

LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

UV SPEKTROFOTOMETRICKÉ STANOVENÍ SMĚSÍ FENOLU A CHLORFENOLŮ VE VODÁCH S POUŽITÍM PROJEKCE DO LATENTNÍCH STRUKTUR A KALMANOVA FILTRU

ROMANA KOSTRHOUNOVÁ-ŠTĚPÁNKOVÁ^a,
LUDEK JANČÁŘ^b a LUMÍR SOMMER^c

^aRECETOX, Fakulta přírodovědecká, Masarykova univerzita, Kamenice 126/3, 625 00 Brno, ^bKatedra chemie, Fakulta pedagogická, Masarykova univerzita, Poříčí 7, 603 00 Brno, ^cÚstav chemie a technologie ochrany životního prostředí, Fakulta chemická, Vysoké učení technické, Purkyňova 118, 612 00 Brno
e-mail: kostrhounova@recetox.muni.cz, sommer@fch.vutbr.cz

Došlo 12.4.03, přepracováno 20.1.03, přijato 20.3.03.

Klíčová slova: spektrofotometrie, multivariální kalibrace, projekce do latentních struktur (PLS), Kalmanův filtr, fenol, chlorfenoly

Úvod

Fenol a chlorfenoly jsou významnými polutanty životního prostředí a jsou hojně využívány jako prostředky pro konzervaci dřeva, pesticidy, herbicidy a fungicidy, případně mohou vznikat při jejich metabolizaci. Jejich všestranné použití produkuje výrazná rezidua ve vodách, půdě i potravinách. Výskyt chlorfenolů ve vodách do značné míry souvisí i s procesem chlorování vody. S ohledem na rizika spojená s jejich přítomností v životním prostředí jsou vybrané chlorfenoly zařazeny do seznamu prioritních polutantů Americké agentury pro ochranu životního prostředí (US EPA) a Evropské Unie¹. Pro jejich účinnou separaci a stanovení ve směsích přicházejí v úvahu různé časově náročné varianty plynové chromatografie (GC) a vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) po případném předchozím zakoncentrování kapalinovou extrakcí či extrakcí na pevné sorbenty (SPE) (cit.^{2–5}) a také kapilární zónová elektroforéza^{6–8}.

Fenol a chlorfenoly podobně jako jiné aromatické polutanty vykazují v alkalickém prostředí výraznou absorpci v UV oblasti, která je vhodná pro jejich rychlé spektrofotometrické stanovení^{9,10}. S rostoucím počtem atomů chloru v molekule se absorpční maximum ve spektru posouvá k delším vlnovým délkám do oblasti 280–320 nm a vzrůstá hodnota molárního absorpčního koeficientu. Pro rychlou charakteristiku směsí fenolů ve vodách přichází v úvahu spektrofotometrická analýza s multivariální kalibrací v přeurčených systémech, zejména vícenásobná lineární regrese (MLR), regrese hlavních komponent měřené veličiny vůči reálným koncentracím analytů (PCR) a regrese latentních proměnných měřené veličiny

vůči latentním proměnným hodnot koncentrací analytů s úplnou projekcí do latentních struktur (PLS) (cit.^{11–21}). Pro daný soubor spektrofotometrických dat však nelze v některých případech předvídat, který z uvedených postupů povede za daných podmínek k optimální predikci koncentrací určovaných analytů^{22,23}. Chyba predikce hledaných koncentrací analytů při použití multivariální kalibrace je závislá na charakteru a stupni překrytí absorpčních spekter jednotlivých komponent ve směsi, na výběru a počtu vlnových délek použitých pro měření, na počtu kalibračních roztoků a zejména na tvaru statistického plánu kalibračního souboru. Pro interpretaci velmi blízkých spekter jednotlivých komponent je výhodné použití Kalmanova filtru^{24–31} a také derivace absorpčních spekter, která umožňuje větší rozlišení signálů jednotlivých absorbujících komponent.

V posledních letech byla multivariální kalibrace aplikována pro směsi fenolů a chlorfenolů v různých osnovách s použitím vícenásobné lineární regrese metodou nejmenších čtverců, PCR a především PLS, a také po derivaci absorpčních spekter a v kombinaci s umělými neuronovými sítěmi (ANN) (cit.^{32–35}). V práci³⁶ je uvedeno porovnání výsledků většího počtu metod multikomponentního spektrofotometrického stanovení po předchozí prekoncentraci chlorfenolů pomocí SPE s použitím varianty injekční průtokové analýzy (FIA) a multidetekčního systému.

V naší práci jsou testovány dvě modelové směsi fenolů, z nichž první (A) respektuje výraznější změny v absorpčních spektrech chlorfenolů, druhá (B) je obvyklá po chlorování vod s obsahem fenolu:

- směs A: směs fenolu, 2-chlorfenolu (2-CP), 2,6-dichlorfenolu (2,6-DCP) a 2,3,6-trichlorfenolu (2,3,6-TCP),
- směs B: směs fenolu, 2-chlorfenolu (2-CP), 3-chlorfenolu (3-CP) a 4-chlorfenolu (4-CP)

v koncentračním rozsahu 10–100 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ v prostředí 1 mol.l^{-1} NaOH a 1 mmol.l^{-1} EDTA, s použitím PLS pro různý počet vlnových délek a různé statistické plány kalibračních roztoků při vyhodnocení absorpčních křivek a jejich derivací. Výsledky jsou porovnány s výsledky získanými při použití Kalmanova filtru. Optimální podmínky pro predikci koncentrací fenolu a chlorfenolů byly aplikovány pro jejich stanovení v pitné a povrchové vodě.

Experimentální část

Chemikálie

Zásobní vodné roztoky fenolu a chlorfenolů o koncentraci 5 mmol.l^{-1} byly připraveny z pevných preparátů o obsahu fenolu 99% (Loba Feinchemie) a 2-chlorfenolu 99%, 3-chlorfenolu 98%, 4-chlorfenolu 98%, 2,6-dichlorfenolu 98% a 2,3,6-trichlorfenolu 99% (vše Riedel-de Haën).

Nízkomolekulární huminová kyselina MAR 244 (Výzkumný ústav anorganické chemie, Ústí nad Labem) byl preparát připravený z oxihumolitu. 2 g preparátu byly převedeny na amonnou sůl po 24 h přechovávání v exsikátoru nad konc.

NH₃. Ve vodě rozpustná amonná sůl pak byla doplněna na objem 1 l.

Dále byly použity NaOH p. a. (Onex, Rožnov p. Radhoštěm), dvojsodná sůl ethylendiamintetraoctové kyseliny – EDTA p.a. (Lachema, Brno) a destilovaná voda ze skleněné aparatury.

Vzorky vod

Pitná voda (PI) byla odebírána z vodovodní sítě města Brna po pětiminutovém vypouštění.

Povrchová voda (PV) pocházela z vodního toku Lhotka v obci Drnovice a byla odebírána ze středu proudu 10 cm pod vodní hladinou do skleněných lahví o objemu 1 litr.

Odběr huminové vody (HV) byl prováděn z potůčku vytékajícího z rašeliníště u Velkého Dářka. Uprostřed proudu 10 cm pod hladinou byla ponořena hadice čerpadla a voda byla čerpána do barelu o objemu 50 litrů.

Umělá huminová voda (HK) byla připravena do 25 ml odměrné baňky z přídatků preparátu MAR 244 (2 g.l⁻¹) a destilované vody. Vzorky vod obsahovaly standardní přídatky fenolu a chlorfenolů v koncentracích odpovídajících koncentračnímu rozsahu používaných kalibračních sad.

Instrumentace a metodika registrace spekter

Měření absorpčních spekter směsi A (fenol, 2-CP, 2,6-DCP a 2,3,6-TCP) bylo prováděno na spektrofotometru PU 8700 Series UV/VIS firmy Philips s šířkou spektrální štěrby 2 nm. Měření absorpčních spekter systému B (směs fenolu, 2-CP, 3-CP a 4-CP) byla z důvodu snímání derivace signálu prováděna na přístroji UV 500 firmy Unicam s nastavitelnou šířkou spektrální štěrby při šířce štěrby 1 nm.

Měření hodnot absorpance a derivace absorpance u všech jednotlivých roztoků kalibračních sad, testovacích sad i modelových vzorků vod bylo prováděno vždy při 24 vlnových délkách v rozmezí 274–320 nm s krokem 2 nm (PLS), resp. při 48 vlnových délkách v rozmezí 271–318 nm s krokem 1 nm (Kalmanův filtr) v křemenných kyvetách o tloušťce 1 cm. Pro vyhodnocení dat byly vždy použity střední hodnoty ze tří paralelních hodnot absorpance.

Pracovní postupy

Destilovaná voda

Do odměrné baňky byly odměřeny zředěné vodné roztoky standardů fenolu a chlorfenolů do výsledné koncentrace v rozmezí 10–100 μmol.l⁻¹, resp. 10–50 μmol.l⁻¹. Následně byl přidán roztok NaOH do výsledné koncentrace 1 mol.l⁻¹ a EDTA do výsledné koncentrace 1 mmol.l⁻¹ a objem roztoku byl doplněn na 25 ml destilovanou vodou.

Pitná (PI), povrchová (PV) a huminová voda (HV)

Do odměrné baňky bylo odměřeno 15 ml vzorku vody (PI, PV, HV) a zředěné vodné roztoky standardů fenolu a chlorfenolů do výsledné koncentrace v rozmezí 10–50 μmol.l⁻¹. Následně byl přidán roztok NaOH do výsledné koncentrace 1 mol.l⁻¹ a EDTA do výsledné koncentrace 1 mmol.l⁻¹ a objem roztoku byl doplněn na 25 ml destilovanou vodou.

Umělá huminová voda (HK)

Do odměrné baňky byl odměřen zředěný zásobní vodný roztok nízkomolekulární huminové kyseliny MAR 244 do výsledné koncentrace 10 mg.l⁻¹. Dále byly přidány zředěné vodné roztoky standardů fenolu a chlorfenolů do výsledné koncentrace v rozmezí 10–50 μmol.l⁻¹, posléze roztoky NaOH a EDTA jako v případě pitné vody a povrchových vod a destilovaná voda do výsledného objemu 25 ml.

Všechny výše uvedeným způsobem připravené roztoky kalibračních sad, testovacích sad a modelových vzorků byly před měřením ponechány vždy 2 hodiny v temnu pro ustavení rovnováhy.

Vyhodnocení dat metodou projekce do latentních struktur (PLS) a Kalmanova filtru

Pro vyhodnocení dat metodou PLS byl použit program PLS-G v jazyce Fortran na bázi algoritmů^{37–39}; jeho autory jsou L. Jančář a W. Wegscheider.

Výpočet metodou PLS probíhá ve dvou základních krocích: kalibrace a predikce. V průběhu kalibrace je vytvořen matematický vztah mezi maticí absorbančních dat A_{ij} ($i = 1, \dots, n$, $j = 1 \dots p$, kde p je počet vlnových délek a n je počet roztoků kalibrační sady) a maticí koncentrací C_{ik} ($i = 1, \dots, n$, $k = 1, \dots, m$, kde m je počet stanovovaných komponent a n je počet roztoků kalibrační sady). To je realizováno stanovením počtu hlavních (abstraktních) komponent a současnou regresí a rotací transformovaných matic A_{ij} a C_{ik} . Počet abstraktních (latentních) komponent je v průběhu výpočtu určen metodou minimální chyby modelu⁴⁰.

V průběhu predikce jsou koncentrace jednotlivých komponent v neznámém vzorku (testovací sadě) určeny z naměřených hodnot absorpance vzorku při použití vztahů nalezených při kroku kalibrace.

Míru správnosti výsledků získaných metodou PLS určuje shoda nalezených koncentrací komponent s jejich skutečnými hodnotami vyjádřená jednak relativními chybami stanovení jednotlivých komponent $CRPE$ (component relative prediction error) (1), jednak relativní chybou stanovení jednotlivého vzorku $SRPE$ (sample relative prediction error) (2) a střední chybou stanovení pro všechny komponenty a vzorky $MRPE$ (mean relative prediction error) (3), hodnoty jsou vyjádřeny v %.

$$CRPE_k = \sqrt{\frac{\sum_{l=1}^t (c_{lk} - \hat{c}_{lk})^2}{\sum_{l=1}^t c_{lk}^2}} \cdot 100 \quad (1)$$

$$SRPE_l = \sqrt{\frac{\sum_{k=1}^m (c_{lk} - \hat{c}_{lk})^2}{\sum_{k=1}^m c_{lk}^2}} \cdot 100 \quad (2)$$

$$MRPE = \left[\sum_{l=1}^t \sqrt{\frac{\sum_{k=1}^m (c_{lk} - \hat{c}_{lk})^2}{\sum_{k=1}^m c_{lk}^2}} \right] \cdot t^{-1} \cdot 100 \quad (3)$$

kde $l = 1, \dots, t$ (t je počet testovaných roztoků), $k = 1, \dots, m$

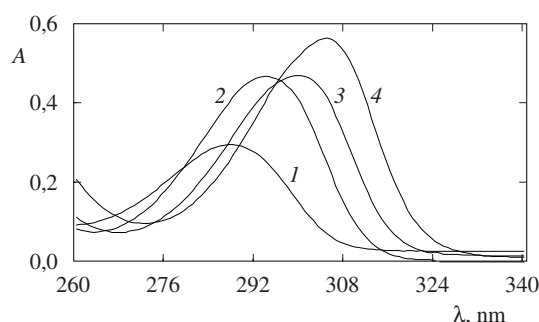
(m je počet komponent (složek) ve směsi), c_{ik} a $\hat{c}_{ik}$ jsou dané a vypočtené hodnoty koncentrací jednotlivých komponent.

Chybu predikce koncentrací komponent ovlivňuje vedle dostatečného počtu vlnových délek především počet kalibračních roztoků a charakter statistického plánu kalibračního souboru^{41–44}.

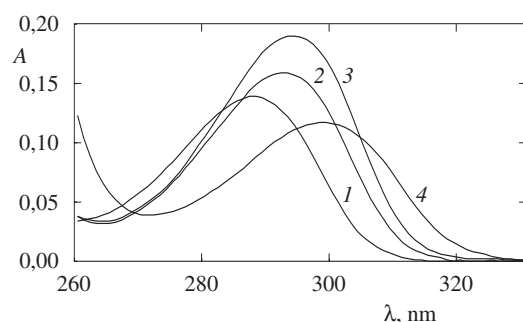
Nalezené hodnoty *CRPE* a *MRPE* umožňují posoudit předpokládané chyby vypočtených neznámých koncentrací komponent v analyzovaných vzorcích při respektování stejných podmínek kalibrace a testování pro kalibrační a testovací soubory.

Pro vyhodnocení dat metodou Kalmanova filtru byl použit program KF v jazyce Turbo Pascal na bázi algoritmu^{24,27}; jeho autorem je L. Jančář.

Algoritmus Kalmanova filtru je zcela odlišný od algoritmu PLS. Na rozdíl od ostatních metod multivariátní kalibrace je odvozen na základě teorie pravděpodobnosti. Při výpočtu se tedy parametry modelu (a tím i hledané koncentrace komponent) neodhadují podle statistických zákonů (kritérium shody minimální sumy čtverců odchylek mezi vypočtenými a naměřenými daty), ale jsou určovány Bayesovým odhadem na základě podmíněné pravděpodobnosti (odhad vypočtených dat pro j -tou vlnovou délku na základě hodnot předpovězených pro 1, ..., j -tou vlnovou délku). Kritériem shody modelu a dat je střední kvadratická chyba odhadovaných parametrů³¹:



Obr. 1. Absorpční spektra fenolu + 2-CP + 2,6-DCP + 2,3,6-TCP; spektra jednotlivých komponent v prostředí NaOH (1 mol.l⁻¹) a EDTA (1 mmol.l⁻¹), koncentrace fenolů 100 μmol.l⁻¹; 1 – fenol, 2 – 2-CP, 3 – 2,6-DCP, 4 – 2,3,6-TCP



Obr. 2. Absorpční spektra fenolu + 2-CP + 3-CP + 4-CP; spektra jednotlivých komponent v prostředí NaOH (1 mol.l⁻¹) a EDTA (1 mmol.l⁻¹), koncentrace fenolů 50 μmol.l⁻¹; 1 – fenol, 2 – 2-CP, 3 – 3-CP, 4 – 4-CP

$$s^2 = [(x_k - x_d)^2] \quad (4)$$

kde x_k je předpovězená a x_d daná hodnota funkce x (vektor hodnot absorbancí neznámého vzorku) pro $k = 1, \dots, p$ a pro $d = 1, \dots, p$ (p je počet vlnových délek). Minimalizuje se tedy chyba určovaných parametrů modelu krok po kroku pro každou vlnovou délku. Model pro Kalmanův filtr se skládá ze dvou částí: z modelu systémové dynamiky (změna hodnot absorbancí s časem – časové závislosti) a modelu měření (aditivita absorbancí jednotlivých komponent na základě platnosti Bouguerova-Lambertova-Beerova zákona). V případech, kdy systém nemá žádnou dynamiku, a určované koncentrace komponent zůstávají tedy po celou dobu měření konstantní, se k výpočtu funkce x využívá pouze model měření. Na rozdíl od PLS nemusíme u Kalmanova filtru volit vhodnou kalibrační sadu a vybírat vhodné vlnové délky, musíme ale znát spektra čistých látek a varianci šumu měření.

Výsledky a diskuse

I. Optimalizace podmínek stanovení směsi fenolu a chlorfenolů v destilované vodě

Disociace fenolů na fenolátový anion při pH > 10 má za následek výrazný bathochromní posun absorpčního maxima a vzrůst hodnoty molárního absorpčního koeficientu. Podobně se bathochromní posun projevuje také s rostoucím počtem atomů chloru v molekule.

Absorpční spektra fenolu a studovaných chlorfenolů v koncentracích 100 μmol.l⁻¹ (systém A), resp. 50 μmol.l⁻¹ (systém B) v 1 mol.l⁻¹ NaOH a v 1 mmol.l⁻¹ EDTA jsou uvedeny na obr. 1, resp. 2. Hodnoty molárních absorpčních koeficientů fenolu a chlorfenolů a příslušných vlnových délek $\lambda_{\max}$ jsou uvedeny v tabulce I.

Tabulka I
Hodnoty $\lambda_{\max}$ (nm) a ϵ (l.mol⁻¹.cm⁻¹) studovaných fenolů

Analyt	$\lambda_{\max}$	ϵ
Fenol	288,0	2640
2-Chlorfenol	294,0	3865
3-Chlorfenol	292,0	3350
4-Chlorfenol	298,5	2300
2,6-Dichlorfenol	300,0	4820
2,3,6-Trichlorfenol	305,0	4705

Analýza modelové směsi A (fenol, 2-CP, 2,6-DCP a 2,3,6-TCP)

Pro optimalizaci podmínek pro stanovení fenolu a chlorfenolů ve vodách byla vybrána směs A, neboť absorpční maxima $\lambda_{\max}$ jednotlivých komponent jsou na rozdíl od směsi B více separována (viz obr. 1). Jednotliví zástupci chlorfenolů pro směs A byli vybráni tak, aby poskytovali vždy nejvyšší odezvu v dané skupině chlorfenolů.

Optimalizace podmínek byla zaměřena na 3 základní body:

- 1) tvar (podoba) kalibrační sady (KS)
- 2) poloha centrálního bodu (CB) kalibrační sady
- 3) koncentrační rozsah kalibrační sady

Pro testování v bodech 1) až 3) byly použity čtyři testovací roztoky s koncentracemi složek ve třech čtvrtinách ($77,5 \mu\text{mol.l}^{-1}$, resp. $40 \mu\text{mol.l}^{-1}$) a v jedné čtvrtině ($32,5 \mu\text{mol.l}^{-1}$, resp. $20 \mu\text{mol.l}^{-1}$) celkového rozsahu koncentrací kalibrační sady fenolu a chlorfenolů. Dále byly připraveny dva roztoky s náhodně zvolenými koncentracemi komponent, které simulovaly neznámé modelové vzorky (I-MD, resp. II-MD).

Ad 1) Byly testovány tři základní kalibrační sady (kalibrační statistické plány):

- úplný faktorový plán (complete factorial design – CFD) (5)
- částečný faktorový plán (fractional factorial design – FFD) (6)
- Box-Behnkenův statistický plán (box-behnken plan – BBP) a jejich vliv na výsledné relativní chyby predikce (*CRPE*, *MRPE*) pro soubor čtyř testovacích roztoků (testovacích sad) a dva modelové vzorky.

Celkový počet kalibračních roztoků u jednotlivých kalibračních sad pro čtyři komponenty ve vzorku, dvě hladiny koncentrací komponent a centrální bod je možné určit podle vztahů (5)–(6) (cit.⁴⁴):

$$n = L^m + CB \quad (17 \text{ roztoků}) \quad (5)$$

$$n = L^{m-1} + CB \quad (9 \text{ roztoků}) \quad (6)$$

kde n – počet roztoků, m – počet komponent, L – počet hladin koncentrací, CB – centrální bod.

Kódovaná struktura kalibračních sad (kalibračních souborů) pro dvě mezní (horní a dolní) koncentrační hladiny a střední hladinu koncentrací jednotlivých statistických plánů, včetně složení testovací sady (TS), je uvedena v tabulce II.

Relativní chyby predikce *CRPE* a *MRPE* pro všechny analyzované složky ve směsi A při použití různého statistického plánu, a tedy různého počtu roztoků kalibračního souboru, jsou pro čtyři testovací roztoky uvedeny v tabulce III. Výsledky výpočtu pro modelové vzorky I-MD a II-MD jsou také uvedeny v tabulce IV.

Pro výběr tvaru kalibrační sady, polohy centrálního bodu i rozsahu koncentrací je rozhodující míra shody vypočtených koncentrací složek, charakterizovaná relativními chybami predikce *MRPE* a *CRPE*, s jejich skutečnými hodnotami. Jak je vidět z tabulky III a tabulky IV, kalibrační sada CFD se 17 kalibračními roztoky poskytuje ve směsi A nejmenší chybu predikce.

Ad 2) Při výše uvedených statistických plánech kalibračních roztoků byly testovány dvě hladiny (polohy) koncentrací centrálního bodu (CB):

- „aritmický“, posilující oblast koncentrací uprostřed kalibrační sady – jeho koncentrace je aritmetickým průměrem mezních hladin koncentračního rozsahu kalibračního sady $10\text{--}100 \mu\text{mol.l}^{-1}$ ($55 \mu\text{mol.l}^{-1}$)
- „geometrický“, posilující oblast nižších koncentrací komponent – jeho koncentrace je druhou odmocninou podílu mezních hladin koncentračního rozsahu kalibrační sady ($31,6 \mu\text{mol.l}^{-1}$).

Výsledky výpočtů pro testovací sadu i modelové vzorky I-MD a II-MD jsou uvedeny v tabulce III a IV.

Z tabulek plyne, že nižších relativních chyb predikce (správ-

Tabulka II

Statistické plány kalibračních a testovacích roztoků; symboly: + horní hladina koncentrace ($100 \mu\text{mol.l}^{-1}$ – vyšší rozsah, resp. $50 \mu\text{mol.l}^{-1}$ – nižší rozsah koncentrací KS), – spodní hladina koncentrace ($10 \mu\text{mol.l}^{-1}$ – vyšší i nižší rozsah koncentrací KS), 0 centrální bod (aritmetický, $55 \mu\text{mol.l}^{-1}$ – vyšší rozsah, resp. $30 \mu\text{mol.l}^{-1}$ – nižší rozsah koncentrací KS; geometrický, $31,6 \mu\text{mol.l}^{-1}$ – vyšší rozsah koncentrací KS), +0,5 3/4 koncentrační škály ($77,5 \mu\text{mol.l}^{-1}$ – vyšší rozsah, resp. $40 \mu\text{mol.l}^{-1}$ – nižší rozsah koncentrací KS), –0,5 1/4 koncentrační škály ($32,5 \mu\text{mol.l}^{-1}$ – vyšší rozsah, resp. $20 \mu\text{mol.l}^{-1}$ – nižší rozsah koncentrací KS)

Roztok	Komponenta ^a				Roztok	Komponenta ^a			
	1	2	3	4		1	2	3	4
(a)					(b)				
1	+	+	+	+	1	+	+	+	+
2	+	+	+	–	2	+	+	–	–
3	+	+	–	+	3	+	–	+	–
4	+	+	–	–	4	+	–	–	+
5	+	–	+	+	5	–	+	+	–
6	+	–	+	–	6	–	+	–	+
7	+	–	–	+	7	–	–	+	+
8	+	–	–	–	8	–	–	–	–
9	–	+	+	+	9	0	0	0	0
10	–	+	+	–	(c)				
11	–	+	–	+	1	0	+	+	0
12	–	+	–	–	2	+	0	+	+
13	–	–	+	+	3	–	0	+	–
14	–	–	+	–	4	0	–	+	0
15	–	–	–	+	5	+	+	0	+
16	–	–	–	–	6	–	+	0	–
17	0	0	0	0	7	+	–	0	+
(d)					8	–	–	0	–
1	+0,5	–0,5	–0,5	+0,5	9	0	+	–	0
2	–0,5	+0,5	+0,5	–0,5	10	+	0	–	+
3	–0,5	–0,5	+0,5	–0,5	11	–	0	–	–
4	+0,5	+0,5	–0,5	+0,5	12	0	–	–	0
					13	0	0	0	0

^a Kalibrační sada (KS): CFD (a), FFD (b), BBP (c); testovací sada (TS): (d)

nějších výsledků) je jednoznačně dosaženo pro soubory s aritmetických centrálním bodem.

Ad 3) Rozsah koncentrací kalibrační sady byl testován pro již optimální podobu kalibračního setu (CFD) nalezenou v bodě 1) a optimální centrální bod (aritmetický CB) nalezený v bodě 2).

Byly testovány dva rozsahy koncentrací kalibrační sady:

- vyšší rozsah koncentrací ($10\text{--}100 \mu\text{mol.l}^{-1}$)
- nižší rozsah koncentrací ($10\text{--}50 \mu\text{mol.l}^{-1}$).

Hodnoty *MRPE* a *CRPE* získané pro oblast vyššího i nižšího rozsahu koncentrací pro testovací sadu a modelové vzorky I-MD a II-MD jsou uvedeny v tabulkách III a IV.

Jak je vidět z tabulek III a IV, jsou výsledky (relativní chyby predikce) pro kalibrační sady pro vyšší i nižší rozsah koncentrací kalibrační sady srovnatelné.

Tabulka III

Srovnání relativních chyb predikce testovací sady pro různé kalibrační statistické plány ve směsi A, měřeno pro 24 vlnových délek v rozsahu 274–320 nm

Kalibrační plán	Centrální bod									
	aritmetický					geometrický				
	CRPE [%]				MRPE [%]	CRPE [%]				MRPE [%]
	fenol	2-CP	2,6-DCP	2,3,6-TCP		fenol	2-CP	2,6-DCP	2,3,6-TCP	
CFD ^a	4,8	5,6	5,2	4,6	5,2	11,1	11,9	12,9	11,0	11,6
FFD ^a	7,1	8,9	8,4	8,5	8,4	14,2	16,4	16,9	14,6	15,4
BBP ^a	7,4	7,8	7,9	7,1	7,7	11,7	12,9	12,9	12,6	12,7
CFD ^b	5,4	4,2	5,4	5,0	5,1	–	–	–	–	–

^a Hodnoty pro rozsah koncentrací fenolu a chlorfenolů 10–100 $\mu\text{mol.l}^{-1}$: 77,5 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ a 32,5 $\mu\text{mol.l}^{-1}$, ^b hodnoty pro rozsah koncentrací fenolu a chlorfenolů 10–50 $\mu\text{mol.l}^{-1}$: 40 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ a 20 $\mu\text{mol.l}^{-1}$, složení testovacích roztoků – viz tabulka II

Tabulka IV

Srovnání relativních chyb predikce u modelových vzorků I-MD a II-MD pro různé kalibrační statistické plány ve směsi A, měřeno pro 24 vlnových délek v rozsahu 274–320 nm

Kalibrační plán	Centrální bod									
	aritmetický					geometrický				
	CRPE [%]				SRPE [%]	CRPE [%]				SRPE [%]
	fenol	2-CP	2,6-DCP	2,3,6-TCP		fenol	2-CP	2,6-DCP	2,3,6-TCP	
CFD ^a	6,8	9,4	6,8	5,9	7,2	5,9	7,9	8,8	9,0	8,0
FFD ^a	7,4	8,2	8,2	6,4	7,6	14,0	19,0	17,1	16,1	16,5
BBP ^a	9,8	12,0	10,3	10,1	10,5	14,0	14,5	13,9	14,6	14,2
CFD ^b	7,2	9,2	9,1	6,4	7,9	–	–	–	–	–
CFD ^c	5,0	6,8	7,0	5,8	6,2	7,2	7,2	7,9	8,2	7,7
FFD ^c	9,2	8,8	8,9	6,1	8,3	11,6	13,2	13,4	10,7	12,2
BBP ^c	8,8	10,2	11,3	10,5	10,2	14,0	15,8	15,9	14,2	15,0
CFD ^d	6,2	9,4	6,2	5,0	6,5	–	–	–	–	–

^a I-MD01, ^b II-MD01, ^c I-MD02 – pro koncentrace fenolu a chlorfenolů v rozmezí 13–90 $\mu\text{mol.l}^{-1}$, ^d II-MD02 – pro koncentrace fenolu a chlorfenolů v rozmezí 12–44 $\mu\text{mol.l}^{-1}$

Jako optimální pro další stanovení byl na základě předchozích výsledků vybrán centrální faktorový plán, aritmetický centrální bod a nižší rozsah koncentrací komponent, který lépe modeluje reálné obsahy chlorfenolů ve vodách.

Analýza modelové směsi B (fenol, 2-CP, 3-CP a 4-CP)

Toto seskupení fenolů se často vyskytuje v reálných vzorcích vod. Měření bylo opět provedeno pro prostředí 1 mol.l^{-1} NaOH a 1 mmol.l^{-1} EDTA. Pro stanovení fenolu a chlorfenolů v systému B byly vybrány optimální podmínky nalezené pro směs A, tj. kalibrační soubor obsahoval celkem 17 roztoků (statistický plán CFD), byl zvolen nižší rozsah koncentrací kalibračního setu s koncentračními mezními hladinami 50 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ a 10 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ a aritmetickým centrálním bodem (30 $\mu\text{mol.l}^{-1}$). Testovací sada obsahovala čtyři roztoky obdobného uspořádání jako v předchozím případě směsi A a dva náhodně zvolené neznámé modelové vzorky (III-MD).

Výsledky stanovení v destilované vodě pro testovací sadu a modelové vzorky III-MD jsou uvedeny v tabulce V.

Hodnoty *CRPE* a *MRPE* pro jednotlivé složky směsi a chyby koncentrací v testovacích roztocích jsou proti směsi A relativně vysoké, což je způsobeno vysokým stupněm překrytí absorpčních spekter jednotlivých analytů ve směsi B.

II. Stanovení fenolů v pitné a povrchové vodě

Vzorky vod byly uměle kontaminovány přísadami fenolu a chlorfenolů v koncentracích, které odpovídaly optimalizovanému statistickému plánu kalibračního souboru a testovací sadě uvedených v předchozí části.

Stanovení bylo provedeno opět v prostředí 1 mol.l^{-1} NaOH v přítomnosti 1 mmol.l^{-1} EDTA za optimálních podmínek měření nalezených v kapitole I (úplný faktorový plán s aritmetickým centrálním bodem a nižším rozsahem koncentrací fenolu a chlorfenolů).

Tabulka V

Relativní chyby predikce testovací sady a u modelových vzorků III-MD ve směsi B, měřeno pro 24 vlnových délek v rozsahu 274–320 nm

Kalibrační plán	CRPE [%]				MRPE, (SRPE) [%]
	fenol	2-CP	3-CP	4-CP	
CFD ^a	14,4	12,7	19,9	14,8	15,8
CFD ^b	13,9	9,6	15,8	12,6	(13,2)
CFD ^c	20,0	16,2	28,1	17,2	(20,0)

^a Destilovaná voda: 20 a 40 $\mu\text{mol.l}^{-1}$, ^b vzorek III-MD01: v rozmezí 16–46 $\mu\text{mol.l}^{-1}$, ^c vzorek III-MD02: v rozmezí 12–44 $\mu\text{mol.l}^{-1}$

Tabulka VI

Relativní chyby predikce pro vzorky pitné, povrchové a huminové vody ve směsi A, pro úplný faktorový plán (CFD) s aritmetickým centrálním bodem pro rozsah koncentrací fenolu a chlorfenolů 10–50 $\mu\text{mol.l}^{-1}$; měřeno pro 24 vlnových délek v rozsahu 274–320 nm

Typ vody	CRPE [%]				MRPE, (SRPE) [%]
	fenol	2-CP	2,6-DCP	2,3,6-TCP	
Pitná ^a	7,1	7,1	9,8	8,5	8,2
Povrchová ^a	6,7	6,9	8,0	8,9	7,8
Huminová ^a	9,8	9,7	8,5	9,2	9,2
Pitná (PI) ^b	1. vzorek	6,6	8,9	8,4	13,5 (9,3)
	2. vzorek	14,4	10,0	12,2	13,0 (12,4)
Povrchová (PV) ^b	1. vzorek	10,6	12,0	7,2	12,5 (10,5)
	2. vzorek	6,6	8,9	13,2	13,8 (10,6)
Huminová (HV) ^b	1. vzorek	11,8	13,4	11,0	13,0 (12,3)
	2. vzorek	13,0	13,9	12,5	12,1 (12,8)

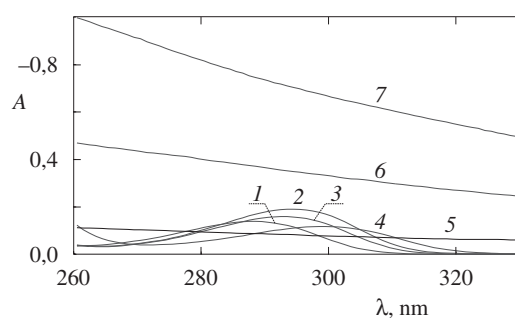
^a Testovací sada: 20 a 40 $\mu\text{mol.l}^{-1}$, ^b 1. vzorek III-MD01: v rozmezí 16–46 $\mu\text{mol.l}^{-1}$, 2. vzorek III-MD02: v rozmezí 12–44 $\mu\text{mol.l}^{-1}$

Tabulka VII

Relativní chyby predikce pro vzorky povrchové, huminové a umělé huminové vody pro hodnoty absorbance a derivace absorbance ve směsi B, úplný faktorový plán (CFD) s aritmetickým centrálním bodem pro rozsah koncentrací fenolu a chlorfenolů 10–50 $\mu\text{mol.l}^{-1}$

Typ vody	Absorbance					1. Derivace				
	CRPE [%]				MRPE, (SRPE) [%]	CRPE [%]				MRPE, (SRPE) [%]
	fenol	2-CP	3-CP	4-CP		fenol	2-CP	3-CP	4-CP	
Povrchová ^a	19,4	22,7	24,1	19,4	21,7	15,6	18,0	18,5	15,0	16,4
Huminová ^a	18,8	22,2	22,4	18,7	20,7	16,4	17,9	19,3	15,4	16,9
MAR 244 ^a	17,5	21,3	21,0	16,4	19,4	15,0	18,2	17,7	14,8	16,2
Povrchová (PV) ^b	1. vzorek	20,4	22,9	24,0	19,0 (21,6)	16,2	19,1	18,6	13,3 (16,8)	
	2. vzorek	18,7	21,8	22,9	19,1 (20,6)	15,9	19,3	18,1	12,0 (16,3)	
Huminová (HV) ^b	1. vzorek	18,9	22,5	22,6	18,3 (20,5)	17,1	18,0	20,3	16,9 (18,0)	
	2. vzorek	18,0	23,0	22,8	18,4 (20,6)	16,7	18,1	19,3	15,5 (17,4)	
MAR 244 (HK) ^b	1. vzorek	16,0	22,7	20,6	15,5 (18,7)	15,5	19,0	17,8	14,1 (16,5)	
	2. vzorek	15,8	19,8	23,0	15,9 (18,7)	14,5	17,9	18,8	15,6 (16,6)	

^a Testovací sada roztoků, ^b modelové vzorky – viz tabulka VI



Obr. 3. Absorpční spektra fenolu + 2-CP + 3-CP + 4-CP, povrchové vody (PV), huminové kyseliny (10 mg.l^{-1}) (HK) a huminové vody (HV); spektra jednotlivých komponent v prostředí NaOH (1 mol.l^{-1}) a EDTA (1 mmol.l^{-1}), koncentrace fenolů 50 $\mu\text{mol.l}^{-1}$; 1 – fenol, 2 – 2-CP, 3 – 3-CP, 4 – 4-CP, 5 – PV, 6 – HK, 7 – HV

Tabulka VIII

Relativní chyby predikce povrchové vody a umělé huminové vody ve směsi B metodou Kalmanova filtru, měřeno pro 48 vlnových délek v rozsahu 271–318 nm po 1 nm, 1 mol.l⁻¹ NaOH, 1 mmol.l⁻¹ EDTA, koncentrace komponent v testovací sadě a v modelových vzorcích (μmol.l⁻¹)

Typ vody		SKCH [%]				SSKCH [%]
		fenol	2-CP	3-CP	4-CP	
Huminová ^a		3,0	8,4	8,8	5,3	6,3
MAR 244 ^a		10,4	10,5	12,9	5,4	9,8
Huminová (HV) ^b	1. vzorek	0,9	-10,8	11,6	-3,6	6,7
	2. vzorek	-5,4	0,5	5,9	-1,8	3,4
MAR 244 (HK) ^b	1. vzorek	-6,9	-14,2	-7,1	7,8	9,0
	2. vzorek	-14,4	-5,8	15,0	4,0	9,8

^a Testovací sada, ^b modelové vzorky – viz tabulka VI

Pro směs A byly výsledky porovnány pro pitnou (PI), povrchovou (PV) a huminovou vodu (HV), pro směs B pro povrchovou vodu (PV), huminovou vodu (HV) a vodu s obsahem preparátu huminové kyseliny MAR 244 (HK).

V přítomnosti huminových kyselin ve vodách je absorbance v oblasti 260–320 nm výrazně zvýšená a překrývá absorpční spektra fenolů (viz obr. 3). Proto bylo stejné množství huminové vody nebo huminové kyseliny neobsahující fenoly přidáno i do všech kalibračních a testovacích roztoků.

Pro modelovou směs A (fenol, 2-CP, 2,6-DCP a 2,3,6-TCP) jsou relativní chyby predikce *CRPE* a *MRPE* pro všechny složky, čtyři testovací roztoky a pro modelové vzorky pitné, povrchové a huminové vody porovnány v tabulce VI.

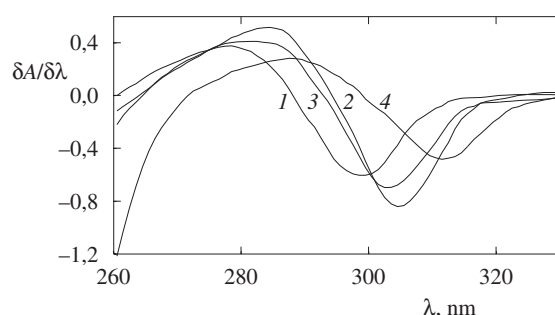
Pro modelovou směs B (fenol, 2-CP, 3-CP a 4-CP) jsou relativní chyby predikce *CRPE* a *MRPE* pro všechny složky, čtyři testovací roztoky a pro modelové vzorky povrchové a huminové vody a vody s obsahem preparátu huminové kyseliny MAR 244 porovnány v tabulce VII.

Jak ukazují výsledky v tabulce VII, způsobuje blízký charakter absorpčních spekter pro modelovou směs B podstatné zvýšení chyby predikce proti směsi A. Tyto chyby je možné snížit při vyhodnocení první derivace absorpčních křivek studovaných fenolů (obr. 4), které zpřesňují polohu absorpčního maxima ve srovnání s nederivovaným signálem. Tuto skutečnost ilustrují výsledky pro první derivaci absorbance v tabulce VII. Použití vyšších derivací však opět zvyšovalo chyby predikce v důsledku rostoucího vlivu pozadí a šumu na hodnoty signálů.

Vzhledem k tomu, že spektra komponent ve směsi B se značně překrývají, bylo provedeno srovnání výsledků získaných metodou PLS s výsledky získanými metodou Kalmanova filtru, která je založena na zcela odlišném principu a algoritmu a již v minulosti vedla k uspokojivým výsledkům při značném překryvu spekter^{45–47}.

Srovnání bylo provedeno ve směsi B (fenol, 2-CP, 3-CP a 4-CP) pro huminovou vodu (HV) a umělou huminovou vodu s obsahem preparátu huminové kyseliny MAR 244 (HK). Spektra fenolu a jednotlivých chlorfenolů v testovací sadě a modelových vzorcích byla pro metodu Kalmanova filtru měřena pro 48 vlnových délek v rozsahu 271–318 nm. Výsledky výpočtů pro testovací sadu a modelové vzorky jsou uvedeny v tabulce VIII.

Jak je vidět z tabulek VII a VIII, výsledky získané pomocí



Obr. 4. 1. derivace spekter fenolu + 2-CP + 3-CP + 4-CP; 1. derivace spekter jednotlivých komponent v prostředí NaOH (1 mol.l⁻¹) a EDTA (1 mmol.l⁻¹), koncentrace fenolů 50 μmol.l⁻¹; 1 – fenol, 2 – 2-CP, 3 – 3-CP, 4 – 4-CP

Kalmanova filtru poskytují mnohem menší relativní chyby predikce, a jsou tedy správnější než po použití PLS.

Závěr

V této práci byly optimalizovány podmínky pro stanovení fenolu a chlorfenolů ve vodách. Jako optimální se ukázal úplný faktorový plán (CFD) kalibrační sady, centrální bod v oblasti aritmetického průměru mezních hladin koncentrací kalibrační sady a nižší rozsah koncentrací kalibrační sady zvolený na základě reálných koncentrací chlorfenolů ve vodách. Výhodným se také ukázalo využití derivace absorbancí, zejména ve směsi B (fenol, 2-chlorfenol, 3-chlorfenol, 4-chlorfenol) s podstatně větším překryvem absorpčních spekter komponent.

Hodnoty relativních chyb predikce koncentrací fenolu a chlorfenolů v jednotlivých vzorcích vod dosahovaly v závislosti na systému a druhu vody hodnot 4,2–28,1 % (PLS), resp. 0,5–15,0 % (KF) pro obsah fenolu 0,9–9,4 mg.l⁻¹, monochlorfenolů 1,25–12,8 mg.l⁻¹, 2,6-dichlorfenolu 1,63–16,3 mg.l⁻¹ a 2,3,6-trichlorfenolu 2,0–19,7 mg.l⁻¹ ve směsích.

Výsledky ukazují, že ve směsích, kde se komponenty vzájemně chemicky neovlivňují (viz směs B), ale přitom se značně překrývají jejich absorpční spektra, je vhodnější použití Kalmanova filtru, jehož algoritmus si poradí s rozlišením překrývajících se spekter komponent mnohem lépe než al-

goritmus PLS při daleko větším počtu kalibračních roztoků.

Přítomnost huminových látek ve vodě, které jsou makroabsorbujícími komponentami ve vzorku, podstatně zvyšuje chybu predikce pro použité fenoly. Ve vodách v přítomnosti neznámého obsahu huminových látek by exaktní řešení problému s použitím PLS vyžadovalo pokládat huminové látky za další neznámou komponentu a použít multivariátní kalibraci v systému s pěti komponentami, jehož řešení ve zvýšené míře ovlivňuje chybu při stanovení koncentrací jednotlivých komponent pro omezený počet kalibračních roztoků a zvyšuje dobu měření a analýzy při použití úplného statistického plánu kalibračních roztoků.

Obvyklé obsahy solí v pitné a povrchové vodě do tvrdosti 4,5 mmol.l⁻¹ neovlivňují výsledky stanovení fenolu a použitých chlorfenolů v přítomnosti 1 mol.l⁻¹ NaOH a ≥0,001 mol.l⁻¹ EDTA.

LITERATURA

- Puig D., Barceló D.: Trends Anal. Chem. 15, 362 (1996).
- Tesařová E., Pacáková V.: *Nové směry v analytické chemii II* (Zýka J., ed.), str. 90. SNTL, Praha 1984.
- Andrés M. P. S., León-González M. E., Pérez-Arribas L. V., Polo-Díez L. M.: J. High Resolut. Chromatogr. 23, 367 (2000).
- Lacorte S., Fraise D., Barceló D.: J. Chromatogr., A 857, 97 (1996).
- Frébortová J., Tatarkovičová V.: Analyst (Amsterdam) 119, 1519 (1994).
- Belenkii B. G., Belov Y. V., Kasalainen G. E.: Zh. Anal. Khim. 51, 817 (1996).
- Zemann A., Volgger D.: Anal. Chem. 69, 3243 (1997).
- Li G., Locke D. C.: J. Chromatogr., A 734, 357 (1996).
- Schmauch L. J., Grubb H. M.: Anal. Chem. 26, 308 (1954).
- Afghan B. K., Bellivean P. E., Larose R. H., Ryan J. F.: Anal. Chim. Acta 7, 355 (1974).
- Martens H., Naes T.: *Multivariate Calibration*. Wiley, Chichester 1989.
- Geladi P., Kowalski B. R.: Anal. Chim. Acta 185, 1 (1986).
- Van Loosbroek A., Debels H. J., Coemgrecht G.: Anal. Lett. 17, 779 (1984).
- Kowalski B. R., Seasholtz H. B.: J. Chemom. 5, 129 (1991).
- Martin F., Otto M.: Fresenius' J. Anal. Chem. 352, 451 (1995).
- Höskuldsson A.: J. Chemom. 2, 211 (1988).
- Danzer K.: Fresenius' J. Anal. Chem. 351, 3 (1995).
- Sjöström M., Wold S., Lindberg W., Persson J. A., Martens H.: Anal. Chim. Acta 150, 61 (1983).
- Xie Y. L., Kalivas J. H.: Anal. Chim. Acta 348, 19 (1997).
- Otto M., Wegscheider W.: Anal. Chem. 57, 63 (1985).
- Otto M., Wegscheider W.: Anal. Chem. 61, 1847 (1989).
- Lang P. M., Kalivas J. H.: J. Chemom. 7, 153 (1993).
- Thomas E. V., Haaland D. M.: Anal. Chem. 62, 1091 (1990).
- Brown S. D.: Anal. Chim. Acta 181, 1 (1986).
- Rutan S. C., Brown S. D.: Anal. Chim. Acta 167, 23 (1985).
- Monfre S. L., Brown S. D.: Anal. Chim. Acta 200, 397 (1987).
- Rutan S. C., Brown S. D.: Anal. Chim. Acta 160, 99 (1984).
- Gerow D. D., Rutan S. C.: Anal. Chim. Acta 184, 53 (1986).
- Gerow D. D., Rutan S. C.: Anal. Chem. 60, 847 (1988).
- Poullisse H. N. J.: Anal. Chim. Acta 112, 361 (1979).
- Yuzuru H., Toshio S., Rieko M., Mitsuru U.: Anal. Chim. Acta 202, 187 (1987).
- Cladera A., Gómez E., Estela J. M., Cerda V.: Anal. Chim. Acta 267, 95 (1992).
- Estevas da Silva J. C. G., Laquipai M. C. P. O.: Anal. Lett. 31, 2549 (1998).
- Navarro-Villoslada F., Pérez-Arribas L. V., León-González M. E., Polo-Díez L. M.: Anal. Chim. Acta 381, 93 (1999).
- Navarro-Villoslada F., León-González M. E., Pérez-Arribas L. V., Santos-Delgado M. J., Polo-Díez L. M.: Microchem. J. 44, 339 (1991).
- Navarro-Villoslada F., Pérez-Arribas L. V., León-González M. E., Polo-Díez L. M.: Anal. Chim. Acta 308, 238 (1995).
- Wold H., v knize: *Perspectives in Probability and Statistics* (Gani J., ed.). Academic Press, London 1975.
- Lindberg W., Persson J. A., Wold S.: Anal. Chem. 55, 643 (1983).
- Wegscheider W., Jančář L.: Fresenius' J. Anal. Chem. 334, 697 (1989).
- Wold S.: Technometrics 20, 397 (1978).
- Vítouchová M., Jančář L., Sommer L.: Fresenius' J. Anal. Chem. 343, 274 (1992).
- Jančář L., Preisler J., Sommer L.: Collect. Czech. Chem. Commun. 58, 1509 (1993).
- Jančář L., Wegscheider W.: Anal. Chim. Acta 248, 459 (1991).
- Bandemer H., Näther W.: *Theorie und Anwendung der Optimalen Versuchsplanung. II. Handbuch zur Anwendung*. Akademie Verlag, Berlin 1980.
- Jančář L.: Chem. Listy 87 (Suppl.), 205 (1993).
- Jančář L.: *Chemometrics III, Brno, 11.–15. července 1993*. Abstracts str. 59.
- Jančář L., Urban P.: předneseno na 47. sjezdu chemických společností, Praha, 1.–4. července 1991.

R. Kostrhounová-Štěpánková^a, L. Jančář^b, and L. Sommer^c (^aRECETOX, Faculty of Science, Masaryk University, Brno, ^bDepartment of Chemistry, Faculty of Education, Masaryk University, Brno, ^cInstitute of Environmental Chemistry and Technology, Faculty of Chemistry, Brno University of Technology, Brno): **UV Spectrophotometric Determination of Phenol and Chlorophenols Mixtures in Water using Partial Least-Squares and Kalman Filtering**

The UV spectrophotometric determination of phenol and chlorophenols in mixtures was performed by using multivariate calibration with partial least-squares by drinking and surface waters. Absorbance and their first derivatives were evaluated for mixtures of phenol, 2-chloro-, 2,6-dichloro- and 2,3,6-trichlorophenol or phenol, 2-, 3- and 4-chlorophenol with satisfactory prediction of errors of results in the 10–100 μmol.l⁻¹ range for drinking and surface waters in the presence of 1.0 mol.l⁻¹ NaOH and ≥ 1.0 mmol.l⁻¹ EDTA using a calibration set with 17 standard solutions (full statistic design) and 24 wavelengths. Humic acids interfere and their influence must be eliminated by previous addition into calibration solutions. Kalman filtering gives more accurate results for samples containing monochlorophenols and phenol with very similar absorption spectra.