

4. NEFELOMETRIE A TURBIDIMETRIE

4.1. OPTICKÉ METODY

Optické metody jsou fyzikální metody, které pro stanovení látek využívají jevů, které vznikají vzájemnou interakcí mezi stanovovanou látkou a elektromagnetickým zářením. Můžeme je rozdělit do dvou hlavních skupin. Jedná se o metody, při kterých dochází k výměně energie mezi látkou a zářením a při kterých nedochází k výměně energie mezi látkou a zářením.

4.1.1. SPEKTRÁLNÍ METODY

Spektrální metody jsou optické metody, při kterých dochází k výměně energie mezi látkou a zářením, označujeme také jako metody spektrální. U těchto metod při vyhodnocování dat můžeme získat spektrum, které charakterizuje závislost veličiny (např. intenzita elektromagnetického záření) na frekvenci záření. Běžně se zde také využívají veličiny jako je vlnová délka či vlnočet. Mezi tyto metody patří metody emisní a absorpční.

a) **Emisní metody** - metody, při kterých dochází k emisi částic na základě dodání tepelné energie, elektrické energie, proudu částic či elektromagnetického záření vzorku a následnému měření těchto emitovaných částic. Mezi emisní metody řadíme např. atomovou emisní spektrometrii.

b) **Absorpční metody** - metody, u nichž dochází k absorpci záření vzorkem a toto absorbované záření je poté měřeno. U absorpčních metod lze využít záření o různých vlnových délkách, podle kterých je můžeme dělit na atomovou absorpční spektrometrii, ultrafialovou a viditelnou spektrometrii, infračervenou spektrometrii, Ramanovu spektrometrii a další.

4.1.2. NESPEKTRÁLNÍ METODY

U nespektrálních metod nedochází k výměně energie mezi látkou a zářením, ale při interakci látky se zářením můžeme sledovat jiné změny vlastností záření, mezi které řadíme například rychlost záření, rozptyl záření či stáčení roviny polarizovaného světla. Zahrnujeme sem polarimetrii, refraktometrii, interferometrii, nefelometrii a turbidimetrii.

Elektromagnetické záření

Elektromagnetické záření je druh energie, která je v prostoru přenášena velkou rychlostí. Na elektromagnetické záření je z jedné strany nahlíženo jako na vlnění a z druhé strany je popisováno jako proud částic, které mají nulovou klidovou hmotnost a nazývají se fotony. Z hlediska vlnění jsou pro záření důležitými parametry vlnová délka, frekvence, rychlost, amplituda a vlnočet. U fotonu je potom důležitá jeho energie, která je přímo úměrná frekvenci záření. Oba tyto dva pohledy na záření jako na částice a vlny se vzájemně nevylučují.

Elektromagnetické záření má mnoho forem, z nichž nejznámější a také nejsnadněji rozeznatelné je světlo a tepelné záření. Mezi další formy, které se běžně v analytické chemii využívají, se podle rozsahu vlnové délky řadí záření radiofrekvenční, mikrovlnné, infračervené, ultrafialové, rentgenové a γ . Mezi infračervenou a ultrafialovou oblastí záření se vyskytuje viditelné záření, jehož rozsah vlnových délek je velmi úzký – přibližně 400 až 800 nm.

O záření lze mluvit jako o monochromatickém či polychromatickém v závislosti na tom, zda se skládá ze záření o jedné vlnové délce či více – např. u laseru hovoříme o monochromatickém záření. Příkladem polychromatického záření, tedy složeného záření, je například sluneční světlo. Každé bílé světlo je tedy polychromatické záření, jelikož obsahuje záření všech vlnových délek z viditelné oblasti elektromagnetického spektra.

Kolorimetrie

Kolorimetrie - vizuální kolorimetrie, jedna z nejstarších analytických metod, byla používána již v dobách dávných Řeků a Římanů, ačkoliv až v roce 1729 začala nabírat modernějšího vědeckého charakteru, kdy Pierre Bouguer postuloval, že pokud daná šířka barevného skla absorbuje polovinu

světla vycházejícího ze zdroje, poté bude dvojnásobná šířka snižovat intenzitu na čtvrtinu její počáteční hodnoty. Nezávisle na Bouguerovi se v roce 1760 Jean-Henri Lambert zabýval vztahem mezi intenzitou světla a neprůsvitností prostředí. Auguste Beer pak v roce 1850 odvodil vztah mezi koncentrací a optickou hustotou (dnes nazývanou absorbance), který vedl k současné formě Lambert-Beerova zákona (též nazývaného Bouguer-Lambert-Beerův zákon).

Lambert-Beerův zákon tedy vyjadřuje závislost absorbance na tloušťce vrstvy l , na molárním absorpčním koeficientu ε a také na koncentraci roztoku c :

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

Tloušťka vrstvy je udávána v cm, molární absorpční koeficient se vyjadřuje v $\text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ a molární koncentrace v $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Absorbance je bezrozměrná veličina.

Absorbance A je také spojena s transmitancí T , protože molekula absorbuje záření o určité vlnové délce a čím více molekul se v roztoku nachází, tím více je záření o této vlnové délce absorbováno a tím méně je toto záření propouštěno dále roztokem. Vztah mezi absorbancí a transmitancí vyjadřuje následující rovnice:

$$A = -\log T$$

Hodnoty transmitance jsou často vyjadřovány v procentech. Jestliže víme, že hodnota transmitance je 100 %, tedy veškeré záření, které vstoupilo do vzorku, jím také prošlo, hodnota absorbance je nulová, vzorek nepohltil žádné záření. V opačném případě, když je hodnota transmitance nulová, vzorek pohltit veškeré záření, které do něj vstoupilo, má absorbance určitou číselnou hodnotu.

Kolorimetrie je založena na absorpci elektromagnetického záření z oblasti ultrafialového až infračerveného záření látkou, tento poznatek je využíván pro kvantitativní stanovení. Vzhledem k Lambert-Beerovu zákonu lze ze specifické absorbance látky při určité vlnové délce stanovit její koncentraci v roztoku. Technika kolorimetrie je používána ke stanovení koncentrace barevných sloučenin v roztoku.

Kolorimetrie se netýká pouze sloučenin, které mají absorpční spektra v oblasti UV/Vis spektra, ale lze ji také aplikovat na všechny sloučeniny, které po změně specifickými činidly poskytují deriváty, umožňující měření absorpce.

Mezi kolorimetrické techniky spojené s Lambert-Beerovým zákonem patří také nefelometrie a turbidimetrie.

4.1.3. NEFELOMETRIE A TURBIDIMETRIE

Nefelometrii a turbidimetrii řadíme do metod nespektrálních. Mezi látkou a zářením nedochází k výměně energie, ale je sledován rozptyl záření. Rozptyl spojený s nefelometrií a turbidimetrií (na rozdíl od Ramanovy spektroskopie) nezahrnuje žádnou ztrátu zářivé energie; je ovlivněn pouze směr šíření záření.

Rozptyl záření je komplexní jev, tj. zahrnuje odraz, lom a také částečnou absorpci záření heterogenními částicemi, převážně v koloidních roztocích, suspenzích a na jemných vrstvách pevných částic. Při dopadu záření na vzorek, který obsahuje malé částičky, dojde k vytvoření sekundárního záření stejné vlnové délky a toto záření následně vychází z částičky do všech směrů. Pro charakter a intenzitu rozptýleného záření je rozhodující velikost částičky, která má být blízká vlnové délce dopadajícího záření. Pro viditelné záření by měla být velikost částičky menší nebo rovna $0,8 \mu\text{m}$ a pro ultrafialové záření menší nebo rovna $0,3 \mu\text{m}$. Zde má rozhodující význam parametr α , jehož vztah k vlnové délce a k poloměru částice vidíme v následující rovnici:

$$\alpha = (2 \pi r) / \lambda$$

kde r vyjadřuje poloměr částice, λ vyjadřuje vlnovou délku dopadajícího záření.

Má-li částice mnohem menší velikost, než je vlnová délka dopadajícího záření, pak se emitované záření do ostatních směrů do značné míry ruší mimo směr dopadajícího záření, u velkých částic zase převažuje odraz záření.

Částičky můžeme rozdělit podle velikosti do tří skupin:

1. Malé částičky - průměr menší než $0,1\lambda$. Po dopadu paprsku na malou částičku získáme charakteristický rozptyl záření, který je relativně symetrický. Rozptyl záření od molekul nebo shluků molekul s velikostí výrazně menší než vlnová délka záření se nazývá Rayleighův rozptyl. Teorie Rayleighova rozptylu z roku 1871, původně odvozená pro plyny, je vhodná pro kapaliny s malou

koncentrací suspendovaných částic, které spolu navzájem neinteragují. Intenzita rozptýleného záření závisí na vlnové délce, na polarizovatelnosti částice a také na již zmíněné velikosti částičky. Pro intenzitu rozptýleného záření platí Rayleighův zákon.

2. Větší částičky – tj. částičky s průměrem mezi $0,1\lambda$ a $0,8\lambda$. S rostoucí velikostí částic roste rozptyl a mění se vliv vlnové délky na intenzitu rozptýleného záření. U větších částiček už nepozorujeme symetrické rozložení rozptýleného záření, ale značně nesymetrické. Destruktivní interference světla rozptýleného ve zpětném směru vede k vychýlení rozptylu světla vpřed. Pro skupinu částiček, jejichž velikost se přibližuje a přesahuje vlnovou délku záření, je vhodnější takzvaný Mieův rozptyl. Jedná se o teorii rozptylu, která pochází z roku 1908 od německého fyzika Gustava Miea, jenž se zabýval rozptylem záření od kulových částic všech průměrů. Nevýhodou však je, že Mieova teorie je složitější.

3. Velmi velké částičky – mezi ně řadíme ty, jejichž průměr je větší než $0,8\lambda$. I pro takto velké částice však můžeme použít Mieovu teorii rozptylu. Pro částice větší než $\sim 0,4 \mu\text{m}$ v průměru se v rozptylových obrazcích objevují široké oscilace. Pro částice o průměru větším než $1 \mu\text{m}$ se objevuje extrémní koncentrace rozptýleného záření v přímém směru (kvůli vzájemným destruktivním efektům zpětného rozptylu) spolu s druhotnými vrcholky v úhlovém rozložení rozptýleného světla.

Na rozptyl záření má značný vliv i koncentrace částic. Útlum paralelního paprsku rozptylem ve zředěné suspenzi je dán vztahem:

$$I = I_0 e^{-\tau l}$$

kde I vyjadřuje intenzitu záření prošlou prostředím, I_0 počáteční intenzitu záření, τ koeficient zakalení prostředí, l délka prostředí.

Hodnota koeficientu zakalení je spojena s koncentrací částic c . Lze odvodit následující vztah analogický k Lambert-Beerovu zákonu:

$$-\log I/I_0 = klc$$

kde $k = 2,3 \tau/c$

Tento vztah je využíván v turbidimetrických analýzách stejně, jako je Lambert-Beerův zákon používán ve fotometrických analýzách. Tento vztah nebere v úvahu ztráty záření vzniklé při absorpci suspendovanými částicemi nebo odrazem od stěn nádoby.

S rozptylem světla souvisí i takzvaný Tyndallův jev, na němž jsou založena nefelometrická měření. Jedná se o difúzní rozptyl záření, které prochází prostředím s rozptýlenými částicemi (zejména koloidními). Záření dopadající na částici se v důsledku následného rozptylu stává dostatečně intenzivním a lze ho sledovat pouhým okem. Má tvar kužele a jeho vrchol se nachází v místě, kde záření vstupuje do prostředí s částicemi. Toto záření lze vidět při pozorování v úhlu jiném než 180° ke vstupujícímu záření do prostředí. V homogenním prostředí není Tyndallův jev pozorovatelný. Je, který sice už roku 1857 objevil Faraday, avšak poprvé jej popsal až fyzik John Tyndall, lze sledovat běžně i v přírodě, jestliže jsou v setmělém prostředí ve vzduchu přítomny částičky prachu a dopadají na ně sluneční paprsky.

4.1.4. PRINCIP NEFELOMETRIE A TURBIDIMETRIE

Nefelometrie a turbidimetrie jsou úzce spojené analytické metody, které pro stanovení využívají rozptylu záření na částicích. Tyto částice způsobují zakalení roztoků.

Mezinárodní organizace pro standardizaci (ISO) definuje zákal jako snížení průhlednosti kapaliny způsobené přítomností nerozpuštěné hmoty. Zákal je vyjádření optické vlastnosti prostředí, která způsobuje rozptyl záření a absorpci spíše než jeho propustnost v přímém směru vzorkem. Jako vzorek se pro tato měření běžně využívá kapalina, která obsahuje částičky nutné pro rozptyl počátečního záření. Pokud je tedy vzorek zakalený, není dostatečně čistý a také není průhledný. V takovém případě můžeme hovořit o zákalu jako o protikladu čirosti. Proto lze zákal interpretovat jako měřítko relativní čistoty vody. Čím více je vzorek zakalený, tím více obsahuje různých částic. Záření procházející kapalným prostředím může být rozptýleno a absorbováno nehomogenními částicemi v cestě záření, zejména pevnými částicemi bláta, jílem, řasami planktonem, mikroby, organickou hmotou. Jestliže záření dopadá na roztok s vyjmenovanými částicemi nebo jim podobnými, interagují tyto částice s dopadajícím paprskem tak, že absorbují světelnou energii a poté opět vyzáří energii do různých směrů. Uvnitř částice je záření převedeno na jinou formu energie, například na tepelnou, a probíhá tak absorpce záření. Následně dochází k vyzáření do všech směrů, tedy k rozptylu záření,

jedná se o komplexní jev, jelikož zahrnuje jak odraz od povrchu částice uvnitř prostředí, tak lom uvnitř částice. Může však nastat i situace, kdy dojde k několika odrazům uvnitř částice. Rozptyl světla je často doprovázený absorpcí.

Snížení energie kolimovaného paprsku v důsledku rozptylu částicemi je základem turbidimetrických metod. Oproti turbidimetrickým metodám jsou nefelometrické metody založeny na měření rozptýleného záření obvykle v pravém úhlu k dopadajícímu paprsku. Obě metody se tedy odlišují pouze tím, kde je umístěn detektor. V turbidimetrii je detektor v ose paprsku a měřeno je záření prošlé vzorkem, které je ochuzené o rozptýlenou složku. V nefelometrii lze detektor umístit pod úhlem 10° až 90° vzhledem k dopadajícímu záření, nejčastěji se však rozptýlené záření měří v kolmém směru. Turbidimetrie je vhodná pro měření koncentrovanějších roztoků s relativně velkými částicemi, nefelometrických měření se využívá pro vzorky s nižší koncentrací částic o menší velikosti.

Oproti gravimetrickým metodám mohou turbidimetrie a nefelometrie poskytnout značné výhody týkající se úspory času při stanovení koncentrace částic. Co se týče citlivosti, je nefelometrie obecně citlivější než turbidimetrie. U obou metod je nevýhodou jejich poměrně obtížná reprodukovatelnost. Abychom mohli provádět reprodukovatelné měření, je důležité dodržovat stejné podmínky pro všechna měření. Mezi rozhodující podmínky patří konstantní teplota prostředí, dodržování stejného časového intervalu jak pro míchání roztoku, tak i pro odečet hodnoty z přístroje a neměnná velikost a tvar částic. Často se do nestabilního roztoku přidává ochranný koloid pro jeho stabilizaci. Jedná se o látku, která se adsorbuje na povrchu částic a zabraňuje jejich koagulaci. Jako ochranné koloidy se běžně využívají povrchově aktivní látky, mezi něž patří například polyethylenglykol, želatina, Tween 20 či 80, glycerin, arabská guma a další.

Instrumentace

Zeslabené záření nebo míra zákalu měřená v přímém směru vzhledem k dopadajícímu paprsku jsou běžně měřeny na fotometrech či spektrofotometrech, nefelometrická měření rozptýleného záření jsou prováděna na fluorimetrech, které jsou uzpůsobeny pro měření v kolmém směru od dopadajícího paprsku. Většina přístrojů pro turbidimetrická a nefelometrická měření má obvykle 5 základních komponent - zdroj záření, monochromátor, prostor pro vložení kyvety se vzorkem, fotosenzor a vyhodnocovací zařízení.

1. Zdroj záření – jako zdroj záření se využívají různé druhy žárovek. Mezi nejběžněji používané patří wolframová žárovka. Relativně nízká intenzita však způsobuje horší využitelnost u vzorků s malým rozptylem záření. Dalším běžným zdrojem záření bývá xenonová lampa. Můžeme se však setkat i s nefelometry, které jako zdroj záření využívají rtuťovou obloukovou lampu, halogenovou lampu, světlo emitující diody a také lasery. Laserové nefelometry mají obvykle helium-neonový laser. Všechny tyto zdroje mají vyšší intenzitu než wolframové žárovky. Různé typy zdrojů záření se používají proto, že v závislosti na látce dochází k emisi záření při různých frekvencích. Výhodou laserového nefelometru je vysoká intenzita záření a díky kolimovanému paprsku odpadá nutnost jeho zaostřování.

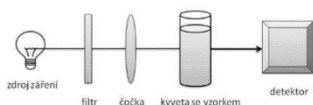
2. Monochromátor (resp. filtr) - slouží k izolaci úzkého intervalu vlnových délek. Nejjednodušším a nejlevnějším monochromátorem je filtr povolující průchod pouze diskretní vlnové délky. Lze použít téměř všechny monochromátory, které se běžně používají u fotometrických měření. U fluorimetrů nebo spektrofluorimetrů, které jsou uzpůsobené pro užití jako nefelometry, se musí nastavit vlnová délka pro rozptýlené (emitované) záření tak, aby byla stejná jako pro dopadající záření. Nefelometry jsou často vybaveny uzavíracím filtrem, který brání vstupu fluorescenčního záření do detektoru.

3. Prostor pro kyvetu se vzorkem – u nefelometrů používaných především v imunoanalýze klinických vzorků je důležité zejména to, že prostor pro kyvetu se vzorkem musí být navržen takovým způsobem, který umožňuje neustálé promíchávání vzorku, aby bylo zajištěno, že jsou agregáty jednotné. Kyveta může mít buď válcovitý tvar, nebo tvar hranolu. Pro nefelometrická měření prováděná pod jiným úhlem než 90° ke vstupujícímu paprsku jsou vhodnější kruhové kyvety než kyvety hranaté. Výhodou kruhových kyvet je minimalizace odrazu měřeného záření od stěn kyvety. S přístrojem jsou často dodávány kyvety s formazinovými standardy pro jeho kalibraci.

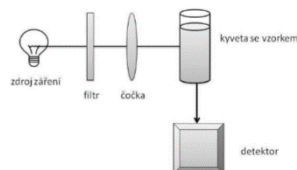
4. Detektor - slouží k detekci signálu a následně předá informaci vyhodnocovacímu zařízení, kde se na displeji či monitoru objeví číselná hodnota signálu. Jako detektor se u většiny přístrojů

používá buď fotodiody, nebo fotonásobič. U nefelometrů využívaných pro klinickou analýzu se častěji setkáváme s fotonásobiči. Aby nedošlo k chybám, které by mohly vzniknout při detekování vnějšího světla, je důležité, aby byly detektory dobře stíněné a tak minimalizovaly případné interference. Detektor lze umístit do úhlu v rozmezí 10° až 90° vzhledem k dopadajícímu paprsku. Některé nefelometry také umožňují měnit polohu detektorů

5. Vyhodnocovací zařízení - obdrží elektrický signál od detektoru a poskytne uživateli výstupní hodnotu. Výstupní hodnota může být udávána v libovolných jednotkách intenzity rozptýleného světla. V nefelometrii se nejběžněji můžeme setkat s nefelometrickou jednotkou zákalu (tzv. Nephelometric Turbidity Unit = NTU). Existují však další jednotky zákalu, jako je například FNU (Formazin Nephelometric Unit), FTU (Formazin Turbidity Unit), FAU (Formazin Attenuation Unit) či JTU (Jackson Turbidity Unit).



Obr. 4.1. Schéma turbidimetru



Obr. 4.2. Schéma nefelometru

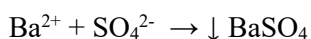
Nefelometrie a turbidimetrie jsou v dnešní době hojně užívané analytické metody. Využití nachází v odvětvích nejen chemického průmyslu, ale například i ve farmaceutickém průmyslu, v potravinářském průmyslu. Lze je uplatnit například při kontrole potravin a nápojů, stanovení koncentrací iontů (např. SO_4^{2-} , Cl^- , Ag^+ , Na^+) na základě vytvoření sraženiny, stanovení makromolekul, proteinů, globulinů a albuminů krevního systému, rozborech tělních tekutin a obecně při měření znečištění ovzduší i kapalin. Jsou důležité v potravinářství zejména při hodnocení kvality vod, dále také při sledování kvality produktu zvláště v mléčném průmyslu a v pivovarnictví. V různých odvětvích průmyslu jsou nefelometrie i turbidimetrie užitečné rovněž při sledování a kontrole účinnosti filtračního procesu. Jako imunonefelometrie a imunoturbidimetrie jsou využívány při sledování imunologických reakcí, při kterých dochází ke vzniku imunoprecipitátu na základě interakce antigenu a protilátky. Tyto imunochemické metody slouží k důkazu protilátky v séru či v jiném vzorku za předpokladu, že máme k dispozici známý antigen. Příkladem protilátek jsou imunoglobuliny různých tříd. Mezi základní řadíme IgG, IgM, IgA, IgE a IgD.

Tab.4.1. Příklady nefelometrického a turbidimetrického stanovení iontů

Ion	Činidlo	Sraženina	Metoda
Cl^-	AgNO_3	AgCl	turbidimetrie, nefelometrie
SO_4^{2-}	BaCl_2	BaSO_4	turbidimetrie, nefelometrie
Ag^+	NaCl	AgCl	turbidimetrie, nefelometrie
Na^+	$\text{Zn}(\text{OAc})_2$ a $\text{UO}_2(\text{OAc})_2$	$\text{NaZn}(\text{UO}_2)_3(\text{OAc})_9$	turbidimetrie, nefelometrie
Au^{3+}	SnCl_2	Au	turbidimetrie
Ca^{2+}	$\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$	CaC_2O_4	turbidimetrie

4.2. STANOVENÍ SÍRANŮ NEFELOMETRICKY

Principem nefelometrického stanovení síranů je reakce chloridu barnatého se síranovými anionty za vzniku bílé sraženiny BaSO_4 . Stejně jako u chloridů i zde lze pozorovat mléčný zákal. Míra zákalu je přímo úměrná koncentraci aniontů.



Navážením potřebného množství síranu draselného K_2SO_4 nejprve připravíme zásobní roztok o koncentraci $1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1} \text{ SO}_4^{2-}$ (na přípravu 100 ml roztoku navážíme 0,1814 g K_2SO_4), které kvantitativně převedeme do odměrné baňky, rozpustíme v destilované vodě a baňku doplníme po rysku destilovanou vodou.

Následně připravíme 1M HCl a 1% roztok $BaCl_2$. 1M HCl připravíme odměřením 15,5 ml 35% HCl do odměrné baňky o objemu 500 ml, baňku doplníme po rysku destilovanou vodou. Roztok $BaCl_2$ připravíme navážením 1,0000 g $BaCl_2 \cdot 2H_2O$ do odměrné baňky o objemu 100 ml a doplněním destilovanou vodou po rysku.

Ze zásobního roztoku K_2SO_4 připravíme sadu kalibračních roztoků o koncentraci 0, 20, 40, 60, 80 a $100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1} \text{ SO}_4^{2-}$. Do odměrných baněk o objemu 50 ml napipetujeme předem vypočtený objem zásobního roztoku, ke každému roztoku přidáme 5 ml 1M HCl a baňku doplníme po rysku destilovanou vodou.

Každý neznámý vzorek vody nejprve vložíme v kádince na 5 minut do ultrazvukové lázně, aby došlo k jeho odplynění. Do odměrných baněk o objemu 50 ml poté napipetujeme vždy 40 ml vzorku minerálky (některé bude potřeba předem zředit) nebo 20 ml vzorku pitné vody. K jednotlivým vzorkům přidáme 5 ml 1M HCl a všechny baňky následně doplníme destilovanou vodou po rysku. Na závěr připravené roztoky pečlivě promícháme.

Při měření kalibračních roztoků postupujeme následujícím způsobem. Na magnetickou míchačku umístíme Erlenmeyerovu baňku o objemu 50 ml a do ní vložíme míchadélko. Do baňky pak postupně napipetujeme 2 ml roztoku $BaCl_2$ jako srážedla, 8 ml destilované vody a nakonec 10 ml roztoku z kalibrační sady.

Stejným způsobem postupujeme u měření roztoků neznámých vzorků, pouze místo 10 ml kalibračního roztoku napipetujeme 10 ml neznámého vzorku.

Každou směs promícháme 2 minuty na míchačce, ihned poté ji přelijeme do kyvety a změříme signál. Každý kalibrační roztok a neznámý vzorek změříme $3\times$.

Tab. 4.2: Příprava kalibračních roztoků $NaCl$, pipetované množství jednotlivých roztoků v ml.

Roztok č.	1	2	3	4	5	6
Standardní roztok K_2SO_4 v ml do 50 ml od.baňky						
1M HCl v ml	5	5	5	5	5	5
$C_{SO_4^{2-}}$ ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)	0	20	40	60	80	100
Zákal (NTU)						

4.3. POSTUP PRÁCE S NEFELOMETREM

4.3.1. SENZOR ZÁKALU TRB-BTA

1. Propojíme nefelometr pomocí USB kabelu propojíme s počítačem.
2. Na počítači spustíme program pro sběr dat Logger Pro 3.
3. Software rozpozná nefelometr, umožní nám spustit kalibraci.
4. Kalibrace

PRVNÍ BOD KALIBRACE:

Připravíme si prázdnou kyvetu, opláchneme ji a naplníme destilovanou vodou. **POZOR!** Hladina vody musí být při tomto testovacím měření doplněna po rysku. Tento objem je pro získání správných hodnot zákalu kritický. Kyvetu uzavřeme víčkem. Otřeme stěny kyvety měkkou látkou nebo buničitou vatou. Uchopíme kyvetu za víčko a vložíme ji do přístroje, značka na kyvetě musí směřovat směrem k rysce na senzoru (označeno šipkou). Při každém měření zkontrolujeme, zda značky směřují k sobě. Uzavřeme kryt senzoru. Jako hodnotu NTU

v programu na PC zadáme 0.

DRUHÝ BOD KALIBRACE:

Vezmeme kyvetu s obsahem standardu zákalu 100 NTU a opatrně ji čtyřikrát překllopíme, aby se promíchaly částice, které se mohly usadit na dně. Kyvetu se standardem ale nemícháme, mícháním by se v ní vytvořily malé bublinky, které by mohly ovlivnit měření. Otřeme stěny kyvety měkkou látkou, která nepouští vlákna, nebo buničitou vatou, abychom se zbavili případných nečistot. Uchopíme kyvetu za víčko a vložíme ji do senzoru zákalu. Značka na kyvetě musí směřovat k rysce senzoru. Uzavřeme kryt senzoru zákalu, jako hodnotu NTU zadáme 100. Potvrdíme a teprve poté kyvetu se standardem vyjmeme. Nefelometr je připraven pro měření zákalu.

5. MĚŘENÍ VZORKŮ

Z kyvety vylijeme destilovanou vodu, Vypláchneme ji měřeným vzorkem a naplníme ji tímto vzorkem po rysku. Kyvetu uzavřeme víčkem, odstraníme z jejího vnějšího povrchu nečistoty měkkou látkou nebo buničitou vatou. Opatrně překllopíme nádobku se vzorkem vody, aby se promíchaly částice, které se mohly usadit na dně. Uchopíme kyvetu za víčko a vložíme ji do nefelometru. Dbáme na to, aby značky na kyvetě a na senzoru směřovaly k sobě. Uzavřeme kryt. Změříme hodnotu zákalu 3×.

- Po ukončení práce s nefelometrem vypláchneme kyvetu destilovanou vodou. Kyvetu i formazinové standardy je nutné udržovat v dobrém stavu, je to pro měření zákalu důležité.

Poznámka:

Částice se ve vodě časem usazují a způsobují mírný posun měřených hodnot zákalu směrem dolů. Proto odečítáme hodnotu krátce po vložení kyvety do senzoru.

Teoretický obsah chloridů ve vodě z vodovodu je $35 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$, teoretický obsah chloridů v pivu je $15 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$.

V úloze pracujeme se senzorem zákalu TRB-BTA a s vyhodnocovacím zařízením Vernier LabQuest od společnosti Edufor.



Obr. 4.3: Nefelometr TRB-BTA s lahvičkou formazinového standardu

Technické údaje nefelometru:

- rozsah 0 až 200 NTU,
- rozlišení 12-bitové (LabQuest) 0,25 NTU,
- přesnost: ± 2 NTU při hodnotách pod 25 NTU, $\pm 5 \%$ NTU při hodnotách nad 25 NTU,
- citlivá fotodioda (LED dioda) s vlnovou délkou $\lambda = 890 \text{ nm}$.

4.3.2. UNIVERZÁLNÍ FOTOMETR MN PF-12 PLUS

1. Fotometr (s možností měření zákalu pod úhlem 90°) zapneme stiskem klávesy On/Off.
2. Pomocí šipek vybereme metodu nefelometrického měření zákalu zadáním čísla 906.
3. Kalibraci zahájíme stiskem klávesy NULL ZERO. Poté vložíme jeden po druhém standardní kalibrační roztoky testovací soupravy NANOCONTROL NANOTURB (0 – 400 NTU),

měření provedeme stiskem klávesy M . Ukončení kalibrace potvrdíme stiskem M . Nyní je přístroj nakalibrován.

4. Při měření přelijeme roztok z baňky do kyvety, kyvetu uzavřeme, pečlivě otřeme a vložíme ji do kyvetového otvoru. Stiskem klávesy M roztok proměříme. Hodnotu zákalu zobrazenou na displeji si zapíšeme. Kyvetu vkládáme do kyvetového otvoru vždy stejným směrem.
5. Po ukončení měření kyvetu pečlivě vypláchneme destilovanou vodou a vypneme fotometr stiskem klávesy .



Obr. 4.4: Fotometr a nefelometr MN PF-12 PLUS

4.4. VYHODNOCENÍ

1. Na základě tabulky naměřených hodnot zákalu pro kalibrační roztoky sestojíme kalibrační graf.
2. Provedeme základní statistické vyhodnocení pro jednotlivé neznámé vzorky. Určíme chybu samotného měření v časové závislosti pro stanovení chloridů.
3. Z rovnice kalibrační křivky vypočítáme koncentraci vysrážených síranových iontů v neznámých vzorcích, pokud je to možné srovnáme získané hodnoty s teoretickými a zdůvodníme.