Příloha III

Návod pro realizaci stanovení koncentrace železitých kationtů ve vodě DSLR spektrofotometrií vytvořený na základě předložené práce, jejíž je přílohou.

Autor: Tomáš Kudláček

Stručný úvod

Tato metodika vznikla jako jeden z výstupů ročníkové práce během studia na nižším stupni Gymnázia Přírodní škola. Práce se zabývala hledáním optimálního uspořádání metody stanovení koncentrace železa ve vodách, při které je využíván digitální zrcadlový fotoaparát.

Koncentrace železitých kationtů ve vzorcích je stanovována přes kalibrační závislost koncentrace udané v mg/l a intenzit modré nebo zelené barvy z RGB spektra na stupnici od 0 do 255.

Vzorek obsahující železo totiž po reakci s vhodným činidlem změní svou barvu na červenou. Červený komplex poté pohlcuje modrou a zelenou složku viditelné části elektromagnetického záření. Intenzita barvy komplexu je dána množstvím barevně aktivního analytu ve vzorku. Tedy když bude vzorek hodně koncentrovaný, tak po reakci s daným činidlem změní barvu na velmi intenzivní červenou a bude pohlcovat velké množství modré a zelené barvy záření – intenzita barev bude menší. Když bude naopak vzorek málo koncentrovaný, komplex barvu téměř nezmění a určené intenzity modré a zelené barvy budou vysoké.

Pomůcky

Pro odběr vzorku

Odměrný válec o objemu min. 100ml, lékové skleněné lahvičky s víčkem o objemu 100 ml (počet závisí na množství vzorků), nastavitelná automatická pipeta o objemu dávkování 100 – 1000 µl + špičky, ředěná kyselina dusičná (HNO_3) v poměru 1:1, latexové rukavice a ochranné brýle, uzavíratelná nádoba na odpad, popisovač na lahvičky (ne vodou omyvatelný), chladící box

Příprava kalibračních standardů a příprava vzorků k analýze

3x 5ml, 6x 25ml a 12x 10ml odměrné baňky se zátkou na kalibrační standardy + další 3x 5ml odměrná baňka na každý odebraný vzorek, zásobní roztok dusičnanu železitého (c = 1000 mg/l, čistota p. a.), zásobní roztok thiokyanatanu draselného (10% roztok, čistota p. a.), destilovaná nebo deionizovaná voda, několik různě velikých kádinek, několik plastových kapátek, fixní automatická pipeta o objemu dávkování 200 µl + špičky, nastavitelná automatická pipeta o objemu dávkování 100 – 1000 µl, skleněná 5ml dělená pipeta + balonek, mikrotitrační destička

Analýza vzorku

Mikrotitrační destička, LED videosvětlo s matnicí (min. rozměry světla jako rozměry mikrotitrační destičky), digitální fotoaparát, stativ s vyositelnou středovou tyčí, počítač s nainstalovaným programem Adobe Photoshop a tabulkový software (Microsoft Excel apod.)

Postup práce

Odběr vzorku

1) Pro odběr vzorku nejprve použijeme odměrný válec. Ten před samotným odběrem vzorku několikrát propláchneme vodou, ze které bude vzorek odebírán.
2) Poté do válce odebereme 100 ml vzorku a přelijeme je do připravené lahvičky, kterou předem také propláchneme vodou, ze které odebíráme vzorek.
3) Po naplnění lahvičky vzorek zakonzervujeme 2 ml ředěné kyseliny dusičné. Kyselinu do lahvičky se vzorkem pipetujeme automatickou nastavitelnou pipetou. Při práci s kyselinou dusičnou používáme latexové rukavice a ochranné brýle!
4) Po přidání kyseliny dusičné lahvičku se vzorkem zavřeme a nadepíšeme popisovačem. Z pipety sundáme použitou špičku a vyhodíme ji do nádoby určené na odpad.
5) Odebraný, zakonzervovaný a nadepsaný vzorek umístíme do chladícího boxu.

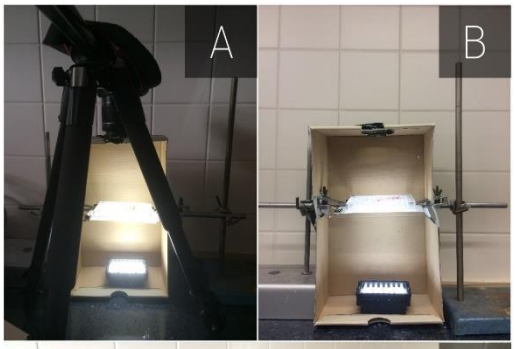
Kalibrace metody

1) Pro kalibraci metody z připravených zásobních roztoků sestavíme kalibrační standardy podle tabulky níže. V baňce je poté doplníme destilovanou vodou po rysku a protřepeme. Každý standard připravíme právě 3x.

číslo standardu	c [mg/l]	$V_{Fe(NO_3)_3}$ [ml]		V_{KSCN} [µl]	$V_{baňky}$ [ml]
		c = 1000 mg/l	c = 50 mg/l		
0 (blank)	0,00	-	0,00	200	5,00
1	1,00	-	0,50	200	25,00
2	2,00	-	1,00	200	25,00
3	5,00	-	1,00	200	10,00
4	10,00	-	2,00	2000	10,00
5	20,00	-	4,00	200	10,00
6	50,00	0,5	-	200	10,00

2) Z každého standardu odlijeme jeho část do kádinky, ze které automatickou pipetou dávkujeme 250 µl do jamek mikrotitrační destičky.
3) Mikrotitrační destičku spolu s matnicí uchytíme do stojanů (viz Obr. B). Pod destičku umístíme LED videosvětlo (viz Obr. A,B) (destičku fotografujeme v místnosti bez jiného zdroje světla než je videosvětlo, nebo okolní světlo odstíníme např. kartonovou krabicí viz Obr. B) destičku vyfotíme fotoaparátem uchyceným do stativu podle Obr. C nastaveným podle následující tabulky:

	nastavení
Délka expozice snímku	1/125 sec
Clonové číslo	f/6.3
ISO (citlivost)	100
WB	Co nejbližší teplotě barvy používaného světla
Picture style	S (standardní)
Ohnisková vzdálenost	18 mm



4) Fotografie poté importujeme do počítače. Fotografie ve formátu RAW prostřednictvím https://cloudconvert.com/ převedeme do formátu PSD. Tento soubor otevřeme v programu Adobe Photoshop.
5) Fotografii vyhodnotíme:
   a. V programu Adobe Photoshop zvolíme „nástroj kapátko“ (klávesová zkratka „I“)
   b. Myší klikneme do jamky destičky na fotografii. Poté otevřeme okno „Nastavit barvu popředí“ – zde uvidíme intenzitu modré a zelené barvy (hodnoty od 0 do 255).
   c. V každé jamce se standardem intenzitu obou barev zjistíme na 6 různých místech – zjištěné intenzity modré i zelené barvy si zaznamenáváme do tabulky v Excelu (popř. Origin – pro pokročilejší)
6) Ze zjištěných šesti intenzit od každé barvy vypočítáme v Excelu medián -> vybereme prázdnou buňku v listu, zadáme „=MEDIAN“, vložíme závorku a do ní vybereme všech šest intenzit od jednoho standardu. Potvrdíme. Takto medián určíme pro každý standard.
7) Z mediánů poté vytvoříme bodový graf, který proložíme „spojnicí trendu“. U té si poté necháme zobrazit hodnotu koeficientu determinace R^2. Z bodového grafu pak ubíráme odlehlé hodnoty (zpravidla nejnižší a nejvyšší), aby byl $R^2 \geq 0{,}9900$. V takovém případě je kalibrace úspěšná.
8) **Standardy po dokončení kalibrace necháváme pipetované v jamkách destičky.**

Příprava vzorků a jejich analýza

1) Vzorky připravujeme do 5ml odměrných baněk podle tabulky níže:

V_{vzorku} [ml]	V_{KSCN} [µl]	$V_{baňky}$ [ml]
4,00	200	5,00

Každý vzorek připravíme právě 3x.

2) Z každého vzorku část odlijeme do kádinky a pipetujeme 250 µl do jamek v destičce vedle kalibračních standardů.
3) Destičku s kalibračními standardy i vzorky vyfotíme jako při kalibraci a stejně jako při kalibraci vyhodnotíme – zjistíme 6x intenzitu modré i zelené barvy v každém standardu/vzorku; vypočítáme medián; vytvoříme kalibrační přímku.
4) Pro analýzu vzorků **opět sestavíme kalibrační křivku.**

Výpočet koncentrace

1) Pro výpočet koncentrace analytu ve vzorku u kalibrační křivky zobrazíme „rovnici regrese“, která je ve formátu

$$y = ax + b$$

Tu pro výpočet koncentrace upravíme do formátu

$$x = \frac{y-b}{a}.$$

Za *y* dosadíme medián daného vzorku, *a* a *b* pak dosadíme z rovnice regrese zobrazené u grafu s kalibrační přímkou.

2) Nyní jsme získali koncentraci **ředěného vzorku** [mg/l]. Pro výpočet koncentrace tak koncentraci ředěného vzorku vynásobíme objemem baňky v litrech, ve které jsme vzorek připravovali, tj. 0,005. To celé poté vydělíme objemem vzorku pipetovaného do baňky (taktéž v litrech) – tedy 0,004. Pro výpočet koncentrace z koncentrace v ředěném vzorku tedy použijeme

$$C_{\text{neředěná}} = (c_{\text{ředěná}} * V_{\text{baňky}}) / V_{\text{pipetovaného vzorku}}$$

Po dosazení to tedy bude

$$C_{\text{neředěná}} = (x*0{,}005)/0{,}004$$

3) Teď máme vypočítané 3 neředěné koncentrace železa v jednom vzorku. Tyto hodnoty statisticky vyhodnotíme.

Statistické vyhodnocení

1) Pro statistické vyhodnocení použijeme přiložený excelový soubor.
2) V něm do tabulky, kde je sloupec pro tři hodnoty vložíme vypočítané koncentrace **od nejmenší po největší**.
3) Automaticky proběhne výpočet mediánu – to je teď výsledná koncentrace; výpočet $L_{1,2}$, který udává, v jakém rozsahu může ležet námi hledaná koncentrace (jelikož je měření zatíženo určitou chybou); výpočet Sr [%], která v procentech udává chybu stanovení.