayerových baněk a pokračujeme podle úkolu č. 2. (tj. 5,0 ml klimatizačního činidla, přídavek 2 odměrných lžiček BaCl<sub>2</sub> a míchat 4 min. na magnetické míchače).
- Měření provedete celkem 3× (tj. připraví se 3 roztoky z každé koncentrace a navážky!!!).** Pro výpočet chyby měření použijete průměrnou hodnotu. **Slepý pokus použijte z úkolu č. 2.**

Tabulka č. 4: Hodnoty absorbance a koncentrace SO<sub>4</sub> při λ=DOPLNIT nm

	$\rho_{SO_4}$ mg/l					
	HCl 1M			HCl 5M		
Navážka	35 g	75 g	100 g	35 g	75 g	100 g
1						
2						
3						
Průměr						

**SPEKTROFOTOMETRICKÉ STABOVENÍ SO<sub>4</sub> VE VODÁCH**

Navážka	ρ <sub>SO<sub>4</sub></sub> mg/l					
	NaOH 1M			NaOH 5M		
	35 g	75 g	100 g	35 g	75 g	100 g
1						
2						
3						
Průměr						

**Výpočet chyby měření**

Jediné měření k odhadu chyby nestačí – není s čím srovnávat!! Je proto třeba měřit vícekrát. Úkolem teorie chyb je tedy na základě souboru měření najít „nejlepší“ odhad  $x_0$  skutečné hodnoty  $x$  měřené veličiny  $X$  (v podstatě takový, aby rozptyl hodnot byl nejmenší) a určit jak přesný tento odhad je, tj. stanovit **absolutní** chybu  $\delta x_0$ . Tato chyba není odchylkou od skutečné hodnoty, ale charakterizuje velikost intervalu, v němž můžeme nějakou dohodnutou pravděpodobností očekávat, že bude skutečná hodnota ležet. Standardně se volí pravděpodobnost výskytu skutečné hodnoty v intervalu  $(x_0 - \delta x_0; x_0 + \delta x_0)$  rovna 0,683.

Výsledek pak uvádíme ve tvaru

$$x = x_0 \pm \delta x_0.$$

Kvalitu měření pak hodnotíme buď pomocí této absolutní chyby, nebo častěji pomocí chyby relativní, definované jako podíl absolutní chyby a odhadované hodnoty:

**Úkol č. 7: Stanovení SO<sub>4</sub> v reálném vzorku vody tj. pitná a povrchová voda**

1. Budete používat kalibrační přímku, kterou jste si proměřili.
2. Reálným vzorkem naplníme odměrnou baňku o objemu 100 ml cca do  $\frac{3}{4}$ . pak se přidá 5,0 ml klimatizačního činidla a necháme vzorek míchat po dobu 4 min. na magnetické míchačce. Pak přidáme a rozpustíme 2 odměrné lžičky BaCl<sub>2</sub> a pomocí vytvořené kalibrační přímky proměříme takto upravený vzorek pitné a povrchové vody.
3. Naměřené hodnoty síranu a jejich absorbance ve vzorcích vody zapište do Tabulky č. 5.

**Tabulka č. 5:** Hodnoty absorbance a koncentrace SO<sub>4</sub> ve vzorcích vody při  $\lambda = \text{DOPLNIT}$  nm

Vzorek	Absorbance	ρ <sub>SO<sub>4</sub></sub> mg/l
Povrchová voda (upřesnit lokalitu)		

**Závěr:** Odpověď na odstavec pracovní úkol a komentář k naměřeným hodnotám. K protokolu přiložte graf závislosti absorbance a stanovené koncentrace kalibračních roztoků orthofosforečnanů – kalibrační přímku, včetně jejich statistických parametrů.