

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2020

Bc. Lenka Hrodková

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Zavedení nové metody jako součást vyšetření kvality vod pro stanovení celkového fosforu a celkového dusíku iontovou chromatografií

Bc. Lenka Hrodková

Diplomová práce

2020

Univerzity of Pardubice
Faculty of Chemical Technology

Introduction of a new method as a part of water quality testing for determination
of total phosphorus and total nitrogen using ion chromatography.

Bc. Lenka Hrodková

Diploma thesis

2020

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2019/2020

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Lenka Hrodková**
Osobní číslo: **C18551**
Studijní program: **N1407 Chemie**
Studijní obor: **Analytická chemie**
Téma práce: **Zavedení nové metody jako součást vyšetření kvality vod pro stanovení celkového fosforu a celkového dusíku iontovou chromatografií**
Zadávající katedra: **Katedra analytické chemie**

Zásady pro vypracování

1. Proveďte literární rešerši zaměřenou na stanovení celkového fosforu a celkového dusíku metodou iont chromatografie.
2. V experimentální části nalezněte vhodné podmínky pro rozklad reálného vzorku s využitím U záření a zaveďte tuto metodu do provozu jako rutinní součást vyšetření kvality vod.
3. Dosažené výsledky kriticky zhodnoťte

Rozsah pracovní zprávy:
Rozsah grafických prací:
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů veducí práce.

Vedoucí diplomové práce: **doc. Ing. Petra Bajerová, Ph.D.**
Katedra analytické chemie

Konzultant diplomové práce: **Ing. Vladimír Alexi**
Zdravotní ústav Hradec Králové

Datum zadání diplomové práce: **5. února 2020**

Termín odevzdání diplomové práce: **7. května 2020**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Karel Ventura, CSc.
vedoucí katedry

Prohlášení autora

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnici Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně

V Pardubicích dne:

Lenka Hrodková

PODĚKOVÁNÍ

Chtěla bych poděkovat paní doc. Ing. Petře Bajerové, PhD., jako vedoucí diplomové práce, za podnětné poznámky, korekturu a návrhy ke zlepšení této práce, za práci a čas s tím spojený. Stejně tak děkuji panu Ing. Vladimírovi Aleximu, jenž byl konzultantem této diplomové práce, za to, že mne naučil jak správně operovat se všemi přístroji, jež jsou v této práci uvedeny. Dále rovněž děkuji za podnětné poznámky k práci.

Velké díky patří i Zdravotnímu ústavu se sídlem v Ústí nad Labem, konkrétně jeho zástupcům – pan Ing. Ivoš Šrámek, paní Ing. Kateřina Kárníková – za umožnění práce na diplomové práci.

ANOTACE

Tato práce obsahuje informace o celkovém fosforu a celkovém dusíku – konkrétně základní rozdělení sloučenin fosforu a dusíku v životním prostředí a jak se tyto sloučeniny chovají v životním prostředí. Dále jsou uvedeny hlavní emisní zdroje fosforu a dusíku do vod, a možné důsledky kontaminace vod těmito polutanty. Rovněž jsou zde uvedeny různé způsoby dekontaminace odpadních vod od těchto polutantů a laboratorní možnosti stanovení celkového fosforu a celkového dusíku ve vodách, zejména pak se zaměřením na iontovou chromatografii, které je rovněž věnována část této práce.

Cílem praktické části bylo zavedení nové metody pro rutinní stanovení celkového fosforu a celkového dusíku ve vodách iontovou chromatografií s rozkladem vzorku pomocí UV záření a oxidačních činidel podle norem ČSN EN ISO 15681-1 (75 7464) – Jakost vod – Stanovení orthofosforečnanů a celkového fosforu průtokovou analýzou (FIA a CFA) – Část 1: Metoda průtokové injekční analýzy (FIA) a ČSN ISO 29441 (75 7526) – Jakost vod – Stanovení celkového dusíku po rozkladu UV zářením: Metoda průtokové analýzy (CFA a FIA) se spektrometrickou detekcí.

KLÍČOVÁ SLOVA

Celkový fosfor; celkový dusík; čištění odpadních vod; stanovení sloučenin fosforu; stanovení sloučenin dusíku; iontová chromatografie

TITLE

Introduction of a new method as a part of water quality testing for determination of total phosphorus and total nitrogen using ion chromatography.

ANNOTATION

This thesis contains informations about total phosphorus and total nitrogen – specifically basic informations about distribution of phosphorus and nitrogen compounds in environment and how these compound behave in the environment. Next are mentioned main emission sources of phosphorus and nitrogen to water, and possible consequences of contamination of these pollutants. Also are mentioned various methods of wastewater decontamination of these pollutants

and laboratory possibility of quantification of compounds of phosphorus and nitrogen, especially focusing on ion chromatography, which i also devoted a part of this thesis.

The goal of practical part was an itroduction of new method for routine quantification of total phosphorus and total nitrogen by ion chromatography with sample disintegration using UV radiation and oxidizing agent according to norm ČSN EN ISO 15681-1 (75 7464) – Water qaulity – Quantification of orhophosphates and total phosphorus using flow analysis (FIA and CFA) – Part 1: Flow Injection Analysis method. And ČSN ISO 29441 (75 7526) – Water quality – Quantification of total nitrogen after disintegration using UV radiation: flow analysis method (CFA and FIA) with spectrophotometric detection.

KEYWORDS

Total phosphorus; total nitrogen; water treatment; quantification of phosporus compounds; quantification of nitrogen compounds; ion chromatography

Obsah

Úvod	17
I Teoretická část	18
1.1 Celkový fosfor:	18
1.1.1 Fosfátový cyklus	18
1.1.2 Zdroje fosforu:	19
1.1.3 Důsledky kontaminace fosfáty	22
1.2 Celkový dusík	23
1.2.1 Koloběh dusíku	24
1.2.2 Emisní zdroje celkového dusíku do vod	26
1.2.3 Důsledky kontaminace dusíkatými látkami:	28
1.3 Dekontaminace vod od fosforu a dusíku	28
1.3.1 Popis čištění odpadních vod	28
1.3.2 Defosfatace	29
1.3.3 Odstranění dusíku:	30
1.4 Možnosti stanovení různých skupin sloučenin fosforu	32
1.4.1 Spektrální stanovení	33
1.4.2 Iontová chromatografie	34
1.5 Možnosti stanovení různých skupin sloučenin dusíku	35
1.5.1 Spektrální stanovení:	36
1.5.1.1 Stanovení amonných iontů:	36
1.5.1.2 Stanovení dusitanů:	37
1.5.1.3 Stanovení dusičnanů:	37
1.5.2 Elektrochemická stanovení:	38

1.5.2.1	Ostatní metody	38
1.5.2.2	Iontová chromatografie	39
1.6	HPLC s iontoměničovou kolonou	39
1.6.1	Základní princip HPLC	39
1.6.2	Iontová chromatografie	40
1.6.2.1	Iontoměničové kolony	40
1.6.2.2	Iontová výměna	42
1.6.2.3	Detektory	44
1.6.2.4	Supresor	45
1.7	Validace metody	46
1.7.1	Linearita kalibrace	46
1.7.2	Meze stanovitelnosti a meze detekce	46
1.7.3	Robustnost	47
1.7.4	Opakovatelnost, reprodukovatelnost	47
1.7.5	Správnost	48
1.7.6	Nejistota měření	48
2	Praktická část	49
2.1	Cíl praktické části:	49
2.2	Obecný postup při zavádění nové metody:	49
2.3	Princip stanovení celkového dusíku a celkového fosforu ve vodách:	50
2.4	Iontový chromatograf:	51
2.5	Použité chemikálie:	53
2.5.1	Chemikálie pro přípravu aniontů:	53
2.5.2	Chemikálie pro přípravu oxidačních činidel a pufrů:	54

2.5.3	Chemikálie pro přípravu mobilní fáze:	54
2.6	Použité roztoky a jejich příprava:	54
2.6.1	Příprava aniontů:	54
2.6.2	Příprava mobilní fáze:	55
2.6.3	Příprava oxidačních činidel a pufrů:	55
2.7	Příprava kalibrace 1:	56
2.8	Kontrola kvality pomocí standardních roztoků:	58
2.9	Sestavení potřebné aparatury:	60
2.10	Ověření hydrolyzy na připraveném standardu pouze s použitím UV-C:	61
2.11	Ověření hydrolyzy na připraveném standardu s použitím UV-C s přidavkem činidla:	62
2.12	Měření celkového dusíku a celkového fosforu v reálném vzorku vody:	62
2.13	Úprava průtokového systému pro rozklad vzorku:	64
2.14	Příprava kalibrace 2:	65
2.15	Měření vzorku reálné vody po změně rozkladné aparatury:	66
2.16	Měření dalších reálných vzorků:	67
2.17	Příprava podkladových dat pro validaci metody:	67
3	Výsledky a diskuze:	70
3.1	Vyhodnocení kalibrace 1:	70
3.2	Vyhodnocení standardních vzorků dusičnanů a fosforečnanů měřených v kalibraci 1, jako kontrola kvality	73
3.3	Vyhodnocení standardních vzorků celkového fosforu a celkového dusíku jako kontrola kvality rozkladu pomocí UV-C záření:	76
3.4	Hodnocení výtěžnosti pro použitá činidla s jejich různým poměrem k objemu vzorku pro celkový dusík:	79
3.5	Vyhodnocení měření vzorku reálné vody:	79

3.6	Vyhodnocení upravení systému pro rozklad vzorku:	80
3.7	Vyhodnocení kalibrace 2:	81
3.8	Vyhodnocení měření vzorků reálné vody po změně aparatury:	84
3.9	Vyhodnocení validačních dat:	85
3.9.1	Vyhodnocení linearity kalibrace:	85
3.9.2	Vyhodnocení meze detekce a meze stanovitelnosti pro celkový dusík a celkový fosfor: 86	
3.9.3	Vyhodnocení robustnosti metody:	87
3.9.4	Vyhodnocení opakovatelnosti a reprodukovatelnosti metody:	88
3.9.5	Vyhodnocení nejistoty měření:	88
4	Závěr.....	89
5	Citovaná literatura	90
6	Přílohy	96

Seznam ilustrací, tabulek a grafů:

Obrázek 1 - Rozdělení celkového fosforu vyskytujícího se v půdách	20
Obrázek 2 - Eutrofizace vod - Otavské rameno Orlíku 2004	23
Obrázek 3 - Rozdělení celkového dusíku v půdě	24
Obrázek 4 - Schéma ČOV Jihlava	29
Obrázek 5 - Různé přeměny amonného kationtu. (1- amonifikace; 2- amonné štěpení; 3- asimilace; 4- nitritace; 5- nitratice; 6- denitratace; 7- denitritace; 8- deamonifikace; 9 – anammox proces) ...	31
Obrázek 6 – Schéma vzniku polystyren-divinylbenzenu ze styrenu a divinylbenzenu	41
Obrázek 7 - Měřicí sestava - iontový chromatograf a autosampler	51
Obrázek 8 - Technické uspořádání toku mobilní fáze.....	52
Obrázek 9 - Původní aparatura pro rozklad vzorku	60
Obrázek 10 - Systém pro rozklad vzorku po úpravě.....	65
Obrázek 11 - Report z měření - Standardní vzorek nízké koncentrace kalibrace 1	74
Obrázek 12 - Report z měření - Standardní vzorek vysoké koncentrace - kalibrace 1	75
Obrázek 13 - Report z měření - Rozklad standardního vzorku na celkový fosfor pro 40ti minutách ozařování UV-C zářením	77
Obrázek 14 - Report z měření - Rozklad standardního vzorku na celkový dusík po 40ti minutách ozařování UV-C zářením	78
Tabulka 1 - příklady katexový a anexových substituentů	41
Tabulka 2 - Příprava zásobního roztoku pro kalibraci	57
Tabulka 3 - Pipetované objemy zásobního roztoku pro přípravu kalibračních roztoků a koncentrace jejich aniontů.....	57
Tabulka 4 - Příprava QC-VK roztoku.....	59
Tabulka 5 - Připravená koncentrace aniontů v roztoku QC-NK.....	59

Tabulka 6 - Historické hodnoty parametrů vzorku odpadní vody ze Synthesia, a.s., Sementin.....	63
Tabulka 7 - Příprava základního roztoku ke kalibraci	66
Tabulka 8 - Příprava kalibračních roztoků ze základního kalibračního roztoku.....	66
Tabulka 9 - Zvolené koncentrace pro testování opakovatelnosti a reprodukovatelnosti.	68
Tabulka 10 - Naměřené plochy píků v kalibraci 1 pro dusičnany a fosforečnany.....	70
Tabulka 11 - Připravené a naměřené koncentrace kalibračních roztoků pro dusičnany a fosforečnany.	72
Tabulka 12 - Nalezené koncentrace testovaného standardu celkového dusíku před a po zvýšení teploty v křemenné kádince.....	80
Tabulka 13 - Vliv chlazení na správnost výsledku celkového dusíku.	80
Tabulka 14 - Naměřené plochy píků v kalibraci 1 pro dusičnany a fosforečnany.....	81
Tabulka 15 - Připravené a naměřené koncentrace kalibračních roztoků pro celkový dusík a celkový fosfor.	83
Tabulka 16 - Data pro výpočet LOD pro dusičnany a fosforečnany.	86
Graf 1 - Kalibrační závislost pro dusičnany - kalibrace 1.....	71
Graf 2 - Kalibrační závislost pro fosforečnany - kalibrace 1.	72
Graf 3 - Kalibrační závislost pro dusičnany - kalibrace 2.....	82
Graf 4 - Kalibrační graf pro fosforečnany - kalibrace 2.....	83

Seznam zkratk:

API-MS = hmotnostní spektrometrie s ionizací za atmosférického tlaku

ATP = adenosintrifosfát

CFA = kontinuální průtoková analýza

CRM = certifikovaný referenční materiál

ČIA = český institut akreditace

ČOV = čistička odpadních vod

DNA = deoxyribonukleová kyselina

FIA = Průtoková injekční analýza

HPLC = vysokoúčinná kapalinová chromatografie

ICP-MS = hmotnostní spektrometrie s ionizací v indukčně vázaném plazmatu

ICP-OES = optická emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem

IMP = inositolmonofosfát

LOD = mez detekce

LOQ = mez stanovitelnosti

MŽP = Ministerstvo životního prostředí

PAO = fosfor akumulující organizmy

QC-NK = kontrola kvality – nízká koncentrace

QC-VK = kontrola kvality – vysoká koncentrace

QC vzorky = kontrolní vzorky

R = korelační koeficient

RNA = ribonukleová kyselina

SOP = standardní operační postup

STD – VK = standardní vzorek o vysoké koncentraci

STD – NK = standardní vzorek o nízké koncentraci

TOC = celkový organický uhlík

TON = celkový organický dusík

Úvod

Celkový fosfor a celkový dusík jsou jedny z parametrů, které indikují kvalitu odpadních vod. Jejich nadbytek může být způsoben mimo jiné nadměrným používáním hnojiv, pracích prášků, nebo fekálním znečištěním. Velký problém může tento druh kontaminace vyvolat například tehdy, kontaminují-li odpadní vody studny, a studniční voda je následně konzumována. Dalším velkým problémem je zvýšení hodnot celkového fosforu a celkového dusíku v povrchových vodách, kde může nastat tzv. eutrofizace.

Pro čističky odpadních vod je tedy důležité znát hodnotu těchto parametrů u čištěných vod před jejich opětovným vypuštěním do vod povrchových.

V laboratořích je několik možností, jak stanovit celkový fosfor a celkový dusík. Zcela nejčastějšími metodami jsou metody spektrofotometrické, ale je možno i využít iontové chromatografie, či elektrochemických stanovení.

Cílem praktické části bylo zcela od základů zavést novou metodu pro stanovení celkového dusíku a celkového fosforu v odpadních vodách do rutinního provozu podle normy ČSN EN ISO 15681-1 (75 7464) – Jakost vod – Stanovení orthofosforečnanů a celkového fosforu průtokovou analýzou (FIA a CFA) – Část 1: Metoda průtokové injekční analýzy (FIA) a podle normy ČSN ISO 29441 (75 7526) – Jakost vod – Stanovení celkového dusíku po rozkladu UV zářením – Metoda průtokové analýzy (CFA a FIA) se spektrometrickou detekcí.

1 Teoretická část

Celkový dusík a celkový fosfor jsou jedny ze skupinových analytických ukazatelů, jejichž hlavní význam spočívá ve sledování kvality odpadních vod a zároveň jsou to dvě hlavní půdní živiny. Jejich přítomnost je tedy důležitá pro dostatečnou funkci a růst mikroorganismů a rostlin, a zároveň jsou to částeční ukazatelé znečištění.

1.1 Celkový fosfor:

Celkový fosfor je skupinový analytický ukazatel. Je to hlavní limitující prvek buněčného růstu, proto je nezbytnou součástí určitých hnojiv (viz dále) [1].

Ze stejného důvodu ovšem může jeho nadbytek způsobovat přemnožení sinic a řas. Proto se jeho stanovení provádí zejména v odpadních vodách a přírodních vodách (rybníky, vodní nádrže...).

1.1.1 Fosfátový cyklus:

Fosfor se v přírodě volně pohybuje pouze v litosféře, hydrosféře a pedosféře. Do atmosféry se nedostává (až na speciální výjimky).

Pohyb fosforu v přírodě lze popsat fosfátovým cyklem, který lze rozdělit na dvě části – malý a velký cyklus. Celý cyklus lze popsat čtyřmi body [2]:

- Malý cyklus:
 - 1) Eroze minerálů a uvolnění molekul fosfátů do půdy (do vody),
 - 2) Absorpce fosfátů rostlinami (řasami),
- Velký cyklus:
 - 3) Sedimentace v oceánech, vznik hornin,
 - 4) Vyzvednutí hornin do hor.

Základním zdrojem fosforu, jak již bylo zmíněno výše, jsou horniny a minerály. Ty jsou vlivem eroze postupně rozloženy na menší a menší částice až molekuly. V půdě jsou molekuly fosfátů absorbovány rostlinami. Rostliny poskytují potravu pro nejrůznější vyšší organizmy, kterými jsou, za pomoci

mikroorganismů, kompostovány, a tak se fosfáty dostávají zpět do půdy. Tento malý cyklus může pokračovat donekonečna. V momentě, kdy se fosfor dostane do nějaké vodní nádrže, moře nebo oceánu, může být malý cyklus stejným způsobem opakován. Fosfáty jsou absorbovány řasami, které tvoří plankton, potravu pro ryby, které ho zase vyloučí [3].

V případě, že nedojde ke znovuvyžití fosfátů, ukládají se na dnech oceánů do sedimentů, kde se nakonec přeměňují na horniny, a v rámci geologických proměn jsou vyzvednuty zpět do hor [4].

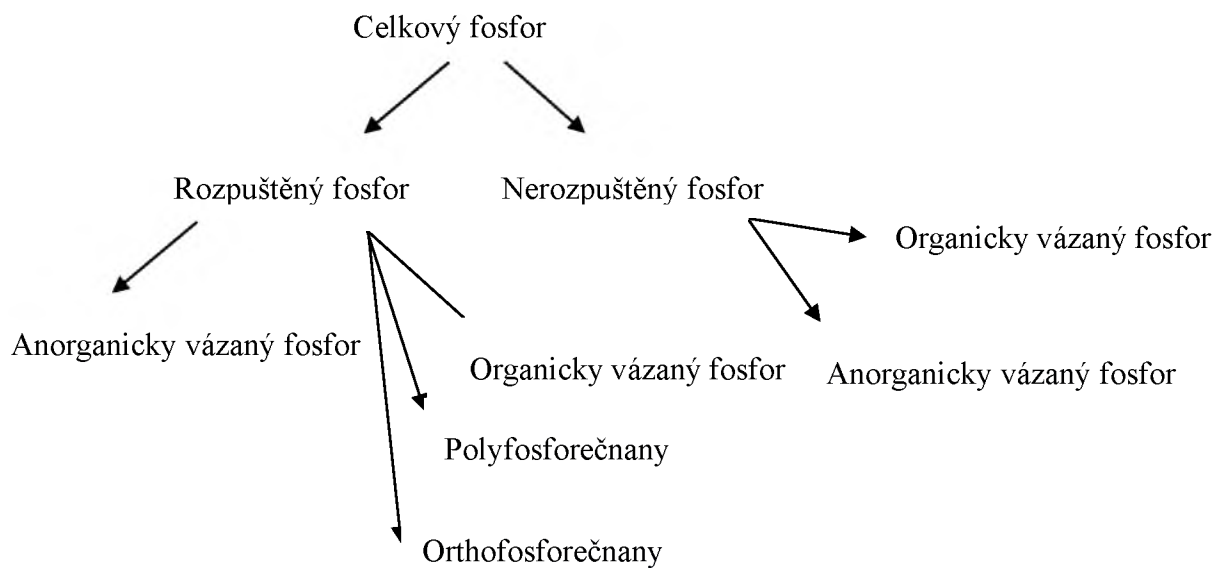
1.1.2 Zdroje fosforu:

V přírodě se fosfor vyskytuje pouze ve formě sloučenin různého původu. Podle tohoto původu se rozděluje na fosfor organický a anorganický.

Fosfor je klíčový prvek pro růst a dělení buněk. Je součástí mnoha biomolekul, jako např. ATP (adenosintrifosfát) nebo je součástí RNA (ribonukleová kyselina) a DNA (deoxyribonukleová kyselina).

Anorganický fosfor se rozděluje do dvou skupin, na polyfosforečnany a orthofosforečnany.

Rozdělení fosforu vyskytujícího se v půdách je na obrázku 1. Proto, aby rostlina mohla absorbovat půdní fosfor, musí být daná sloučenina fosforu rozpustná ve vodě. Většinou jsou ale přirozeně se vyskytující sloučeniny fosforu v půdách ve vodě nerozpustné, což je důvod k používání fosforečnanových hnojiv [4].



Obrázek 1 - Rozdělení celkového fosforu vyskytujícího se v půdách¹

Mezi hlavní emisní zdroje fosforu řadíme [5]:

- Sedimenty, minerály,
- Živočišný odpad,
- Hnojiva a pesticidy,
- Prací prášky.

Největším přírodním zdrojem fosforu jsou sedimenty. Z nich má konkrétně největší zastoupení minerál apatit, který se vyskytuje v různých formách. Např. jako chlorapatit $[\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{Cl}]$ nebo fluorapatit $[\text{Ca}_5\text{F}(\text{PO}_4)_3]$, od čehož se pak odlišuje i barevnost samotného minerálu. Mezi další minerální zdroje fosforu patří, kromě jiných, např. monazit (CePO_4) nebo vivianit $[\text{Fe}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 8 \text{H}_2\text{O}]$. Erozi hornin dochází k jejich postupnému rozpouštění ve vodě [6].

Dalším zdrojem fosforu jsou zbytky po degradaci buněk a živočišný odpad obecně. Jak již bylo řečeno, jedná se zpravidla o ATP, IMP (inositolmonofosfát), fosfolipidy, fosfátové

¹ Zdroj: Pivokonský M.: Hydrochemie-anorganické látky ve vodách: P, N, Si. Praha: ÚŽP PřF UK, 2017.

zbytky po odbourávání nukleonových kyselin, druhých poslů, apod. Specifická produkce fosforu člověkem je 2-3 g/den. Zvýšené hodnoty fosforu tedy můžou být i známkou fekálního znečištění [6].

Mezi další zdroje fosforu patří hnojiva a pesticidy. Fosforečná hnojiva patří k nejstarším používaným způsobům hnojení. Obecně se rozdělují na 4 kategorie [7]:

- Hnojiva s fosforem rozpustným ve vodě - superfosfáty,
- Hnojiva s fosforem rozpustným v citranu amonném - dikalciumfosfát,
- Hnojiva s fosforem rozpustným ve 2% kyselině citronové - Thomasova moučka,
- Hnojiva s fosforem rozpustným v silných kyselinách - kostní moučky, hyperfosfáty.

Pravděpodobně nejpoužívanějším hnojivem z těchto uvedených je superfosfát $[\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2]$. Je to zcela univerzální hnojivo používané před a po výsevu a na přihnojování [8].

Pesticidy odvozené od kyseliny fosforečné se nazývají organofosfáty. Mezi ně patří rovněž kontroverzně přijímaný herbicid glyfosát, což je účinná složka Roundupu. Mezi insekticidní organofosfáty patří např. malathion, parathion, diazinon a tetrachlorvinphos. Obecnou vlastností organofosfátů je, že mají strukturní podobnost s enzymem acetylcholin esteráza, tedy mají i potenciál ho blokovat [9].

Glyfosát inhibuje enzym 5-enoylpyruvylšikimát-3-fosfát syntáza, který je pro rostliny nezbytný k syntéze aromatických aminokyselin. U živočichů není podobná metabolická dráha, proto je považován za málo toxický, bez karcinogenních účinků pro živočichy. Výrazně větší problém ale je u ryb a obojživelníků, kteří jsou vůči glyfosátu citlivější [10,11].

V některých státech (Rakousko, Francie, USA) platí naprostý zákaz používání přípravku Roundup. V České republice je zakázána jeho plošná aplikace. Smí se použít pouze v případech, kdy není dostupné jiné řešení [12].

Obecně samozřejmě platí snaha používat takové látky, které jsou nejméně škodlivé k životnímu prostředí. Současně světově nejpoužívanější insekticid je Imidacloprid, který patří do skupiny neonikotinoidů [13].

Neonikotinoidy mají ovšem velmi nežádoucí účinky na včelstvo, proto se předpokládá, že místo těchto neonikotinooidů se přejde opět na organofosfáty, jelikož zatím není adekvátní náhrada [14].

Prací prášky a detergenty jsou dalším zdrojem fosforu. Konkrétně se tyto fosfáty nebo fosfonáty do pracích prášků přidávají jednak kvůli jejich pufrací schopnosti, kdy je při praní vyžadováno spíše alkalické pH. Dále jsou schopny vyvazovat kovové ionty. V případě vápníku, hořčíku a železa se pak jedná o změkčování vody. Fosfáty jsou schopny vyvazovat i těžké kovy. Udržují je tak v roztoku, čímž ochraňují vlákna textilií. Dále zabraňují zpětnému usazování nečistot [15].

Od září 2001 se výrobci detergentů a MŽP České republiky (Ministerstvo životního prostředí) dobrovolně dohodli, že od tohoto data už budou prodávat pouze prostředky s obsahem fosforu do 0,1% hmotnosti výrobku. Fosfáty byly nahrazeny zejména zeolitem [16].

1.1.3 Důsledky kontaminace fosfáty:

Hlavním důsledkem při nadbytku fosforu je eutrofizace vod (obrázek 2). Pro růst a tvorbu organismů je optimální poměr N:P, jakožto hlavních živin, 16:1. Ve většině stojatých vod je ale tento poměr větší než 16, což dělá z fosforu hlavní limitující prvek [5].

Zvýšeným příjmem fosforu tedy dochází k množení a růstu planktonu a mikroorganismů. Plankton je základem potravního řetězce pro ryby a celkově vodní ekosystém, takže v brzké fázi eutrofizace dochází ke zvýšení počtu ryb.

S přibývajícím množstvím fosforu se ovšem zrychluje proces buněčného stárnutí. Tím dochází k nerovnováze mezi tvořením nových organismů a kompostování těch odumřelých. Na vodní hladině se pak začíná tvořit vrstva sinic a vodních řas, tzv. vodní květ, díky němuž se ve vodě snižuje hladina rozpuštěného kyslíku a do vody pronikne méně světla. Toto má za následek snížení počtu ryb a dalších vodních organismů [17].



Obrázek 2 - Eutrofizace vod - Otavské rameno Orlíku 2004²

Fosfáty se rovněž mohou dostat do podzemních vod, kde mohou kontaminovat vodu ve studnách. V případě konzumace této vody mohou rovněž způsobovat zdravotní problémy, tj. hyperfosfatemii.

Normální hladina fosfátů v plazmě se pohybuje v rozmezí 0,6 – 1,7 mmol/l. Při hyperfosfatemii se tato hladina zvýší nad horní hranici. Fosfáty jsou v lidském těle úzce spojeny s metabolismem vápníku a kostí. V extrémním případě může hyperfosfatemii vést k hypokalcemii v plazmě, a tedy tetanii. Změnou vápníku v plazmě dochází k porušení rovnováhy pH, a může dojít jak k acidóze, tak i k alkalóze [18].

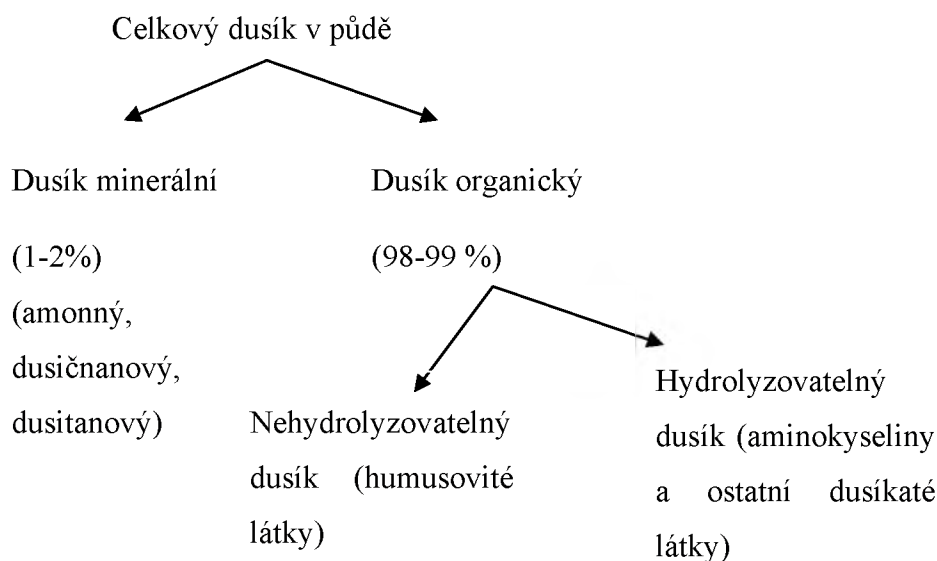
1.2 Celkový dusík:

Celkový dusík je skupinový analytický ukazatel, pomocí něž se hodnotí kvalita povrchových a odpadních vod.

Celkový dusík, stejně jako celkový fosfor, patří mezi hlavní živiny. Proto je součástí mnoha hnojiv. Chceme-li detailnější rozbor sloučenin, které utvářejí celkový dusík, můžeme dále stanovit anorganický dusík, organický dusík, dusitanový dusík, dusičnanový dusík, a amoniakální dusík. Základní rozdělení celkového půdního dusíku je na obrázku 3. Obecně má dusík, stejně jako fosfor,

² Zdroj: Havel Petr, Aktuálně.cz: Sinice zaplavují české vody, úřady mlčí. 2006, dostupné z: <https://zpravy.aktualne.cz/ekonomika/ceska-ekonomika/sinice-zaplavuji-ceske-vody-urady-mlci/r~i:article:152819/>

velmi omezenou existenci jednoduchých iontových prvků. Dusík se obecně může vyskytovat ve vodném prostředí v těchto formách: NO_3^- , N_2O_4 , NO_2^- , NO , N_2O , N_2 , NH_2OH , N_2H_4 , NH_3 [19].



Obrázek 3 – Rozdělení celkového dusíku v půdě³

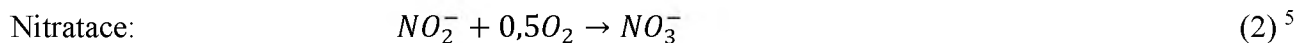
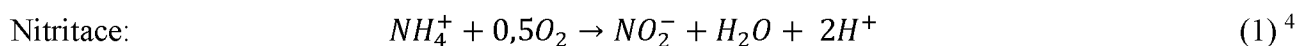
1.2.1 Koloběh dusíku:

Dusík, stejně jako uhlík a kyslík, je součástí tzv. biogeochemického cyklu, tj. neustálé výměny mezi atmosférou, pedosférou, biosférou a hydrosférou.

Prvotním zdrojem dusíku je zemská atmosféra, obsahující 78 % převážně elementárního dusíku N_2 . Do půdy se dusík dostává fixací prokaryotickými mikroorganismy (proces tzv. diazotrofie) nebo srážkami. V těchto bakteriích, popř. sinicích je elementární dusík přeměněn na amoniak, který se v reakci s vodou mění na amonný kationt (amonifikace).

Amonné kationty, stejně jako pak dusitany a dusičnany, už mohou být vstřebány rostlinami. Přeměnu amonných kationtů na dusitany a dusičnany zprostředkovávají nitrifikační bakterie (*Nitrosomonas*, *Nitrobacter*) postupnou nitritací (rovnice 1) a nitratací (rovnice 2). Tyto bakterie se vyskytují jak v půdě, tak i ve vodě, a mohou být symbionty bobovitých rostlin [20].

³ Zdroj: Ivanič J, Havelka B, Knop K.: Výživa a hnojení rostlin. Příroda Bratislava – SZN Praha, 1984. 487 s



V kterémkoliv kroku z tohoto cyklu může dojít ke strhnutí dusíkaté molekuly, ať už vodou, či erozí, do podzemních vod, kde může dojít ke kontaminaci.

Anorganický dusík vstřebaný rostlinou je dále využit k syntéze purinových a pyrimidinových bazí, jež jsou využity k syntéze DNA, RNA a aminokyselin. Z anorganického dusíku je tak vytvořen dusík organický [21].

Rostliny jsou potravou pro živočichy, kteří využívají dusík ke stejným účelům, tj. ke stavbě nukleonových kyselin a bílkovin. Podle dusíkatých odpadních produktů můžeme rozdělit živočichy do tří kategorií [22].

- Amonotelní živočichové – odpadním produktem nukleonových kyselin a aminokyselin je amoniak. (Zejména vodní živočichové),
- Urikotelní – vylučují kyselinu močovou (živočichové s omezeným kontaktem s vodou – plazi, ptáci),
- Ureotelní – vylučují dusík ve formě močoviny (savci).

Tyto odpadní produkty se tak dostanou zpět do půdy, či vody, kde je rozkladači, tj. bakterie a houby, přemění zpět na anorganický amoniak. Takto se může cyklus několikanásobně opakovat, až do té doby, dokud se amoniak nedostane k denitrifikačním bakteriím, které ho přeměňují zpět, na plynný dusík [20].

⁴ Zdroj: ASIO spol. s.r.o.: Aplikace nitritace – Anammox. Brno, dostupné Z: <https://www.asio.cz/cz/anammox-aplikace-nitrifikace-anammox>

⁵ Zdroj: ASIO spol. s.r.o.: Aplikace nitritace – Anammox. Brno, dostupné Z: <https://www.asio.cz/cz/anammox-aplikace-nitrifikace-anammox>

1.2.2 Emisní zdroje celkového dusíku do vod:

Mezi hlavní emisní zdroje dusíku patří:

- Hnojiva,
- Fekální znečištění, kompostování.

Hovoříme-li o kontaminaci životního prostředí dusíkem, pak jsou na prvním místě dusíkatá hnojiva. Jak již bylo zmíněno výše, dusík patří k hlavním biogenním prvkům. Vlivem nepříznivého počasí se ovšem dusík může z půd snadno eliminovat. Např. po dlouhých deštích je dusík strháván z povrchových vrstev půd, kde může být vstřebán rostlinami, do hlubších vrstev půdy, nebo může být odplaven pryč [23].

Aby se předcházelo ztrátám dusíku, používají se dusíkatá hnojiva, která v dusíkovém cyklu působí pozitivně pro vznik dusičnanů z amoniaku, a naopak působí negativně v opačném směru.

Dusíkatá hnojiva lze rozdělit na tři kategorie podle jejich základního složení – amonná, močovinová a dusičnanová [24].

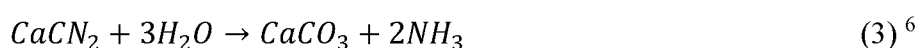
Nejkoncentrovanějším dusíkatým hnojivem je kapalný bezvodý amoniak (obsahuje 82,2 % dusíku). Při jeho výrobě musí být plynný amoniak zkapalněn, a jako kapalina je pod tlakem vpraven do půdy. Za atmosférického tlaku v půdě se stává plynným. Jelikož se jedná o silně hygroskopickou molekulu, prakticky okamžitě reaguje s okolní vodou za vzniku amonného kationtu, který dále podléhá nitrifikaci nebo je vstřebán rostlinami [25].

Dalším amonným hnojivem je například síran amonný, či sulfid amonný. Tato hnojiva obsahují přímo amonný kationt. Jejich efektivita je ovšem v poměru ke kapalnému bezvodému amoniaku poměrně nízká (síran amonný obsahuje 20,3 % dusíku) [25].

Nejkoncentrovanější tuhé dusíkaté hnojivo je močovina $[\text{CO}(\text{NH}_2)_2]$, která v jedné své molekule obsahuje 46 % dusíku. Močovina je snadno rozpustná ve vodě za vzniku amoniaku. Při kontaktu močovinových granulí hnojiva s půdní vodou dochází tedy jednak k pronikání hnojiva hlouběji pod povrch, a jednak ke vzniku amoniaku. Vzniká-li amoniak při povrchu půdy, dojde pravděpodobně k částečné ztrátě dusíku únikem amoniaku do vzduchu. Je-li vzniknuvší amoniak hlouběji pod povrchem, reaguje s půdní vodou za vzniku amonného kationtu, který je dále využíván bakteriemi a rostlinami [26].

Dusičnanová hnojiva představují pro rostliny nejsnáze dostupnou formu dusíku. Mezi nejznámější dusičnanová hnojiva patří hlavně tzv. ledky. Ledek chilský (dusičnan sodný NaNO_3), ledek vápenatý (dusičnan vápenatý $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$), ledek amonný (dusičnan amonný NH_4NO_3) apod.

Dalším velmi známým hnojivem je dusíkaté vápno. Je to z větší části kyanamid vápenatý (CaCN_2), který se ve vodném prostředí mění na amoniak (rovnice 3). Zároveň brání překyselení půdy vlivem vznikajícího uhličitanu vápenatého. Dále působí jako dezinfekce půdy a odpuzuje slimáky, drátovce a jiné škůdce [27].



Dalším zdrojem emisí je obecně fekální znečištění, tedy odpadní vody. Ať se již jedná o amonotelní, urikotelní nebo ureotelní živočichy, stručně popsané výše, je odpadním produktem vždy látka obsahující dusík. Stejně tak odpadní produkt hemoglobinu, bilirubin, popř. urobilin, je dusíkatá látka vylučovaná močí nebo stolicí [22].

Množství vyloučeného dusíku, tzv. celkový katabolický dusík lze jednoduše vypočítat z koncentrace močoviny v moči a množství vyloučené moči [5].

$$N_{katabolický} = U \cdot V \cdot 0,028 \cdot 1,2 + Z \quad (4)^7$$

V rovnici 4 je U koncentrace močoviny v moči (mmol/l), V je objem vyloučené moči za 24 h. Faktor 0,028 je na přepočítání mmol/l urey na gram urey a faktor 1,2 je korigující faktor za předpokladu, že močovina tvoří 80 % celkového dusíku. Z jsou ztráty dusíku extrarenálně (kůže, stolice) za 24 hodin v gramech (obvykle 4g/24h) [28].

Referenční fyziologická hodnota pro endogenní katabolický dusík je 0,03 – 0,137 g/kg/d. Tedy člověk o průměrné váze 60 kg, vyloučí denně 1,8 – 8,22 g dusíku [29].

⁶ Zdroj: Singhal Atul: The Pearson Guide to Objective Chemistry for the AIEEE, second edition. Dorling Kindersley, 2011, ISBN: 978-81-3173381-3.

⁷ Zdroj: Z. Zadák: Výživa v intenzivní péči: 2, rozšířené a aktualizované vydání. Praha 2008, Grada Publishing. ISBN: 978-80-247-2844-5.

1.2.3 Důsledky kontaminace dusíkatými látkami:

Jak již bylo zmíněno výše, dusík a fosfor jsou hlavní limitující živiny mikroorganismů, sinic a řas. Při zvýšené koncentraci dusíku v povrchových vodách, za přítomnosti vyšší koncentrace fosforu, dochází k přemnožení mikroorganismů a řas, tedy k eutrofizaci. Na povrchu vody pak vzniká vodní květ, který brání vzdušnému kyslíku v rozpuštění ve vodě, čímž může dojít k masivnímu úhynu ryb [30].

Je-li v pitné vodě obsaženo vyšší množství dusičnanů, je to zpravidla spojováno s rizikem methemoglobinemie. Methemoglobinemie je patologický případ, kdy je centrální atom dvojmocného železa oxidován na trojmocné železo. Díky tomu železo v methemoglobinu nemůže vázat a přenášet kyslík. Na methemoglobinemii jsou citlivé zejména novorozenci a kojenci, u nichž způsobuje tzv. modráni kojenců [31].

Oxidaci železa ale způsobují dusitany. S dusičnany je methemoglobinemie spojena pouze proto, protože se obecně ve vodách vyskytují v daleko větších koncentracích oproti dusitanům. V lidském těle jsou pak přijaté dusičnany redukovány na dusitany střevními bakteriemi [31].

1.3 Dekontaminace vod od fosforu a dusíku:

Čistírny odpadních vod ČOV mohou do jisté míry přechistit vody od fosfátů a dusíku.

1.3.1 Popis čištění odpadních vod:

Procesy probíhající v čističkách vod lze rozdělit do dvou skupin: mechanické předčištění (primární proces), biologické čištění (sekundární proces) a někdy fyzikálně-chemické čištění (terciální proces). Schematicky je uspořádání ČOV znázorněno na obrázku 4.

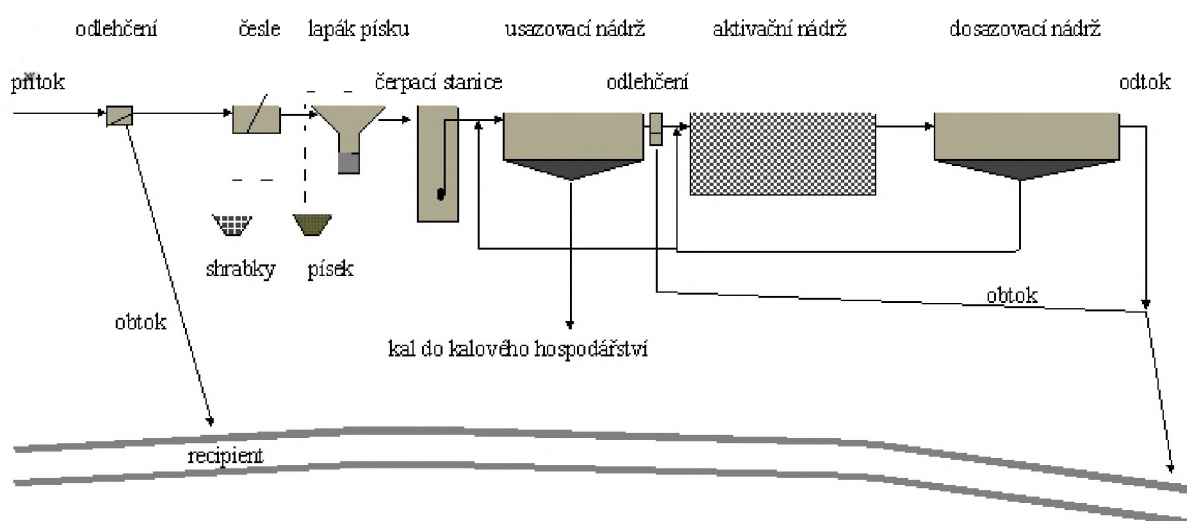
Mechanickým předčištěním se nejprve voda z přívaděče zbaví šterku a hrubších částic prostřednictvím tzv. lapáku šterku. V přívodném kanálu vytvořena jímka se sníženým dnem. V této jímce dochází k sedimentaci hrubých nerozpustných látek, jako jsou např. šterk, dlažební kostky apod. Následují česle, které zbavují vodu od hrubých plovoucích látek, např. cigaretové filtry, zbytky ovoce, hadry apod. Dále se nachází lapáky písku, který funguje na stejném principu jako lapák šterku, ale rychlost průtoku je pomalejší. Vzhledem k rychlosti průtoku se v lapáku písku částečně rozdělují i tuky, které vzlínají na hladinu. Posledním krokem v mechanickém čištění tvoří tzv. usazovací nádrže. Na jejich dno se usazuje tzv. surový kal, který dále putuje do anaerobních

nádrží k vyhnívání a tvorbě bioplynu. Na povrchu usazovacích nádrží plavou lehké nerozpustné látky, které jsou shrnovány do lapáku. Voda uprostřed výšky lapáku je mechanicky přečištěná a odchází do aktivačních nádrží, kde už dochází k sekundárnímu čištění [32].

Biologické čištění je zprostředkováno pomocí mikroorganismů, které oxidací kyslíkem rozkládají organické látky na vodu a oxid uhličitý. V aktivační nádrži je mechanicky přečištěná voda smíchána s tzv. aktivovaným kalem, který obsahuje mikroorganismy schopné této oxidace. Po smíchání s aktivovaným kalem je voda odvezena do dosazovací nádrže, kde se opět od aktivovaného kalu přečistí. Část kalu putuje zpátky do aktivačních nádrží, zbytek je odveden do vyhnívacích nádrží.

Takto přečištěná voda, po kontrole nejrůznějších parametrů, může být znovu vypuštěna [32].

Schéma biologické části ČOV Jihlava - před intenzifikací



Obrázek 4 - Schéma ČOV Jihlava⁸

1.3.2 Defosface:

Fosfor může být z odpadních vod odstraněn biologickými nebo fyzikálně-chemickými metodami.

V případě fyzikálně-chemických metod je využito srážení fosfátů s kovy, zejm. s vápníkem, hliníkem a železem, za vzniku nerozpustných fosforečnanů.

⁸ Zdroj: Pazdera O: Rozšíření a intenzifikace čistíren odpadních vod z hlediska EIA. Brno, dostupné z: [https://www.mzp.cz/web/edice.nsf/D66DBC7CBF544E3AC1256FC8004A3515/\\$file/cast1.html](https://www.mzp.cz/web/edice.nsf/D66DBC7CBF544E3AC1256FC8004A3515/$file/cast1.html)

Z hlediska zařazení tohoto srážení v systému čištění, ho můžeme rozdělit na předřazené, simultánní a zařazené srážení.

U předřazeného srážení se srážecí činidla do vody přidávají před usazovací nádrží, v níž pak sraženiny sedimentují spolu s primárním kalem. V simultánním srážení se činidlo přidává do směsi aktivovaného kalu, a sraženiny se usazují v dosazovací nádrži spolu s kalem. U zařazeného srážení se činidlo dávkuje až za dosazovací nádrž. Tento způsob srážení je jediný, který nemá vliv na sedimentující biomasu, ale je zapotřebí do systému zařadit speciální míchající nádrže [32].

Biologická metoda defosfatace je založena na takové schopnosti některých mikroorganismů (nejčastěji rod *Acinetobacter*, *Competibacter*), které jim umožňují akumulovat fosfor ve formě polyfosfátů. Takové bakterie se označují jako PAO (fosfor akumulující organizmy). Polyfosfáty slouží jako energetická rezerva buňky. Jelikož hlavní energetická molekula, ATP, nemůže být v buňce uchovávána do zásoby, jsou nadbytečné fosfáty přeměněny, prostřednictvím fosfátové kinázy, na polyfosfáty [33].

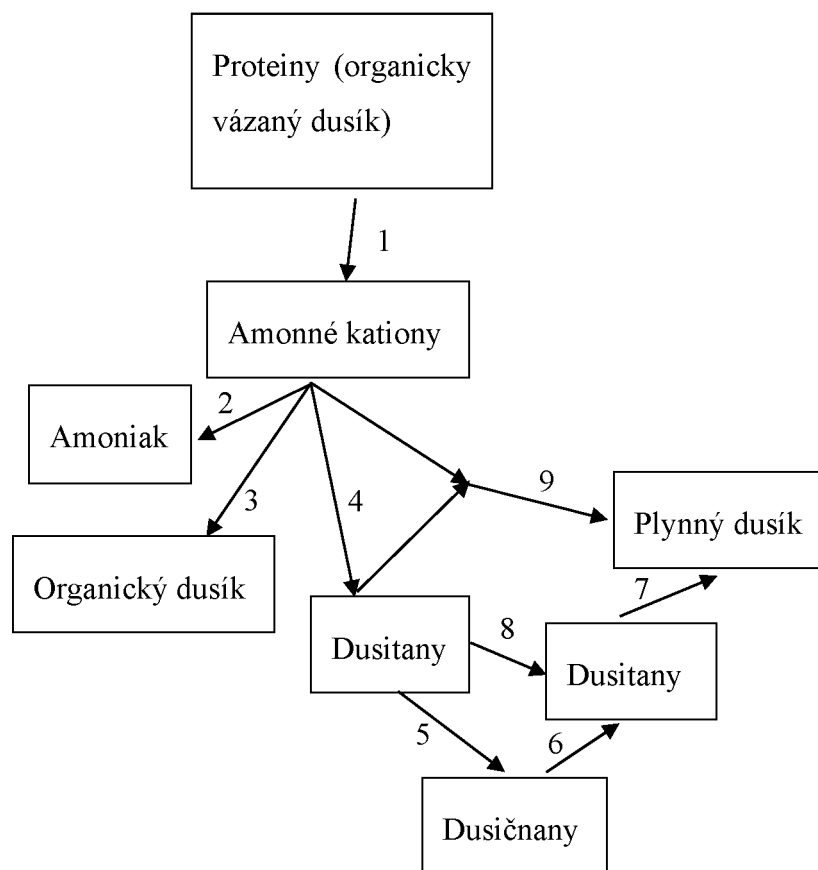
Odpadní voda se smíchá s aktivovaným kalem v anaerobní nádrži. Tím se zahájí fermentace, kdy se z odpadních organických látek tvoří mastné kyseliny. V následujícím, již aerobním reaktoru, jsou vzniklé mastné kyseliny přeneseny do PAO bakterií aktivním transportem. Energie pro aktivní transport je získána hydrolýzou buněčných polyfosfátů. Z mastných kyselin je v buňce syntetizována kyselina poly- β -hydroxymáselná, která slouží jako zdroj uhlíků pro syntézu polyfosfátů.

Odpadní voda se tak zbaví nadbytečného fosforu, který je uložen v biomase kalu [33].

1.3.3 Odstranění dusíku:

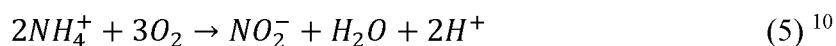
Odstraňování dusíku z odpadních vod je prováděno na základě dvou biochemických reakcí, nitrifikace a denitrifikace. Dochází tedy k oxidaci amonných kationtů na dusitany a dusičnany, tedy k nitrifikaci. Vzniklé dusitany jsou dále redukovány na oxid dusný, nebo plynný dusík, pak se jedná se o denitrifikaci. Vztahy mezi jednotlivými formami dusíku a názvy reakcí jejich přechodů jsou znázorněny na obrázku 5.

Amoniakální forma dusíku ve vodě je závislá na pH. Je-li pH v rozmezí 6-9, je téměř veškerý amoniakální dusík ve formě amonného kationtu. Proto většinou není třeba zavedení speciální reakce na převedení amoniaku na amonný kation [34].



Obrázek 5 - Různé přeměny amonného kationtu. (1- amonifikace; 2- amonné štěpení; 3- asimilace; 4- nitritace; 5- nitratace; 6- denitratace; 7- denitritace; 8- deamonifikace; 9 – anammox proces)⁹

Nitrifikace probíhá v aerobním prostředí podle rovnic 5 a 6:

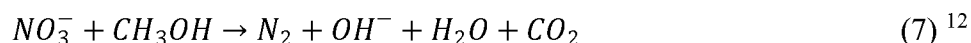


⁹ Zdroj: Plaza E, Trela J, Gut L, Löwén M, Szatkowska B: Deamonification Process for Treatment of Ammonium Rich Wastewater. Department of Land and Water Resources Engineering, Royal Institute of Technology, Stockholm. Dostupné z: https://www.kth.se/polopoly_fs/1.650641.1550154720!/JPS10s77.pdf

¹⁰ Zdroj: Asio: Aplikace nitritace – Anammox – kontejnerová technologie pro čištění průmyslových odpadních vod. Asio.cz, Brno, 2015, dostupné z: <https://www.asio.cz/cz/anammox-aplikace-nitrifikace-anammox>

¹¹ Zdroj: Asio: Aplikace nitritace – Anammox – kontejnerová technologie pro čištění průmyslových odpadních vod. Asio.cz, Brno, 2015, dostupné z: <https://www.asio.cz/cz/anammox-aplikace-nitrifikace-anammox>

Denitrifikace probíhá podle rovnice 7:



První reakci zpravidla zprostředkovávají rody *Nitrosomonas* a *Nitrospira*. Druhé reakce se účastní *Nitrobacter* [32].

Míra denitrifikace je zčásti ovlivněna množstvím dostupného organického uhlíku. Proto se v některých případech do anaerobní nádrže přidává methanol [34].

Poněkud inovativním způsobem mohou obě reakce proběhnout v jednom kroku, to je nazýváno deamonifikace. Její výhody spočívají zejména v tom, že se během odbourávání amoniaku a vznikajících dusíkatých sloučenin spotřebuje méně než polovina kyslíku, oproti klasické nitrifikaci a denitrifikaci. Další výhodou je, že není potřeba zdroj uhlíku. Z těchto důvodů se deamonifikace používá zejména u vod, které jsou bohaté na amoniak [34].

Deamonifikace (rovnice 8) obsahuje rovněž dva kroky. Prvním krokem je oxidace amonných kationtů na dusitany, stejně jako v klasickém přístupu odstraňování dusíku, s použitím stejných mikroorganismů. Druhým krokem ovšem je anaerobní deamonifikace, kde jsou použity speciální bakterie (rod *Planctomycetales*). Vzniklé dusitany reagují s amonnými ionty v anaerobním prostředí za vzniku plynného dusíku. Tento proces bývá označován jako *anammox process*, z anglického *ammonium oxidation*.



1.4 Možnosti stanovení různých skupin sloučenin fosforu:

Pro stanovení fosforu existují tyto normy (platné k 2. 1. 2020) [35]:

- ČSN EN ISO 6878 (75 7465) – Jakost vod – Stanovení fosforu – Spektrofotometrická metoda s molybdenanem amonným,

¹² Zdroj: Pollert: Biologická část ČOV, recirkulace kalu, řízení procesů. Praha - ČVUT – přednáška, 2012. Dostupné z: http://kzei.fsv.cvut.cz/pdf/COV_pr_6.pdf

¹³ Zdroj: Plaza E, Trela J, Gut L, Löwén M, Szatkowska B: Deamonification Process for Treatment of Ammonium Rich Wastewater. Department of Land and Water Resources Engineering, Royal Institute of Technology, Stockholm. Dostupné z: https://www.kth.se/polopoly_fs/1.650641.1550154720!/JPS10s77.pdf

- ČSN EN ISO 15681-1 (75 7464) – Stanovení orthofosforečnanů a celkového fosforu průtokovou analýzou (FIA a CFA) – Část 1: Metoda průtokové injekční analýzy (FIA),
- ČSN EN ISO 15681-2 (75 7464) – Stanovení orthofosforečnanů a celkového fosforu průtokovou analýzou (FIA a CFA) – Část 2: Metoda kontinuální průtokové analýzy (CFA),
- ČSN EN ISO 15923-1 (75 7389) – Stanovení vybraných ukazatelů diskretními analytickými systémy – Část 1: Amonné ionty, dusičnany, dusitany, chloridy, orthofosforečnany, sírany a křemičitany s fotometrickou detekcí,
- ČSN EN ISO 10304-1 (75 7391) – Jakost vod - Stanovení rozpuštěných aniontů metodou kapalinové chromatografie iontů – Část 1: Stanovení bromidů, chloridů, fluoridů, dusičnanů, dusitanů, fosforečnanů a síranů,
- ČSN EN ISO 11885 (75 7387) – Jakost vod – Stanovení vybraných prvků optickou emisní spektrometrií s indukčně vázaným plazmatem (ICP-OES),
- TNV 757466 – Jakost vod – Stanovení fosforu po rozkladu kyselinou dusičnou a chloristou (pro stanovení ve znečištěných vodách),
- ČSN EN ISO 10695 (75 7576) – Jakost vod – Stanovení vybraných sloučenin s organicky vázaným dusíkem a fosforem – metoda plynové chromatografie.

1.4.1 Spektrální stanovení:

Při spektrálním stanovení všech skupin sloučenin fosforu se musí nejdříve tyto sloučeniny převést na rozpuštěné anorganické orthofosforečnany, jejichž absorbance se měří.

Celkové polyfosforečnany jsou převedeny na orthofosforečnany hydrolyzou kyselinou sírovou při 100 °C [36].

Při stanovení celkových fosforečnanů se využívá oxidačního rozkladu organických sloučenin fosforu. Při tomto rozkladu zároveň dochází k hydrolyze polyfosforečnanů. Z organický i anorganický sloučenin fosforu vznikají tímto způsobem opět orthofosforečnany.

Celkové orthofosforečnany stanovujeme v nefiltrovaném vzorku bez oxidačního rozkladu i bez hydrolyzy. Při stanovení pouze anorganických orthofosforečnanů se vzorek musí předem zfiltrvat, dále nedochází ani k hydrolyze, ani k oxidačnímu rozkladu [36].

Pro stanovení celkových fosforečnanů je důležité zvolit optimální podmínky oxidačního rozkladu.

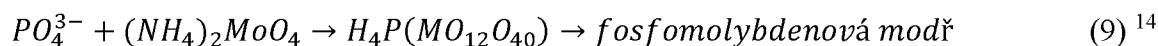
Oxidaci organických sloučenin fosforu docílíme [36]:

- Kyselinou chloristou v kombinaci s kyselinou dusičnou nebo sírovou,
- Peroxodisíranem amonným nebo draselným v prostředí kyseliny sírové,
- Kyselinou dusičnou v kombinaci s kyselinou sírovou,
- Peroxidem vodíku v prostředí kyseliny sírové,
- UV záření,
- Fotochemická oxidace.

Po převedení různých forem fosforu na orthofosforečnany jsou tyto nejčastěji stanoveny jejich převedením na fosfomolybdenovou modř (rovnice 9).

Orthofosforečnany reagují s molybdenanem amonným v prostředí kyseliny sírové za vzniku žlutého komplexu kyseliny molybdatofosforečné. Tento komplex je redukován na fosfomolybdenovou modř, která je stanovována při 690 nm.

Jako redukční činidla se používá buď kyselina askorbová nebo chlorid cínatý [36].



1.4.2 Iontová chromatografie:

Celkový fosfor lze rovněž stanovit iontovou chromatografií (viz dále) podle následujících norem [37]:

- ČSN EN ISO 15681-1 (75 7464) – Jakost vod – Stanovení orthofosforečnanů a celkového fosforu průtokovou analýzou (FIA a CFA) – Část 1: Metoda průtokové injekční analýzy (FIA),
- ČSN EN ISO 15681-2 (75 7464) – Jakost vod – Stanovení orthofosforečnanů a celkového fosforu průtokovou analýzou (FIA a CFA) – Část 2: Metoda kontinuální průtokové analýzy (CFA).

Toto stanovení je náplní praktické části této práce.

¹⁴ Zdroj: **Horáková M, Lischke P, Grünwald A.** *Chemické a fyzikální metody analýzy vod. Druhé nezměněné vydání.* Praha : SNTL - Nakladatelství technické literatury, 1989. 04-606-89.

1.5 Možnosti stanovení různých skupin sloučenin dusíku:

Pro stanovení dusíkatých látek existují tyto normy (citováno 7. 2. 2020) [35]:

- ČSN ISO 5664 (75 7449) - Jakost vod - Stanovení amonných iontů - Odměrná metoda po destilaci,
- ČSN ISO 6778 (75 7450) - Jakost vod - Stanovení amonných iontů - Potenciometrická metoda,
- ČSN ISO 7150-1 (75 7451) - Jakost vod - Stanovení amonných iontů - Část 1: Manuální spektrometrická metoda,
- ČSN ISO 7150-2 (75 7451) - Jakost vod - Stanovení amonných iontů - Část 2: Automatizovaná spektrometrická metoda,
- ČSN EN 26777 (75 7452) - Jakost vod - Stanovení dusitanů - Molekulární absorpční spektrofotometrická metoda,
- ČSN ISO 7890–3 (75 7453) - Jakost vod - Stanovení dusičnanů - Část 3: Spektrometrická metoda s kyselinou sulfosalicylovou,
- ČSN EN ISO 11732 (75 7454) - Jakost vod - Stanovení amoniakálního dusíku - Metoda průtokové analýzy (CFA a FIA) se spektrofotometrickou detekcí,
- ČSN 75 7455 – Jakost vod - Stanovení dusičnanů - Fotometrická metoda s 2,6-dimethylfenolem – Metoda ve zkumavkách,
- ČSN EN ISO 13395 (75 7456) - Jakost vod - Stanovení dusitanového dusíku a dusičnanového dusíku a sumy obou průtokovou analýzou (CFA a FIA) se spektrofotometrickou detekcí,
- ČSN EN ISO 12260 (75 7524) - Jakost vod - Stanovení dusíku - Stanovení vázaného dusíku (TN_b) po oxidaci na oxidy dusíku,
- ČSN EN 25663 (75 7525) - Jakost vod - Stanovení dusíku podle Kjeldahla - Odměrná metoda po mineralizaci se selenem,
- ČSN ISO 29441 (75 7526) - Jakost vod - Stanovení celkového dusíku po rozkladu UV zářením – Metoda průtokové analýzy (CFA a FIA) se spektrofotometrickou detekcí,
- ČSN EN ISO 11905 (75 7527) - Jakost vod - Stanovení dusíku - Část 1: Metoda oxidační mineralizace peroxidisíranem,

- ČSN EN ISO 15923-1 (757389) - Jakost vod - Stanovení vybraných ukazatelů diskretními analytickými systémy - Část 1: Amonné ionty, dusičnany, dusitany, chloridy, orthofosforečnany, sírany a křemičitany s fotometrickou detekcí,
- ČSN EN ISO 10304-1 (75 7391) - Jakost vod - Stanovení rozpuštěných aniontů - Metoda kapalinové chromatografie iontů - Část 1: Stanovení bromidů, chloridů, fluoridů, dusičnanů, dusitanů, fosforečnanů, síranů,
- ČSN EN ISO 13395 (75 7456) - Jakost vod - Stanovení dusitanového dusíku a dusičnanového dusíku a sumy obou průtokovou analýzou (CFA a FIA) se spektrofotometrickou detekcí,
- ČSN EN ISO 10695 (75 7576) Jakost vod - Stanovení vybraných sloučenin s organicky vázaným dusíkem a fosforem – Metoda plynové chromatografie.

1.5.1 Spektrální stanovení:

Spektrální stanovení vycházejí buď z redukce dusíkatých látek na amonné ionty, nebo z oxidace dusíkatých látek na dusitany, popř. na dusičnany. Oxidační rozklad vzorku je ovšem používán daleko častěji, kvůli menší časové a technické náročnosti [36].

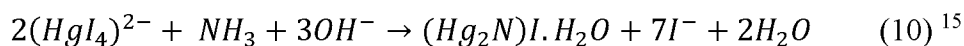
1.5.1.1 Stanovení amonných iontů:

- Redukce dusíkatých látek fluoroglucinolem a zinkem:

Příkladem redukčního rozkladu je převedení veškerého dusíku na amoniakální dusík metodou s fluoroglucinolem a zinkem. Dusičnany a dusitany jsou redukovány fluoroglucinolem v prostředí kyseliny sírové na nitrofluoroglucinol. Ten je redukován zinkem za vzniku aminoderivátů, které se spolu s organicky vázaným dusíkem převádějí mineralizací na amonné ionty [36].

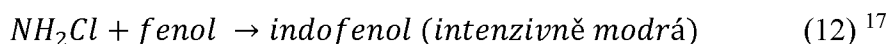
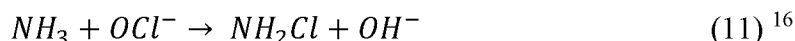
- Reakce amonných iontů s Nesslerovým činidlem:

Nesslerovo činidlo (HgI_4^{2-}) reaguje v prostředí vinanu draselného s amonnými ionty za vzniku koloidní sraženiny aminojodidu rtuťnatého (rovnice 10), který je měřen spektrofotometricky při 425 nm [36].



- Reakce amoniaku s fenolem a chlornanem:

Reakcí amoniaku s fenolem a chlornanem za katalýzy manganatými ionty vzniká indofenol, který je v alkalickém prostředí disociován za vzniku modrého indofenolového barviva (rovnice 11, 12), jehož absorbance se měří při 630 nm [36].



1.5.1.2 Stanovení dusitanů:

- Reakce dusitanů s kyselinou sulfanilovou a N-(-1-naftyl)-ethylendiamindihydrochloridem

Dusitany ve vzorku diazotují kyselinu sulfanilovou v prostředí hydrogensíranu draselného. Vzniklá diazoniová sůl kopuluje s N-(-1-naftyl)-ethylendiamindihydrochloridem za vzniku červeného azobarviva. Intenzita zbarvení je úměrná koncentraci dusitanů ve vzorku. Měření absorbance se provádí při 540 nm [36].

- Reakce dusitanů s kyselinou sulfanilovou a α -naftylaminem:

Dusitany ve vzorku diazotují kyselinu sulfanilovou v prostředí kyseliny chlorovodíkové. V prostředí octanového pufru kopuluje vzniklá diazoniová sůl s α -naftylaminem za vzniku červenofialového azobarviva, které se měří při 520 nm. Intenzita zbarvení je úměrná koncentraci dusitanů ve vzorku [36].

1.5.1.3 Stanovení dusičnanů:

- Reakce dusičnanů se salicylanem sodným.

¹⁵ Zdroj: **Horáková M, Lischke P, Grünwald A.** *Chemické a fyzikální metody analýzy vod. Druhé nezměněné vydání.* Praha : SNTL - Nakladatelství technické literatury, 1989. 04-606-89.

¹⁶ Zdroj: **Horáková M, Lischke P, Grünwald A.** *Chemické a fyzikální metody analýzy vod. Druhé nezměněné vydání.* Praha : SNTL - Nakladatelství technické literatury, 1989. 04-606-89.

¹⁷ Zdroj: **Horáková M, Lischke P, Grünwald A.** *Chemické a fyzikální metody analýzy vod. Druhé nezměněné vydání.* Praha : SNTL - Nakladatelství technické literatury, 1989. 04-606-89.

Dusičnany nitrují kyselinu salicylovou v prostředí kyseliny sírové. Vzniklý žlutý nitroderivát je úměrný koncentraci dusičnanů ve vzorku. Absorbance se měří při 410 nm.

- Přímé měření absorbance dusičnanů v UV oblasti při vlnové délce 220 nm,
- Nepřímé stanovení dusičnanů po redukci na amoniakální dusík Devardovou slitinou.

Při reakci Devardovy slitiny s hydroxidem sodným vzniká vodík, který okamžitě redukuje dusičnany na amoniakální dusík [36].

1.5.2 Elektrochemická stanovení:

- Pro amoniakální a dusičnanovou formu dusíku je možné použít specifické iontově selektivní elektrody.

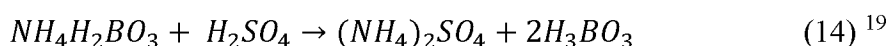
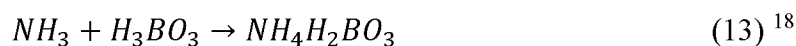
Iontově selektivní elektroda pro amoniak je elektroda druhého druhu, tj. plynová. Amoniak existuje ve vodě v disociované a nedisociované formě v závislosti na pH. Rozpuštěný amoniak v plynné formě prochází hydrofobní membránou elektrody, čímž dochází k poklesu pH ve vnitřním elektrolytu elektrody, který odpovídá množství amoniaku [38].

Dusičnanová iontově selektivní elektroda je elektroda se kapalnou membránou z PVC, v níž je jako iontoměnič zabudována krystalová violet' [36].

- Poměrně zastaralou metodou je stanovení dusičnanů polarograficky, kdy dojde k jejich redukci na rtuťové kapkové elektrodě v roztoku chloridu draselného a kyseliny chlorovodíkové za katalýzy uranylových iontů z octanu uranylu. Při měření jsou poskytnuty dvě polarografické vlny redukce uranu, z nichž ta druhá vlna nese informaci o množství dusičnanů ve vzorku [36].

1.5.2.1 Ostatní metody:

- Neutralizační odměrné stanovení amoniakálního dusíku probíhá na principu jímání plynného amoniaku, získaného destilací vzorku, do kyseliny borité (rovnice 13) nebo kyseliny sírové (rovnice 14). Je-li vzorek jímán do kyseliny borité, titruje se obsah amonných iontů ve vzniklém dihydrogenboritanu amonném kyselinou sírovou na Tashiro:



Je-li amoniak jímán do kyseliny sírové, stanovuje se při titraci nezreagovaná kyselina sírová hydroxidem sodným na methylčerveň [36].

- Automatické analyzátoři na stanovení celkového organického dusíku (TON - celkový organický dusík) bývají často spojeny s analyzátoři na stanovení celkového organického uhlíku (TOC - celkový organický uhlík), které nejprve musí odstranit anorganické složky vzorku obsahující tyto elementy. Následně je vzorek unášen nosným plynem do spalovací komory, kde jsou všechny organické formy těchto dvou prvků přeměněny na CO₂ a NO. Tyto jsou stanoveny infračervenou analýzou spalování [39].

1.5.2.2 Iontová chromatografie:

Dusitany a dusičnany, mimo jiné, je možno stanovit iontovou chromatografií. Při zvolení metody iontové chromatografie je základním požadavkem, zvolit takovou kolonu, která toto stanovení umožňuje.

Celkový fosfor lze po rozložení na dusičnany rovněž stanovit iontovou chromatografií (toto je náplň praktické části této práce).

1.6 HPLC s iontoměničovou kolonou:

1.6.1 Základní princip HPLC:

HPLC (vysokoúčinná kapalinová chromatografie) je druh separační metody, která umožňuje dělení jednotlivých složek vzorku a detekci těchto složek v detektoru za vzniku chromatogramu.

¹⁸ Zdroj: **Horáková M, Lischke P, Grünwald A.** *Chemické a fyzikální metody analýzy vod. Druhé nezměněné vydání.* Praha : SNTL - Nakladatelství technické literatury, 1989. 04-606-89.

¹⁹ Zdroj: **Horáková M, Lischke P, Grünwald A.** *Chemické a fyzikální metody analýzy vod. Druhé nezměněné vydání.* Praha : SNTL - Nakladatelství technické literatury, 1989. 04-606-89.

Vzorek je zaváděn, nebo je nasáván do injektoru, a přes šesticečný ventil je za vysokého tlaku zaváděn do toku mobilní fáze, která vzorek unáší skrz kolonu. V koloně se jednotlivé složky vzorku dělí na základě dynamického ustavování rovnováhy mezi mobilní a stacionární fází. Po rozdělení jsou složky vzorku eluovány mobilní fází do detektoru. Výsledným signálem je chromatogram, kde se hodnotí zpravidla plocha píku a retenční čas, jako ukazatele kvantity a kvality.

1.6.2 Iontová chromatografie:

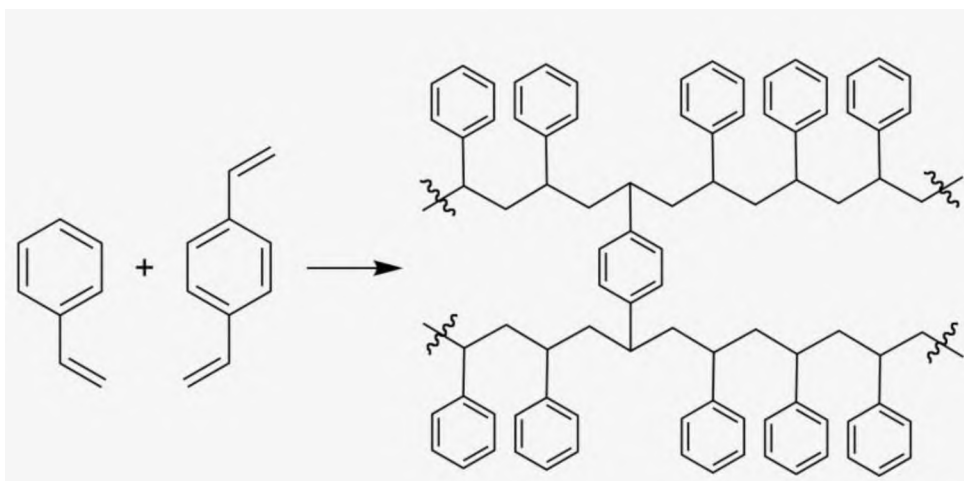
Principem iontové chromatografie je soutěžení analyzovaných iontů a iontů stacionární fáze o místo na ionexu (viz dále). Jejimi nejdůležitějšími součástmi jsou nejčastěji iontově výměnná kolona, supresor a vodivostní detektor. Jedná se o jednu z možných variací kapalinové chromatografie.

Ionty jsou unášeny do kolony mobilní fází, z níž jsou později eluovány. Separace probíhá na základě různé migrace uvnitř iontoměničové kolony, nebo na desce impregnované iontoměničem. Tyto vzájemné reakce jsou umožněny kvůli vzájemné kompetici iontů mobilní fáze s ionty vzorku, kde obě skupiny iontů reversibilně reagují s funkčními skupinami navázané na stacionární fázi. Ionty při prostupu kolonou se tak několikrát naváží a opět oddělí od stacionární fáze. Jelikož je afinita daného iontu k iontoměničiči specifická, dochází tak k separaci iontů [40].

1.6.2.1 Iontoměničové kolony:

Jako nosič stacionární fáze se používají gely, kam patří celulóza nebo dextran. Dále se používají anorganické iontoměniče, což jsou hydratované oxidy zirkonu, titanu. Typickým nosičem jsou také zeolity. Další skupinou nosičů jsou polymerní organické látky, jako jsou pryskyřice, styreny nebo akryláty [41,42,43].

Tyto materiály jsou sami o sobě poměrně pórovité, ovšem samotná pórovitost se ještě zvyšuje s použitím síťovacího činidla, nejčastěji divinylbenzen – viditelné na obrázku 6. Jedná se o tzv. crosslinking, kdy se utvoří třidimenzionální struktura. V závislosti na poměru divinylbenzenu a styrenu pak vzniká síť těsnější, nebo prostupnější [41].



Obrázek 6 – Schéma vzniku polystyren-divinylbenzenu ze styrenu a divinylbenzenu ²⁰

Na jakémkoliv aromatickém jádře (v případě polystyren-divinylbenzenu) se pak v podobě π -komplexu může objevit funkční skupina určující charakter iontoměniče. Tato funkční skupina je ve vodném prostředí schopna disociace. Z funkční skupiny se tak stává iont a protiont. A právě protiont může být dočasně zaměněn za jiný iont stejného náboje [43].

Podle navázané funkční skupiny rozlišujeme iontoměniče na katexy a anexy. Anex je měnič aniontů, tzn. že protiont funkční skupiny je schopen se zaměnit za jiný aniont přítomný v roztoku. Katex disponuje stejnou schopností, ovšem pro kationty. Příklady funkčních skupin pro katexy a anexy jsou uvedeny v tabulce 1. [43].

Podle schopnosti disociace rozdělujeme anexy na silně bazické, které jsou schopny disociace při jakémkoliv pH, a slabě bazické – disociují pouze v kyselějším prostředí. Katexy naopak dělíme na silně kyselé – schopny disociace při jakémkoliv pH a slabě kyselé – disociují pouze v bazičtějším prostředí [43].

Tabulka 1 - příklady katexových a anexových substituentů ²¹

	Katex	Anex
Silně kyselý/bazický	$R - SO_3H$	$R - N^+(CH_3)_3OH^-$
Slabě kyselý/bazický	$R - COOH$	$R - N^+(CH_3)_2$

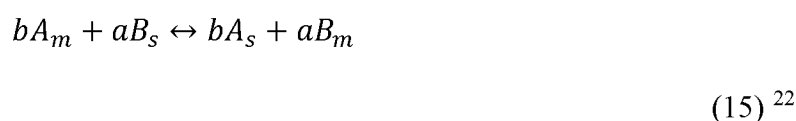
²⁰ Zdroj: Autor neznámý, dostupné z https://www.pngkey.com/detail/u2q8t4o0a9a9a9u2_polv-polvstvrene-crosslinked-with-divinylbenzene/. Citováno 3. 2. 2020

²¹ Zdroj: Jelínek L: Ionexové technologie v úpravě vody – Základy energetiky. VŠCHT Praha. Dostupné z: <https://web.vscht.cz/~jelinek1/ZEN/Prednaska-09.pdf>

1.6.2.2 Iontová výměna:

Hlavními parametry kinetiky iontové výměny jsou koeficient iontové výměnné selektivity a distribuční koeficient, popř. retenční faktor. Oba dva závisejí na ustalování iontové výměnné rovnováhy. Koeficienty jsou měřeny ustálením známého roztoku a známého množství stacionární fáze a následným určením množství vyměněných iontů v každé fázi. Kapacitní faktor může být vypočítán přímo z retenčních objemů vzorku [44].

Iontové výměny se tedy účastní dva ionty v kompetici o vazbu se stacionární fází (rovnice 15):



Symbol m označuje iont v mobilní fázi, symbol s je iont navázaný na stacionární fázi.

Rovnovážná konstanta pro tuto rovnici je uveden v rovnici 16:

$$K_B^A = \frac{[A]_s^b [B]_m^a}{[A]_m^b [B]_s^a} \quad (16)^{23}$$

V závorkách jsou uvedeny molární koncentrace iontů. Rovnovážná konstanta K_B^A je zároveň koeficient selektivity. Čím vyšší má daný iont A koeficient selektivity vůči stacionární fázi, tím vyšší má afinitu oproti iontu B [44].

Distribuční koeficient D indikuje míru afinity iontu k iontoměničce. Čím je koeficient vyšší, tím vyšší má daný iont afinitu k vybranému iontoměničce. Definován je jako poměr koncentrace iontu obsaženého ve stacionární a tohoto iontu v mobilní fázi (rovnice 17):

$$D = \frac{[A]_s}{[A]_m} \quad (17)^{24}$$

²² Zdroj: HPLC.CZ: Speciální techniky HPLC – Iontová chromatografie, Praha, 2008. Dostupné z: http://www.hplc.cz/Teorie/ion_chromatography.html

²³ Zdroj: HPLC.CZ: Speciální techniky HPLC – Iontová chromatografie, Praha, 2008. Dostupné z: http://www.hplc.cz/Teorie/ion_chromatography.html

²⁴ Zdroj: Jiráková L, Švéda M: Chromatografie. VŠCHT Praha. Dostupné z: <http://old.vscht.cz/anl/oppa-sem-bio/PDFs/4OPPAst.pdf>

Častěji se v chromatografii ovšem místo distribučního koeficientu používá retenční faktor k , což je poměr látkového množství iontu v obou fázích (rovnice 18):

$$k_A = \frac{n_{(A)s}}{n_{(B)m}} = D \cdot \frac{V_s}{V_m} \quad (18)^{25}$$

Retenční faktor se ovšem v praxi určuje podle retenčních časů měřené látky (rovnice 19):

$$k = \frac{t-t_0}{t_0} \quad (19)^{26}$$

Kde t je retenční čas eluovaného iontu, t_0 je mrtvý čas [44].

Iontová výměna má 5 fází [43]:

- 1) Difuze iontu A z mobilní fáze na povrch ionexu,
- 2) Difuze iontu A z povrchu ionexu k funkční skupině,
- 3) Vlastní iontová výměna,
- 4) Difuze iontu B od funkční skupiny k povrchu ionexu,
- 5) Difuze iontu B z povrchu ionexu do mobilní fáze.

Ionty mobilní fáze přirozeně difundují mezi stacionární fází. Pronikne-li nabitý iont ionexem k funkční skupině ionexu, musí přirozený protiont funkční skupiny tuto opustit, aby byla zachována neutralita. Stejným způsobem funguje navrácení původního protiontu do funkční skupiny a vyplavení iontu, jež původně obsahovala mobilní fáze [45].

Aby tato zpětná výměna mohla proběhnout, musí mít ionex nižší afinitu k iontům mobilní fáze, oproti vlastním protiontům, u koeficientu selektivity pro daný pár iontu a ionexu je tedy vyžadována co nejnižší hodnota, nebo musí být použita gradientová eluce [45].

Bude-li koeficient selektivity vyšší pro iont v mobilní fázi, dojde k odstranění tohoto iontu z mobilní fáze. Toho se využívá při přečišťování vody od vápenatých a hořečnatých iontů, tedy ke změkčování vody (viz dále) [45].

²⁵ Zdroj: Douša M: Základní charakteristiky chromatografického procesu. Dostupné z: <http://www.hpplc.cz/Teorie/uvod.html>

²⁶ Zdroj: Nikolova I: Chromatografické metody. Český hydrometeorologický ústav. Dostupné z: http://physics.uipep.cz/~mkormund/P219/chromatograficke_metody_2014.pdf

Díky rozdílnému koeficientu selektivity jednotlivých iontů, tedy díky jejich různé afinitě k ionexu může dojít k jejich separaci.

1.6.2.3 Detektory:

Volba detektoru závisí na typu analytu a mobilní fázi. Mezi používané detektory v iontové chromatografii patří vodivostní, UV-Vis detektor, nebo amperometrický detektor. Tyto detektory musí být schopny spolehlivě a efektivně rozlišit ionty analytu a mobilní fáze [46].

Konduktometrický detektor patří mezi nejrozšířenější. Používá se k analýze široké škály iontů. Je to univerzální, to znamená, že měří všechny prošlé ionty bez výhrady, ale není schopen detekovat molekulové látky, jako např. voda nebo ethanol. Průchod takovýchto látek se pak projeví jako záporný pík na základní linii. Použití konduktometrického detektoru zároveň vyžaduje zapojení supresoru do systému (viz výše) [46].

Základem vodivostního detektoru je detekční cela, kde jsou dvě elektrody měřící změnu elektrické vodivosti v závislosti na typu a množství prošlých iontů. Aby se zabránilo polarizaci elektrod, je na ně vkládáno střídavé napětí [47].

UV-Vis detektor je selektivní a jeho selektivita se dá měnit volbou vlnové délky. Pro spektrofotometrické detektory platí Lambert-Beerův-Bouguerův zákon, kde je koncentrace analytu přímo úměrná absorbanci.

Optimální vlnová délka k detekci daného iontů lze určit proměřením daného iontů v celé škále vlnových délek, kde je detektor schopný pracovat. Optimální vlnová délka pro detekci se pak nachází v maximu absorpčního pásu. Například pro chloridy, bromidy, azidy a dusitany je absorpční maximum mezi 190 a 210 nm [46].

Při použití UV-Vis detektoru můžeme rozlišit přímé stanovení iontů, kdy mobilní fáze absorbuje minimálně při dané vlnové délce a analyzovaný iont absorbuje maximálně, nebo nepřímá detekce, kde je situace obráceně. Využití UV-Vis detektoru dále nabízí aplikaci post kolonové deprivatizace, kdy se ke stanovovanému iontu přidá vybarvovací činidlo pro zvýšení absorbance [46].

Do elektrochemických detektorů patří polarografický, amperometrický, coulometrický. Tyto detektory patří mezi nejselektivnější a nejcitlivější. Jejich podstatou je totiž oxidace nebo redukce na elektrodě. Z tohoto důvodu není mnoho látek, které lze stanovit elektrochemickými detektory. Jsou to zejména léčiva [48].

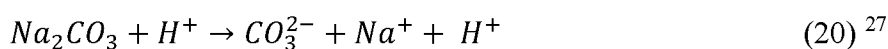
Při amperometrické detekci se měří proud vzniklý při oxidaci nebo redukci látek na elektrodách, na něj je vkládáno napětí. Při coulometrické detekci je měřen elektrický náboj, který je třeba na oxidaci nebo redukci látky.

Dalším možným detektorem využitelným pro iontovou chromatografii je hmotnostní detektor. Využívá se buď ICP – MS (hmotnostní spektrometrie s ionizací v indukčně vázaném plazmatu) nebo API – MS (hmotnostní spektrometrie s ionizací za atmosférického tlaku). Jelikož ICP – MS je schopná zionizovat více mobilní fáze, je tedy větší objem injektovaného vzorku a tím pádem i vyšší citlivost oproti API – MS. Na druhou stranu ovšem API – MS má širší rozsah identifikace neznámých látek [49].

1.6.2.4 Supresor:

Důležitou součástí iontové chromatografie, zpravidla pak separace aniontů s konduktometrickou detekcí je supresor. Jeho funkcí je snižování signálu mobilní fáze a zvyšování poměru signál/šum. Tímto se tedy zvyšuje pracovní rozsah metody směrem k nižší hodnotě LOD (limit detekce) [50].

Principem jeho funkce je výměna sodných, popř. draselných iontů z mobilní fáze a ze vzorku za vodíkové kationty, které vznikají hydrolyzou vody (rovnice 20). Tím dochází ke vzniku hydroxylových nebo uhličitanových iontů o daleko nižší vodivosti oproti původní hydroxidové nebo uhličitanové mobilní fázi [51].



Supresor je složen ze tří oddílů. Prostřední částí protéká mobilní fáze spolu se vzorkem. Tato část je od zbývajících dvou oddělena iontově výměnnou membránou. Na druhé straně membrány je neustálý tok vody, který je hydrolyzována přilehlými elektrodami. Na membránách oddělující tyto sektory tak může být uskutečněna iontová výměna [52].

²⁷ Zdroj: Thermo Fisher Scientific: Eluent Suppressors for Ion Chromatography. Dionex Corporation, Sunnyvale, 2016.

1.7 Validace metody:

Pro zveřejňování platných výsledků měření je třeba mít danou metodu zvalidovanou. Po validaci metody je možné přejít k akreditaci metody prostřednictvím auditu u společnosti ČIA (Český institut pro akreditaci).

Validace metody poskytuje důkazy o tom, že je daná metoda vhodná pro zamýšlené použití a že požadavky na specifickou aplikaci byly splněny [53].

Validace metoda zahrnuje následující parametry:

1.7.1 Linearita kalibrace:

Lineární průběh kalibrace nejčastěji vyhodnocujeme pomocí korelačního koeficientu (R) a QC koeficientu (koeficient kontroly kvality). Za lineární je kalibrace považována v případě, když hodnota korelačního koeficientu je větší než 99 a hodnota QC koeficientu je menší než 5 % [54].

Korelační koeficient popisuje míru těsnosti mezi naměřenými hodnotami a proloženou kalibrační přímkou. Hodnota tohoto koeficientu nesmí pro platnou validaci klesnout pod 0,98 [55].

Výpočet korelačního koeficientu můžeme provést podle rovnice 21. V této rovnici jsou hodnoty x_i , y_i naměřené hodnoty koncentrace a příslušné odezvy při kalibraci [55].

$$R = \frac{\sum x_i y_i}{\sqrt{(\sum x_i^2) \cdot (\sum y_i^2)}} \quad (21)^{28}$$

Další parametr, vyplývající z rovnice kalibrační přímky, je citlivost. Hodnota citlivosti je rovna směrnici kalibrační přímky. Čím je citlivost větší, tím je větší je změna odezvy pro různé koncentrace analytu.

1.7.2 Meze stanovitelnosti a meze detekce:

Limit detekce (LOD) udává nejnižší koncentraci, kterou je metoda schopná detekovat, a mez stanovitelnosti (LOQ) udává jakou nejnižší koncentraci jsme schopni stanovit s danou nejistotou.

²⁸ Zdroj: Douša M: Validační program pro statistické zpracování analytických dat. HPLC.cz; Dostupné z: http://www.hplc.cz/Validace/program_validace.htm#_3.3.1_Linearita

Obě meze, LOD i LOQ, je možné stanovit pomocí hodnot kalibrační přímky za pomoci Studentova rozdělení, většinou použitím speciálního softwaru. Orientačně lze tyto meze určit ze znalosti koncentrace slepého stanovení c_{sl} a směrodatné odchylky slepého stanovení s_{sl} (viz rovnice 22, 23).

$$LOD = c_{sl} + 3 \cdot s_{sl} \quad (22)^{29}$$

$$LOQ = c_{sl} + 10 \cdot s_{sl} \quad (23)^{30}$$

V praxi ovšem bývá hodnota LOQ brána jako nejnižší bod kalibrace. Matematicky lze dojít k nižším hodnotám, ale prakticky nevíme, jak se daný analyt chová mimo kalibraci.

1.7.3 Robustnost:

Robustnost je definována jako míra schopnosti metody zůstat netečný vůči malým změnám v parametrech metody. Čím je metoda více robustní, tím méně je ovlivnitelná různými parametry metody [56].

1.7.4 Opakovatelnost, reprodukovatelnost:

Opakovatelnost vyjadřuje těsnost shody mezi výsledky nezávislých měření stejného analytu provedených stejnou metodou, stejným experimentátorem na stejném přístroji, stejném místě, za stejných podmínek a v krátkém časovém intervalu.

Čím je opakovatelnost vyšší, tím vyšší je i variabilita získaných výsledků. Pod získanou hodnotou opakovatelnosti, leží absolutní rozdíl dvou získaných výsledků. Je-li hodnota opakovatelnosti např. 0,1, pak absolutní rozdíl dvou výsledků je menší než 0,1 [56].

U reprodukovatelnosti je vysvětlení prakticky stejné, s tím rozdílem, že měření jsou prováděna různými analytiky, s delším časovým odstupem.

²⁹ Zdroj: Autor neznámý: Pokročilé praktikum z analytické chemie. Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Praha, 2017. Dostupné z: https://web.natur.cuni.cz/~suchan/N%C3%A1vodv_NANALD_2017.pdf

³⁰ Zdroj: Autor neznámý: Pokročilé praktikum z analytické chemie. Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Praha, 2017. Dostupné z: https://web.natur.cuni.cz/~suchan/N%C3%A1vodv_NANALD_2017.pdf

1.7.5 Správnost:

Správnost vyjadřuje těsnost shody mezi naměřeným výsledkem a správnou hodnotou. Správnost nelze vyčíslit, proto se číselně odkazuje jako vychýlení (bias). Bias je rozdíl střední hodnoty naměřených dat a referenční hodnoty [57].

1.7.6 Nejistota měření:

Nejistota měření je nezbytnou součástí každého výsledku a každé validace. Bez nejistoty měření nemá výsledek smysl.

Nejistoty jsou dvojího typu – nejistota typu A (u_A) a typu B (u_B). Nejistoty typu A jsou způsobeny náhodnými chybami během měření (nebo obecně během nějakého probíhajícího procesu) a systematickými chybami tohoto procesu. Jejich vyhodnocování je statistické (výběrová směrodatná odchylka aritmetického průměru). Nejistoty typu B jsou rovněž chyby náhodné, a chyby externího prostředí (např. odchylka koncentrace referenčních materiálů, kalibrace samotného měřidla...). Nejistoty typu B nelze statisticky odhadnout, ale bývají deklarovány výrobcem (např. koncentrace referenčního materiálu $c = 1 \pm 0,5$ mg/l). Tyto nejistoty bývají často označovány jako standardní nejistoty typu A a typu B [58].

Sloučením těchto dvou nejistot získáme tzv. kombinovanou nejistotu (u_C), která je vypočtena dle rovnice 24:

$$u_C = \sqrt{u_A^2 + u_B^2} \quad (24)^{31}$$

Rozšířená kombinovaná nejistota (U_C) se získá pouze rozšířením kombinované nejistoty koeficientem rozšíření k podle rovnice 25. Pro získání nejistoty, v níž dosažený výsledek leží s 95% pravděpodobností je $k = 2$. Pro získání nejistoty, v níž dosažený výsledek leží s pravděpodobností 99 % je $k = 3$. Vypočtená rozšířená nejistota má stejné rozměry jako měřená veličina.

$$U_C = u_C \cdot k \quad (25)^{32}$$

³¹ Zdroj: Bartoš V, et al.: Doporučení k výpočtu nejistot kvantitativních výsledků měření v klinických laboratořích. 2014; Dostupné z: https://www.sekk.cz/infoservis/2014_nejistoty_doporuceni.pdf

³² Zdroj: Bartoš V, et al.: Doporučení k výpočtu nejistot kvantitativních výsledků měření v klinických laboratořích. 2014; Dostupné z: https://www.sekk.cz/infoservis/2014_nejistoty_doporuceni.pdf

2 Praktická část

2.1 Cíl praktické části:

Cílem této praktické části bylo zcela od základů zavést novou metodu pro stanovování celkového dusíku a celkového fosforu v odpadních vodách do rutinního provozu podle normy ČSN EN ISO 15681-1 (75 7464) – Jakost vod – Stanovení orthofosforečnanů a celkového fosforu průtokovou analýzou (FIA a CFA) – Část 1: Metoda průtokové injekční analýzy (FIA) a podle normy ČSN ISO 29441 (75 7526) – Jakost vod – Stanovení celkového dusíku po rozkladu UV zářením – Metoda průtokové analýzy (CFA a FIA) se spektrometrickou detekcí.

Práce probíhala ve Zdravotním Ústavu se Sídlem v Ústí nad Labem na pobočce v Hradci Králové (Jana Černého 361) na oddělení anorganických analýz.

Tato laboratoř doposud prováděla stanovování celkového dusíku a celkového fosforu na spektrofotometrickém analyzátoru Smartchem. Ovšem z důvodu časové náročnosti této metody byla snaha o zavedení nové metody využívající kontinuální průtokovou analýzu. V rutinním provozu by tato nově zavedená metoda výrazně zvýšila časovou efektivitu.

V této laboratoři byly již dříve rutinně prováděny analýzy pro stanovení koncentrace aniontů ve vodách. (Konkrétně se jedná o fluoridy, chloridy, dusitany, sírany, dusičnany, fosforečnany a siřičitany). Tyto analýzy byly prováděny na iontovém chromatografu ICS 1000, který byl použit právě k zavedení této nové metody na celkový dusík a celkový fosfor.

Tato metoda, kterou chceme zavést, doposud není mnohokrát testovaná. Drtivá většina stanovení celkového fosforu a celkového dusíku ve vodách využívá spektrofotometrickou detekci, která je poměrně zdlouhavá.

2.2 Obecný postup při zavádění nové metody:

Při zavádění každé nové metody do rutinního provozu je vždy aplikován následující postup:

- 1) Zvolení počáteční sestavy aparatury, počáteční koncentrace používaných roztoků a činidel a počáteční množství těchto činidel a roztoků pro provedení analýzy.
- 2) Změření standardního vzorku, ideálně o více koncentracích.

- 3) Není-li výsledek měření standardního vzorku v požadovaném rozmezí, je třeba hledat chybu buď v přípravě tohoto standardního vzorku, nebo ve funkci samotného přístroje nebo v příslušné sestavené aparatuře, nebo koncentraci použitých roztoků a činidel a jejich dávkovaný poměr se vzorkem.
- 4) Je-li výsledek měření standardního vzorku v požadovaném rozmezí od správné hodnoty, následuje kalibrace metody.
- 5) Změření vzorku se stejnou maticí, tj. reálného vzorku, pro jakou je metoda určena. U tohoto vzorku je třeba znát koncentraci analytu.
- 6) Není-li výsledek měření reálného vzorku v požadovaném rozmezí od správné hodnoty, musí se dále přikročit ke kroku 3, tj. provést takovou změnu, která bude mít pozitivní vliv na výsledek měření. Kroky 3 - 6 se opakují tak dlouho, dokud není dosaženo požadovaných hodnot.
- 7) Je-li výsledek měření reálného vzorku v požadovaném rozmezí od správné hodnoty, je provedena kompletní validace metody, napsán standardní operační postup (SOP), zavedeny regulační diagramy pro řízení kontroly kvality metody, a nakonec může být metoda akreditována.

2.3 Princip stanovení celkového dusíku a celkového fosforu ve vodách:

Principem stanovení celkového fosforu a celkového dusíku je jejich rozložení na dusičnany a fosforečnany. Rozklad může probíhat buď pomocí UV-C záření, nebo s přidavkem oxidačních činidel (viz dále).

Vzniklé dusičnany a fosforečnany jsou poté stanoveny prostřednictvím iontové chromatografie s vodivostní detekcí.

Výpočet koncentrace celkového dusíku a celkového fosforu z naměřených hodnot dusičnanů a fosforečnanů je proveden na základě podílu molekulových hmotností a z ředění vzniklé přidavkem činidel (viz dále).

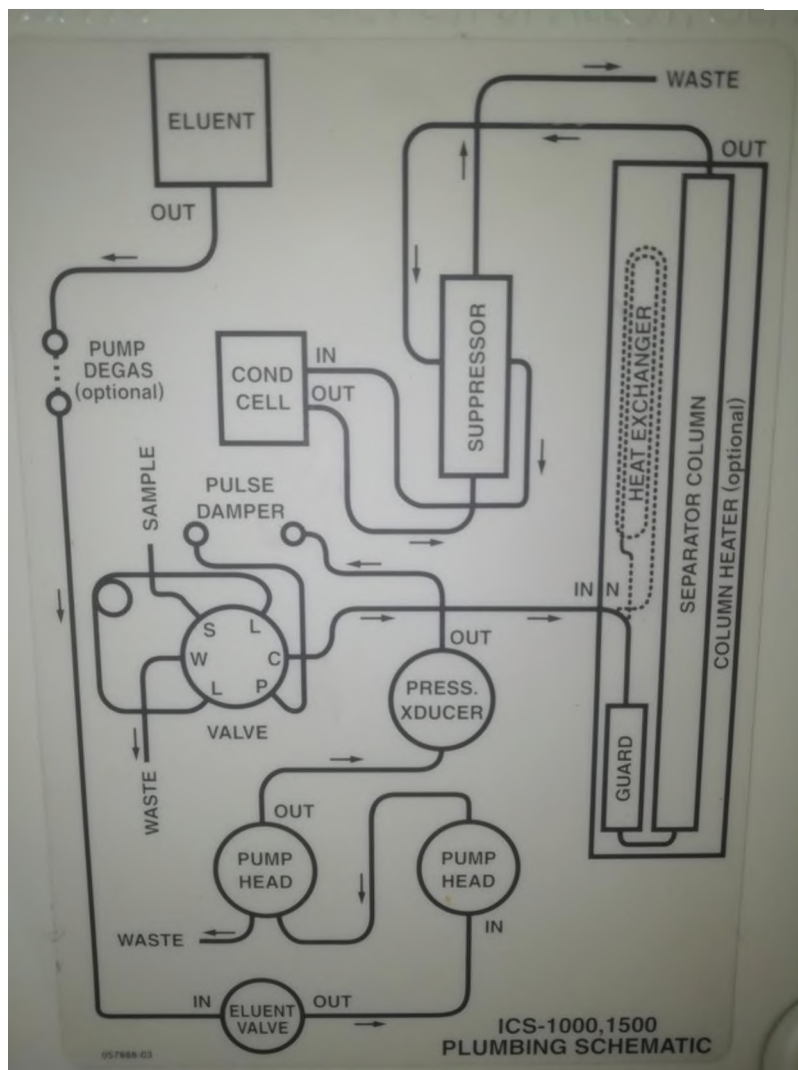
2.4 Iontový chromatograf:

Pro veškeré analýzy byl použit iontový chromatograf ICS 1000 od firmy Dionex (Sunnyvale, Kalifornie, USA), který je na obrázku 7.



Obrázek 7 - Měřicí sestava - iontový chromatograf a autosampler

Mobilní fáze uvnitř chromatografu protéká soustavou, jejíž technické uspořádání je znázorněno na obrázku 8.



Obrázek 8 - Technické uspořádání toku mobilní fáze

Mobilní fáze proudí ze zásobníku přes primovací ventil, měřič tlaku a směřuje do šesticestného ventilu, do předkolony, kolony, supresoru a detektoru. Mezi měřičem tlaku a šesticestným ventilem je tzv. „pulse damper“ (zařízení, které eliminuje tlakové pulsy mobilní fáze, které vznikají při jejím čerpání).

Chromatografické vybavení:

- Předkolona – uhličitanová AG-9-HC (4x50 mm) Fisher Scientific, spol. s.r.o. - Pragolab s.r.o., Praha, Česká republika,
- Kolona – uhličitanová AS-9-HC (4x2500 mm) Fisher Scientific, spol. s.r.o., - Pragolab s.r.o., Praha, Česká republika,
- Supresor – ADRS 600 - 4 mm - Fisher Scientific, spol. s.r.o., - Pragolab s.r.o., Praha, Česká republika,

- Smyčka o objemu 25 μ l.

2.5 Použité chemikálie:

2.5.1 Chemikálie pro přípravu aniontů:

2.5.1.1 Fluoridy, CRM, c = 1000 mg/l; ANALYTIKA®, spol. s r.o., Praha, Česká republika; šarže: 0001

2.5.1.2 Fluoridy, CRM, c = 1000 mg/l; Merck, Praha, Česká republika; šarže: HC85388314

2.5.1.3 Chloridy, CRM, c = 1000 mg/l; ANALYTIKA®, spol. s r.o., Praha, Česká republika; šarže: 9005

2.5.1.4 Chloridy, CRM, c = 1000 mg/l; Merck, Praha, Česká republika; šarže: HC98978697

2.5.1.5 Dusitany, CRM, c = 100 mg/l; ANALYTIKA®, spol. s r.o., Praha, Česká republika; šarže: 8003

2.5.1.6 Dusitany, CRM, c = 1000 mg/l; Merck, Praha, Česká republika; šarže: HC99012399

2.5.1.7 Dusičnany, CRM, c = 1000 mg/l; ANALYTIKA®, spol. s r.o., Praha, Česká republika; šarže: 0002 a 9007

2.5.1.8 Dusičnany, CRM, c = 1000 mg/l; Merck, Praha, Česká republika; šarže: HC98874811

2.5.1.9 Sířany, CRM, c = 1000 mg/l; ANALYTIKA®, spol. s r.o., Praha, Česká republika; šarže: 0004

2.5.1.10 Sířany, CRM, c = 1000 mg/l; Merck, Praha, Česká republika; šarže: HC99010213

2.5.1.11 Fosforečnany, CRM, c = 100 mg/l; ANALYTIKA®, spol. s r.o., Praha, Česká republika; šarže: 8002

2.5.1.12 Fosforečnany, CRM, c = 1000 mg/l; Merck, Praha, Česká republika; šarže: HC86992598

2.5.1.13 Celkový dusík, CRM, c = 100 mg/l; Merck, Praha, Česká republika; šarže: HC 87401845

2.5.1.14 Celkový fosfor, CRM, c = 100 mg/l; Merck, Praha, Česká republika; šarže: HC 86835946

2.5.2 Chemikálie pro přípravu oxidačních činidel a pufrů:

2.5.2.1 Chlorid titaničitý, p.a., Merck, Praha, Česká republika; šarže: S785AM7682003

2.5.2.2 Peroxodisíran draselný, p.a., Lach-Ner s.r.o., Neratovice; šarže: 302930206

2.5.2.3 Hydroxid sodný, p.a., Lach-Ner s.r.o., Neratovice; šarže: PP/2019/07692

2.5.2.4 Kyselina boritá, p.a., Merck, Praha, Česká republika; šarže: AM0941965851

2.5.2.5 Kyselina sírová, 96%, Penta s.r.o., Praha, Česká republika; šarže: 2108100816

2.5.3 Chemikálie pro přípravu mobilní fáze:

2.5.3.1 Uhličitan sodný, CRM, $c = 0,5 \text{ mol/l}$; ANALYTIKA®, spol. s r.o., Praha, Česká republika; šarže: 0003

2.5.3.2 Hydrogen uhličitan sodný, CRM, $c = 0,5 \text{ mol/l}$; ANALYTIKA®, spol. s r.o., Praha, Česká republika; šarže: 0005

2.6 Použité roztoky a jejich příprava:

2.6.1 Příprava aniontů:

2.6.1.1 Příprava roztoku fluoridů; $c = 100 \text{ mg/l}$

Do 100 ml odměrné baňky odpipetujeme 10 ml fluoridů o koncentraci 1000 mg/l (2.5.1.1). Doplníme deionizovanou vodou po rysku.

2.6.1.2 Příprava roztoku fosforečnanů; $c = 100 \text{ mg/l}$

Do 100 ml odměrné baňky odpipetujeme 10 ml fluoridů o koncentraci 1000 mg/l (2.5.1.11). Doplníme deionizovanou vodou po rysku.

2.6.1.3 Příprava roztoku fluoridů; $c = 100 \text{ mg/l}$

Do 100 ml odměrné baňky odpipetujeme 10 ml fluoridů o koncentraci 1000 mg/l (2.5.1.2). Doplníme deionizovanou vodou po rysku.

2.6.1.4 Příprava roztoku dusitanů; $c = 100 \text{ mg/l}$

Do 100 ml odměrné baňky odpipetujeme 10 ml dusitanů o koncentraci 1000 mg/l (2.5.1.6). Doplňíme deionizovanou vodou po rysku.

2.6.1.5 Příprava roztoku fosforečnanů; $c = 100 \text{ mg/l}$

Do 100 ml odměrné baňky odpipetujeme 10 ml fosforečnanů o koncentraci 1000 mg/l (2.5.1.12). Doplňíme deionizovanou vodou po rysku.

2.6.2 Příprava mobilní fáze:

Do nádoby určené pro mobilní fázi se odměří 38,4 ml 0,5 M uhličitanu sodného (2.5.3.1) a 25,6 ml 0,5 M hydrogenuhličitanu sodného (2.5.3.2). Nádoba se doplní odplyněnou deionizovanou vodou po rysku a obsah se promíchá

2.6.3 Příprava oxidačních činidel a pufrů:

2.4.3.1 Příprava kyseliny sírové 0,2 M

Asi k 500 ml destilované vody v 1 l odměrné baňce odpipetujeme 11,1 ml koncentrované kyseliny sírové (2.5.2.5) a doplňíme deionizovanou vodou po rysku.

2.4.3.2 Příprava kyseliny sírové 0,4 M

Asi k 500 ml destilované vody v 1 l odměrné baňce odpipetujeme 22,3 ml koncentrované kyseliny sírové (2.5.2.5) a doplňíme deionizovanou vodou po rysku.

2.4.3.3 Příprava hydroxidu sodného 0,37 M

Navážíme 14,8 g NaOH (2.5.2.3) a doplňíme deionizovanou vodou po rysku baňku o objemu 1 l.

2.4.3.4 Příprava oxidačního činidla A:

Ve 30 ml 0,37 M NaOH (2.5.2.8) rozpustíme 1 g peroxodisíranu draselného (2.5.2.2). Po rozpuštění doplňíme deionizovanou vodou po rysku

2.4.3.5 Příprava oxidačního činidla B:

Ve 100 ml odměrné baňce rozpustíme 4,5 g peroxodisíranu draselného (2.5.2.2). Pro rozpuštění přidáme 1,2 g hydroxidu sodného (2.6.2.1) a 0,25 ml chloridu titaničitého (2.5.2.1). Doplňíme po rysku deionizovanou vodou.

2.4.3.6 Příprava oxidačního činidla C:

Ve 30 ml 0,2 M H_2SO_4 (2.6.2.6) se nechá rozpustit 0,15 g peroxodisíranu draselného (2.5.2.2). Po rozpuštění přelijeme do vhodné nádoby k uchování.

2.4.3.7 Příprava oxidačního činidla D:

Do 100 ml baňky odlijeme asi 50 ml 0,4 M H_2SO_4 (2.5.2.7) a rozpustíme 0,5 g peroxodisíranu draselného (2.5.2.2). Po rozpuštění doplníme 0,4 M H_2SO_4 (2.5.2.7) po rysku.

2.4.3.8 Příprava roztoku chloridu titaničitého:

Do 200 ml odměrné baňky se přidá 0,5 ml chloridu titaničitého (2.5.2.1) a doplní se deionizovanou vodou po rysku.

2.4.3.9 Příprava borátového pufru:

Ve 100 ml odměrné baňce rozpustíme 2,4 g kyseliny borité (2.5.2.4) a doplníme deionizovanou vodou po rysku.

2.7 Příprava kalibrace 1:

Pro tuto kalibraci byly připraveny a proměřeny kalibrační roztoky o koncentracích, které jsou uvedeny v tabulce 3. Pro fluoridy je pracovní rozsah kalibrace 0,1 - 1,0 mg/l; pro chloridy 5,0 - 50,0 mg/l; pro dusitany 0,05 - 0,5 mg/l; pro dusičnany 5,0 - 50,0 mg/l; pro sírany 25,0 - 250,0 mg/l; pro fosforečnany 0,2 - 2,0 mg/l.

Ačkoliv je cílem práce zavést novou metody pouze pro celkový dusík a celkový fosfor, je vhodné udělat kalibraci pro všechny uvedené anionty. Důvodem je, že během zavádění metody mohou být odhaleny interference (např. při stanovení celkového dusíku ve vodách s přebytkem chloridů), nebo nevhodný vliv připravených činidel na kolonu (přetížení kolony sírany při použití velkého množství peroxodisíranu jako oxidačního činidla pro celkový dusík a celkový fosfor), nebo nedostatečné rozložení vzorku na dusičnany - např. nalezneme pík dusitanů.

Kalibrace byla připravena dle následujícího postupu:

- 1) Připravíme zásobní roztok do 500 ml plastové odměrné baňky pipetováním objemů roztoků podle tabulky 2. Baňku doplníme deionizovanou vodou po rysku.

Tabulka 2 – Příprava zásobního roztoku pro kalibraci

Aniont	Zdroj aniontu	Koncentrace pipetovaného roztoku (mg/l)	Pipetováno (ml)	Koncentrace zásobního roztoku (mg/l)
Fluoridy	2.6.1.1	100	5,0	1,0
Chloridy	2.5.1.3	1000	25,0	50,0
Dusitany	2.5.1.5	100	2,5	0,5
Dusičnany	2.5.1.7	1000	25,0	50,0
Fosforečnany	2.6.1.2	100	10,0	2,0
Sírany	2.5.1.9	1000	125,0	250,0

- 2) Připravíme 4 kalibrační roztoky. Do řady 4 plastových odměrných baněk o objemu 100 ml se napipetují objemy zásobního roztoku (připraveného v bodu 1) uvedené v tabulce 3 a doplníme deionizovanou vodou po rysku.

Tabulka 3 - Pipetované objemy zásobního roztoku pro přípravu kalibračních roztoků a koncentrace jejich aniontů

Označení vzorku	Pipetováno (ml) zásobního kalibračního roztoku	Koncentrace aniontů (mg/l)
Kalibrační vzorek č. 2	80	Fluoridy – 0,8
		Chloridy – 40,0
		Dusitany – 0,4
		Dusičnany – 40,0
		Sírany – 200,0
		Fosforečnany – 1,6
Kalibrační vzorek č. 3	40	Fluoridy – 0,4
		Chloridy – 20,0
		Dusitany – 0,2
		Dusičnany – 20,0
		Sírany – 100,0
		Fosforečnany – 0,8

Kalibrační vzorek č. 4	30	Fluoridy – 0,8
		Chloridy – 15,0
		Dusitany – 0,15
		Dusičnany – 15,0
		Sírany – 75,0
		Fosforečnany – 0,6
Kalibrační vzorek č. 5	10	Fluoridy – 0,1
		Chloridy – 5,0
		Dusitany – 0,05
		Dusičnany – 5,0
		Sírany – 25,0
		Fosforečnany – 0,2

- 3) Připravené kalibrační roztoky a zásobní roztok proměříme na přístroji a nastavíme je jako kalibrační roztoky.
- 4) Po proměření vyhodnotíme plochy píků uvedených aniontů. Vyhodnocení této kalibrace je uvedeno v kapitole 3.1

2.8 Kontrola kvality pomocí standardních roztoků:

Pro ověření kontroly kvality stanovení se používají tzv. QC (quality control) roztoky, neboli kontrolní vzorky, o nízké a vysoké koncentraci označované jako std VK a std NK. Jejich příprava probíhá dle následujícího postupu:

- 1) Pro přípravu roztoku std VK pipetujeme množství chemikálií uvedené v tabulce 4.

Tabulka 4 - Příprava QC-VK roztoku

Aniont	Zdroj aniontu	Koncentrace pipetovaného roztoku (mg/l)	Pipetováno (ml)	Koncentrace aniontu v std-VK roztoku (mg/l)
Fluoridy	2.6.1.3	100	7,5	1,5
Chloridy	2.5.1.4	1000	25,0	50,0
Dusitany	2.6.1.4	100	2,5	0,5
Dusičnany	2.5.1.8	1000	25,0	50,0
Fosforečnany	2.6.1.5	100	10,0	2,0
Sírany	2.5.1.10	1000	125,0	250,0

- 2) Roztok QC-NK připravíme tak, že roztok QC-VK zředíme 10x vodou. Pipetujeme 5 ml QC-VK do 50 ml baňky a doplníme deionizovanou vodou po rysku. Koncentrace aniontů v roztoku QC-NK je uvedena v tabulce 5.

Tabulka 5 - Připravená koncentrace aniontů v roztoku QC-NK

Aniont	Koncentrace aniontu v roztoku QC-NK (mg/l)
Fluoridy	0,15
Chloridy	5,0
Dusitany	0,05
Dusičnany	5,0
Fosforečnany	0,2
Sírany	25,0

Tolerovatelná odchylka měření je 10 % od referenční hodnoty. Správný výsledek standardu je základní předpoklad k tomu, že následující měření budou správná.

Chromatografický záznam pro vzorek nízké i vysoké koncentrace kontrolního vzorku je uveden v kapitole 3.2 spolu s jejich vyhodnocením.

2.9 Sestavení potřebné aparatury:

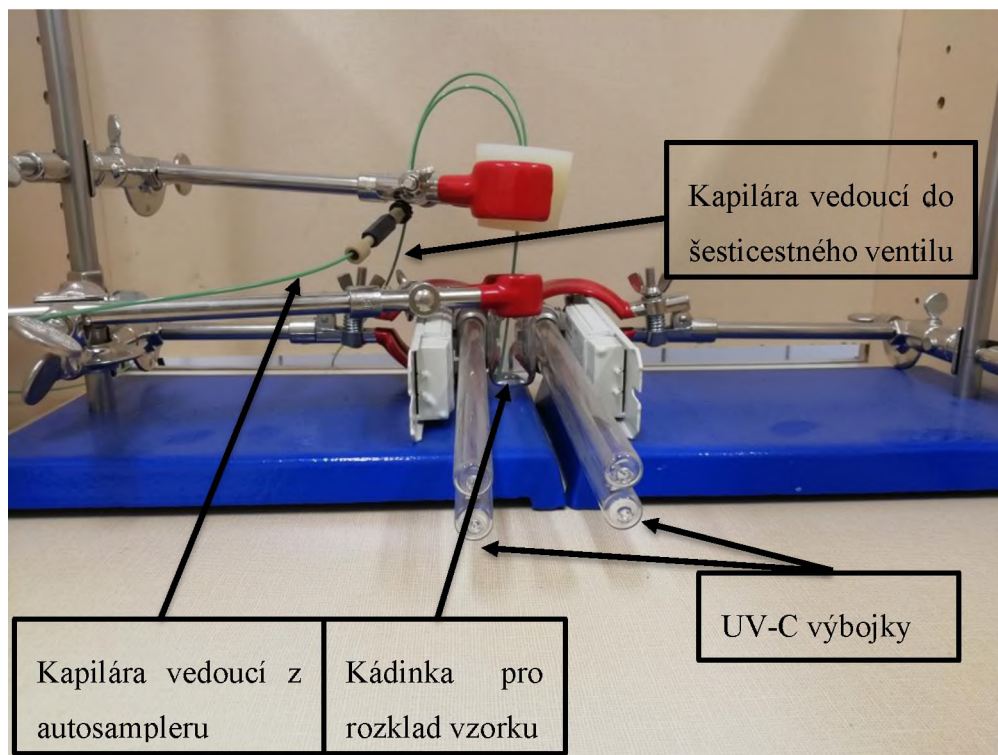
Pro zavedení této metody do provozu byly využity tři technické normy:

- ČSN ISO 15691-1 (75 7464) Jakost vod – Stanovení orthofosforečnanů a celkového fosforu průtokovou analýzou (FIA a CFA) – Část 1: Metoda průtokové injekční analýzy FIA,
- ČSN ISO 15691-1 (75 7464) Jakost vod – Stanovení orthofosforečnanů a celkového fosforu průtokovou analýzou (FIA a CFA) – Část 2: Metoda kontinuální průtokové analýzy CFA,
- ČSN ISO 29441 (75 7526) Jakost vod – Stanovení celkového dusíku po rozkladu UV zářením – Metoda průtokové analýzy (CFA a FIA) se spektrometrickou detekcí.

Pro naše účely byla zvolena FIA.

Aby byla metoda co nejméně náročná na obsluhu přístroje a manuální přípravu vzorku před analýzou, byl zvolen rozklad vzorku prostřednictvím UV-C záření, a to i v případě celkového fosforu.

Při klasické analýze vede kapilára z autosampleru přímo do šesticestného ventilu. Na této cestě musí nastat rozklad vzorku. Byl tedy zařazen průtočný systém s UV-C výbojkou (viz obrázek 9).



Obrázek 9 - Původní aparatura pro rozklad vzorku

Vzorek proudí kapilárou z autosampleru do křemenné kádinky, kde je vzorek po dobu 40 minut ozařován a hydrolyzován. Poté je již hydrolyzovaný vzorek přiveden druhou kapilárou přímo do šesticestného ventilu a do smyčky.

V momentě, kdy je vzorek z křemenné kádinky nasán do šesticestného ventilu a pokračuje dál do kolony, je následující vzorek převeden rovněž do této křemenné kádinky. Rozklad vzorku tak probíhá stejně dlouho, jak dlouhá je doba analýzy. V tomto případě je to 40 minut.

Aby nedocházelo ke kontaminaci následujících vzorků vzorkem prvním, je mezi každý měřený vzorek zařazena destilovaná voda bez jakýchkoliv činidel. Tento promývací vzorek je analyzován stejným způsobem, jako jakékoliv jiné vzorky, absolvuje tedy stejnou cestu.

Jelikož je UV-C záření poměrně tvrdé, je celý tento systém umístěn ve dřevěném uzavíratelném boxu, a pod digestoří, aby byl odčerpáván ozon vzniklý ionizací vzduchu.

2.10 Ověření hydrolyzy na připraveném standardu pouze s použitím UV-C:

Pro ověření správnosti hydrolyzy vzorků byly připraveny standardní vzorky z certifikovaného referenčního materiálu pro celkový fosfor a pro celkový dusík.

Pro celkový fosfor byl připraven standardní vzorek o koncentraci 1 mg/l a pro celkový dusík standardní vzorek o koncentraci 2 mg/l. Tyto koncentrace byly zvoleny proto, že tyto stejné koncentrace analytů jsou nastaveny jako standardní vzorky pro stanovení celkového dusíku a celkového fosforu, které jsou stanovovány spektrálně na Smartchemu.

Měření, která byla provedena na Smartchemu (např. stanovení hodnot celkového fosforu a celkového dusíku v reálných vzorcích vod) jsou brána jako referenční. Pro tuto metodu jsou totiž již roky vedeny regulační diagramy a je periodicky revalidována. Rovněž i v mezilaboratorních porovnávacích testech je naprosto spolehlivá.

Jelikož jsou vzorky celkového dusíku a celkového fosforu měřeny na kalibraci pro fosforečnany a dusičnany, musí být koncentrace celkového fosforu a celkového dusíku převedeny na příslušné anionty. Přepočítání je provedeno pouze na základě poměru molekulových hmotností – rovnice 26 a 27.

$$\frac{[PO_4^{3-}]}{[P_{celk}]} = \frac{92,97}{30,97} = 3,00 \quad (26)$$

Je-li připraven standardní roztok celkového fosforu o koncentraci 1 mg/l, odpovídá tato koncentrace trojnásobku fosforečnanů. Vypočtenou hodnotu z kalibrace tedy očekáváme 3 mg/l.

Stejný postup provedeme i v případě celkového dusíku. Očekávaná hodnota z kalibrace při koncentraci 2 mg celkového dusíku na litr je 8,86 mg dusičnanů na litr.

$$\frac{[NO_3^-]}{[N_{celk}]} = \frac{62,01}{14,01} = 4,43 \quad (27)$$

Výsledek měření těchto standardních vzorků je uveden v kapitole 3.3, spolu s jejich chromatogramy.

2.11 Ověření hydrolýzy na připraveném standardu s použitím UV-C s přidavkem činidla:

Činidla, použitá pro rozklad vzorku, byla volena podle následujících norem:

- ČSN ČSN ISO 15691-1 (75 7464) Jakost vod – Stanovení orthofosforečnanů a celkového fosforu průtokovou analýzou (FIA a CFA) – Část 1: Metoda průtokové injekční analýzy FIA,
- ČSN ISO 29441 (75 7526) Jakost vod – Stanovení celkového dusíku po rozkladu UV zářením – Metoda průtokové analýzy (CFA a FIA) se spektrometrickou detekcí.

Optimální poměr těchto činidel byl zjišťován experimentálně. Testována byla následující činidla (s různými poměry objemu se vzorkem):

- 5 ml vzorku + 100 µl 0,37 M NaOH (2.6.3.3),
- 5 ml vzorku + 100 µl činidla A (2.6.3.4),
- 8 ml vzorku + 300 µl činidla A (2.6.3.4).

Výtěžnosti pro tato testovaná činidla a jejich poměry s objemem vzorku jsou uvedeny v kapitole 3.4.

2.12 Měření celkového dusíku a celkového fosforu v reálném vzorku vody:

Jako reálný vzorek na vyzkoušení hydrolýzy byla použita odpadní voda ze Synthesia, a.s., Semtín, před přečistěním v ČOV. Objektivně je to nejhorší vzorek, který se v této laboratoři může vyskytnout.

Tento druh vzorku je v laboratoři proměřován každý měsíc validovanými metodami na Smartchemu, a historicky má hodnoty parametrů, které jsou uvedeny v tabulce 6.

Tabulka 6 - Historické hodnoty parametrů vzorku odpadní vody ze Synthesia, a.s., Semtin

Název parametru	Jednotka	Počet měření	Průměr	Minimum	Maximum
Amoniakální dusík	mg/l	23	37,64	0,71	53,6
Dusík anorganický	mg/l	23	171,7	117	243
Dusík celkový	mg/l	23	199	134	302
Dusičnanový dusík	mg/l	23	133,7	89,1	189
Dusitanový dusík	mg/l	12	0,445	0,01	4,98
Fosfor celkový	mg/l	23	3,26	1,38	12,4

Stejný vzorek byl měřen na automatickém analyzátoru Smartchem, kdy rozklad byl proveden rutinně podle SOP validovanou metodou.

Pro stanovení celkového dusíku na analyzátoru Smartchem se k 8 ml vzorku přidá 1,8 ml 0,5% NaOH a 0,2 g peroxidisíranu draselného. Ampule se vzorkem je temperována v termostatu 1 h při 120 °C.

Pro stanovení celkového fosforu na analyzátoru Smartchem se k 5 ml vzorku přidá 0,2 ml 5,5 M H₂SO₄ a přidá se 0,1 g peroxidisíranu draselného. Ampule se vzorkem je temperována v termostatu 30 minut při teplotě 120 °C.

Pomocí výše zmíněných postupů, které jsou validovány, bylo dosaženo následujících hodnot – pro celkový dusík 151 mg/l a pro celkový fosfor 4,83 mg/l. Tyto hodnoty byly brány jako referenční.

Jelikož nejistota měření metod na Smartchemu je 10 %, výsledky pro celkový dusík a celkový fosfor by se měly pohybovat v uvedeném rozmezí: 135,9 – 166,1 mg/l pro celkový dusík a 4,38 – 5,31 mg/l pro celkový fosfor.

Testována byla následující činidla (s různými poměry objemu se vzorkem):

- 8 ml vzorku + 300 µl činidla A (2.6.3.4),
- 1 ml vzorku + 7,5 ml oxidačního činidla B (2.6.3.5) + 2,5 ml borátového pufru (2.6.3.9),

- 5 ml vzorku + 1 ml oxidační činidla B (2.6.3.5) + 0,5 ml borátového pufru (2.6.3.9).

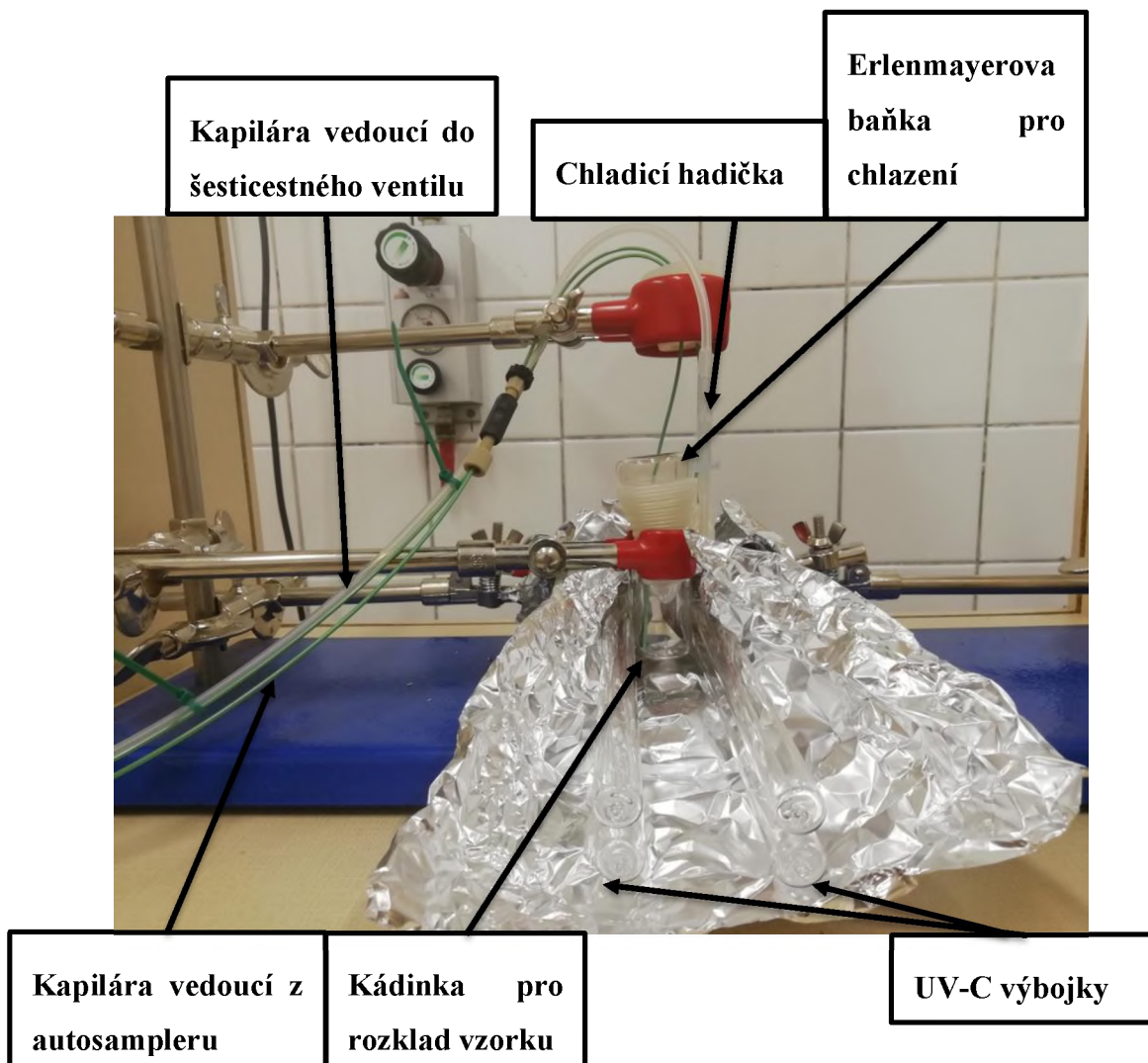
2.13 Úprava průtokového systému pro rozklad vzorku:

Původní systém pro rozklad vzorku je na obrázku 9 v kapitole 2.9.

Jelikož standardní rozklad pro celkový dusík, podle validovaného postupu pro metodu měření na Smartchemu, probíhá 1 h při 120 °C, byly UV-C výbojky obaleny alobalem, jak je vidět na obrázku 10, aby se zvýšila teplota v křemenné kádince.

Se zvýšením teploty ovšem může docházet k odpařování vzorku v křemenné kádince během rozkladu. Proto byla do tohoto systému zařazena chladicí hadička s Erlenmayerovou baňkou. Hrdlo Erlenmayerovy baňky je nasazeno na křemennou kádinku, a téměř celá je po obvodu omotána hadičkou, v níž proudí studená voda. Táž hadička je připnuta ke kapiláře vedoucí z křemenné kádinky do šesticestného ventilu, rovněž kvůli chlazení.

Během analýzy, po zavedení chladicí hadičky, byly na dně Erlenmayerovy chlazené baňky dokonce vidět kondenzované kapky analyzovaného vzorku.



Obrázek 10 - Systém pro rozklad vzorku po úpravě

Vyhodnocení výtěžnosti těchto úprav je uvedeno v kapitole 3.6.

Po této změně v rozkladu vzorku byla opět vyzkoušena analýza na tomtéž reálném vzorku odpadní vody.

2.14 Příprava kalibrace 2:

Nová kalibrace se připravuje opět z aniontů, ovšem již jen z dusičnanů a fosforečnanů. Důvod je ten, že pokud se při měření kontrolního standardu objeví nějaká chyba, musí být tato chyba způsobena pouze chybným rozkladem vzorku.

Připraví se jeden základní roztok pro kalibraci (vzorek 1), a z něho se ředěním připraví další čtyři kalibrační roztoky. Základní kalibrační roztok se připravuje do 500 ml odměrné baňky pipetováním chemikálií uvedených v tabulce 7. Baňka se doplní odplyněnou vodou po rysku a promíchá se.

Tabulka 7 - Příprava základního roztoku ke kalibraci

Aniont	Zdroj aniontu	Pipetováno	Koncentrace
Dusičnany	2.5.1.7	25,0	50,0
Fosforečnany	2.6.1.2	10,0	2,0

Další kalibrační roztoky se připraví pipetováním základního kalibračního roztoku podle tabulky 8. Pipetuje se vždy do 100 ml odměrné baňky. Po napipetování se doplní odplyněnou vodou po rysku a obsah se promíchá.

Tabulka 8 - Příprava kalibračních roztoků ze základního kalibračního roztoku

Označení kalibračního roztoku	Pipetováno základního kalibračního roztoku (ml)	Koncentrace aniontů (ml)
Vzorek 2	80	Dusičnany – 40,0
		Fosforečnany – 1,6
Vzorek 3	40	Dusičnany – 20,0
		Fosforečnany – 0,8
Vzorek 4	30	Dusičnany – 15,0
		Fosforečnany – 0,6
Vzorek 5	10	Dusičnany – 5,0
		Fosforečnany – 0,2

Vyhodnocení kalibrace 2 je uvedeno v kapitole 3.7.

2.15 Měření vzorku reálné vody po změně rozkladné aparatury:

Pro celkový dusík byla testována tato činidla:

- 5 ml vzorku + 0,5 ml oxidačního činidla B (2.6.3.5) + 0,25 ml borátového pufru (2.6.3.9).

Pro celkový fosfor byla testována tato činidla:

- 5 ml vzorku + 100 μl 0,2 M H_2SO_4 (2.6.3.1),
- 5 ml vzorku + 0,5 ml oxidační činidlo C (2.6.3.6),
- 5 ml vzorku + 0,3 ml oxidačního činidla D (2.6.3.7).

Naměřené výsledky a chromatogramy jsou v kapitole 3.8.

2.16 Měření dalších reálných vzorků:

Pro další ověření správnosti analýzy byly měřeny vzorky odpadních vod paralelně touto novou metodou a na Smartchemu.

Níže jsou uvedeny oxidační činidla, která byla použita.

Pro celkový dusík: 5 ml vzorku + 0,5 ml oxidačního činidla C (2.6.3.6) + 0,25 ml borátového pufru (2.6.3.9).

Oxidační činidlo C: ve 30 ml 0,2 M H_2SO_4 rozpustíme 0,15 g peroxidisíranu draselného. Borátový pufr: ve 100 ml odměrné baňce rozpustíme 2,4 g kyseliny borité a doplníme destilovanou vodou po rysku.

Pro celkový fosfor: 5 ml vzorku + 0,3 ml oxidačního činidla D (2.6.3.7).

Oxidační činidlo D: do 100 ml baňky odlijeme asi 50 ml 0,4 M H_2SO_4 a rozpustíme 0,5 g peroxidisíranu draselného. Po rozpuštění doplníme 0,4 M H_2SO_4 po rysku.

2.17 Příprava podkladových dat pro validaci metody:

- Příprava dat pro hodnocení linearitu kalibrace:

Tato data již byla získána proměřením kalibrace 2.

- Příprava dat pro hodnocení LOD:

Pro vyhodnocení LOD budou použita slepá stanovení koncentrace dusičnanů a fosforečnanů. Slepé stanovení je provedeno pokaždé, když se začíná nová série měření, tzn. každý den minimálně jednou.

- Příprava dat pro hodnocení robustnosti metody:

Data pro hodnocení robustnosti metody byla naměřena již dříve v této práci – viz vyhodnocení robustnosti v kapitole 3.9.3.

- Příprava dat pro hodnocení opakovatelnosti metody:

Pro opakovatelnost metody byl zvolen postup testování po úrovních. Tedy na minimálně třech různých koncentračních úrovních se provedou minimálně tři měření.

Koncentrace měřených standardů byly voleny tak, aby rovnoměrně pokryly kalibrační rozsah. Zvolené koncentrace pro celkový dusík a celkový fosfor, které budeme připravovat a jejich ekvivalenty pro dusičnany a fosforečnany jsou uvedeny v tabulce 9.

Tabulka 9 - Zvolené koncentrace pro testování opakovatelnosti a reprodukovatelnosti.

	Koncentrace dusičnanů/fosforečnanů (mg/)	Koncentrace celkového dusíku/celkového fosforu (mg/l)
Dusičnany/celkový dusík	19,261	5,0
	30,817	8,0
	38,522	10,0
Fosforečnany/celkový fosfor	0,566	0,20
	1,132	0,40
	1,981	0,70

Pro vyhodnocení opakovatelnosti je nezbytné, aby všechna měření byla provedena jedním operátorem, na jednom přístroji a za co nejkratší časový úsek.

- Příprava dat pro hodnocení reprodukovatelnosti metody:

Koncentrace roztoků celkového fosforu a celkového dusíku volíme stejně jako při přípravě dat k vyhodnocení opakovatelnosti.

Tato měření budou ovšem provedena jiným operátorem a v jiný čas, a to i s kompletní přípravou všech standardů a činidel. Tato data byla měřena konzultantem této práce.

- Příprava dat pro hodnocení nejistot měření:

Potřebná data pro hodnocení nejistot měření jsou po třech koncentračních úrovních. V tomto případě můžeme čerpat z dat dosažených při měření opakovatelnosti a reprodukovatelnosti.

3 Výsledky a diskuze

3.1 Vyhodnocení kalibrace 1:

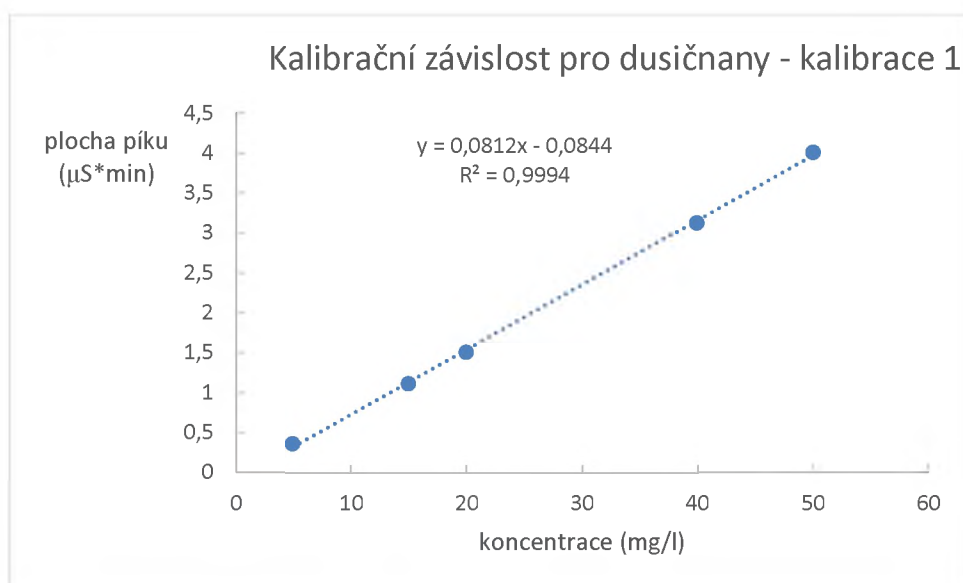
V kalibraci 1 hodnotíme naměřené plochy píků oproti připravené koncentraci kalibračního roztoku.

V tabulce 10 jsou uvedeny připravené koncentrace kalibračních roztoků a naměřené plochy píků pro dusičnany a fosforečnany.

Tabulka 10 - Naměřené plochy píků v kalibraci 1 pro dusičnany a fosforečnany.

Dusičnany		Fosforečnany	
Připravená koncentrace (mg/l)	Plocha píku (μS*min)	Připravená koncentrace (mg/l)	Plocha píku (μS*min)
5,0	0,364	0,2	0,007
15,0	1,114	0,6	0,021
20,0	1,507	0,8	0,029
40,0	3,135	1,6	0,057
50,0	4,011	2,0	0,072

Kalibrační graf (graf 1) obsahuje závislost plochy píků z tabulky 10 na koncentraci připravených kalibračních standardů pro dusičnany.



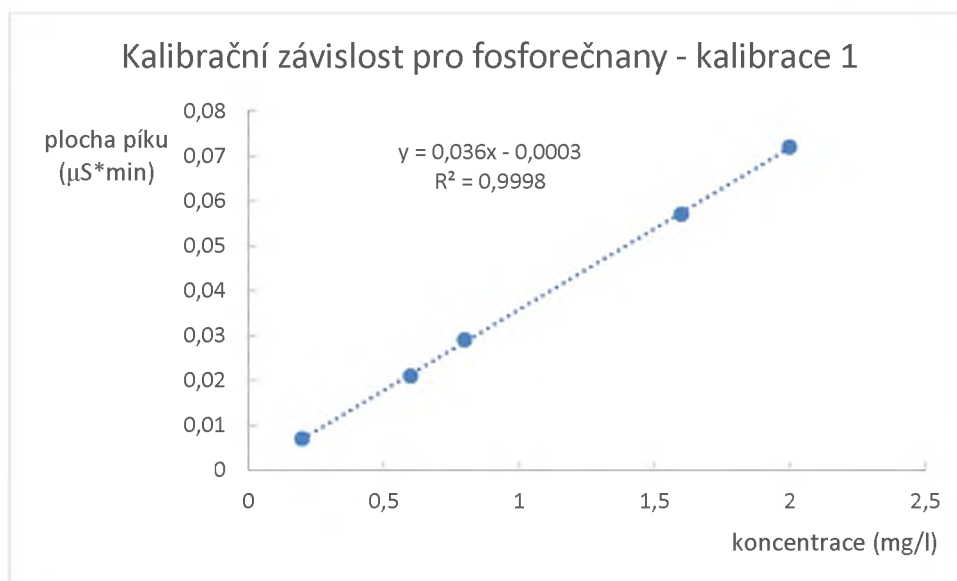
Graf 1 - Kalibrační závislost pro dusičnany - kalibrace 1.

Rovnice regrese je $y = 0,0812x - 0,0844$

Korelační koeficient 0,9994. Tato hodnota zároveň prokazuje linearitu regrese.

Zpětně vypočtené hodnoty koncentrací kalibračních roztoků z rovnice regrese jsou uvedeny v tabulce 11.

Kalibrační graf pro fosforečnany je uveden v grafu 2. Obsahuje rovněž závislost plochy píků z tabulky 10 na koncentraci připravených kalibračních standardů pro fosforečnany.



Graf 2 - Kalibrační závislost pro fosforečnany - kalibrace 1.

Rovnice regrese je $y = 0,036x - 0,0003$

Korelační koeficient 0,9998. Tato hodnota zároveň prokazuje linearitu regrese.

Zpětně vypočtené hodnoty koncentrací kalibračních roztoků z rovnice regrese jsou uvedeny v tabulce 11.

Tabulka 11 - Připravené a naměřené koncentrace kalibračních roztoků pro dusičnany a fosforečnany.

Dusičnany		Fosforečnany	
Připravená koncentrace (mg/l)	Vypočtená koncentrace (mg/l)	Připravená koncentrace (mg/l)	Vypočtená koncentrace (mg/l)
5,0	5,522	0,2	0,203
15,0	14,759	0,6	0,592
20,0	19,600	0,8	0,814
40,0	39,658	1,6	1,592
50,0	50,436	2,0	2,008

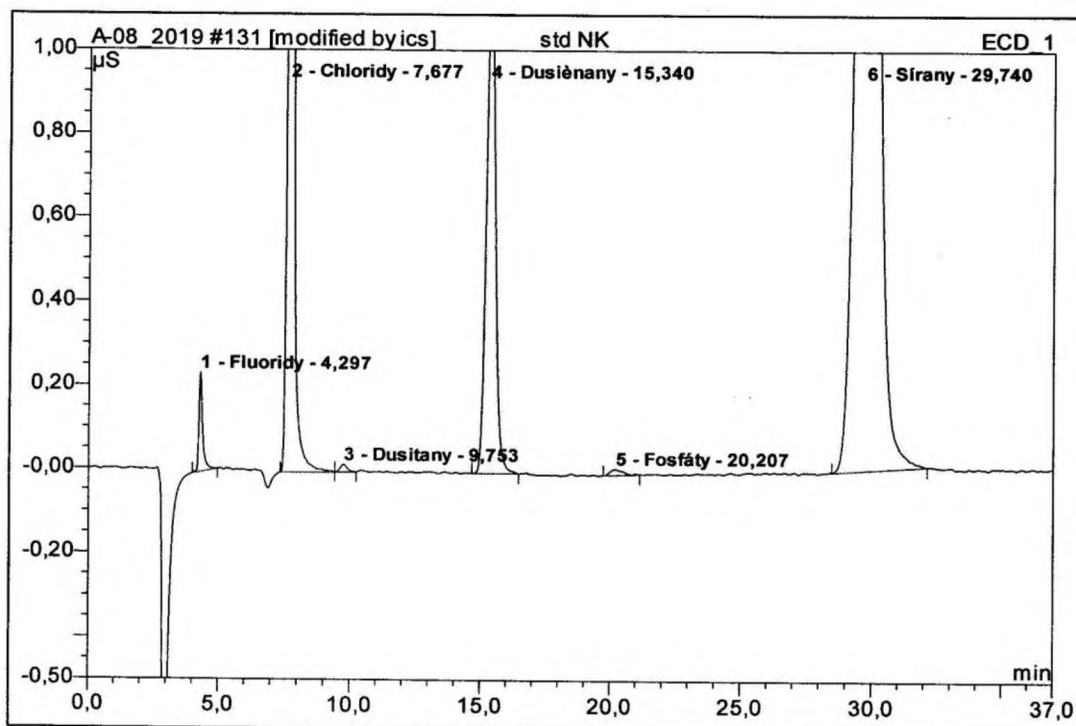
Největší směrodatná odchylka vypočtená z dat z tabulky 11 je 0,261, a to pro dusičnany o teoretické koncentraci 5,0 mg/l a příslušné vypočtené hodnotě. Na základě velikosti největší nalezené

směrodatné odchylky můžeme říci, že je kalibrace poměrně hodně přesná. Toto svědčí jednak o kvalitní přípravě kalibračních roztoků a jednak o správné funkci samotného přístroje.

3.2 Vyhodnocení standardních vzorků dusičnanů a fosforečnanů měřených v kalibraci 1, jako kontrola kvality

Chromatogram kontrolního vzorku nízké koncentrace je na obrázku 11. Připravená koncentrace tohoto vzorku byla pro dusičnany 5,0 mg/l a pro fosforečnany 0,2 mg/l. Z chromatogramu je patrné, že naměřena hodnota pro dusičnany byla po zaokrouhlení na 1 desetinné místo 5,0 mg/l a pro fosforečnany 0,2 mg/l.

Standardní vzorek - nízká koncentrace			
Sample Name:	std NK	Injection Volume:	25,0
Vial Number:	10190	Channel:	ECD_1
Sample Type:	unknown	Wavelength:	n.a.
Control Program:	Anionty_IC1000_electrolytic_recycle_TTL	Bandwidth:	n.a.
Quantif. Method:	IC_cal_7_11_2012	Dilution Factor:	1,0000
Recording Time:	27.8.2019 6:13	Sample Weight:	1,0000
Run Time (min):	37,00	Sample Amount:	1,0000



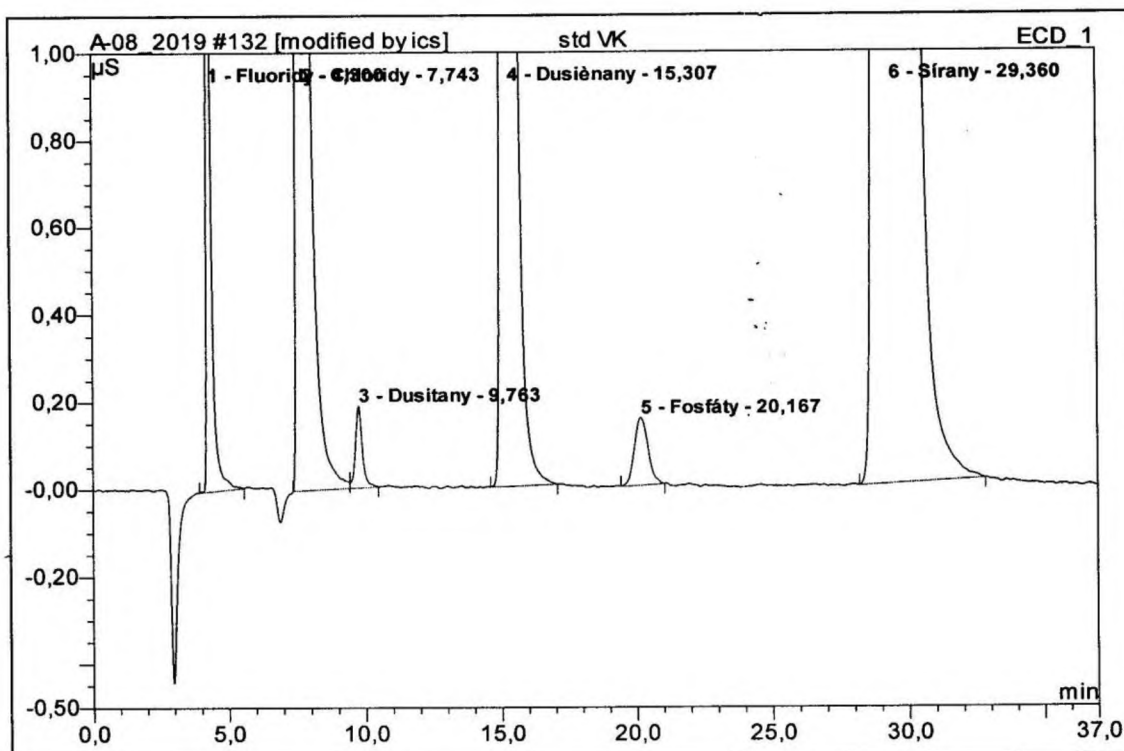
No.	Ret.Time min	Peak Name	Height μS	Area μS*min	Rel.Area %	Amount mg/l	Type
1	4,30	Fluoridy	0,237	0,039	0,82	0,152	BMB*
2	7,68	Chloridy	4,337	0,921	19,37	4,940	BM *
3	9,75	Dusitany	0,018	0,005	0,11	0,053	MB*
4	15,34	Dusičnany	1,205	0,483	10,15	5,003	BMB
5	20,21	Fosfáty	0,014	0,008	0,17	0,197	BMB*
6	29,74	Sířany	4,075	3,301	69,39	23,723	BMB
Total:			9,885	4,757	100,00	34,066	

Obrázek 11 - Report z měření - Standardní vzorek nízké koncentrace kalibrace 1

Chromatogram kontrolního vzorku pro vysokou koncentraci je uveden na obrázku 12. Připravená koncentrace dusičnanů v tomto roztoku je 50,0 mg/l a fosforečnanů 2,0 mg/l. Naměřená koncentrace pro dusičnany je po zaokrouhlení na 1 desetinné místo 50,4 mg/l a pro fosforečnany (fosfáty) je 2,0 mg/l.

Standardní vzorek - vysoká koncentrace

Sample Name:	std VK	Injection Volume:	25,0
Vial Number:	10191	Channel:	ECD_1
Sample Type:	unknown	Wavelength:	n.a.
Control Program:	Anionty_ICS1000_electrolytic_recycle_TTL	Bandwidth:	n.a.
Quantif. Method:	IC_cal_7_11_2012	Dilution Factor:	1,0000
Recording Time:	27.8.2019 6:52	Sample Weight:	1,0000
Run Time (min):	37,00	Sample Amount:	1,0000



No.	Ret.Time min	Peak Name	Height μS	Area $\mu\text{S}\cdot\text{min}$	Rel.Area %	Amount mg/l	Type
1	4,30	Fluoridy	2,394	0,397	0,67	1,552	BMB*
2	7,74	Chloridy	56,928	11,542	19,51	49,630	BM *
3	9,76	Dusitany	0,187	0,054	0,09	0,526	MB*
4	15,31	Dusičnany	14,106	5,453	9,22	50,426	BMB
5	20,17	Fosfáty	0,154	0,090	0,15	1,983	BMB
6	29,36	Sířany	51,399	41,607	70,35	249,502	BMB
Total:			125,167	59,142	100,00	353,619	

Obrázek 12 - Report z měření - Standardní vzorek vysoké koncentrace - kalibrace 1

Na základě proměření kontrolních roztoků můžeme říci, že získaná kalibrace je velmi přesná, jelikož připravené koncentrace a naměřené koncentrace se velmi úzce shodují.

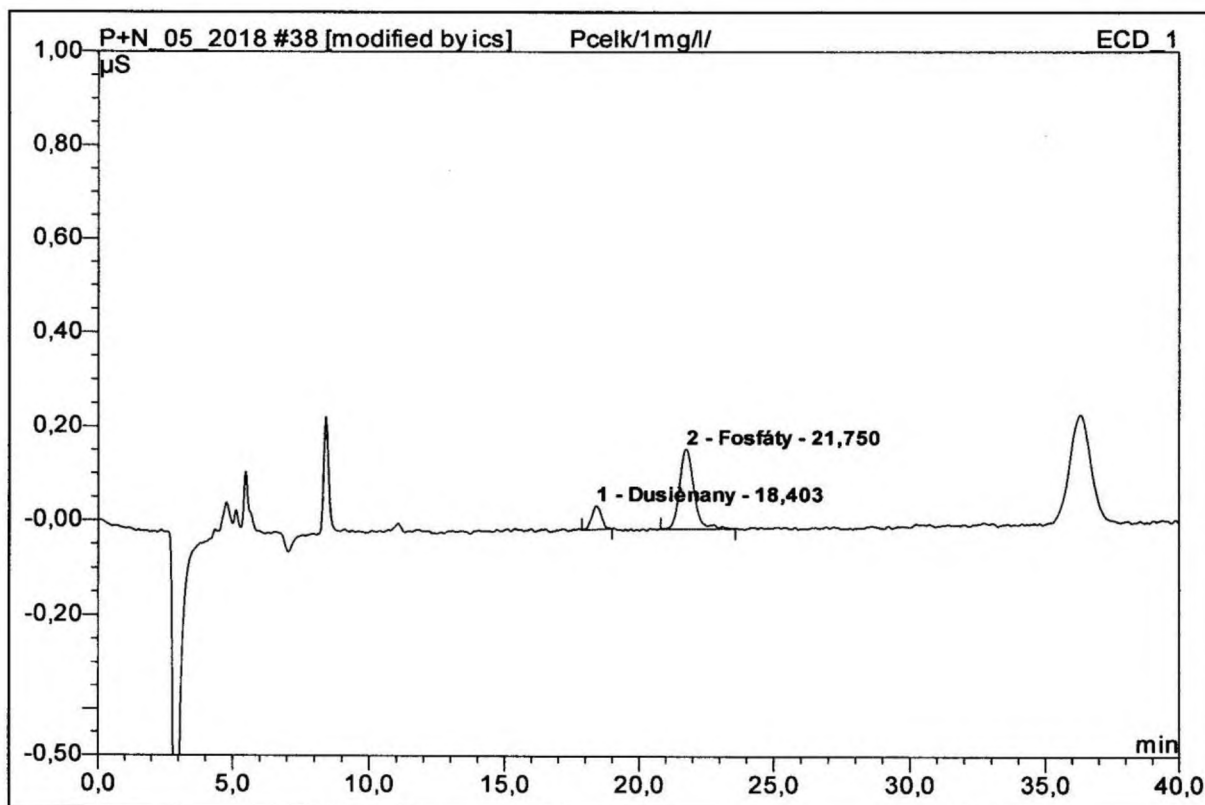
3.3 Vyhodnocení standardních vzorků celkového fosforu a celkového dusíku jako kontrola kvality rozkladu pomocí UV-C záření:

Chromatogram z měření celkového fosforu pouze pomocí UV-C záření je uveden na obrázku 13. Očekávaná hodnota při ideální rozkladu je 3,0 mg fosforečnanů na litr. Naměřená hodnota viditelná z chromatogramu je po zaokrouhlení na 1 desetinné místo 3,1 mg fosforečnanů na litr.

Jelikož se můžeme dopustit chyby 10 %, je naše dosažená hodnota naprosto dostatečná a zatím není třeba použít dalších úprav.

Standardní vzorek na celkový fosfor - 1 mg/l

Sample Name:	Pcelk/1mg/l/	Injection Volume:	25,0
Vial Number:	5603	Channel:	ECD_1
Sample Type:	unknown	Wavelength:	n.a.
Control Program:	P+ N	Bandwidth:	n.a.
Quantif. Method:	IC_cal_7_11_2012	Dilution Factor:	1,3300
Recording Time:	1.10.2019 10:00	Sample Weight:	1,0000
Run Time (min):	40,00	Sample Amount:	1,0000



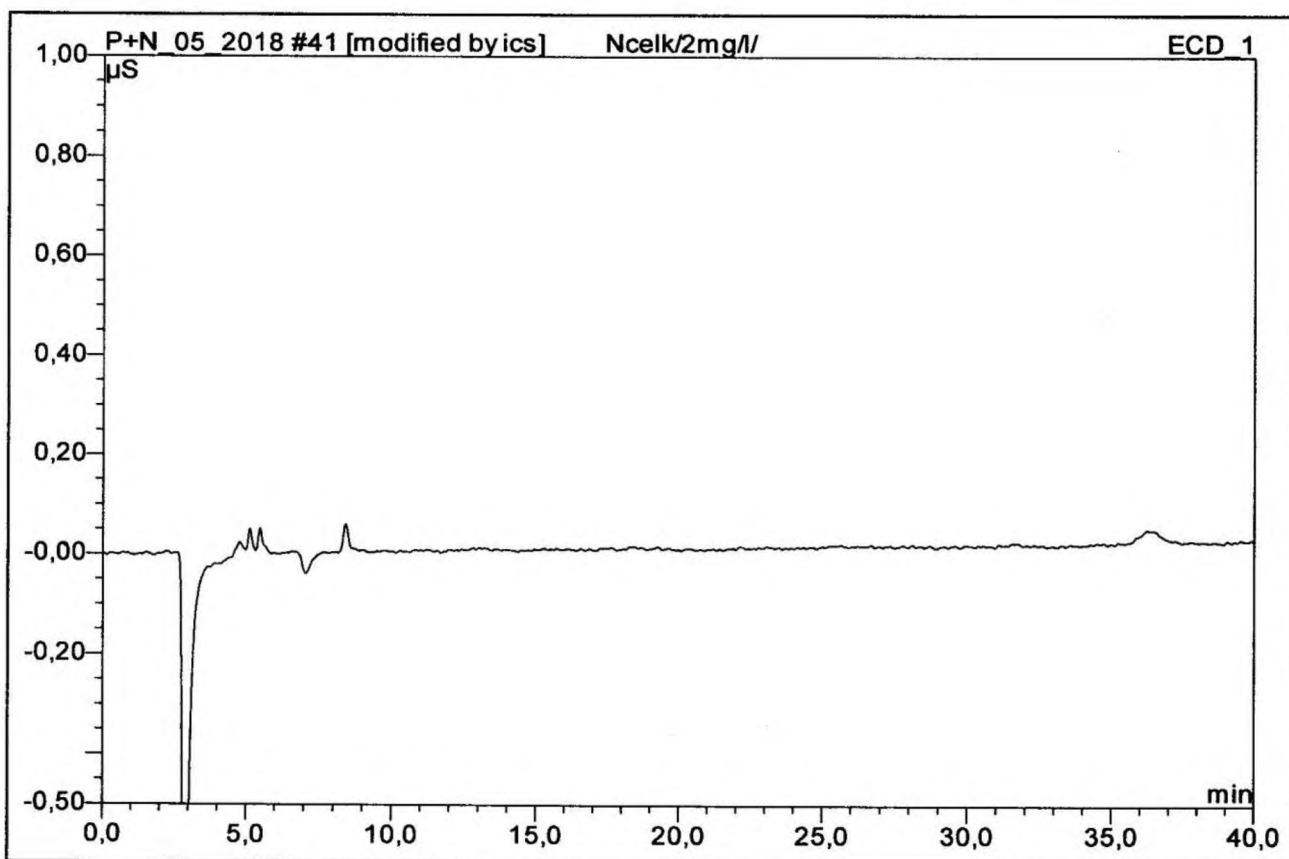
No.	Ret.Time min	Peak Name	Height µS	Area µS*min	Rel.Area %	Amount mg/l	Type
1	18,40	Dusičnany	0,049	0,020	16,16	0,304	BMB
2	21,75	Fosfáty	0,170	0,105	83,84	3,076	BMB*
Total:			0,219	0,125	100,00	3,380	

Obrázek 13 - Report z měření - Rozklad standardního vzorku na celkový fosfor pro 40ti minutách ozařování UV-C zářením

Chromatogram z měření celkového dusíku je uveden na obrázku 14. Očekáváme hodnotu dusičnanů 8,86 mg/l. Z chromatogramu je patrné, že pro retenční čas dusičnanů (18,40 minut) není ani náznak píku, proto je zapotřebí upravit systém rozkladu vzorku.

Standardní vzorek na celkový dusík - 2 mg/l

Sample Name:	Ncelk/2mg/l/	Injection Volume:	25,0
Vial Number:	5606	Channel:	ECD_1
Sample Type:	unknown	Wavelength:	n.a.
Control Program:	P+ N	Bandwidth:	n.a.
Quantif. Method:	IC_cal_7_11_2012	Dilution Factor:	1,4100
Recording Time:	1.10.2019 12:00	Sample Weight:	1,0000
Run Time (min):	40,00	Sample Amount:	1,0000



No.	Ret.Time min	Peak Name	Height µS	Area µS*min	Rel.Area %	Amount mg/l	Type
Total:			0,000	0,000	0,00	0,000	

Obrázek 14 - Report z měření - Rozklad standardního vzorku na celkový dusík po 40ti minutách ozařování UV-C zářením

Upravit systém rozkladu vzorku můžeme dvěma způsoby - buď zvýšit dobu ozařování vzorku UV-C zářením, nebo přidat rozkladná činidla.

Jelikož je našim cílem zefektivnit a zrychlit stanovení celkového dusíku a celkového fosforu, tak delší ozařování UV-C nebylo zvoleno. Dalším faktorem je i plynulost samotných analýz. Vzorek je ozařován přesně tak dlouho, jak dlouho setrvává předešlý vzorek uvnitř chromatografu (v předkoloně, koloně, detektoru). Proto tedy volíme přidání doprovodných činidel k analyzovanému vzorku.

3.4 Hodnocení výtěžnosti pro použitá činidla s jejich různým poměrem k objemu vzorku pro celkový dusík:

Z výsledků výtěžnosti prvních dvou testovaných činidel (pro první testovaný poměr vzorku a činidla 3,8 % a pro druhý 88,9 %) můžeme vyčíst, že zcela dominantní funkci v rozkladu vzorku celkového dusíku na dusičnany má peroxodisíran draselný obsažený v oxidačním činidle A.

Poslední dosažená výtěžnost pro celkový dusík (99,4 %) je naprosto dostačující.

Jelikož bylo dosaženo dostatečné správnosti stanovení na připraveném standardu, je dalším krokem analýza na reálném vzorku vody. Reálný vzorek vody je daleko složitější matrice než pouhý připravený standard, zejména jedná-li se o vodu odpadní. Můžou se proto vyskytnout nejrůznější problémy.

3.5 Vyhodnocení měření vzorku reálné vody:

Validovanou metodou byla zjištěna referenční koncentrace pro celkový dusík 151 mg/l. S 10% odchylkou měření tedy 135,9 - 166,1 mg/l.

Proměřením téhož vzorku s činidly uvedenými v kapitole 2.11, byla získána nejvyšší koncentrace pro poslední použité činidlo 124,8 mg/l. Tato koncentrace ovšem není dostatečná, a proto se musí přistoupit opět ke kroku 1) v procesu zavádění nové metody – tedy k úpravě systému, kterým vzorek protéká.

Z důvodu nutnosti upravit tento průtokový systém pro rozklad vzorku nemusel být vzorek proměřen na celkový fosfor.

3.6 Vyhodnocení upravení systému pro rozklad vzorku:

Systém pro rozklad vzorku byl obalen alobalem pro zvýšení teploty. Tento krok vedl ke zvýšení teploty z původních 49,7 °C na 63,5 °C.

Toto zvýšení teploty mělo pozitivní vliv na zjištěné koncentrace celkového dusíku (viz tabulka 12).

Tabulka 12 - Nalezené koncentrace testovaného standardu celkového dusíku před a po zvýšení teploty v křemenné kádince.

Nalezená koncentrace celkového dusíku (mg/l) při 49,7 °C (referenční hodnota $N_{\text{celk}} = 4 \text{ mg/l}$) (počet opakování = 3)	Nalezená koncentrace celkového dusíku (mg/l) při 63,5 °C (referenční hodnota $N_{\text{celk}} = 4 \text{ mg/l}$) (počet opakování = 3)
3,55	3,82
3,48	3,77
3,49	3,83

Toto zvýšení teploty tedy zlepšilo dosažené výsledky průměrně o 7,88 % oproti původním hodnotám.

Dále byla zavedena chladicí hadička. Vliv chlazení na správnost výsledku ukazuje tabulka 13.

Tabulka 13 - Vliv chlazení na správnost výsledku celkového dusíku.

Nalezená koncentrace celkového dusíku (mg/l) při teplotě 63,5 °C bez chlazení (referenční hodnota = 4 mg/l)	Nalezená koncentrace celkového dusíku (mg/l) při teplotě 63,5 °C se zařazeným chlazením (referenční hodnota = 4 mg/l)
3,82	3,98
3,77	4,02
3,83	3,91

Toto zvýšení teploty tedy zlepšilo dosažené výsledky o 4,10 % oproti původním hodnotám.

Po tomto vylepšení můžeme opět přikročit k testování reálné vody.

3.7 Vyhodnocení kalibrace 2:

Provede-li se jakýkoliv zásah do systému analýzy, ať již v úpravě vzorku, nebo v zásahu do samotného chromatografu – musí se připravit nová kalibrace. V případě použití staré kalibrace by naměřené hodnoty pravděpodobně nebyly správné. Tyto rozdíly mohou být způsobeny např. lehkým vypařováním vzorku vlivem zvýšení teploty, nebo zbytkovými objemy deionizované vody po promývání za každým analyzovaným vzorkem.

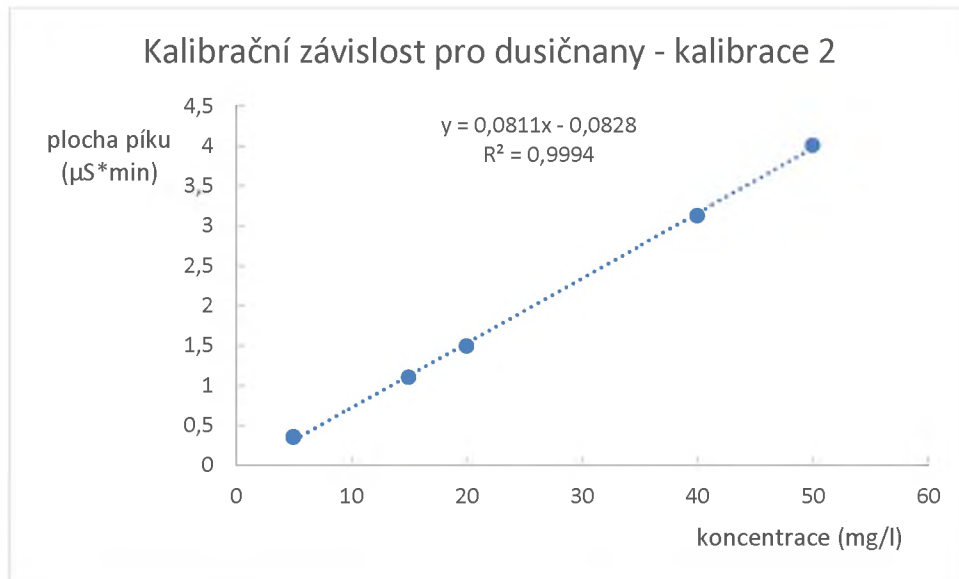
V kalibraci 2 hodnotíme rovněž naměřené plochy píků proti připravené koncentraci kalibračního roztoku.

V tabulce 14. jsou uvedeny připravené koncentrace kalibračních roztoků a naměřené plochy píků pro dusičnany a pro fosforečnany.

Tabulka 14 - Naměřené plochy píků v kalibraci 1 pro dusičnany a fosforečnany.

Dusičnany		Fosforečnany	
Připravená koncentrace (mg/l)	Plocha píku ($\mu\text{S} \cdot \text{min}$)	Připravená koncentrace (mg/l)	Plocha píku ($\mu\text{S} \cdot \text{min}$)
5,0	0,366	0,2	0,006
15,0	1,115	0,6	0,020
20,0	1,506	0,8	0,028
40,0	3,134	1,6	0,056
50,0	4,010	2,0	0,072

Kalibrační graf pro dusičnany (graf 3) obsahuje závislost plochy píků na koncentraci připravených kalibračních standardů z tabulky 14.



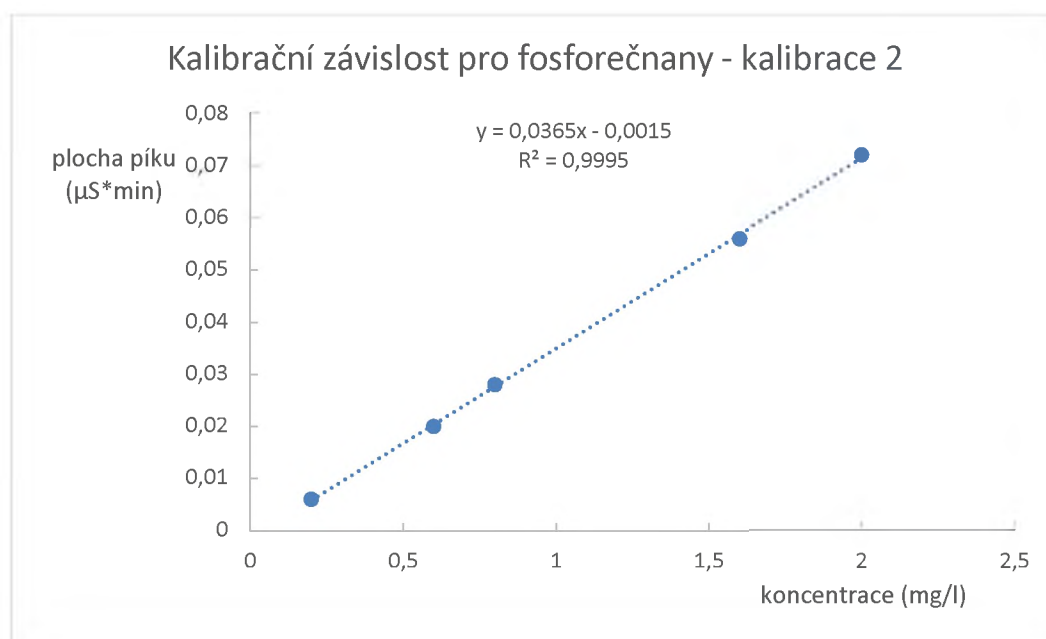
Graf 3 - Kalibrační závislost pro dusičnany - kalibrace 2.

Rovnice regrese je $y = 0,0811x - 0,0828$

Korelační koeficient je 0,9994. Tato hodnota zároveň prokazuje linearitu regrese.

Zpětně vypočtené hodnoty koncentrací kalibračních roztoků z rovnice regrese jsou uvedeny v tabulce 15.

V grafu 4 je kalibrační závislost pro fosforečnany, kde je rovněž vynesena závislost plochy píku z tabulky 14 na teoretické koncentraci kalibračních standardů.



Graf 4 - Kalibrační graf pro fosforečnany - kalibrace 2.

Rovnice regrese je $y = 0,0365x - 0,0015$

Korelační koeficient je 0,9995. Tato hodnota zároveň prokazuje linearitu regrese.

Zpětně vypočtené hodnoty koncentrací kalibračních roztoků z rovnice regrese jsou uvedeny v tabulce 15.

Největší směrodatná odchylka vypočtená z dat z tabulky 15 je 0,267, a to pro dusičnany o teoretické koncentraci 5,0 mg/l a příslušné vypočtené hodnotě. Na základě hodnoty této směrodatné odchylky můžeme říci, že kalibrace je poměrně přesná.

Tabulka 15 - Připravené a naměřené koncentrace kalibračních roztoků pro celkový dusík a celkový fosfor.

Dusičnany		Fosforečnany	
Připravená koncentrace (mg/l)	Naměřená koncentrace (mg/l)	Připravená koncentrace (mg/l)	Naměřená koncentrace (mg/l)
5,0	5,534	0,2	0,205
15,0	14,796	0,6	0,589
20,0	19,591	0,8	0,808
40,0	39,665	1,6	1,575
50,0	50,466	2,0	2,014

3.8 Vyhodnocení měření vzorků reálné vody po změně aparatury:

Po změně aparatury a proměření nové kalibrace jsme opět přikročili k testování reálného vzorku odpadní vody. Poslední použité činidlo a jeho poměr pro celkový dusík (5 ml vzorku + 0,5 ml oxidačního činidla B (2.6.3.5) + 0,25 ml borátového pufru (2.6.3.9)) dával průměrnou koncentraci celkového dusíku 158,2 mg/l. Rozmezí přijatelných koncentrací (zjištěno analýzou na Smartchemu) je 135,9 - 166,1 mg/l celkového dusíku. Dosažená hodnota pro celkový dusík je tedy přijatelná.

Pro celkový fosfor bylo rozmezí přijatelných hodnot 4,38 - 5,31 mg/l celkového fosforu - získáno analýzou na Smartchemu. Při analýze s využitím posledních uvedených činidel pro celkový fosfor (5 ml vzorku + 0,3 ml oxidačního činidla D (2.6.3.7)) byla získána průměrná hodnota 4,735 mg/l. Tato dosažená hodnota je rovněž přijatelná.

Kvůli přidávaným činidlům k analyzovaným vzorkům někdy docházelo ke krystalizaci a ucpání uvnitř kapilár v systému rozkladu vzorku, nebo i přímo ve smyčce. Z tohoto důvodu musí být za každým vzorkem zařazena promývací deionizovaná voda.

Metoda byla dále testována na dalších reálných vzorcích, paralelně s analýzou na Smartchemu. Výsledky dosažené oběma metodami byly od sebe vzdáleny požadovaných 10 %.

Optimalizované poměry oxidačních činidel je tedy správná.

Metoda byla otestována jak na připravených standardech, tak i na nejhorším možném reálném vzorku, který může být v této laboratoři měřen. Byly nalezeny uspokojivé hodnoty, proto můžeme přejít k validaci metody a tvorbě standardního operačního postupu.

Brian M. De Borba, etc, zavedl velmi podobnou metodu, jako je v této diplomové práci, na stanovení celkového dusíku a celkového fosforu ve vodách s využitím alkalického rozkladu peroxodisíranem draselným s iontově chromatografickou detekcí. Využil manuálního rozkladu vzorku, a poté ho injektoval do systému iontové chromatografie. Využité oxidační činidlo byl 0,15 M peroxodisíran draselný v 0,15 M NaOH. Poměr tohoto oxidačního činidla a dávkovaného vzorku byl 1:2, tedy na 2 ml oxidačního činidla 4 ml testované vody. Samotný rozklad byl uskutečněn v termoreaktoru, který byl temperován na 120 °C po dobu 60 minut [59].

Tento způsob byl ve Zdravotním Ústavu se Sídlem v Ústí nad Labem doposud používán, ovšem s výjimkou detekce iontové chromatografie, ale s detekcí spektrofotometrickou, která je v tomto případě daleko rychlejší. Právě proto bylo cílem praktické části této práce se tomuto

manuálnímu rozkladu vyhnout, a zabudovat ho do systému iontového chromatografu. Po přidání činidel k testovanému vzorku a po vložení do autosampleru nevyžaduje již stanovení celkového dusíku a celkového fosforu téměř žádnou práci.

3.9 Vyhodnocení validačních dat

3.9.1 Vyhodnocení linearity kalibrace:

Hodnocení linearity kalibrace bylo provedeno z již vyhodnocené kalibrace 2. Jelikož přístroj kalibrujeme na koncentrace dusičnanů a fosforečnanů, nelze v tomto případě uvést kalibrace pro celkový dusík a celkový fosfor.

Hodnocení linearity, rovnice přímky a korelační koeficient tedy vychází z kalibrace dusičnanů a fosforečnanů.

Všechny další hodnoty a parametry (pracovní rozsah, opakovatelnost...) jsou pro celkový dusík přepočteny z hodnot naměřených dusičnanů podle rovnice 28. Pro celkový fosfor jsou hodnoty přepočteny z fosforečnanů podle rovnice 29.

$$N_{celk} = \frac{c_1 \cdot 1,15}{4,43} \text{ (mg/l)} \quad (28)$$

$$P_{celk} = \frac{c_2 \cdot 1,06}{3} \text{ (mg/l)} \quad (29)$$

V těchto rovnicích jsou c_1 a c_2 naměřené koncentrace dusičnanů, resp. fosforečnanů v mg/l. Faktory 1,15 a 1,06 jsou zahrnuty kvůli ředění vzorku přidávanými činidly a pufry. Faktory 4,43 a 3 jsou k přepočtení molekulové hmotnosti z dusičnanů na celkový dusík, resp. z fosforečnanů na celkový fosfor.

Pro dusičnany byl nalezen korelační koeficient 0,9994. Jelikož se korelační koeficient velmi blíží k hodnotě 1, a jednotlivé kalibrační body jsou na přímce rozloženy rovnoměrně, můžeme říci, že kalibrace je v tomto rozsahu lineární.

Pro fosforečnany byl nalezen korelační koeficient 0,9995. Jelikož se korelační koeficient rovněž blíží k hodnotě 1, a jednotlivé kalibrační body jsou na přímce rozloženy rovnoměrně, můžeme říci, že kalibrace je v tomto rozsahu také lineární.

3.9.2 Vyhodnocení meze detekce a meze stanovitelnosti pro celkový dusík a celkový fosfor:

Meze stanovitelnosti je získána přepočtem nejnižšího bodu kalibrace dusičnanů, resp. fosforečnanů na celkový dusík, resp. celkový fosfor.

Meze detekce je získána podle rovnice 30, kdy c_{sl} je koncentrace slepého stanovení a s_{sl} je směrodatná odchylka tohoto stanovení. Takto získaná hodnota LOD pro dusičnany, resp. fosforečnany je opět přepočtena na LOD pro celkový dusík a celkový fosfor podle rovnic 28 a 29.

$$LOD = c_{sl} + 3 \cdot s_{sl} \quad (30)$$

Naměřené hodnoty slepých stanovení a jejich směrodatné odchylky pro dusičnany a fosforečnany jsou uvedeny v tabulce 16.

Tabulka 16 - Data pro výpočet LOD pro dusičnany a fosforečnany.

	Slepé stanovení pro dusičnany (mg/l)	Slepé stanovení pro fosforečnany
Slepé stanovení 1	0,142	0,009
Slepé stanovení 2	0,128	0,007
Slepé stanovení 3	0,134	0,011
Průměr slepých stanovení	0,135	0,009
Směrodatná odchylka slepých stanovení	0,006	0,002
Vypočtená hodnota LOD	0,153	0,015

Námi zjištěné hodnoty LOD pro celkový dusík je 0,040 mg/l a LOQ je 1,44 mg/l. Na Smartchemu, kde byl celkový dusík analyzován doposud, je hodnota LOQ 0,5 mg/l celkového dusíku.

Námi zjištěné hodnoty LOD pro celkový fosfor je 0,005 mg/l a LOQ je 0,0053 mg/l. Na Smartchemu, kde byl celkový fosfor analyzován doposud, je hodnota LOQ 0,05 mg/l celkového fosforu.

Námi získaný limit stanovitelnosti pro celkový fosfor je poměrně uspokojivý, vzhledem k téměř shodnému limitu stanovitelnosti pro Smartchem.

Limit detekce pro celkový dusík se od meze stanovitelnosti na Smartchemu poměrně liší, proto by stálo za zvážení pokusit se udělat kalibraci pro dusičnany v nižším rozsahu (směrem k nižším hodnotám připravených koncentrací). Pokud by byla kalibrace i v tomto rozsahu lineární, pravděpodobně bychom dospěli k nižším hodnotám LOD a LOQ.

Limity detekce a stanovitelnosti, jež zjistil Brian M. De Borba, etc. (LOD celkový dusík = 1,0 µg/l; celkový fosfor = 1,3 µg/l; LOQ celkový dusík = 3,4 µg/l; celkový fosfor = 4,2 µg/l) mají několikanásobně nižší hodnoty oproti námi zjištěnými limitům [59].

3.9.3 Vyhodnocení robustnosti metody:

Hodnocení robustnosti bylo v podstatě provedeno již v průběhu předešlého hodnocení dosažených výsledků v této práci.

Zjistili jsme, že naprosto radikální vliv má druh použitého oxidačního činidla a jeho poměr s testovaným vzorkem.

Také již víme, že se výtěžnost analýzy zvyšuje s teplotou, které je dosaženo během rozkladu v křemenné kádince.

Jiné parametry ovlivňující výtěžnost metody doposud nebyly odhaleny.

Brian M. De Borba použil jako zkoušené standardy pro celkový dusík glycin, močovinu a kyselinu nikotinovou. Glycin použil v každém analyzovaném vzorku jako kontrolu rozkladu, přičemž daný vzorek byl uměle obohacen zmiňovanými dalšími standardy. Toto mělo za účel testování robustnosti metody, tedy kontroly toho, jak vyvíjená metoda reaguje na dusíkaté látky různého původu. Stejný postup volil i v případě celkového fosforu, kde v každém testovaném vzorku byl přítomen glycerolfosfát. Další standardy na celkový fosfor byly ATP a glukóza-1-fosfát [59].

V této diplomové práci je ovšem od obou parametrů testován pouze jeden standard. Jak bylo i zde zjištěno, a co je bezpochyby faktem, reálný vzorek se nechová zdaleka stejně

jako připravený standard, proto by bylo dobré, testovat metodu na více standardech různého původu, nebo jimi uměle obohatit vzorek reálný.

3.9.4 Vyhodnocení opakovatelnosti a reprodukovatelnosti metody:

Pro hodnocení opakovatelnosti a reprodukovatelnosti metody byl využit program EffiValidation 4.0 (Brno, Česká republika). Protokoly z EffiValidationu jsou pro celkový dusík v příloze 5 a 6 a pro celkový fosfor v příloze 9 a 10.

Čím menší je hodnota vypočtené opakovatelnosti a reprodukovatelnosti, tím je metoda přesnější. Znamená to, o kolik se od sebe budou lišit dvě po sobě jdoucí měření.

Naše vypočtená opakovatelnost pro celkový dusík je 0,0058 a reprodukovatelnost je 0,0053.

Pro celkový fosfor je opakovatelnost 0,0016 a reprodukovatelnost 0,0013.

Tyto výsledky jsou velmi uspokojivé.

3.9.5 Vyhodnocení nejistoty měření:

Pro hodnocení nejistoty měření byl rovněž použit program EffiValidation.

Nalezená standardní nejistota pro celkový dusík je 0,0083 a rozšířená standardní nejistota pro celkový dusík je 0,0166.

Pro celkový fosfor je standardní nejistota 0,0014 a rozšířená standardní nejistota 0,0028.

Standardní nejistota udává nejistotu samotného měřicího systému a měření. Nezahrnuje chybu, která může být obsažena např. v CRM (nejistoty typu B). Rozšířená standardní nejistota sice nejistoty typu B rovněž neobsahuje, ale vzhledem k rozšíření (rozšíření koeficientem 2) leží výsledek v rozmezí této nejistoty s 95% pravděpodobností.

Vyhodnocení nejisto měření je pro celkový dusík v příloze 3 a pro celkový fosfor v příloze 7.

4 Závěr

Cílem praktické části této práce bylo zavést metodu pro stanovení celkového fosforu a celkového dusíku ve vodné matrici s rozkladem vzorku, který probíhá během analýzy, s tím, že se do vzorku přidá oxidační činidlo, a po vložení do autosampleru je již dále metoda plně automatizovaná.

Rozklad vzorku je zprostředkován jednak prostřednictvím oxidačních činidel a zároveň pomocí UV-C záření, které zvyšuje teplotu v rozkladné kádince.

Pro stanovení celkového fosforu i celkového dusíku bylo nalezeno optimální oxidační činidlo a optimální poměr dávkovaného činidla a vzorku.

Dále byla provedena validace metody a napsán standardní operační postup. Validace prokázala lineární průběh kalibrační přímky, dobrou opakovatelnost i reprodukovatelnosti pro oba parametry. Byly nalezeny limity detekce, stanovitelnosti a nejistoty měření.

Kalibrační rozsah pro celkový dusík je 1,44-13,10 mg/l. Limit detekce pro celkový dusík je 0,040 mg/l a limit stanovitelnosti je 1,44 mg/l. Rozšířená standardní nejistota pro celkový dusík je 0,0166.

Kalibrační rozsah pro celkový fosfor je 0,053-0,523 mg/l. Limit detekce pro celkový fosfor je 0,005 mg/l a limit stanovitelnosti je 0,053 mg/l. Rozšířená standardní nejistota pro celkový fosfor je 0,0028.

Pro tuto metodu může být zaveden regulační diagram pro řízení kvality a může se zažádat o akreditaci metody, aby mohla být plnohodnotně využita.

5 Citovaná literatura

1. Integrovaný registr znečištění. *Celkový fosfor*. Praha: Ministerstvo životního prostředí České republiky. Dostupné z: <https://www.irz.cz/node/25>.
2. Nitrogen and Phosphorus cycles: Always recycle! *Crash Course*. Khan Academy. citováno 5.5.2020. Dostupné z: <https://khanovaskola.cz/video/30/177/2316-cyklus-dusiku-a-fosforu-kdo-recykluje-zije>.
3. Biologydictionary.net Editors. Phosphorus Cycle. *Biology Dictionary*. [Online] 05. 06. 2017. <https://biologydictionary.net/phosphorus-cycle/>.
4. Monaghan, R. *The Phosphorus Cycle*. Otago, Dostupné z: <https://www.sciencelearn.org.nz/resources/961-the-phosphorus-cycle> : Science Learning Hub, 2013.
5. Integrovaný registr znečištění. *Celkový fosfor*. Praha: Ministerstvo životního prostředí České republiky. Dostupné z: <https://www.irz.cz/node/25>.
6. Pivokonský M. *Hydrochemie-anorganické látky ve vodách: P, N, Si*. Praha: ÚZP PŘF UK, 2017.
7. Hlušek J. *Minerální hnojiva - fosforečná*. Brno: Ústav agrochemie a výživy rostlin MLZÚ, 2004. Dostupné z: http://web2.mendelu.cz/af_221_multitext/vyziva_rostlin/html/hnojiva/mineralni/fosforecna.htm.
8. Agrochemický podnik Mstětice, a.s. *Superfosfát trojitý 46*. Mstětice, 2019. Dostupné z: <http://www.achpmstetice.cz/superfosfat-trojity-46>.
9. Pouzar M. *Glyfosát odsouzený*. Pardubice: OSEL.CZ, 2019. Dostupné z: <http://www.osel.cz/10652-glyfosat-odsouzeny.html>.
10. Bezpečnost potravin. *Glyfosát*. Praha : Bezpečnost potravin, Ministerstvo zemědělství, 2018. Dostupné z: <https://www.bezpecnostpotravin.cz/az/termin/92499.aspx>.
11. National Center for Biotechnology Information. *GLYPHOSATE*. PubChem Database. citováno 6. 5. 2020. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/source/hsdb/3432>.
12. Bezpečnost potravin. *Ministerstvo zemědělství výrazně omezí používání glyfosátu, od ledna zakáže jeho plošnou aplikaci*. Praha : Bezpečnost potravin, Ministerstvo zemědělství, 2018.

Dostupné z: <https://www.bezpecnostpotravin.cz/ministerstvo-zemedelstvi-vyrazne-omezi-pouzivani-glyfosatu-od-ledna-zakaze-jeho-plosnou-aplikaci.aspx>.

13. ALS Czech Republic. *ALS Pesticidy*. Praha: alsglobal.cz, 2015. Dostupné z: <https://www.alsglobal.cz/media-cz/pdf/pesticidy-2015.pdf>.

14. Pícha V. Bylo správné zakázat neonikotinoidy? [Pro a proti] Praha: Český rozhlas, 2. 5. 2018.

15. Milacron. *Role of Phosphates in Cleaners*. Cincinnati, Ohio: Milacron, 2019. Dostupné z: <https://www.milacron.com/role-of-phosphates-in-cleaners/>.

16. Drábková M, Maršálek B, Jančula D. *Podporujete výběrem pracího prášku nežádoucí růst sinic?* Brno: Centrum pro cyanobakterie a jejich toxiny, 2005. Dostupné z: <http://www.sinice.cz/index.php?pg=aktivity--popularizacni-cinnost--fosfaty>.

17. Brian, Oram. *Phosphate in Surface Water Streams Lakes*. Dallas: Water Research Center, 2014. Dostupné z: <https://water-research.net/index.php/phosphate-in-water>.

18. Trojan S. *Lékařská fyziologie*. Praha: Grada Publishing, a.s., 2003. ISBN: 80-247-0512-5.

19. Housecraft C. E, Sharpe A. G. *Agronomická chemie*. Praha: VŠCHT, 2014. 978-80-7080-872-6.

20. Robert W. Kadlec, Scott D. Wallace. *Treatment Wetlands, second edition*. Broken Sound Parkway: Taylor & Francis Group, LLC, 2009. ISBN: 13-978-1-56670-526-4.

21. Pidwirny M. *The Nitrogen Cycle*. Physical Geography.net, 2018. Dostupné z: <http://www.physicalgeography.net/fundamentals/9s.html>.

22. Mayerová S. *Fylogeneze vylučovací soustavy - prezentace*. Rokycany: Gymnázium a Střední odborná škola, 2013.

23. Yara Internacional ASA. *Nitrátová hnojiva: Optimalizace výnosů, ochrana životního prostředí*. Praha. Dostupné z: <https://www.yaraagri.cz/contentassets/2612c0cf43c24804ba66a42d17ddaa84/yara-nitratova-hnojiva-broura-2016.pdf/>.

24. Hlušek J. *Minerální hnojiva dusíkatá*. Brno: Ústav agrochemie a výživy rostlin, MZLU, 2004. Dostupné z: http://web2.mendelu.cz/af_221_multitext/vyziva_rostlin/html/hnojiva/mineralni/dusikata.htm.

25. Hlušek J. *Minerální hnojiva dusíkatá - dusíkatá hnojiva s dusíkem amonným a amoniakálním*. Brno: Ústav agrochemie a výživy rostlin MZLU, 2004. Dostupné z: http://web2.mendelu.cz/af_221_multitext/vyziva_rostlin/html/hnojiva/mineralni/amon.htm.
26. Manager, DuPont Pioneer Agronomy Information. *Common Nitrogen Fertilizers and Stabilizers for Corn Production*. Johnoson, Iowa, 2019. Dostupné z: https://www.pioneer.com/us/agronomy/common_n_fertilizers_stabilizers.html.
27. Smil V. *Enriching the Earth: Fritz Haber, Carl Bosh, and the Transformation of World Food Production*. London: Cambridge, Mass. : MIT Press, ©, 2001. 00-026291.
28. Zadák Z. *Výživa v intenzivní péči, 2. rozšířené aktualizované vydání*. Praha: Grada Publishing, 2008. 978-80-247-2844-5.
29. Nemocnice Podlesí a.s. *Referenční meze*. Podlesí: autor neznámý, 2011. Dostupné z: <http://okb.nempodlesi.cz/html/refmezvyp.html>.
30. Integrovaný registr znečišťování. *Celkový dusík*. Praha: Ministerstvo životního prostředí České republiky. Dostupné z: <https://www.irz.cz/node/19>.
31. Fewtrell L. Drinking Water Nitrate, Methemoglobinemia and Global Burden of Disease: A Discussion. *Environmental Health Perspectives*. 2004, Sv. 113, 1371-1374.
32. Ministerstvo zemědělství České republiky. *Čištění odpadních vod jako nástroj k ochraně životního prostředí v zemědělské praxi a na venkově*. Brno: MZLU, 2007. Dostupné z: http://eagri.cz/public/web/file/26962/cistení_odpadnich_vod.pdf.
33. Mino T, et al. Microbiology and Biochemistry of The Enhanced Biological Phosphate Removal Process. *Water Research*. 32, 1998, Sv. 11, 3193-3207.
34. Plaza E, Trela J, Gut L, Löwén M, Szatkowska B. *Deammonification Process for Treatment of Ammonium Rich Wastewater*. Stockolm: Department of Land and Water Resources Engineering, Royal Institute of Technology, 2003. Dostupné z: https://www.kth.se/polopoly_fs/1.650641.1550154720!/JPS10s77.pdf.
35. Technické normy ČSN. technické normy ČSN - 75 - vodní hospodářství. *Technor*. [Online] [Citace: 2. 1 2020.] Dostupné z: <http://www.technicke-normy-csn.cz/technicke-normy/vodni-hospodarstvi-75>.

36. Horáková M, Lischke P, Grünwald A. *Chemické a fyzikální metody analýzy vod. Druhé nezměněné vydání*. Praha : SNTL - Nakladatelství technické literatury, 1989. 04-606-89.
37. Technické normy ČSN. technické normy ČSN - 75 - vodní hospodářství. *Technor*. [Online] [Citace: 09. 05 2020.] Dostupné z: [http://www.technicke-normy-csn.cz/technicke-normy/vodni-hospodarstvi-75/jakost-vod-chemicky-rozbor-vod-7574/?do\[\]=setOffset&offset=0](http://www.technicke-normy-csn.cz/technicke-normy/vodni-hospodarstvi-75/jakost-vod-chemicky-rozbor-vod-7574/?do[]=setOffset&offset=0).
38. Cole-Parmer. *What You Should Know About ISE Measurements of Ammonia*. Vermon Hills, United States: Cole-Parmer , 2018. Dostupné z: <https://www.coleparmer.com/tech-article/ise-measurements-of-ammonia>.
39. Toray Engineering Co., Ltd. *Automatic Total Organic Carbon/Total Nitrogen analyzers (TOC/TN)*. Tokyo: Toray Engineering Co, Ltd., 2020.
40. Khare, Suneel Kumar. *Ion Exchange Chromatography. Production of Courseware for Postgraduate Subjects*, 2017. Dostupné z: https://www.youtube.com/watch?v=6pXLQw_mgro.
41. Walton H. F. Ion-Exchange reaction. *Encyclopaedia Britannica*. [Online] 17. 10 2016. [Citace: 03. 01 2020.] Dostupné z: <https://www.britannica.com/science/ion-exchange-reaction/Ion-exchange-materials>.
42. bio-rad. *Ion Exchange Chromatography*. [Online] 2020. Dostupné z: <https://www.bio-rad.com/en-cz/applications-technologies/ion-exchange-chromatography?ID=MWHAY9ESH#3>.
43. Sobotníková J. *Iontově výměnná chromatografie*. Praha: Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy. Dostupné z: https://web.natur.cuni.cz/~suchan/IEC_2020_web.pdf.
44. Douša, M. *Speciální techniky HPLC - Iontová chromatografie*. Praha: HPLC.cz, 2008. Dostupné z: http://www.hplc.cz/Teorie/ion_chromatography.html.
45. Lenntech. *Ion-exchange for Dummies*. místo neznámé: lenntech.com, 2008. Dostupné z: <https://www.lenntech.com/Data-sheets/Ion-Exchange-for-Dummies-RH.pdf>.
46. Douglas T. Gjerde, James S. Fritz. *Ion Chromatography, 2nd Edition*. Iowa: Hüthig, 1987. 3-7785-1207-2.
47. Douša, M. *Vodivostní HPLC detektory*. Praha: HPLC.cz. Dostupné z: http://www.hplc.cz/Teorie/COND_detector.html.

48. Douša, M. *Elektrochemické HPLC detektory*. Praha: HPLC.cz. Dostupné z: http://www.hplc.cz/Teorie/EC_detector.html.
49. Buchberger, W. W. Detection Techniques in Ion Chromatography of Inorganic Ions. *Trends in Analytical Chemistry*. 20, 2001, str. 296 - 303.
50. Madden J., Verma M. *What is the Role of a Next Generation Suppressor?* Sunnyvale: Thermo Fisher Scientific. Dostupné z: <http://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/114608-WP-70688-What-is-the-Role-of-a-Next-Generations-Suppressor.pdf>.
51. Theromo Fisher Scientific. *Eluent Suppressors for Ion Chromatography*. Sunnyvale: Dionex Corporation, 2016.
52. Yan Lin, Zhongqing Lu, Chris Pohl, John Madden, Navette Shirakawa. *Reagent-Free Ion Chromatography System With Eluent Regeneration: RFIC-ER Systems*. místo neznámé: American Laboratory, 2007. Dostupné z: <https://www.americanlaboratory.com/914-Application-Notes/1327-Reagent-Free-Ion-Chromatography-Systems-With-Eluent-Regeneration-RFIC-ER-Systems/>.
53. Marešová V. *Vývoj, optimalizace a validace metod - Základní pojmy - Problematika nejistot v toxikologii*. Praha: Ústav soudního lékařství a toxikologie 1. LF UK a VFN. Dostupné z: https://soudni.lf1.cuni.cz/file/5702/13_AT_Optimalizace%20a%20validace%20metody%20v%20toxikologii.pdf.
54. Loco Van J, Elskens M, a Croux Ch., Beernaert H. *Accredit Qual Assur* 7. místo neznámé : 281-285, 2002.
55. Douša M. *Validační program pro statistické zpracování analytických dat* . Praha: HPLC.cz. Dostupné z: http://www.hplc.cz/Validace/program_validace.htm#_3.3.1_Linearita.
56. Kocourek V. *Výklad pojmů managementu kvality v analytických laboratořích*. Praha: VŠCHT. Dostupné z: https://web.vscht.cz/~kocourev/files/SlovQA_03.pdf.
57. Plechatá R. *Způsobilost systému měření*. Mladá Boleslav: Diplomová práce, Škoda auto vysoká škola O. P. S., 2017.
58. Ludvík V. *Nejistoty měření, přesnost měření, správnost měření a otázky spojené se vzájemnou porovnatelností výsledků měření a s prohlášením o shodě s technickými specifikacemi*. Sborníky technické harmonizace - únmz, 2005. Dostupné z: https://www.unmz.cz/sborniky_th/sb8/nejistoty.pdf.

59. Brian M. De Borba, Richard F. Jack, Jeffrey S. Rohrer, Joan Wirt, Dongmei Wang. *Simultaneous Determination of Total Nitrogen and Total Phosphorus in Environmental Waters Using Alkaline Persulfate digestion and Ion Chromatography*. 1369; 131-137 : Journal of Chromatography A, 2014. Dostupné z: <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S002196731401591X?token=53D1B63589465F3EC1A1BD7D6B8628F4CFB0F0C3CED2711D9A1B1D200B204B4DFE5BE3AFE1366F126B5DA9001A0E3F52>.
60. Meloun M. *Vícerozměrný statistický soubor*. Univerzita Pardubice. Dostupné z: <https://meloun.upce.cz/docs/lecture/chemometrics/slidy/70korelace.pdf>.
61. Fisher Scientific, spol. s.r.o., Pardubice, Česká republika. *Determination of Total Phosphorus in Wastewater Using Caro's Reagent and Ion Chromatography*. Sunnyvale CA, USA: Fisher Scientific, spol. s.r.o., Pardubice, Česká republika. Dostupné z: <http://www.cromlab.es/Articulos/Columnas/HPLC/Thermo/Dionex/AS22/87551-AN254-IC-TotalPhosphorus-07Sep2010-LPN2570-01.pdf>.

6 Přílohy

Příloha 1: Standardní operační postup pro stanovení celkového fosforu a celkového dusíku iontovou chromatografií.

Příloha 2: Návod k obsluze iontového chromatografu ICS 1000.

Příloha 3: Validační protokol pro stanovení celkového dusíku iontovou chromatografií.

Příloha 4: Linearita kalibrace pro dusičnany.

Příloha 5: Opakovatelnost pro celkový dusík.

Příloha 6: Reprodukovatelnost pro celkový dusík.

Příloha 7: Validační protokol pro stanovení celkového fosforu iontovou chromatografií.

Příloha 8: Linearita kalibrace pro fosforečnany.

Příloha 9: Opakovatelnost pro celkový fosfor.

Příloha 10: Reprodukovatelnost pro celkový fosfor.

Příloha č. 1: Standardní operační postup pro stanovení celkového fosforu a celkového dusíku iontovou chromatografií.

Pro každou používanou metodu v analytické laboratoři musí být dostupný Standardní operační postup, SOP. Nedílnou součástí každé SOP je validační protokol a v příloze celá validace.

SOP - Stanovení celkového dusíku a celkového fosforu ve vodách iontovou chromatografií.

1. Název metody: Stanovení celkového dusíku a celkového fosforu iontovou chromatografií.

2. Předmět a působnost metody:

Metoda je určena pro vody a výluhy.

Při vypracování SOP byly použity jako podkladový materiál:

ČSN ISO 15691-1 (75 7464) Jakost vod – Stanovení orthofosforečnanů a celkového fosforu průtokovou analýzou (FIA a CFA) – Část 1: Metoda průtokové injekční analýzy FIA

ČSN ISO 29441 (75 7526) Jakost vod – Stanovení celkového dusíku po rozkladu UV zářením – Metoda průtokové analýzy (CFA a FIA) se spektrometrickou detekcí

3. Terminologie a definice:

Iontová chromatografie je separační metoda, kde stacionární fází je ionex. V tomto způsobu chromatografie zachycuje sorbent určitý typ iontů výměnou za jiný iont.

4. Princip metody

Stanovení celkového fosforu a celkového dusíku iontovou chromatografií je založeno na jejich oxidaci na fosforečnany a dusičnany. Tyto jsou poté stanoveny klasickou analýzou aniontů na iontovém chromatografu.

Oxidace probíhá ve vsádkovém uspořádání po nasátí vzorku. Pro dostatečnou oxidaci je použito i UV-C záření. Celkový fosfor musí být v kyselém prostředí a celkový dusík v alkalickém.

5. Rušivé vlivy

5.1. Rušivé vlivy při stanovení fosforu:

Má-li voda vysoký podíl oxidovatelných látek, pak redukční činidlo přidávané k převedení na fosforečnany nemusí stačit. Voda s vysokým podílem oxidovatelných látek má vyšší chemickou spotřebu kyslíku (CHSK). Má-li voda vyšší CHSK (nad 700 mg/l), je nutné je zředit.

Vysoká koncentrace fluoridů (nad 50 mg/l) a dusitanů (nad 5 mg/l) má významný rušivý efekt.

5.2. Rušivé vlivy při stanovení dusíku:

Má-li voda vysoký podíl oxidovatelných látek, pak redukční činidlo přidávané k převedení na fosforečnany nemusí stačit. Voda s vysokým podílem oxidovatelných látek má vyšší chemickou spotřebu kyslíku (CHSK). Má-li voda vyšší CHSK (nad 700 mg/l), je nutné je zředit.

Vzorek nesmí obsahovat více než 1000 mg/l chloridů.

6. Bezpečnost

Při provádění zkoušek podle této metody je potřebné zachovat příslušné požadavky bezpečnostních a legislativních předpisů v plném znění.

7. Přístroje a vybavení

Obvyklé laboratorní vybavení

Iontový chromatograf

UV-C zářivky

Ultrazvukový homogenizátor

8. Chemikálie a další materiály

K rozboru se používají výhradně chemikálie zaručeně analyticky čisté

8.1.: Příprava mobilní fáze:

Do nádoby určené pro mobilní fázi se odměří přesně 38,4 ml roztoku uhličitanu sodného a 25,6 ml roztoku hydrogenuhličitanu sodného. Nádoba se doplní odplyněnou vodou po rysku a obsah se promíchá.

8.1.1: Roztok uhličitanu sodného $c = 0,5 \text{ mol/l}$:

Pro přípravu 0,5 mol/l uhličitanu sodného se do 500 ml odměrné baňky naváží 26,5 g bezvodého uhličitanu sodného, který se rozpustí v menším objemu odplyněné vody. Po rozpuštění uhličitanu se baňka doplní odplyněnou vodou po rysku a obsah se promíchá.

8.1.2: Roztok hydrogenuhličitanu sodného $c = 0,5 \text{ mol/l}$:

Do plastové 500 ml odměrné baňky se naváží a rozpustí 21 g hydrogenuhličitanu sodného. Baňka se doplní odplyněnou vodou pro rysku.

8.2: Chemikálie pro přípravu aniontů:

8.2.1: dusičnany, CRM, $c = 1000 \text{ mg/l}$; ANALYTIKA³³

8.2.2: dusičnany, CRM, $c = 1000 \text{ mg/l}$; MERCK

8.2.3: fosforečnany, CRM, $c = 1000 \text{ mg/l}$; ANALYTIKA

8.2.4: fosforečnany, CRM, $c = 1000 \text{ mg/l}$; MERCK

8.2.5: fosforečnany, roztok $c = 100 \text{ mg/l}$; ANALYTIKA

³³ Dodavatel je uváděn pouze proto, aby bylo zřetelné, že je třeba mít stejné anionty od dvou různých dodavatelů. Kalibrace se dělá z chemikálií od jednoho dodavatele, kontrolní standardy z chemikálií od druhého dodavatele.

Z Certifikovaného referenčního materiálu ANALYTIKA o koncentraci fosforečnanů $c = 1000 \text{ mg/l}$ se odpipetuje 10,0 ml do 100 ml odměrné baňky. Baňka se doplní vodou po značku a promíchá se.

Lze použít i přímo dodávaný referenční roztok o příslušné koncentraci.

Tento roztok je uložen v lednici a jeho trvanlivost je 1 rok.

8.2.6: Příprava roztoku fosforečnanů, roztok $c = 100 \text{ mg/l}$ MERCK

Z Certifikovaného referenčního materiálu MERCK o koncentraci fosforečnanů $c = 1000 \text{ mg/l}$ se odpipetuje 10,0 ml do 100 ml odměrné baňky. Baňka se doplní vodou po značku a promíchá se.

Lze použít i přímo dodávaný referenční roztok o příslušné koncentraci.

Tento roztok je uložen v lednici a jeho trvanlivost je 1 rok.

8.3. Oxidační činidla:

8.3.1: Peroxodisíran draselný; p.a

8.3.2: Hydroxid sodný; p.a.

8.3.3: Chlorid titaničitý; p.a.

8.3.4: Kyselina boritá; p.a.

8.3.5: Kyselina sírová; 96%

8.3.6: Oxidační činidlo pro celkový dusík:

Ve 100 ml odměrné baňce rozpustíme 4,5 g peroxodisíranu draselného (8.3.1). Pro rozpuštění přidáme 1,2 g hydroxidu sodného (8.3.2) a 0,25 ml roztoku chloridu titaničitého (8.3.3). Doplníme po rysku deionizovanou vodou.

8.3.7: borátový pufr

Ve 100 ml odměrné baňce rozpustíme 2,4 g kyseliny borité (8.3.4) a doplníme deionizovanou vodou po rysku

8.3.8: oxidační činidlo pro celkový fosfor:

Do 100 ml baňky odlijeme asi 50 ml 0,4 M H₂SO₄ (8.3.5) a rozpustíme 0,5 g peroxidisíranu draselného (8.3.1). Po rozpuštění doplníme 0,4 M H₂SO₄ po rysku.

8.4: příprava vzorku pro ověření správnosti analýzy

Pro ověření správnosti se zpracuje souběžně se vzorkem standardní vzorek s předepsaným obsahem aniontů s nižší koncentrací (NK) a vzorek s vyšší koncentrací (VK).

Do 500 ml baňky se pipetují roztoky dusičnanů a fosforečnanů dle tabulky 1. Baňka se doplní odplyněnou vodou po rysku a obsah se promíchá.

Standard VK je uložen v lednici a jeho trvanlivost je 6 měsíců.

Pro přípravu NK je vzorek VK naředěn 10x. Standard NK je uložen v lednici a jeho trvanlivost je 1 měsíc.

Tabulka 1 - SOP - Příprava standardního vzorku o vysoké koncentraci

Aniont	Zdroj aniontu	Pipetováno (ml)	Koncentrace (mg/l)
Dusičnany	8.2.2	25,0	50,0
Fosforečnany	8.2.6	10,0	2,0

9. Odběr a uchování vzorku

Je nezbytně nutné zajistit, aby odebírané vzorky byly reprezentativní (zejména jsou-li v něm obsaženy nerozpuštěné látky), a aby nebyly při odběru znečištěny organickými látkami.

Vzorky se odebírají do plastových nebo skleněných lahví. Měly by být analyzovány, nebo alespoň rozloženy do 24 hodin od odběru. Do vyšetření se uchovávají při 2 – 5°C.

10. Příprava kalibrace

Připraví se 1 základní roztok pro kalibraci (vzorek 1), a z něho se ředěním připraví další 4 kalibrační roztoky. Základní kalibrační roztok se připravuje do 500 ml odměrné baňky pipetováním chemikálií uvedených v tabulce 2. Baňka se doplní odplyněnou vodou po rysku a promíchá se.

Tabulka 2 - SOP - příprava základního roztoku ke kalibraci

Aniont	Zdroj aniontu	Pipetováno	Koncentrace
Dusičnany	8.2.1	25,0	50,0
Fosforečnany	8.2.5	10,0	2,0

Další kalibrační roztoky se připraví pipetováním základního kalibračního roztoku podle tabulky 3. Pipetuje se vždy do 100 ml odměrné baňky. Po napipetování se doplní odplyněnou vodou po rysku a obsah se promíchá.

Tabulka 3 - SOP - příprava kalibračních roztoků ze základního kalibračního roztoku

Označení kalibračního roztoku	Pipetováno základního kalibračního roztoku (ml)	Koncentrace aniontů (ml)
Vzorek 2	80	Dusičnany – 40,0
		Fosforečnany – 1,6
Vzorek 3	40	Dusičnany – 20,0
		Fosforečnany – 0,8
Vzorek 4	30	Dusičnany – 15,0
		Fosforečnany – 0,6
Vzorek 5	10	Dusičnany – 5,0
		Fosforečnany – 0,2

11. Pracovní postup

Pokud je vzorek zakalený, přefiltruje se přes teflonový filtr o velikosti pórů 0,45 mm. Jedná-li se o viditelně znečištěnou vodu, vzorek se před další úpravou minimálně 10x naředí.

V kádince smícháme uvedené objemy vzorku a činidel uvedených níže. Takto upravený vzorek poté přelijeme do vialek určených k analýze na iontovém chromatografu.

Pro stanovení celkového dusíku: 5 ml vzorku + 0,5 oxidačního činidla (8.3.6.) + 0,25 ml borátového pufru (8.3.7.).

Pro celkový fosfor: 5 ml vzorku + 0,3 ml oxidačního činidla (8.3.8.).

Postup k obsluze iontového chromatografu je uveden v příloze.

12. Výpočet a uvádění výsledků

Výsledky odečtené z iontového chromatogramu, jako dusičnany a fosforečnany v mg/l, jsou přepočteny na celkový dusík a celkový fosfor dle rovnic 1 a 2.

$$N_{celk} = \frac{c_1 \cdot 1,15}{4,43} \text{ (mg/l)} \quad (1)$$

$$P_{celk} = \frac{c_2 \cdot 1,06}{3} \text{ (mg/l)} \quad (2)$$

c_1 = naměřená koncentrace dusičnanů (mg/l)

c = naměřená koncentrace fosforečnanů (mg/l)

hodnota 1,15 = ředění, získané přidáváním činidel ke vzorku určenému k analýze na celkový dusík

hodnota 4,43 = přepočítávací faktor na základě poměru molekulových hmotností $[\text{NO}_3^-]/[\text{N}]$.

hodnota 1,06 = ředění, získané přidáváním činidel ke vzorku určenému k analýze na celkový fosfor

hodnota 3 = přepočítávací faktor na základě poměru molekulových hmotností $[\text{PO}_4^{3-}]/[\text{P}]$.

13. Charakteristiky metody

Charakteristiky metody jsou uvedeny ve validačním protokolu a v protokolu o nejistotě stanovení.

14. Řízení kvality

Pro ověření správnosti analýzy se zpracuje souběžně se vzorkem standardní vzorek o nízké koncentraci označen NK, a standardní vzorek o vysoké koncentraci označen VK.

15. Způsob archivace dat

Primární záznamy související se zkouškou jsou vedeny v souladu s dokumentem „Řízení záznamů“. Dokumenty jsou uloženy v laboratoři nejméně 1 rok. Poté jsou přesunuty do archivu na dobu nejméně 5 let.

16. Technologické lhůty

Technologické lhůty jsou dány dobou přípravy vzorků k analýze, jeho případnou úpravou k odstranění rušivých vlivů, změřením koncentrace celkového dusíku a celkového fosforu a provedením prvků kontroly kvality

17. Odkazy na příloženou literaturu

ČSN EN ISO 15681-1 (75 7464) – Jakost vod – Stanovení orthofosforečnanů a celkového fosforu průtokovou analýzou (FIA a CFA) – Část 1: Metoda průtokové injekční analýzy (FIA)

ČSN ISO 29441 (75 7526) – Jakost vod – Stanovení celkového dusíku po rozkladu UV zářením – Metoda průtokové analýzy (CFA a FIA) se spektrometrickou detekcí.

Příloha č. 2: Návod k obsluze iontového chromatografu ICS 1000.

- 1) Spustí se kolonový termostat zasunutím síťové vidlice do zásuvky. Spustí se IC spínačem umístěným na zadní straně zařízení. Spustí se autosampler AS 40 spínačem umístěným na zadní straně zařízení.

Spustí se počítač a obslužný program „Chromeleon“.

Zkontroluje se, zda je otevřen hlavní ventil na tlakové lahvi s heliem, a za je na ukazateli tlaku i dostatečný tlak.

Zkontroluje se, zda je v nádobě na mobilní fázi (4 litrová plastová láhev) dostatečný objem mobilní fáze. Objem mobilní fáze je psán i na monitoru hlavního panelu v programu Chromeleon.

Je-li potřeba připravit novou mobilní fázi, musí se před zahájením analýzy na cca 3 minuty vyměnit hadičky vedoucí do/z nádoby s mobilní fází, aby se tato probublala heliem a zbavila se tak zbývajícího vzduchu. Dále se musí odstranit bubliny z hadiček, a to přes software, otevřením ventilu „eluent flow valve“. Tento se nechá otevřený tak dlouho, dokud z něj viditelně nebudou vycházet žádné bubliny. Takový stav odpovídá asi 20 ml odpuštěné mobilní fáze.

Zkontroluje se, zda je v nádobě vedoucí k supresoru dostatečný objem odplyněné vody. Na peristaltickém čerpadle, které čerpe vodu k supresoru se přitlačí kladinka do držáku.

- 2) Spustí se chromatograf: otevře se primovací ventil a přes tlačítko „start up“ se spustí primování. Neodchází-li z primovacího ventilu odpadní hadičkou žádné bubliny, klikne se na „OK“ na informační rámečku, který se objevil při začátku primování. Primovací ventil se uzavře.
- 3) Dále se klikne na tlačítko monitorování baseline a ve vyskočeném okně se nastaví koncentrace uhličitanu 13 mmol/l.

Baseline se stabilizuje 70 minut.

Prvním vloženým vzorkem je vždy destilovaná voda, poté standardy NK a VK a pak až vzorky vod k analýze.

- 4) Pro vypnutí chromatografu se buď klikne na „shutdown“ nebo se použije automatický vypínací program.

Příloha 3 – Validační protokol pro stanovení celkového dusíku iontovou chromatografií a stanovení nejistot měření.

Validační protokol	
SOP	Stanovení celkového dusíku iontovou chromatografií
Charakter validačního procesu	Plná validace metody

1. Analytická metoda	
Název metody	Stanovení celkového dusíku iontovou chromatografií
Analyt	CRM - N celk
Předpis, zdroj	ČSN ISO 29441 (75 7526)
Přístroj	iontový chromatograf ICS 1000
Datum měření	2019-2020
Analytik	Lenka Hrodková, Bc.

2. Kalibrace analytické metody	
Kalibrační vztah	Lineární rovnice
Způsob vyhodnocení kalibračního vztahu	Microsoft Excel
Pracovní rozsah	1,44-13,10 mg/l N _{celk} (5,0-50,0 mg/l NO ₃ ⁻)
Linearita (ano/ne) – způsob zjištění	Ano - hodnota korelačního koeficientu
Citlivost směrnice kalibračního vztahu	0,0811

3. Meze detekce a stanovitelnosti	
Mez detekce (mg/l)	0,040 mg/l N _{celk}
Způsob zjištění	Výpočtem ze slepých stanovení pro dusičnany. Přepočteno na celkový dusík.
Mez stanovitelnosti	1,44 mg/l N _{celk}

Způsob zjištění	Spodní bod kalibrační křivky pro dusičnany. Přepočet na celkový dusík.
------------------------	---------------------------------------------------------------------------

4. Robustnost	
Parametry, které mohou mít statistický význam	Stav oxidačního činidla
	Teplota rozkladu vzorku

5. Opakovatelnost - po úrovních				
Průměr zjištěné koncentrace	Úroveň 1 – 5,0 mg/l N_{celk}	5,01 mg/l	Směrodatná odchylna opakovatelnosti po jednotlivých úrovních	0,005
	Úroveň 2 – 8,0 mg/l N_{celk}	8,00 mg/l		0,005
	Úroveň 3 – 10,0 mg/l N_{celk}	10,00 mg/l		0,005
Opakovatelnost metody	0,0058			

6. Reprodukovatelnost - po úrovních				
Průměr zjištěné koncentrace	Úroveň 1 – 5,0 mg/l N_{celk}	5,00 mg/l	Směrodatná odchylna reprodukovatelnosti po jednotlivých úrovních	0,004
	Úroveň 2 – 8,0 mg/l N_{celk}	8,00 mg/l		0,005
	Úroveň 3 – 10,0 mg/l N_{celk}	9,99 mg/l		0,000
Reprodukovatelnost metody	0,0053			

7. Správnost	
Správnost prokázána	Ano

Hodnota vychýlení (bias)	0,102
---------------------------------	-------

8. Závěrečné vyjádření k validačnímu protokolu	
Závěr	Metoda je vhodná pro zamýšlené použití
Schválil	Alexi Vladimír, Ing.
Datum	5. 5. 2020
Přílohy	Kalibrační graf Opakovatelnost, reprodukovatelnosti Nejistota měření

Vstupní data pro vyhodnocení nejistoty měření celkového dusíku jsou uvedena v tabulce 1:

Tabulka 1 - vstupní data pro vyhodnocení nejistoty měření celkového dusíku

Popis	Měření 1 (mg/l)	Měření 2 (mg/l)
5 mg/l N_{celk}	5,01	5,00
8 mg/l N_{celk}	7,99	8,00
10 mg/l N_{celk}	10,00	9,99

Vyhodnocení nejistot je uvedeno v tabulce 2:

Tabulka 2 - vyhodnocení nejistoty měření pro celkový dusík

Charakteristika	Hodnota
Standardní nejistota	0,0083
Koeficient rozšíření	2
Rozšířená standardní nejistota	0,0166

Vypočtená standardní nejistota (nejistota typu A) je 0,0083. Rozšířená standardní nejistota je 0,0166.

Příloha 4 – Linearita kalibrace pro dusičnany.

Vstupní data pro vyhodnocení kalibrace dusičnanů jsou uvedena v tabulce 1:

Tabulka 1 – Vstupní data pro vyhodnocení kalibrace dusičnanů.

Popis	Připravená koncentrace NO₃⁻ (mg/l)	Změřená plocha píku (μS*min)	Vypočtená hodnota koncentrace NO₃⁻ (mg/l)	Přepočet Vypočtená hodnota koncentrace NO₃⁻ (mg/l) na N_{celk} (mg/l)
Úroveň 1	5,0	0,366	5,534	1,437
Úroveň 2	15,0	1,115	14,796	3,834
Úroveň 3	20,0	1,506	19,591	5,086
Úroveň 4	40,0	3,134	39,665	10,297
Úroveň 5	50,0	4,010	50,466	13,101

Rovnice přímky: $y = 0,0811x - 0,0828$

Úsek = - 0,0828

Směrnice = 0,0811

Korelační koeficient = 0,9994

Na základě korelačního koeficientu a znalosti rozložení bodů na přímce můžeme prohlásit, že je kalibrační závislost lineární.

Příloha 5 – Opakovatelnost pro celkový dusík.

Vstupní data pro výpočet opakovatelnosti pro celkový jsou uvedena v tabulce 1:

Tabulka 1 - vstupní data pro výpočet opakovatelnosti pro celkový dusík

Popis	Měření 1 (mg/l)	Měření 2 (mg/l)	Měření 3 (mg/l)	Měření 4 (mg/l)
5 mg/l N _{celk}	5,01	5,01	5,00	5,00
8 mg/l N _{celk}	7,99	8,00	7,99	8,00
10 mg/l N _{celk}	9,99	10,00	10,00	9,99

Vyhodnocení opakovatelnosti pro celkový dusík je uvedeno v tabulce 2:

Tabulka 2 - vyhodnocení opakovatelnosti pro celkový dusík

Popis	Průměr	Opakovatelnost	Rel. opakovatelnost (%)	Počet měření
5 mg/l N _{celk} =	5,01	0,0058	0,12	4
8 mg/l N _{celk} =	8,00	0,0058	0,07	4
10 mg/l N _{celk} =	10,00	0,0058	0,06	4

Opakovatelnost analytické metody pro stanovení celkového dusíku je 0,0058. Hodnota relativní opakovatelnosti vyhovuje zadanému kritériu přijatelnosti 10 %.

Příloha 6: Reprokovatelnost pro celkový dusík.

Vstupní data pro vyhodnocení reprodukovatelnosti pro stanovení celkového dusíku jsou uvedena v tabulce 1:

Tabulka 1 - Vstupní data pro vyhodnocení reprodukovatelnosti pro celkový dusík

Popis	Měření 1 (mg/l)	Měření 2 (mg/l)	Měření 3 (mg/l)	Měření 4 (mg/l)
5,0 mg/l N _{celk}	5,01	5,00	5,00	5,00
8,0 mg/l N _{celk}	7,99	8,00	8,00	7,99
10,0 mg/l N _{celk}	9,98	9,99	9,99	9,99

Vyhodnocení reprodukovatelnosti pro celkový dusík je uvedeno v Tabulce 2:

Tabulka 2 - Vyhodnocení reprodukovatelnosti pro celkový dusík

Popis	Průměr	Reprodukovatelnost	Rel. reprodukovatelnost (%)	Počet měření
5,0 mg/l N _{celk}	5,00	5,003	0,10	4
8,0 mg/l N _{celk}	8,00	7,995	0,072	4
10,0 mg/l N _{celk}	9,99	9,988	0,050	4

Reprodukovatelnost stanovení celkového dusíku je 0,0186 jednotek, tj. 0,0761 %. Hodnota relativní reprodukovatelnosti vyhovuje zadanému kritériu přijatelnosti 10 %.

Příloha 7: Validační protokol pro stanovení celkového fosforu iontovou chromatografií a stanovení nejistot měření.

Validační protokol	
SOP	Stanovení celkového fosforu iontovou chromatografií
Charakter validačního procesu	Plná validace metody

1. Analytická metoda	
Název metody	Stanovení celkového fosforu iontovou chromatografií
Analyt	CRM - P celk
Předpis, zdroj	ČSN EN ISO 15681-1 (75 7464)
Přístroj	iontový chromatograf ICS 1000
Datum měření	2019-2020
Analytik	Lenka Hrodková, Bc.

2. Kalibrace analytické metody	
Kalibrační vztah	Lineární rovnice
Způsob vyhodnocení kalibračního vztahu	Microsoft Excel
Pracovní rozsah	0,053-0,523 mg/l P _{celk} (0,2-2,0 mg/l PO ₄ ³⁻)
Linearita (ano/ne) – způsob zjištění	Ano - hodnota korelačního koeficientu
Citlivost směrnice kalibračního vztahu	0,0365

3. Meze detekce a stanovitelnosti	
Mez detekce (mg/l)	0,005 mg/l P _{celk}
Způsob zjištění	Výpočtem ze slepých stanovení pro fosforečnany. Přepočten na celkový fosfor.
Mez stanovitelnosti	0,053 mg/l P _{celk}

Způsob zjištění	Spodní bod kalibrační křivky pro fosforečnany. Přepočet na celkový fosfor.
------------------------	-------------------------------------------------------------------------------

4. Robustnost	
Parametry, které mohou mít statistický význam	Stav oxidačního činidla
	Teplota rozkladu vzorku

5. Opakovatelnost - po úrovních				
Průměr zjištěné koncentrace	Úroveň 1 – 0,2 mg/l P _{celk}	0,198 mg/l	Směrodatná odchylka opakovatelnosti po jednotlivých úrovních	0,001
	Úroveň 2 – 0,4 mg/l P _{celk}	0,399 mg/l		0,002
	Úroveň 3 – 0,7 mg/l P _{celk}	0,700 mg/l		0,001
Opakovatelnost metody	0,0016			

6. Reprodukovatelnost - po úrovních				
Průměr zjištěné koncentrace	Úroveň 1 – 0,2 mg/l P _{celk}	0,198 mg/l	Směrodatná odchylka reprodukovatelnosti po jednotlivých úrovních	0,001
	Úroveň 2 – 0,4 mg/l P _{celk}	0,399 mg/l		0,001
	Úroveň 3 – 0,7 mg/l P _{celk}	0,699 mg/l		0,001
Reprodukovatelnost metody	0,0013			

7. Správnost	
Správnost prokázána	Ano

Hodnota vychýlení (bias)	0,013
---------------------------------	-------

8. Závěrečné vyjádření k validačnímu protokolu	
Závěr	Metoda je vhodná pro zamýšlené použití
Schválil	Alexi Vladimír, Ing.
Datum	5. 5. 2020
Přílohy	Kalibrační graf Opakovatelnost, reprodukovatelnosti Nejistota měření

Vstupní data pro vyhodnocení nejistot stanovení celkového fosforu je uvedeno v tabulce 1:

Tabulka 1 - Vstupní data pro vyhodnocení nejistot stanovení celkového fosforu

Popis	Měření 1 (mg/l)	Měření 2 (mg/l)
0,2 mg/l P _{celk}	0,196	0,198
0,4 mg/l P _{celk}	0,396	0,398
0,7 mg/l P _{celk}	0,701	0,699

Vyhodnocení nejistot stanovení celkového fosforu je uvedeno v tabulce 2:

Tabulka 2 - Vyhodnocení nejistot stanovení celkového fosforu

Charakteristika	Hodnota
Standardní nejistota	0,0014
Koeficient rozšíření	2
Rozšířená standardní nejistota	0,0028

Rozšířená st. nejistota je 0,0014. Rozšířená standardní nejistota je 0,0028.

Příloha 8: Linearita kalibrace pro fosforečnany.

Vstupní data pro kalibraci fosforečnanů jsou uvedena v tabulce 1:

Tabulka 1 - Vstupní data pro kalibraci fosforečnanů.

Popis	Připravená koncentrace PO₄³⁻ (mg/l)	Změřená plocha píku (μS*min)	Vypočtená hodnota koncentrace PO₄³⁻ (mg/l)	Přepočet Vypočtená hodnota koncentrace PO₄³⁻ (mg/l) na P_{celk} (mg/l)
Úroveň 1	0,2	0,006	0,205	0,053
Úroveň 2	0,6	0,020	0,589	0,153
Úroveň 3	0,8	0,028	0,808	0,210
Úroveň 4	1,6	0,057	1,575	0,409
Úroveň 5	2,0	0,072	2,014	0,523

Rovnice přímky: $y = 0,0365x - 0,0015$

Úsek = - 0,0015

Směrnice = 0,0365

Korelační koeficient = 0,9995

Linearita byla prokázána na základě hodnot korelačního koeficientu a znalosti rozložení bodů na přímce.

Příloha 9: Opakovatelnost pro celkový fosfor.

Vstupní data pro vyhodnocení opakovatelnosti stanovení celkového fosforu jsou uvedena v tabulce 1:

Tabulka 1 -Vstupní data pro vyhodnocení opakovatelnosti stanovení celkového fosforu:

Popis	Měření 1 (mg/l)	Měření 2 (mg/l)	Měření 3 (mg/l)	Měření 4 (mg/l)
0,2 mg/l P _{celk}	0,196	0,198	0,200	0,198
0,4 mg/l P _{celk}	0,396	0,39	0,401	0,399
0,7 mg/l P _{celk}	0,701	0,699	0,701	0,700

Vyhodnocení opakovatelnosti stanovení celkového fosforu je uvedeno v tabulce 2:

Tabulka 2 - Vyhodnocení opakovatelnosti stanovení celkového fosforu

Popis	Průměr (mg/l)	Opakovatelnost	Rel. Opakovatelnost (%)	Počet měření
0,2 mg/l P _{celk}	0,198	0,0016	0,82	4
0,4 mg/l P _{celk}	0,399	0,0021	0,52	4
0,7 mg/l P _{celk}	0,700	0,0010	0,14	4

Opakovatelnost analytické metody je 0,005 Hodnota relativní opakovatelnosti vyhovuje zadanému kritériu přijatelnosti 10 %.

Příloha 10: Reprodukovatelnost pro celkový fosfor.

Vstupní data pro vyhodnocení reprodukovatelnosti stanovení celkového fosforu jsou uvedena v tabulce 1.

Tabulka 1 - Vstupní data pro vyhodnocení reprodukovatelnosti stanovení celkového fosforu

Popis	Měření 1 (mg/l)	Měření 2 (mg/l)	Měření 3 (mg/l)	Měření 4 (mg/l)
0,2 mg/l P _{celk}	0,196	0,199	0,198	0,198
0,4 mg/l P _{celk}	0,396	0,398	0,399	0,399
0,7 mg/l P _{celk}	0,701	0,698	0,699	0,699

Vyhodnocení reprodukovatelnosti stanovení celkového fosforu je uvedeno v tabulce 2:

Tabulka 2 - Vyhodnocení reprodukovatelnosti stanovení celkového fosforu

Popis	Průměr měření na 1 úrovni (mg/l)	Reprodukovatelnost	Rel. Reprodukovatelnost (%)	Počet měření
0,2 mg/l P _{celk}	0,198	0,0013	0,6363	4
0,4 mg/l P _{celk}	0,399	0,0014	0,3553	4
0,7 mg/l P _{celk}	0,699	0,0013	0,180	4

Reprodukovatelnost analytické metody je 0,0039. Hodnota relativní reprodukovatelnosti vyhovuje zadanému kritériu přijatelnosti 10 %.