## Stanovení obsahu organického uhlíku (TOC) a chlorofylu a

## Úvod:

Jedním z důležitých ukazatelů kvality vody je obsah organických látek. Tento obsah může být definován pomocí analytických metod a vyjádřen buď jako chemická spotřeba kyslíku (CHSK) nebo celkový organický uhlík (TOC – "Total Organic Carbon"). Dalším možným ukazatelem obsahu organických látek je např. BSK5 (biochemická spotřeba kyslíku za dobu 5 dnů). TOC je spolu s parametry CHSK a BSK5 také důležitým souhrnným parametrem pro vyhodnocování organické zátěže ve vodě. Vzhledem k tomu, že všechny organické uhlíkaté sloučeniny se stanovují a charakterizují na základě obsahu uhlíku, parametr TOC je přesně definovatelné absolutní množství a lze ho přímo změřit (v jednotkách mg C/l). Parametr TOC sám o sobě nevysvětluje oxidovatelnost měřeného uhlíku, ani množství kyslíku nutného pro biologický rozklad. Poměr CHSK / TOC však poskytuje důležité informace o přítomnosti určitých organických sloučenin (např. alkoholů, proteinů, atd.). Dojde-li ke změně tohoto poměru, např. v přítoku do čistírny odpadních vod, lze ihned učinit závěr o příčinách a možném dopadu na biologické procesy v čistírně odpadních vod. Chlorofyl *a* je z tohoto hlediska zase jedním z nejdůležitějších ukazatelů eutrofizace povrchových vod.

Je také důležité si uvědomit, že všechny uvedené parametry jsou silně korelované s některými dalšími parametry vodního prostředí jako je obsah kyslíku, transparence, turbidita nebo pH. Na to je potřeba pamatovat především při vyhodnocování získaných dat.

#### Definice parametrů

#### Celkový uhlík (TC)

TC je veškerý uhlík ve vzorku, což zahrnuje organický, anorganický a těkavý. TC je reprezentován jako celková hmotnost uhlíku v objemu vzorku. (**TC = TOC + IC**).

#### Anorganický uhlík (IC)

IC je anorganický uhlík ve vzorku, který se po okyselení převede na oxid uhličitý. IC zahrnuje veškeré uhličitany, hydrogenuhličitany a rozpuštěný oxid uhličitý. (**IC = TC – TOC**).

#### Celkový organický uhlík (TOC)

TOC je organický uhlík, který je převeden na oxid uhličitý po oxidaci. Přímé měření TOC se provede po okyselení vzorku. TOC ve vzorcích vody za ideálních podmínek obsahuje uhlík v těkavých materiálech, ačkoliv většina laboratoří udává obsah TOC ve vzorcích, z nichž byly těkavé látky odstraněny před analýzou. Výsledky jsou stále obecně akceptovány jako TOC. (**TOC = TC – IC**).

#### Rozpuštěný organický uhlík (DOC)

DOC je organický uhlík stanovený při analýze vodných roztoků, které byly přefiltrovány přes filtr 0,40  $\mu$ m po okyselení (typicky se jedná o krátké řetězce bílkovin, aminokyseliny, apod.). (**DOC = TC – IC**)

#### Vytěsnitelný organický uhlík (POC)

POC je organický uhlík, který byl ze vzorku vytěsněn pomocí proudu plynu. Standardizace vytěsňovacích postupů nebyla dosud provedena. (POC = TOC – NPOC).

#### Nevytěsnitelný organický uhlík (NPOC)

NPOC je uhlík, který zbývá v roztoku po tom, kdy vzorek byl probubláván plyn. NPOC je často udáván jako TOC, protože mnoho užívaných metod vyžaduje okyselení a vybublání IC před analýzou. (NPOC = TOC – POC).



#### Chlorofyl a (Chla)

Chla je základním ukazatelem biomasy řasové složky. Jeho koncentrace se udává v mg/l a je prakticky jedinou analytickou metodou použitelnou při určení kvantity fytoplanktonu.

#### Feofytin

Je spolu s dalším barvivem feoforbidem nejdůležitějším produktem degradace chlorofylu. Jedná se v podstatě o Chla bez centrálního atomu hořčíku. Vztah mezi koncentrací Chla a feofytinu je důležitým ukazatelem fyziologického stavu řasových buněk.

#### Normy a standardizace analýz

Kvůli legislativě ochrany životního prostředí analytická metoda pro CHSK dnes není v popředí. Alternativní analytická metoda založená na stanovení TOC je více a více zaváděna jako standardní metoda. Podle nařízení Rady Evropské unie týkající se městských odpadních vod lze parametr BSK5 coby kontrolní parametr nahradit parametrem TOC, je-li možné stanovit vztah mezi těmito dvěma parametry.V některých evropských zemích parametr TOC již nahradil parametr CHSK používaný coby kontrolní parametr. Například v Německu se parametr TOC oficiálně používá jako skríninkový test v souvislosti se sledováním parametru CHSK v městských odpadních vodách. Parametr CHSK v odpadních vodách je považován za uspokojivý, pokud čtyřnásobek hodnoty parametru TOC (v mg/l) nepřekročí mezní hodnotu parametru CHSK. Stanovení TOC v ČR upravuje evropská norma EN 1484.

Stanovení chlorofylu *a* je standardizováno v souladu s DIN38412 - L16. Mezní hodnoty se liší podle typu a využití povrchových vod. Limitní hodnoty jsou také rozdílné v některých státech EU. Stanovení Chl*a* v ČR upravuje norma ČSN ISO 10260.

#### Princip analytických metod

Všechny metody stanovení parametru TOC jsou založeny na termické nebo mokré chemické oxidaci organického uhlíku na oxid uhličitý (CO2). Oxid uhličitý se poté detekuje a jeho obsah se kvantitativně vyhodnotí. Jsou známy dvě metody: vytěsňovací metoda a metoda diferenční. Podle evropské normy EN 1484 jsou obě tyto metody považovány za rovnocenné referenční metody. Při volbě metody pro dané stanovení je třeba vycházet ze složení vzorku. Pokud vzorek obsahuje vysoké množství těkavých organických sloučenin (VOC), tyto sloučeniny vytěsňovací metoda nestanoví.Obě dvě metody tedy mohou u stejného vzorku vést k velmi rozdílným výsledkům (kvůli přítomnosti VOC nebo kvůli nepříznivému poměru TC/TIC). Na metodě pro komparativní měření by se tedy měly předem domluvit, např. kontrolní orgány nebo externí laboratoře.



#### Metoda diferenční

Je třeba provést dvě měření, tj. stanovit celkový uhlík (TC) a celkový anorganický uhlík (TIC). Parametr TOC se poté vyhodnotí jako rozdíl mezi TC a TIC (tj. TOC = TC - TIC). **Tato metoda je vhodná zvláště pro vzorky** - Které obsahují těkavé organické sloučeniny (VOC); - U nichž se obsah TOC rovná obsahu TIC nebo je vyšší než TIC

Metody stanovení chlorofylu *a* jsou založeny na spektrofotometrickém stanovení koncentrace v ethanolovém (či jiném specifickém organickém rozpouštědle) extraktu ze zachyceného residua filtrovaného vzorku. Existuje více extrakčních rozpouštědel (aceton/methanol, chloroform, apod.), jejichž typ je nutné brát do úvahy při stanovení (nastavení vlnových délek).V podstatě všechny metody jsou založeny na stanovení tzv. korigovaného chlorofylu, kdy je první měření prováděno v čistém extraktu (při vlnové délce 665 nm, případně při korekci na zákal odečtem měření při 750 nm) a druhé je provedeno po okyselení vzorku (2M HCl), které umožní zjistit koncentraci degradovaného chlorofylu (feofytinu). Obsah chlorofylu *a* je pak počítán z rozdílu naměřených hodnot absorbance.

Stanovení TOC je v praxi standardně prováděno buď metodou kolorimetrického stanovení pomocí měření absorbance (metoda používaná také pro Chla), nebo metodou vysokoteplotního spalování ("combustion"), při které je na analyzátoru jako produkt spalování stanovován plynný oxid uhličitý.

Stanovení TOC pomocí analyzátoru je většinou považováno za přesnější metodu stanovení (i když velkou úlohu zde hraje uložení a příprava vzorku před samotnou analýzou). Je také vhodnější při kontinuálním zpracování většího množství vzorků. Konečně tyto přístroje často umožňují i analýzu TN (Total Nitrogen – celkový dusík). Nevýhodou je vysoká pořizovací cena přístroje (v řádech statisíců až miliónů Kč) a nemožnost okamžitého stanovení v terénu. Proto je najdeme spíše v inventářích výzkumných a expertních pracovišť. Princip

analýzy bude představen na příkladu analyzátoru Formacs<sup>HT</sup> fy. Skalar, který je používán v laboratoři Katedry ekologie a životního prostředí Přf UP v Olomouci:

Nejdříve přístroj provede stanovení TC. Vzorek je nastříknut ("sparged") pomocí integrovaného dávkovače do vysokoteplotního reaktoru. V reaktoru při vysoké teplotě (950°C kobalt + oxid nebo 680°C platinový katalyzátor) je veškerý organický a anorganický uhlík oxidován na plynný oxid uhličitý (CO<sub>2</sub>). Katalyzátor zabezpečuje, aby oxidace byla úplná. Proud vzduchu nebo kyslíku (nebo dusíku) nese oxid uhličitý do IR (InfraRed – infračervený) detektoru. Kyslík potřebný pro oxidaci se bere z proudu vzduchu nebo v případě proudu dusíku se bere ze vzorku. Oxid uhličitý se měří při 4,2 µm IR detektoru.

Dále pokračuje analýza stanovením IC. Druhý nástřik se provede do nízkoteplotního kapalinového reaktoru. V kyselém prostředí (k okyselení je používána 2% kyselina fosforečná) při laboratorní teplotě je veškerý anorganický uhlík převeden na plynný oxid uhličitý. Proud vzduchu opět transportuje oxid uhličitý do IR detektoru pro měření.

Při tomto způsobu měření je celkový organický uhlík počítán z rozdílu výsledků měření při nízké teplotě od měření při vysoké teplotě (diferenční metoda). **TOC = TC - IC** 

## Provedení:

Vzorky odebrané v terénu (podle pravidel správného vzorkování, viz. metodický návod *Metody odběru vzorků, terénní analytické metody*) co nejdříve – max. do druhého dne - přefiltrujeme přes filtry požadované propustnosti. Pokud nás zajímá DOC (rozpuštěný uhlík), pak se standardně používá filtr s propustností 0,45 µm. Pokud chceme stanovit více velikostních frakcí organických látek, můžeme použít postupně více filtrů různé velikosti pórů, přičemž vzorek pro analýzu odebereme z každé frakce (ideálně ve více opakováních).

Postup přípravy odebraných vzorků pro stanovení organických látek (v podobě TOC a Chl*a*) si ukážeme na metodice laboratorního stanovení potravní nabídky invazního mlže slávičky mnohotvárné, jež je standardně prováděna na Katedře zoologie Přf UP v Olomouci.

**Potřeby :** kompresor nebo podtlaková pistole, tlaková filtrační aparatura NALGENE, filtry ze skelných vláken (velikost pórů 0,45 μm a 2,7 μm), skleněné šroubovací láhve (0,5I - 2I), plastové epruvety, pinzeta, lihový popisovač, destilovaná voda



**Postup :** Připravíme si filtrační aparaturu. Připojíme tlakovou hadičku ke kompresoru (případně ruční pistoli) a aparaturu našroubujeme na 0,5 - 2 litrovou šroubovací láhev (**a**). Mezi dva díly aparatury vložíme pinzetou filtrační vrstvu ze skelných vláken o průměru pórů 2,7 μm a oba díly sešroubujeme, tím filtr upevníme v aparatuře (**b**, **c**, **d**). Připravený filtr nejprve prolijeme 0,5l destilované vody (dvakrát naplníme nálevku filtrační aparatury o objemu 250ml) abychom se zbavili případných uhlíkatých látek ve filtru.





Mezi tím si připravíme plastové epruvety, do kterých budeme odebírat jednotlivé frakce. Pro každou frakci potřebujeme tři opakování, takže na 1 vzorek vody (jedna terénní litrová láhev) budeme potřebovat 9 epruvet + 2 epruvety na filtry. Popis epruvet provedeme podle vzoru :

## datum / označení lokality / velikostní frakce / typ analýzy

Tedy například : **11. 3. 09 P > 2,7 TOC** [ tzn. odebráno 11. března 2009, lokalita Poděbrady, frakce větší než 2,7 μm (tedy nefiltrovaný vzorek), analýza celkového uhlíku (total carbon) ] Epruveta na filtr : **11. 3. 09 P 0,45 chl a** [ tzn. odebráno 11. března 2009, lokalita Poděbrady, filtr velikosti 0,45 μm, analýza chlorofylu ]

### Zkratky používané pro popis epruvet (možný příklad)

<u>Lokalita</u>	velikostní frakce [µm]	typ analýzy
P (Poděbrady)	> 2,7	<b>TOC</b> (pro > 2,7 μm a 0,45-2,7) μm)
V (Výkleky)	0,45 - 2,7	<b>DOC</b> (pro < 0,45 μm)
<b>T</b> (Troubky)	< 0,45	chl a (pro filtry)

Připravený, pročištěný filtr naplníme analyzovaným vzorkem vody (filtrujeme 11 vody, nádobka filtru má objem 250 ml, takže 4 x doplníme) a spustíme sací kompresor (nebo natlakujeme mačkáním pistole). Po přefiltrování 11 vody odšroubujeme láhev s přefiltrovanou frakcí menší než 2,7 µm (pokud je aparatura natlakovaná, musíme nejdřív povolit vypouštěcí ventil, jinak nálevku neodšroubujeme !). Do příslušných tří epruvet (frakce 0,45 µm - 2,7 µm) odebereme cca. 10 ml přefiltrovaného vzorku a epruvety uložíme (před odebráním vzorku epruvetu několikrát vzorkem promyjeme). Rozšroubujeme tlakový filtr a filtrační vrstvu (velikost pórů 2,7 µm) uložíme pinzetou do příslušné epruvety (filtrů se nedotýkáme prsty !). Mezi díly filtrační aparatury vložíme jemnější filtrační vrstvu (0,45 µm), znovu sešroubujeme a opět pročistíme filtr 0,5l destilované vody. Do znovu připravené aparatury lijeme filtrát z předchozí filtrace (11 - cca. 30 ml odebraných dříve). Z výsledného filtrátu opět odebereme tři opakování (frakce < 0,45 µm) a filtrační vrstvu (0,45 µm). Frakce > 2,7 µm odebíráme z nefiltrovaného vzorku vody ještě před filtrací.

Všechny epruvety se vzorky velikostních frakcí a epruvety s filtry pro stanovení chlorofylu uložíme v mrazáku při -80°C.

Výsledek :

Výsledkem filtrace jsou :

3 epruvety s frakcí > 2,7 μm (nefiltrovaná voda) 3 epruvety s frakcí 0,45 μm - 2,7 μm (první filtrace přes filtr 2,7 μm) 3 epruvety s frakcí < 0,45 μm (druhá filtrace přes filtr 0,45 μm)

připravené pro pozdější stanovení TOC, respektive DOC (rozpuštěný uhlík) u poslední frakce (< 0,45 µm), na TOC analyzéru

## + 2 epruvety s filtry 0,45 µm a 2,7 µm

připravené pro pozdější standardní stanovení chlorofylu v jednotlivých frakcích

Takto připravené vzorky můžeme po určitou dobu (pokud možno co nejkratší, zvláště u Chl*a* by doba skladování neměla přesáhnout 2 týdny) skladovat v mrazáku (ideálně při hlubokém zmrazení -80°C). Stejným způsobem uchováváme i použité filtry, pokud stanovujeme také chlorofyl*a* (v tomto případě musíme znát i objem – v litrech - přefiltrované vody).

Před samotnou analýzou vzorky necháme rozmrazit a u těch, které nebyly filtrovány přes filtr 0,45  $\mu$ m musíme ještě provést homogenizaci vzorku v ultrazvukové lázni (homogenizujeme minimálně ½ hodiny, tím dosáhneme jednak větší reprezentativnosti vzorku, ale také zabráníme ucpání hadiček analyzéru při případném nasátí větších částic – typicky planktonu).

Můžeme pokračovat samotnou analýzou chlorofylu a a TOC.

# Standardní postup stanovení chlorofylu *a* (metodou výpočtu koncentrace korigovaného chlorofylu)

(pokud jsme vzorky připravili podle předcházejícího Postupu, přejdeme přímo k bodu 3.)

- 1. čerstvý vzorek vody protřepeme a přelijeme přes jemné síto
- dostatečné množství vzorku vody (podle předpokládaného množství fytoplanktonu) přefiltrujeme přes skleněný filtr (WHATMAN GF/F nebo GF/C) ve fritě nebo pomocí membránové filtrace
- 3. filtr složíme pinzetou a rozstříháme do centrifugační zkumavky
- do zkumavky přidáme 7,2 ml extrakční směsi (90% aceton : methanol v objemovém poměru 5:1)
- 5. obsah zkumavky zhomogenizujeme
- 6. zkumavky dáme ve stojánku na 2 minuty do vodní lázně o teplotě 65 °C
- 7. ochladíme zkumavky proudem studené vody
- zkumavky odstředíme při 3000 otáč./min. po dobu 15 minut (pokud má centrifuga chlazení, chladíme při 5 °C)
- 9. na spektrofotometru změříme absorbanci supernatantu při vlnové délce 664 nm
- 10. do kyvety přidáme jednu kapku 10% HCl a opět změříme absorbanci

K výpočtu koncentrace korigovaného chlorofylu a použijeme tento vzorec:

 $c = 28,9. \; (A_o - A_a).7,2/\; V.d$ 

- c ... koncentrace chlorofylu  $a \vee \mu g.l^{-1}$
- $A_o \ldots$  absorbance před okyselením
- $A_a \dots$  absorbance po okyselení
- V ... objem vzorku v l
- d ... délka kyvety v cm

## Standardní postup analýzy na TOC Analyseru Formacs $^{\rm HT}$



Přístroj připravený k analýze se skládá z následujících částí:

Před spuštěním přístroje zkontrolujeme připojení tlakové lahve, přívod destilované vody (**a**) (případně doplníme láhev) a připojení odpadní lahve (**b**) (pokud je plná, vyprázdníme a znovu připojíme).



Dále provedeme kontrolu samotného analyzéru. Otevřeme přední kryt, přístroj má tyto součásti:



Zkontrolujeme hladiny zásobních kyselin (**a**). Levá zásobní lahvička ("IC reactor acid") obsahuje 2%ní kyselinu fosforečnou, která je využívána při analýze IC, pravá lahvička ("sparging acid") obsahuje 2M kyselinu chlorovodíkovou, z ní je získávána kyselina pro nástřik (sparging) okyselení při stanovení TOC. Pokud jsou hladiny kyselin pod ryskou, doplníme.



Dále zkontrolujeme stav hadiček (kontrolujeme jestli nejsou viditelné velké bubliny, ucpání, případně poškození hadiček, pokud objevíme prasklou hadičku, přístroj nesmíme spouštět až do servisní výměny!!!). Pokud jsou tlačné svorky uvolněné, zafixujeme je (**a**, **b**, **c**).



Tím je kontrola přístroje ukončena a můžeme přejít ke spuštění a naprogramování analýz. Analyzér zapneme vypínačem na zadní straně přístroje. U zapnutého přístroje svítí zeleně kontrolka "STAND BY" a v přístroji se protáčejí tlačné válečky (pod tlačnými svorkami), pokud již probíhá analýza (vysokoteplotní reaktor je aktivní) svítí červeně kontrolka "TC OVEN".



Po zapnutí analyzéru spustíme počítač a otevřeme přívod vzduchu z tlakové lahve (červený hlavní ventil). Tlak vzduchu v lahvi by měl být vyšší než 50 bar (pokud je nižší, je láhev téměř prázdná a měla by být vyměněna). Průtok vzduchu se reguluje černým vedlejším ventilem, tlak na druhém "budíku" by se měl pohybovat mezi 20-30 psi – cca. 2 bary (přesnou hodnotu případně upravíme později podle údajů o průtoku zobrazovaných při analýze, výstupní tlak ale nesmí přesáhnout 3 bary!!!).



TOC Analyser FORMACS se ovládá přes softwarové rozhraní počítače (program TOC4Win), zde se zadávají parametry analýz a přes tento software jsou také zobrazovány zjištěné hodnoty. Program spustíme z Plochy (ikona diamantu s názvem "TOC4Win"), případně ze složky "Windows TOC software" na Ploše (do této složky jsou ukládány také templaty-vzory a výsledky analýz).



Po spuštění se objeví "Hlavní" okno a "Info" okno programu ("Info" okno se spouští z nabídky "View" a zobrazuje aktuální stav procesu – teplotu pecí, průtok vzduchu, IR signál, atd.).



Z menu hlavního okna vybereme nabídku "Connection" a zvolíme "Auto Connect". Tímto jsme provedli propojení analyzéru se softwarem, v "Info" okně se zobrazí aktuální číselné hodnoty. Dále vybereme z nabídky "Settings" v hlavním menu odkaz "Options" a zobazí se nám nabídka základního nastavení analyzéru.

IR Raw Signal - 27946 IR Signal - 22983 ND Raw Signal -1 ND Signal 0 TC Temp 957 Peltier Temp 4.1 How In 148 Flow Out 166 Press Sparging 0 Write Pointer 121 Read Pointer 157 Factors	Settrop     Curve Order     Analyser Type     Stand-By       Carve Order     Analyser Settings     COMI       General     Formacs HT     Comic HT       General     Formacs HT     Formacs HT       General     General     Formacs HT       General     General     Formacs HT       General     General     Formacs HT       General	Cetino
-	OK Cancel Apply	

Z nabídky "Options" otevřeme záložku "Analyser Settings" a klikneme na "Reset All". Tím provedeme zresetování přístroje na defaultové nastavení. Průběh zkontrolujeme v podzáložkách "General" a "Formacs HT", u každého parametru nastavení by se měla objevit zelená "fajfka". Pokud je vše v pořádku potvrdíme OK.

🚆 Info 📃			😋 Čeština 🕜 🤤
IR Raw Signal -20042			
IR Signal -29008			
ND Raw Signal -1			
ND Signal 0			
TC Temp 939			
Peltier Temp 4,1			
Flow In 149			
Flow Out 155	<b>2</b> 100-1-0-1	© Options	
Press Sparging 0	= Settings	Curve Order Analyser Type Stand-By	
Write Pointer 180		Analyser Settings Detection Settings	
Read Pointer 123		Oursel Forman HT	
<b>(</b>			
Internet		FormacsHT Analyser Settings	
Explored		Default SampleTime 180 s	
		√ TCTemp 950 °C	
		√ Syringe 250 μl	
		✓ Flush Count Count(s)	
		Piush Volume 20 µ	
		Picklin Speed 35	
		√ Inject Speed 70	
		✓ Acid to Cup 2 count(s) * 50 µl	
		Acid to IC 100 count(s) * 50 µl	
		✓ Sparging Time 120 s	
		✓ StirTime 10 s	
		Send Settings to Analyzer Bestore Defaults	
		Heset Au	
🙀 Start 🛛 🧐 🥔 🚮 🗍 🕮 Dokument 1 -	- Microsoft W		<b>g</b> 12:23

Dále provedeme specifické nastavení přístroje. To se provádí přes nabídku "View" v hlavním menu, odkaz "Control Panel".



Přes okno "Control Panel" můžeme ovládat veškeré procesy přístroje (zdvih a spuštění jehly, nástřik, pozici jehly, atd.) manuálně. Při rutinním spouštění analýzy klikneme jen na "AutoZero C" (vynulování hladiny) a "Acid Reactor" (nasátí cca. 20 ml zásobní kyseliny). Klikneme na "Exit" a okno zavřeme.



Teď můžeme přistoupit k nastavení samotné analýzy. Nejprve musíme nastavit vzor, to provedeme z hlavního menu v nabídce "Template" (můžeme buď vytvořit zcela nový vzor analýzy – odkaz "New", nebo použít již vytvořený – odkaz "Edit").



Pokud nastavujeme nový vzor analýzy objeví se nám (potom co uložíme vytvářený vzor pod zvoleným jménem např. UGO090708final.tdb) prázdný první řádek protokolu, který odpovídá první pozici (vzorku) v bubnovém podavači. Zde nastavujeme veškeré parametry budoucí analýzy. Políčko "Position" udává kde se daný vzorek nachází (reálná pozice vzorku v podavači). V políčku "Type" vybíráme typ vzorku (z nabídky buď "Unknown" – neznámý vzorek, který chceme analyzovat, "Quality Sample" – verifikační roztok pro ověření kvality měření, nebo "Standard" - standard pro nastavení kalibrační křivky). Políčko "Dilution Factor" udává poměr ředění vzorku (pokud nemáme vzorek naředěný zadáme 1x). Políčko "Identification" slouží k identifikačnímu záznamu daného vzorku (doporučuji vzorky identifikovat podle předem stanoveného kódu, např. iniciály + pořadové číslo = UGO 55, apod.). Dále zvolíme v polích "Injection" typ analýzy u daného vzorku, tedy to co chceme zjistit, u "Unknown" vzorků zatrhneme "TC" i "IC" (chceme změřit oba parametry abychom byli schopní zjistit TOC), u "Quality Sample" volíme jen jeden z parametrů (podle toho jestli máme verifikační vzorek na TC nebo IC - přípravu ověřovacích/základních roztoků provedeme podle návodu k TOC Analyseru), "Standard" vzorky volíme jen při stanovení kalibrační křivky (v našem případě už jsou křivky nastaveny). Z dalších polí zatrhneme jen "Stirrer" tedy míchání vzorku. V polích "Injection Volumes" nastavujeme objem vzorku pro nástřik do reaktorů (oba nastavíme na 100). Pokud máme první pole nastavené klikneme na "Add Pos", přidá se nám další pole templatu-vzoru a můžeme pokračovat v nastavení dalších vzorků. Pokud chceme pole odebrat klikneme na "Del Pos". Tímto způsobem nastavíme několik prvních vzorků v pořadí. Je dobré na začátek každé analýzy zařadit sérii verifikačních vzorků ("Quality Sample") o známém objemu uhlíku pro ověření přesnosti měření. Správně zadaný "Template" může vypadat nějak takto: První vzorek je vodovodní voda (kvůli vymytí případných nečistot), následuje verifikační vzorek na TC o známé koncentraci 20 mgC/l, IC

20 mgC/l, případně ještě TC 40 mgC/l a IC 40 mg/l, znovu vodovodní voda (na promytí jehly) a potom už naše vlastní vzorky kódované podle zvoleného systému (první náš vzorek, který chceme analyzovat bude tedy v tomto případě na pozici 6).

Na závěr ještě zkontrolujeme nastavení analýzy v polích "Element" (pro analýzu TOC zvolíme "Carbon"), "Integration Time" (doba analýzy jednoho nástřiku, zvolíme 100 s), "Samples" a "Extra Samples" (počet opakování měření jednoho vzorku – nastavíme 2 opakování, případně extra opakování při velké odchylce měření – nastavíme také 2, tzn. že jeden vzorek bude opakovaně změřen max. 4x), "Max CV" (jakou max. odchylku v opakovaných měřeních akceptujeme, nastavíme na 2% - pokud nebude této hodnoty dosaženo po námi zvoleném počtu standardních opakování, přístroj provede ještě zadaný počet "Extra Samples" čímž se prodlouží čas analýzy, ale zpřesní se výsledek). Kolonku "Sample Time" nastavíme na 180 s. Pokud máme vše nastaveno klikneme na "Exit" a přejdeme k vlastní analýze, náš vytvořený vzor se uloží pod zvoleným jménem (UGO090708final.tdb) do složky "templates".

🕎 Info				🖬 Čeština 👔 🏹
IR Raw Signal	-1054			
IR Signal	-992			
ND Raw Signal	0			
TC Temp	942			
Peltier Temp	Templat	Edit: C'Documents and Settings' Administrator/Plocha/Windows TDC Software	e nůvodní: Temolate) IISO 090708final bdh	X
Flow In	File View			
Flow Out		Injection	s I linje	ection Volumes
Press Sparging	Position	Identification zavadeci voda.	: Sparging TC	Reactor
Read Pointer	Туре	Unknown Dilution Factor 1 × CIC	Closed Cup Stirrer	Reactor 100
<b>(C)</b>	Position	2 Identification TC Std 20.00 mg/l	s Inje	action Volumes
Internet	_		Classed Cup F Acid Cup	Reactor 100
Explorer	Type	Dilution Factor 1 x 1 10	i closed cup le surrer	
	Position	3 Identification IC Std 20.00 mg/I	s Inje FINPOC FISparging TC	Beactor 100
	Type	Quality Sample   Dilution Factor  T C	Closed Cup IC	Reactor 100
			s initial init	action Volumes
	Position	4 Identification TC Std 40.00 mg/I	E NPOC E Sparging TC	Reactor 100
	Туре	Quality Sample Dilution Factor	Closed Cup 🔽 Stirrer IC	Reactor 100
	Desition	5 Hartforder IC Std. 40.00 mg/l	s E NEOC E Statution Inje	ection Volumes
	FUSICUI		C Acid Cup	Reactor 100
	Туре	Dilution Factor	Closed Cup 🖉 Stirrer	
	No Of Po	sitions 8 Add Pos Del Pos	Renumber Refresh Stand	ards Print
	Elemen	Carbon Somples 2 Sample	Fime 180 s	
	Integratio	Time 100 s H C		
		Max CV		
		Analyse	rType FormacsHT	Egit
🏽 🎒 🍮 付	🖞 🛛 🐻 Doki	nent1 - Microsoft W 😨 TOC4Win		<b>#</b> 12:25

Analýzu vyvoláme z hlavního menu v nabídce "Analysis". Po kliknutí na "New" (pro novou analýzu) budeme vyzváni k přiřazení templatu-vzoru. Ze složky "Template" vybereme námi vytvořený vzor (UGO090708final.tdb) a zvolíme "Otevřít". Tímto jsme načetli vzor analýzy a objeví se nám výzva k uložení nové analýzy (ukládá se do složky "Analysis", název můžeme zvolit např. zkouska.adb), uložíme a otevře se nám hlavní okno analýzy.



V tuto chvíli je důležité zkontrolovat stav analyzéru v "Info" okně. Zajímá nás především řádek: "TC Temp" (teplota vysokoteplotního reaktoru, měla by se pohybovat okolo 940°C, pokud je nižší, musíme ještě chvíli počkat, než reaktor nedosáhne potřebné teploty), "Peltier Temp" (teplota nízkoteplotního Peltierova reaktoru, neměla by přesáhnout 4,5°C, pokud je vyšší musíme použít chlazení-větrák), "Flow In" a "Flow Out" (průtok plynu na přívodu a na vývodu, měl by se pohybovat okolo 150 ml u obou, pokud se výrazně liší, upravíme opatrně (!!!) průtok vedlejším (černým) ventilem na tlakové láhvi). Ostatní řádky nás informují o aktuálních hodnotách signálů (IR a ND) a stavu zapisovače (čísla by měla neustále "běhat").

🕎 Info		_ 🗆 🗙
IR Raw Signal	-1297	
IR Signal	-1353	
ND Raw Signal		
ND Signal		
TC Temp	940	
Peltier Temp	4,1	
Flow In	148	
Flow Out	155	
Press Sparging		
Write Pointer	181	
Read Pointer	180	

Pokud jsou všechny hodnoty v pořádku, prohlédneme si hlavní okno anályzy ("Analysis"). V prvních řádcích vidíme název analýzy ("Analysis Name", např. zkouska.adb) a název námi zvoleného vzoru ("Template Name", např. UGO 090708final.tdb). Kolonka "Date/Time" se automaticky vyplní při spuštění analýzy, stejně jako ostatní zatím prázdná políčka. Ze spodního menu dále klikneme na "Graph Peaks". Zobrazí se nám obrazovka grafu naměřených píků ("Analysis, Peaks" okno, v tuto chvíli prázdné), zde se nám budou zobrazovat veškeré informace o právě probíhajícím měření (pozice jehly, typ vzorku, měřené hodnoty, atd.) a budou se zde graficky vykreslovat zjištěné hodnoty. V tuto chvíli odklikneme "AutoZero Carbon" (vlevo dole v okně) a měla by se nám zobrazit vykreslující se linka hladiny měření (měla by se ustálit okolo hodnoty 20000, pokud linka zmateně přeskakuje a vykresluje "klikiháky" nebude pravděpodobně analýza správně fungovat, v tomto případě nám nezbude nic jiného než celý přístroj i s počítačem a lahví vypnout-zapnout a znovu nastavit celou analýzu od začátku). Pokud je vše v pořádku klikneme na " $\rightarrow$  Analysis" a přepnout se zpět do hlavního okna analýzy).

🚆 Info		- IX		CS Čeština [?] 🙄
IR Raw Signal	-182	5		
IR Signal	-177	6		
ND Raw Signal	0	Č .		
ND Signal	0		Okno grafu píků	
TC Temp	941			
Peltier Temp	4.1	Applusic Book	r: E) Decuments and Settings) () devinists ator) () lessa) Windows TOE Settings) () dealers and bettings) () devinists ator) () lessa) () ator)	
Flow In	14	Analysis, Peak	S. C. Documents and Sectings (Administrator (Flocka (Hindows Floc Software purpoint (Anarysis (2000) Rational Control of the Control of Control	
Flow Out	15	Carbon		
Press Sparging	0		Peak Information	
Write Pointer	92		Dec	
Read Pointer	91	140000	Injection	
<b>(</b> =			Sample Nr.	
Internet		120000	Туре	
Explorer			Identification	
		100000	Dilution Factor	
			Injection Volume Oven Temp	
		80000	Cooler Temp	
			Original Values:	
		60000	Start	
		10000	Area	
		40000	Edited Values:	
		20000	Start	
		20000	Area	
			Lico Original Poak	
			Use Edited Peak	
		AutoZer	o Carbon 1	
		-> Results	-> Analysis Print Exit	

Ve výsledkovém okně analýzy ("Analysis, Results") máme přehled plánovaných měření, vytvořených podle námi zvoleného vzoru ("templatu"). V levé horní části okna je zobrazené nastavení vzorkování (počet opakování měření, "extra sampling", čas měření, akceptovaná odchylka, apod.). Pod ní je seznam naplánovaných vzorků v určených pozicích a pravá část okna zobrazuje údaje pro zvolený vzorek (můžeme si je prohlédnout kliknutím v seznamu). V pravé části se zobrazují naměřené výsledky pro TC a IC (u "Quality Samples" jen jednoho z parametrů, podle toho jak jsme nastavili ověřovací vzorek) a to u všech opakování (v našem případě 2+2) a také průměrná hodnota ("Average", "TC Conc") a odchylka v % jednotlivých měření ("CV"). Pokud přístroj dokončí všechna měření pro daný vzorek, kliknutím na "Calculate Results" si necháme vypočítat obsah TOC u všech již analyzovaných vzorků (hodnota TOC pro zvolený vorek se po kalkulaci zobrazí v políčku "Average TOC Conc"). Z výsledkového okna si také můžeme prohlédnout nainstalované kalibrační křivky pro TC a IC kliknutím na "Calibration Curves". Vedlejší odkaz "→ Peaks" nás vrátí do okna grafu píků ("Analysis, Peaks").

🗶 Info			🖸 Ceitina 🕜 🗧
IR Raw Signal IR Signal	-1333 -1391		
ND Raw Signal	0		
TC Temp	942	vysleukove okno analyzy	
Peltier Temp	4,1	🖉 Analysis, Results: C\Documents and Settings\Administrator\Plocha\Windows TOC Software puvodni\Analysis\zkouska.adb	
Flow Out	152	SampleTime 180 s Carbon	
Press Sparging	0	Element Carbon Samples 2 Average TC Volume 100 ut	
Write Pointer Read Pointer	13 12	Integration Time 100 s May CV 2 TC Conc. mg/l CV %	
æ		Sample Area Conc Curve Org. Sel.	
Internet Explorer			
		Position Type Identification Dilution	
		2 Quality Same TC Std 20.00 mg/l 1	
		3 Quality Same IC Std 20.00 mg/l 1 I	
		Country Same I C Sta 40.00 mg/l     Average     IC Volume 100     μl	
		6 Unknown zavadeci voda 2 1 IC Conc. mg/I CV %	
		7 Unknown UG0 55 1 Sample Area Conc Curve Org. Sel.	
		TOC	
		Average TOC Conc. mg/l	
	$\leq$	Calibration Curves     Calculate Results     Exit	
	11.000		
Start 🛛 😘 🧶 🚮	Dok	kument1 - Microsoft W   🙀 TOC4Win	12:27

Pokud jsme při přípravě vzoru (template) nezadali všechny vzorky, které chceme analyzovat, můžeme je přidat do plánu analýzy z výsledkového okna. Provedeme to tak, že zvolíme poslední vzorek v seznamu (v našem vzorovém případě UGO 56), klikneme na něj pravým tlačítkem myši a z rozbalovacího seznamu vybereme "Insert" (pokud bychom naopak chtěli danou pozici vymazat, zvolíme "Delete", pro úpravu stávajícího bychom volili "Edit").

	🖬 Čeština 🍞 🙄
ID Daw Signal 1568	
IR Signal	
ND Raw Signal 0	
ND Signal 0	
TC Temp 942	
Politier Temp 41 States Results: (*) Documents and Settings) Administratory Plochay Windows: TIT: Software ndvodný Analysis	zkouska adb
Flow In 149	
Flow Out 154	TO
Press Sparging 0 Element Corbon Samples 2 Average	
Write Pointer 33 Extra Samples 2 Area	TC Volume 100 µl
Read Pointer 32 Integration Time 100 s Mox. CV 2 TC Conc. n	ng/I CV %
Sample Area Con	ic Curve Ora Sel
Internet	
Explorer	
Position Type Identification Dilution	
2 Ouelity Same IC Std 20.00 mg/l	<u> </u>
4 Duality Same TC Std 40.00 mg/l 1	IC
5 Quality Same C Std 40.00 mg/l 1	IC Volume 100 ul
6 Unknown zavadeci voda 2	
7 Unknown UGO 55	
8 Unknown UG0 56 1 Sample Area Con	c Curve Org. Sel.
Insert	
Edit	
Average	
TOC Conc. n	ng/l
Peaks Calibration Curves Calculate Results	Exit
gapsare    🖓 😹 🔄    🔤 Dokumenci - Microsore W    🔩 TOC4Win	<b>B</b> 12:27

Otevře se nám podokno nastavení/vložení pozice ("Analysis, Insert Position"). Zde můžeme nastavit další plánovaný vzorek podobně jako při nastavování templatu (pro rutinní přidání neznámého vzorku stačí změnit název nebo jen číslo vzorku v poli "Identification", pozice vzorku v poli "Position" se při přidání vzorku automaticky zvýší o jedna). Specifická nastavení (TC, IC, objem, atd.) zůstávají stejná jako u předchozího vzorku. Potvrdíme "OK" a můžeme přidávat další vzorek. Tímto způsobem přidáme všechny vzorky, které budeme analyzovat.

🕎 Info			🖬 Ĉeŝtina 🕜 😳
IR Raw Signal	-1589		
IR Signal ND Raw Signal	-1614		
ND Signal			
TC Temp Peltier Temp	940 4 1	🔽 Rashirin Daruhan () Nacumante and Schland Administrata) North Statement TO' Schusse admoted Anshirid shandar with 👘 🔽 🔽	
Flow In	147	SampleTime 180 s Carbon	
Flow Out	154		
Write Pointer	0 58	Element Carbon Samples 2 Average TCVolume 100 µl	
Read Pointer	57	Integration Time 100 s Max. CV 2 TC Conc. mg/I CV %	
æ		Sample Area Conc Curve Org. Sel	
Explorer			
		Position Type Identification Dilution	
	Se Anal	ysis, Insert Position	
	Positi	Injections	
	Tyrue	Unknown V Dibloire Ferder 1 V PIC C Closed Cup P Stimer IC Reactor 100	
	1300		
		OK Standards Cancel	
		TOC	
		Average	
		-> Peaks Calibration Curves Calculate Results Egit	
	la con		
🏽 🎒 🍰 🎆 🏙	Dol	kument1 - Microsoft W   🔤 TOC4Win	<b>2</b> 12:28

Tímto jsme dokončili nastavení analýzy. Pokud jsme to už neudělali dříve, vyndáme teď připravené vzorky v analyzačních zkumavkách z chladničky a vložíme je do integrovaného dávkovače přístroje. Dávkovač má 80 pozic (**a**). Aktuální pozice se dá nastavit manuálně přes okno "Control Panel". Při inicializaci přístroje (tzn. když jsme provedli "Auto Connection" a "Reset All") se dávkovač automaticky nastavil na pozici jedna pod dávkovací jehlou. Do jednotlivých polí vložíme zkumavky ve správném (!!!) pořadí, tak jak jsme je nastavili v plánu analýzy (**b**). Hlavně dáváme pozor abychom neprohodili vzorky a aby čísla pozic v dávkovači odpovídala nastavené analýze! Při spuštění analýzy se bude dávkovač automaticky otáčet na pozici v pořadí jaké bylo nastaveno v plánu analýzy v programu. Dávkovač se otáčí ve směru hodinových ručiček. Při analýze je dobré celý podavač zakrýt plastovým krytem, abychom zabránili kontaminaci vzorků.



Pokud máme připravený integrovaný dávkovač, naplněný vzorky a zakrytý, můžeme přistoupit ke spuštění analýzy. Doporučuji ještě před spuštěním znovu důkladně zkontrolovat následující:

- jestli máme správně a pochopitelně zapsané v poznámkách identifikace jednotlivých vzorků
- 2) jestli je v programu správně nastaven plán analýzy, hlavně jestli všechny vzorky nastavené ve výsledkovém okně "Analysis, Results" jsou na správných pozicích v dávkovači a jestli není nějaká pozice nastavená v programu pro analýzu v dávkovači prázdná (tím by totiž došlo ke spuštění jehly a nasátí "naprázdno" čímž by mohlo dojít k vážnému poškození přístroje !!!)
- jestli v okně grafu píků ("Analysis, Peaks") je vykreslovací linka rovná a nerozkolísaná
- 4) jestli je prázdná odpadní láhev a plná zásobní láhev na destilovanou vodu
- 5) jestli jsou zaklapnuté tlačné svorky
- 6) jestli jsou v "Info" okně zobrazeny správné hodnoty teplot pecí a průtoků

Pokud analýzu spustíme, máme už jen velmi omezené možnosti nastavování a úprav!!! Když je vše v pořádku vrátíme se do hlavního okna analýzy ("Analysis") a spustíme analýzu kliknutím na "Start Analysis".

🌄 Info	_ IX			🔂 Čeština 👔 🗘
IR Raw Signal -20 IR Signal -2	079 154	Analysis, Peaks: E:\D	ocuments and Settings\Administrator\Plocha\Windows TDE Software pdvodni\Analysis\zl	ouskaadb
ND Raw Signal 0 ND Signal 0 TC Temp 94 Peltier Temp 4.1	13	140000	A P	eak Information os iection
Flow In 15 Flow Out 15	i0	120000	Analysis Analysis Law Zkouska.adb	e e
Press Sparging 0 Write Pointer 40		100000	Template Name UGO 090708final tdb	ttin Factor
Read Pointer 40	Analysis, Res	80000	State Monitoring	n Temp ler Temp
Internet Explorer	Element	60000	Start Temp TC Oven 0 'C	inal Values: t
	Integration Ti	40000	Analysis Info	ed Values:
		20000		t a
	Position T; 1 U/ 2 0; 3 0; 4 0; 5 0; 6 U; 7 U; 8 U; 8 U; 9 U;	AutoZero Car -> Results	Current SampleTime s s s s s s s s s s s s s s s s s s s	R R   se Original Peak   Jse Edited Peak     Print     Exit
🏽 🏦 Start 🛛 🎲 🥭 🚮 🖉	Dokument1 - Microsoft V	🔛 TOC4Win		12:3

Po spuštění se automaticky vyplní kolonky "Date/Time", stav - "State" se změní z "Monitoring" na "Analyzing", kolonky teplot pecí se vyplní údajem aktuálního stavu v "Info" okně (tedy správně by měly být cca. 940°C "TC Oven" a 4°C "Peltier Cooler"). Ve spodních kolonkách okna se nám zobrazuje aktuální stav analýzy (aktuální pozice jehly, typ analýzy, časový průběh, atd.).

🕎 Info		_ X			📧 Čeština 🕜 🤤
ID D	0050		Analysis, Peaks: E:\l	Documents and Settings\Administrator\Plocha\Windows TOE Soltware puvodni\Analysis\zkouska.adb	- 🗆 ×
IN Naw Signal	-3302	,	Carbon		
ND Paw Signal	0		Garbon		1
ND Signal	0			Peak Information	
TC Temp	943		140000	Pos	
Peltier Temp	4.0			Intection	
Flow In	150		120000		
Flow Out	152		0.000.000	Analysis Name zkouska.adb e tricetion	
Press Sparging			100000	Template Name UGO 090708final tdb	
Write Pointer	171		11/2010/00/17	Date/Time 3.6.2009 12:32:53 Dion Volume	
Read Pointer	171	🚆 Analysis, Re	80000	n Temp	
		SampleTi	r	State Prodying	
Internet			60000	Start Temp TC Oven 944 °C +	
Explorer		Element		Start Tomo Politor Coolor 4 10	
		Integration "	40000		
		Integration		Analysis Info ed Values:	
			20000	-	
				a de la companya de la company	
				-	
		Position 7	3	218	
		1	le .	Current Sample Lime 1270 IS	<u> </u>
		2 0	h	Injection Order 1 / 8	
		3 0	-	Position 1 se Original Peak	
		4	-	Jse Edited Peak	
		5	AutoZero Ca	n SampleNo /	
		7		Injection IC	
		8	Jr Results	☑ Go to Stand-By after Analysis	Print Exit
				Results Print Results	
				Start Analysis Graph Poals Excert Poartin	
				Citapin Peaks L.Appin ricburg	
				Exit	
				TOC Case mail	
				▼	
		-> Peaks	Calibration Cu	Inves Calculate Results Exi	
🏽 🕄 🧔 🚮	Dok	ument1 - Microsoft	W		12:33

Doporučuji během analýzy mít otevřené jak hlavní okno analýzy "Analysis", tak okno výsledků "Analysis, Results" i okno grafu "Analysis, Peaks". Mezi jednotlivými okny se můžeme přepínat buď odkazy přímo v oknech (tlačítka se šipkou " $\rightarrow$  Results", " $\rightarrow$  Peaks"), nebo klasicky na hlavní liště Windows, případně jednoduchým kliknutím myší přímo na dané okno. Dále si necháme viditelné také "Info" okno pro kontrolu stavu přístroje (teploty, průtoky). Při probíhající analýze se nám otáčí integrovaný dávkovač a dávkovací jehla automaticky provádí nástřiky do reaktorů (**a**, **b**, **c**, **d**).



Během analýzy kontrolujeme především okno píků "Analysis, Peaks". Při správně probíhající analýze se píky vykreslují jako souměrné "kopečky", analyzovaný vzorek se nám vždy vykresluje postupně (**a**) a při skončení měření se pík vybarví zeleně (**b**) (a následuje další odběr a nástřik). Pokud je něco špatně, píky se začnou deformovat a měření je pak většinou nepoužitelné.



Výsledky si můžeme už v průběhu analýzy zobrazit v okně "Analysis, Results" kliknutím na "Calculate, Results". Výsledek se zobrazí v kolonce "Average TOC Conc".

🕎 Info			_							CS Ceitina	. 3 :
IR Raw Signal	-5268		🔛 Analysis, Peak	a: C:\Documents and Se	ettings\Administrate	or\Plocha\Wi	ndows TOC Software původ:	ıī∖Analys	is\zkouska.adb		-IIX
IR Signal	-5242		Carbon								
ND Raw Signal	0								Peak Information		
ND Signal	0 047		140000						Poe		
Peltier Temp	4.1		140000						Injection		
Flow In	149		120000 -						Sample Nr.		
Flow Out	150								Type Identification		
Press Sparging			100000					-11	Dilution Eactor		
Write Pointer	188			170074800 W Doc - 200					Injection Volume	a	
Read Pointer	187	Manalysis, R	esults: C:\Documents	and Settings\Adminis	strator\Plocha\Wind	ows TOC Soft	ware původní\Analysis\zko 1	uska.adb	×	1	
<u>(</u>		SampleT	ime   180	5		Carbon					
Explorer		Element	Carbon	Samples	2	Aver	age TC		100		
			- 100	Extra Samples	2	Area	3774777	10	Volume 100 µi		
		Integration	Time   100	s Max. CV	2	TCC	inc.  45,653 mg/l	CV	10,000 %		
						Samp	e Area Conc		Curve Org. Sel.		
						-	2 0 0	-			
					-		-1 -10	- 1			
		Position	Type Identi	ication	Dilution						
		2	Quality Same TC St	d 20.00 mg/l	<mark> </mark> [					P -	≤    .
		3	Quality Sam: IC Std	20.00 mg/l	1						
		4	Quality Same TC St	d 40.00 mg/l	1	Aver	nge IC				
		5	Quality Samp IC Std	40.00 mg/l	1	Area		IC	:Volume  100 μl		
		6	Unknown zavad	leci voda 2		IC Co	nc. mg/l	С	v %		
			Unknown UGO	56		Samp	e Area Conc		Curve Org. Sel.		Exit
		*			J						
									•		
						-	TO	-			
						TOC	Conc. ma//				
							ing/	4			
		-> Peak	calibrati	on Curves Cal	Iculate Results				Exit		
			(1								
🛒 🧶 🗯 👔	Dok.	ument1 - Microsof	t W 🔛 TOC4Win								<b>12:37</b>

Zanalyzování jednoho vzorku je poměrně časově náročné (trvá od 15 do 30 minut, podle nastavení počtu opakování měření a aktuálního průběhu analýzy). Při plném dávkovači (80 vzorků) tedy může trvat analýza i 12 hodin. Pokud ale vše probíhá správně (píky se dobře vykreslují, teploty i průtoky jsou stálé, výsledky nejsou nulové, atd.) je možné u přístroje zajistit jen minimální bezpečnostní dohled (pro případ výpadku proudu apod.) a věnovat se jiné práci. Po skončení analýzy se přístroj automaticky přepne do "čekacího módu" a můžeme provést zhodnocení výsledků (je dobré zavřít tlakovou láhev pokud neběží analýza, aby se zbytečně neplýtval plyn, pokud budeme pokračovat v dalších analýzách do tří dnů není nutné samotný přístroj vypínat, ale můžeme odklapnout tlačné svorky aby se neopotřebovaly hadičky).

Po skončení analýzy si můžeme prohlédnout a stáhnout výsledky. Pokud jsme program již předtím vypnuli, vyvoláme naši analýzu z hlavního menu v nabídce "Analysis", zvolíme "Edit" a otevřeme naši analýzu (v tomto vzorovém případě "zkouska.adb").



Otevře se nám hlavní okno analýzy "Analysis", ve kterém se můžeme pohybovat úplně stejně jako při nastavování analýzy (rozdíl je jen v tom, že při ukončené analýze je v kolonce "State" napsáno "Editing" a žádné procesy neběží). Přepneme se do okna grafu "Analysis, Peaks" a zkontrolujeme proběhlá měření (posuvným jezdcem pod grafem si prohlédneme všechny naměřené píky, jestli někde nedošlo k chybám)



Přepneme si na výsledkové okno "Analysis, Reuslts" a klikneme na "Calculate Results". Tím se nám vypočítá objem množství TOC pro všechny vzorky (pokud je u některých vzorků v kolonce "Average TOC Conc" po výpočtu uvedeno "ZERO !" znamená to, že vzorek se nepodařilo zanalyzovat – např. z toho důvodu, že množství TOC je velmi malé).

Teď se můžeme vrátit do hlavního okna analýzy "Analysis". Výsledky si můžeme buď jednoduše opsat z výsledkového okna do poznámek, nebo pokud máme připojenou tiskárnu, můžeme si výsledky vytisknout kliknutím na "Print Results".

🚆 Info		<u>_                                    </u>		n an	na 🕜 😳
IR Raw Signal	-5853				
IR Signal	-5678				
ND Raw Signal					
ND Signal					
IC Temp	944				
Flow In	4,1			Analysis	
Flow Out	150		_	Analysis Name UGO 010609.adb	
Press Sparging			Windows TOC/TN S = Settings View Cor	Template Name UGO 090708final.tdb	
Write Pointer	147			Date/Time 1.6.200916:49:59	
Read Pointer	146			Editing	
æ					
Internet Explorer				Start Temp TC Oven 944 1C	
				Start Temp Peltier Cooler 1 *C	
				Analysis Info	
				Current Sample Lime	
				Injection Order	
				Position -	
				SampleNo -	
				Injection -	
				I Go to Stand-By after Analysis	
				Start Analysis	
				Graph Peaks Export Results	
				Exit	
🏦 Start 🛛 🗯 🥭 🚮	Dokum	ent1 - Microsoft	W 🔛 TOC4Win		12:43

Nejelegantnější je asi nechat si výsledky vyexportovat do textového souboru (klikneme na "Export Results" a uložíme si soubor s příponou \*.txt do složky "Results" ve složce programu). Náš soubor si potom kdykoliv otevřeme v jednoduchých programech jako je Poznámkový blok, nebo WordPad, kde bude vypadat asi takto:

UC0251109 Demnýmkouný blok

Soubor Úpravy Formát Zobrazení Nápověda I dentification", "Inj. Type", "Conc.", "Inj. T	- 000231100 - P021001KVVy DOK									
<pre></pre>	Soubor Úpravy Formát Zobrazení Nápověda									
"UGO 88", "TC", "24,044", "IC", "21,673", "TOC", "2,371", "", "", "", "", "", "", "", "", "",	Lidentification" "Inj. Type" "Conc. " Inj. Type" "Conc. " Inj. Type", "Conc. ", "Inj. Type"									

Na každém řádku máme uveden jeden identifikovaný vzorek a zjištěné koncentrace TC, IC a vypočítané TOC. Jednotlivé údaje jsou od sebe odděleny standardními oddělovači textu (","), které dokáží identifikovat databázové programy. Takovýto soubor můžeme následně importovat do databáze (v balíku Microsoft Office je standardně nabízen program Microsoft Access, případně můžeme použít dBASE, Open Office Database, Star Office Base, apod.). To se provádí většinou příkazem "Import" z hlavního menu (v Accessu nabídka "Soubor", odkaz "Načíst externí data"), přičemž vybereme import dat z textového souboru a zvolíme náš soubor (defaultní nastavení importu není nutné u Accessu příliš upravovat, většinou načte data do tabulky bez problémů). Ve výsledku získáme data přepsaná do tabulky (**a**), která buď můžeme zařadit do existující databáze, nebo pokud ukládáme data např. v Excelu můžeme je jednoduše zkopírovat.

databáze1 : Datab	áze (Formát so	ouborů aptikace	Access 20	_ 🗆 🔀								
GO251108 : Tabul	ka										-	
Pole1	Pole2	Pole3	Pole4	Pole5	Pole6	Pole7	Pole8	Pole9	Pole10	Pole11	Pole12	
avadeci voda	TC	50,279	IC	52,795	TOC	ZERO I						
C Std 20.00 mg/l	TC	19,550										
Std 20.00 mg/l			IC	31,818		_						_
C Std 40.00 mg/l	TC	39,427	0.027									-
Std 40.00 mg/l			IC	54,491								_
avadeci voda 2	TC	53,700	IC	50,652	TOC	3,048						
GO 55	TC	31,012	IC	27,973	TOC	3,039						-
GO 56	TC	31,511	IC	27,859	TOC	3,652						_
GO 57	TC	30,715	IC	28,090	TOC	2,625						_
GO 58	TC	27,105	IC	24,980	TOC	2,125						
GO 59	TC	27,850	IC	26,401	TOC	1,449						_
GO 60	TC	27,759	IC	25,532	TOC	2,227						_
GO 61	TC	28,220	IC	26,696	TOC	1,524						_
GO 62	IC	28 075	IC	25,989	TOC	2,086						_
GO 63	TC	28,407	IC	26,311	TOC	2,096						-
GO 64	IC	23,751	IC	22,681	TOC	1,0/0						-
GO 65	TC	23,997	IC	22,852	TOC	1,145						_
GO 66	IC	23,680	IC	22,501	TOC	1,179						_
GO 67	TC.	24,428	IC.	22,823	TOC	1,605						-
GU 68	TO	23,107	IC IO	22,067	TOC	1,040						-
GU 69	TO	23,111	IC IO	22,402	TOC	0,709						-
GU 70	TO	23,939	IC IO	22,163	TOC	1,776						-
GU 71	TO	22,809	IC IO	22,166	TOC	U,643						-
GU 72	TO	24,101	IC IO	22,270	TOC	1,831						-
GU 73	TC	24,209	IC IS	23,243	TOC	0,966						-
GO 74	TC	24,285	IC	22,790	TOC	1,495						_
GO 75	TC	24,281	IC	22,921	TOC	1,360						_
GO 76	TC	23,152	IC	22,081	TOC	1,071						_
GO 77	TC	23,796	IC	22,046	TOC	1,750						_
GO 78	TC	23,865	IC	22,227	TOC	1,638						_
GO 79	TC	23,133	IC	22,015	TOC	1,118						
GO 80	TC	23,382	IC	21,957	TOC	1,425						_
GO 81	TC	22,884	IC	22,817	TOC	0,067						
GO 82	TC	23,782	IC	21,863	TOC	1,919						
GO 83	TC	25,889	IC	22,492	TOC	3,397						-
GO 84	TC	25,184	IC	22,151	TOC	3,033						_
GO 85	TC	23,768	IC	21,643	TOC	2,125						_
GO 86	TC	24,730	IC	21,802	TOC	2,928						_
GO 87	TC	23,409	IC	21,646	TOC	1,763						
GO 88	TC	24,044	IC	21,673	TOC	2,371						

Tímto postupem (který je možný i u většiny ostatních pokročilých analytických přístrojů) se vyhneme jednak pracnému přepisování dat "do papíru a zase zpátky" a také nám nehrozí nebezpečí chybného přepsání, překlepu, nebo ztráty poznámek s daty. V neposlední řadě je tento postup daleko méně časově i psychicky náročný <sup>(2)</sup>

## Vyhodnocení výsledků

Při uvedeném postupu získáme hodnoty TOC v podobě 3x3 čísel - měli jsme 3 opakování, ve třech velikostních frakcích – na jeden v terénu odebraný vzorek. Tři opakování v každé frakci by v ideálním případě měla vyjít shodně, v praxi se ale většinou budou čísla více nebo méně lišit, případně může dojít k nechtěné kontaminaci jednoho ze tří opakování, rozbití zkumavky, apod. (z toho důvodu provádíme tato opakování !). Výslednou hodnotu tedy můžeme získat buď jako prostý průměr ze všech tří měření, nebo pokud je některá hodnota výrazně odlišná, můžeme ji z hodnocení vyloučit (např. se zdůvodněním pravděpodobné kontaminace). V tomto případě doporučuji předem si stanovit hodnotu odchylky, která pro nás bude rozhodující (např. 20% hodnoty, potom vyřazujeme opakování, které se bude lišit o více jak 1/5 od obou dalších hodnot, přičemž zbývající dvě hodnoty budou mezi sebou mít rozdíl menší než 1/5 hodnoty). Tímto získáme co možná nejreprezentativnější výslednou hodnotu (v podstatě půjde o průměr z minimálně 6 měření – 3 fyzická opakování, každé měřené minimálně dvakrát už samotným analyzérem – pokud nepočítáme ještě "Extra samples", potom je měření až 12).

Teď známe hodnotu TOC v každé ze tří velikostních frakcí (v našem případě >2,7µm; 0,45 – 2,7 µm; <0,45 µm) v rámci jednoho vzorku. Celkový obsah TOC ve vzorku by měl odpovídat frakci největších částic (>2,7µm, nefiltrovaná) – tedy toto číslo by mělo být nejvyšší. Naše hodnoty nám ukazují množství TOC vždy jen snížené o látky předcházející větší frakce odstraněné filtací. Skutečný obsah organiky dané velikosti tedy musíme ještě dopočítat ze vztahů:

obsah TOC>2,7µm = zjištěná hodnota TOC>2,7µm - zjištěná hodnota TOC 0,45-2,7µm

obsah TOC 0,45-2,7 μm = zjištěná hodnota TOC 0,45-2,7 μm - zjištěná hodnota DOC<0,45 μm

obsah DOC<0,45 μm = zjištěná hodnota DOC<0,45 μm



schématicky:

Zjištěné hodnoty chlorofylu *a* nemusíme po výpočtu už nijak přepočítávat, reprezentují nám přímo obsah fytoplanktonu většího než 2,7  $\mu$ m (vláknité řasy a sinice, většina kokálních i bičíkatých) a menšího než 2,7  $\mu$ m (velmi drobné kokální sinice, úlomky stélek, části kolonií, apod.). To může být důležité u hodnocení nejen potravní nabídky (je známo, že někteří filtrátoři preferují různě velkou potravu), ale i třeba vyhodnocení nebezpečí "vodního květu" (např. sinice rodu *Microcystis* jsou zde typickými zástupci - jejich buňky mohou být menší než 1  $\mu$ m).

Pokud se podíváme na takto zjištěná data jsme schopni posoudit velmi důkladně stav lokality z hlediska úživnosti (přesně víme jaký je podíl malých i velkých organických částic, rozpuštěných látek a z toho i podíl velkého a drobného fytoplanktonu). Pokud provedeme tento "skrínink" u většího množství lokalit, jsme schopní metodami vícerozměrné statistiky dobře odlišit i velmi podobné lokality (diskriminační analýza) a zjistit tak např. důvody výskytu/absence určitého druhu (pokud je tento výskyt/absence způsoben specifickou potravní nabídkou). Dalším možným výstupem je zjištění podobnosti lokalit (např. shlukovou analýzou) z hlediska úživnosti, mikrobiální abundance, fytoplanktonu, apod. Tyto údaje jsou důležité např. při hodnocení rekreačních nádrží nebo ve vodárenské praxi pro úpravny vod.

## Použitá a doporučená literatura:

- Aplikační zpráva HACH LANGE APP-PHM-0002 "Chlorophyll", January 2009
- Aplikační zpráva HACH LANGE DOC042.85.20033 "TOC informativní souhrnný parametr", duben 2009
- Česká norma ČSN ISO 10260 http://nahledy.normy.biz/nahled.php?i=18971
- Evropská norma 1484 http://nahledy.normy.biz/nahled.php?i=52333
- FORMACS<sup>HT</sup> TOC/TN Analyser, User Manual, Skalar Analytical B. V. June 2000
- Schumacher, B. A. (2002): Methods for the Determination of Total Organic Carbon (TOC) in Soils and Sediments. EPA, Las Vegas 2002. <u>http://www.epa.gov/esd/cmb/research/papers/bs116.pdf</u>
- Horáková M., Lischke P. & Grünwald A. (1986): Chemické a fyzikální metody analýzy vod
- T. R. E. Southwood & P. A. Henderson (1999): Ecological Methods
- P. A. Henderson (2006): Practical Methods in Ecology
- http://en.wikipedia.org/wiki/Total\_organic\_carbon
- <u>http://dipin.kent.edu/chlorophyll.htm</u>

Tento studijní materiál byl vytvořen díky finanční podpoře projektu **FRVŠ/G4/1506/2009** "Aplikace analytických metod do výuky hydrobiologie".