

Spektrofotometri med mobiltelefon

MARTIN WORM-LEONHARD, Retsmedicinsk Institut, Syddansk Universitet

Abstract

Det er i mange tilfælde muligt at foretage simple, kvantitative spektrofotometriske målinger ud fra et foto af de opløsninger man ønsker at måle på. Dette åbner mulighed for større elevinddragelse og brug af ny teknologi i velkendte øvelser. I denne artikel er det eksemplificeret, hvorledes en mobiltelefon bruges som spektrofotometer ved øvelsen "Opløseligheden af kobber(II)sulfat".

Indledning

Mange elever går rundt med et avanceret stykke måleudstyr i lommen, og bruger det allerede i undervisningen og til øvelser – en moderne mobiltelefon indeholder et utal af sensorer og ofte et udmærket kamera, og især sidstnævnte anvendes ofte til fotodokumentation af opstillinger, nedskrevne data og lignende. Herudover er det endvidere muligt at bruge et kamera som et primitivt spektrofotometer, hvilket gør det muligt at anvende i flere undervisningssituationer. Foruden kamera kræver det kun opmærksomhed på opstillingens lysforhold og simpel billedbehandling, der kan udføres med frit tilgængelige, gratis programmer.

Teori

Når man måler kvantitativt med spektrofotometri foregår det sædvanligvis kun ved én fast bølgelængde, hvor det målte stofs absorbans er størst, og eventuelle interfererende stoffer absorberer mindst. I simple systemer er der ofte nogen fleksibilitet med valget af bølgelængde, da den alene vil påvirke metodens følsomhed og hældningen på kalibreringskurven. Sædvanligvis vil man måle absorbans, snarere end intensitet, og anvende Lambert-Beers lov – at absorbansen er ligefrem proportional med koncentrationen.

Når man optager et digitalt billede bliver farven i hver enkelt pixel gemt som 3 værdier – intensiteten af hhv. rød, grøn og blå, ofte med 8 bit afsat til hver farve, og dermed 256 mulige værdier. Hver af disse farver modsvarer ikke én bestemt bølgelængde, men et kontinuum af bøl-

gælanger, hvor kanalens respons overfor de enkelte bølgelængder varierer.

Således kan man ud fra et billede af en opløsning udtrække værdier for, "hvor rød, grøn og blå denne opløsning er", hvilket svarer til "hvor meget absorberer opløsningen af de komplementære farver". Dette er essentielt et primitivt spektrofotometer, om end kun med tre "bølgelængder".

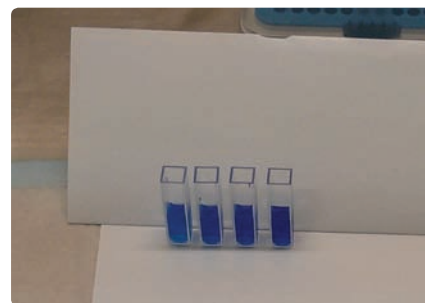
Farveskalaen svarer til additiv farveblanding – helt hvide pixels har værdien (R, G, B) = (255, 255, 255) og helt sorte pixels har værdien (0, 0, 0).

Forsøget

Som eksempel på anvendelsen af et kamera som spektrofotometer er anvendt øvelsesvejledningen "Opløseligheden af kobber(II)sulfat" fra isis Kemi C¹⁾.

I overensstemmelse med forskriften blev der fremstillet en 0,1M opløsning af $\text{CuSO}_4(\text{aq})$, og ud fra denne blev der fremstillet en fortyndingsrække med koncentrationerne 20, 40, 60, 80 og 100 mM. Herudover blev der fremstillet to fortyndinger (fortyndingsfaktor 50) ud fra mættet $\text{CuSO}_4(\text{aq})$.

Fra disse 7 opløsninger blev 1 mL fyldt på 1 cm engangskuvetter og opstillet ved siden af hinanden med en hvid baggrund (almindeligt kopipapir) og affotograferet vinkelret på, med kameraet i en LG



Figur 1
Et eksempel på forsøgsopstillingen

Nexus 4 mobiltelefon. Der blev optaget flere billeder fra forskellige afstande og med forskellige fokuspunkter, og efterfølgende blev det bedste billede udvalgt. I udvælgelsen blev der lagt vægt på at have alle kuvetter i fokus og at billedet var jævnt belyst og uden skygger. Det billede der ud fra disse krav blev vurderet bedst blev efterfølgende databehandlet. Forsøgsopstillingen er afbilledet i figur 1.

Databehandling og resultater

Det udvalgte billede blev hentet ind i programmet ImageJ²⁾, det største mulige areal af hver enkelt kuvette markeret med det rektangulære udvælgelsesværktøj og gennemsnitlige RGB-værdier blev udlæst vha. kommandoen "Plugins → Analyze → Measure RGB", hvorefter middelværdierne blev manuelt overført til et regneark i Microsoft Excel. Se figur 2 for screenshot fra ImageJ.

Figur 2
Screenshot fra billedbehandling i ImageJ.



For at forbedre kvaliteten af data og kompensere for lysforskelle og billedstøj som følge af kamerakvalitet og billedkompressionen ved brug af det meget udbredte JPEG-format er to kunstgreb foretaget: Midling og Excessfunktioner.

Midling

Ved ikke kun at måle enkelte pixels, men tage middelværdien over så mange pixels som muligt inden for interesseområdet fås et noget mere robust estimat af opløsningens sande RGB-værdier. Dette er forholdsvis trivielt at gøre i de fleste billedbehandlingsprogrammer, og der findes adskillige gratis og frit tilgængelige programmer egnet til databehandling. Som det ses af figur 2 er der i dette tilfælde midlet over 14382 pixels.

Excessfunktioner behandles nedenfor, efter de ubehandlede værdier er undersøgt. Som det umiddelbart ses i tabel 1 og figur 3 er der umiddelbart en udmærket lineær sammenhæng mellem værdierne i den røde farvekanal og koncentrationen, hvilket jo også ville være det forventede resultat, da opløsningen absorberer kraftigt i det røde område. Der fås dog kun en korrelationskoefficient (R^2) på 0,97, og residualerne viser en systematisk afvigelse, der antyder at sammenhængen snarere er polynomisk.

De øvrige kanaler viser ikke nogen umiddelbart brugbar relation til koncentrationen, men indeholder stadig information om både opløsningerne og lysniveauet, da kanalerne som tidligere nævnt hverken er monokromatiske eller ortogonale. Derfor ser vi nu på excessfunktioner.

Konc [mM]	R	G	B
20	137,0	130,3	125,4
40	132,8	131,2	127,0
60	128,4	130,2	128,0
80	120,9	129,1	127,1
100	111,5	127,1	125,0

Tabel 1
Midlede, men ubehandlede RGB-værdier fra billede.

Excessfunktioner

For at kompensere for varierende lysmængder eller ujævnhed i belysningen kan man i stedet for de ubehandlede RGB-værdier anvende excess-værdierne, der er defineret således:

$$\text{''Excess Blue''} = 2 \cdot B - R - G,$$

altså 2 gange værdien af den blå kanal, minus værdierne af de røde og grønne kanaler. Excess Red og Excess green beregnes helt analogt ved ombytning af værdierne.

Man risikerer under visse omstændigheder at få negative værdier for excessfunktionerne, men proportionaliteten er stadig ligefrem, og disse værdier kan eventuelt parallelforskydes ved addition af en passende konstant, hvis man finder negative "absorbanser" uskønne eller upædagogiske. Herved fremkommer følgende data:

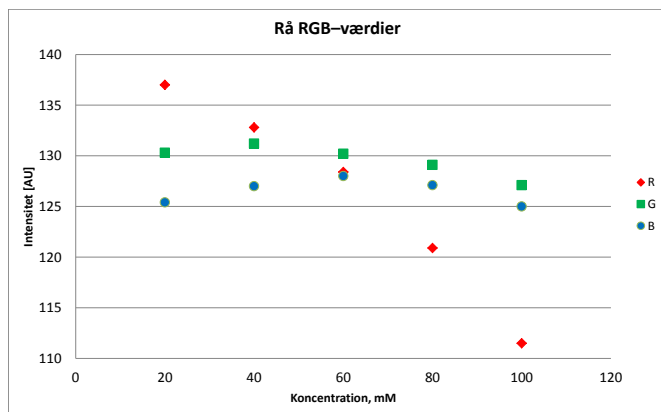
Konc [mM]	Excess Blue
20	-16,5
40	-10,0
60	-2,6
80	4,2
100	11,4

Tabel 2
Excess blue som funktion af koncentration

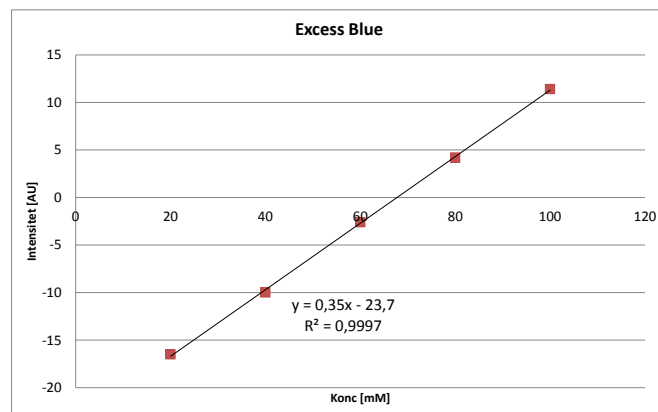
Det ses heraf, at der nu er særdeles god korrelation, så kalibreringskurven anvendes til at beregne koncentrationen af CuSO_4 i fortyndingerne af de mættede opløsninger, ud fra Excess Blue. RGB-data og den beregnede værdi af Excess Blue for de to prøver ses i tabel 3.

	R	G	B	Excess Blue
Prøve 1	132,1	131,0	127,3	-8,5
Prøve 2	126,2	125,2	121,3	-8,8

Tabel 3
RGB-værdier samt Excess Blue for prøverne.



Figur 3
Plot af de rå RGB-værdier som funktion af koncentration.



Figur 4
Plot af Excess Blue som funktion af koncentration og den tilhørende lineære regression.

Ud fra kalibreringskurven og disse data kan det beregnes at koncentrationen af kobber(II)sulfat er hhv. 43,4 og 42,6 mM i de to prøver, og efter at have taget gennemsnittet, ganget med fortyndingsfaktoren (50) og molvægten fås en koncentration af $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ på 537 g/L i den mættede opløsning.

*Databog fysik og kemi*³⁾ opgiver opløseligheden til 320 g/L ved 0 °C og ud fra oplysningerne på Wikipedia kan beregnes en opløselighed af pentahydratet ved 20 °C på ca. 500 g/L. Det ses også af begge kilder, at opløseligheden er kraftigt temperaturafhængig, så dette kan muligvis forklare afvigelsen, da målingerne blev foretaget ved en temperatur på 21–22 °C.

Diskussion

Yderligere forskning har vist, at følgende faktorer er væsentlige for et godt resultat: Ensartet, kraftig belysning med et minimum af skygger og reflekser; en jævn, hvid baggrund og fotografering vinkelret på prøven. Belysningen kan med fordel være fra en kilde med kontinuert spektrum (glødepære), men det er fuldt ud muligt at få tilfredsstillende resultater under lysstofrør og sparepærer, som det ses af ovenstående.

Alle disse krav følger logisk af almindelig teori for spektrofotometri, herunder Lambert–Beers lov – lysvejen og lysintensiteten skal være konstant, og lysstyrken høj nok til, at der transmitteres målelige lysmængder.

Det kan være nødvendigt at foretage en vurdering af den bedste afstand – jo længere væk man fotograferer fra, jo mere

ens er lysvejen, men til gengæld får man færre pixels at arbejde med.

Min erfaring er, at metoden er forholdsvis robust over for de udsving, det giver at tage billeder på klods hold, så længe man udvælger sit analyseområde, så der ikke indgår kanter eller skygge.

Modsat almindelig spektrofotometri er det hér fordelagtigt at fotografere alle sine prøver og kalibranter samlet, snarere end én ad gangen, da det giver de mest homogene lysforhold. Med en nogenlunde fast opstilling er det dog muligt at få brugbare resultater på tværs af foto.

Som alternativ kan man overveje at holde kuvetten op til kameralinsen og fotografere en ensartet hvid flade (almindelig kopipapir) igennem opløsningen. Dette er særligt velegnet til kameraer med små linser, som ofte findes i mobiltelefoner, da man så kan bruge det meste af billedfladen til at udtrage middelværdier.

Perspektivering

Brugen af kameraer som spektrofotometre har flere fordele i forhold til klassiske spektrofotometre – de er lette at bruge i undervisningen og velegnede til feltbrug, og endvidere kan dataopsamling og dokumentation af opstillinger foretages samtidig. Den mindre selektivitet og det begrænsede dynamiske område kan naturligvis begrænse anvendeligheden i nogle tilfælde, men overalt, hvor der måles på kraftigt farvede, enkle systemer, må det antages at være muligt at få information om sit system på denne måde.

Anvendelsesområdet kan således utvivlsomt udvides yderligere med lidt fantasi og eksperimenter.

Konklusion

Det ses, at kalibreringskurven for Excess Blue som funktion af koncentration af kobber(II)sulfat er lineær i området 20 til 100 mM, og at den opnåede værdi for opløseligheden af kobber(II)sulfat er i god overensstemmelse med de kendte tabelværdier, samt at der kun er lille forskel på værdierne fra dobbeltbestemmelsen.

Metoden må således betragtes som velegnet til formålet, og det må konkluderes, at det er muligt at anvende almindeligt forekommende kompaktkameraer, eksempelvis fra en mobiltelefon, som primitive spektrofotometre, og få resultater, der er i god overensstemmelse med, hvad der ses ved brug af normale spektrofotometre.

Tak til Linda Ahrenkiel, NAMADI, Syddansk Universitet for gode, konstruktive diskussioner og korrekturlæsning.

¹⁾ Frit tilgængelig fra: ibog.isisc.systeme.dk/fileadmin/indhold/ISBNXXXXXXXXXXXXXXXXX/oevelsesvejledninger_download/4.6_Oploeseligheden_af_kobberII_sulfat.pdf.

²⁾ Kan downloades gratis fra rsbweb.nih.gov/ij/ – bemærk, at det, afhængigt af platform, kan være nødvendigt at hente plugins manuelt. Kører man Windows og har java installeret (det har de fleste pga. NemID) så kan man blot hente den platformuafhængige zipfil og pakke den ud. Generelt er hjemmesiden meget veldokumenteret og hjælpsom.

³⁾ 10. udgave, 2. oplag.

⁴⁾ [en.wikipedia.org/wiki/Copper\(II\)_sulfate](http://en.wikipedia.org/wiki/Copper(II)_sulfate).