

Gymnázium Přírodní škola, o.p.s.  
Profilová práce — třída Ný  
Nižší stupeň studia  
2018/2019

**Tomáš Kudláček**

**Optimalizace uspořádání  
alternativní metody molekulové  
absorpční VIS spektrofotometrie**

**Vedoucí práce: RNDr. Marek Matura, Ph.D.**

**Datum odevzdání: 22. listopadu 2018**



# Optimalizace uspořádání alternativní metody molekulové absorpční VIS spektrofotometrie

Tomáš Kudláček

Vedoucí práce: RNDr. Marek Matura, Ph.D.

Odborný konzultant: Mgr. Karel Kudláček

Praha  
listopad 2018

Gymnázium Přírodní škola, o. p. s.



## ABSTRAKT

Klasické laboratorní i mobilní spektrofotometry jsou velmi drahé a pro řadu institucí (např. ZŠ, SŠ) tedy nedostupné. Předložená práce se zabývá alternativní metodou stanovení koncentrace železitých kationtů ve vodách pomocí digitálního zrcadlového fotoaparátu (DSLR). V této metodě je koncentrace stanovována stejně jako při klasické spektrofotometrii přes kalibraci a její rovnici, kde je jedna z proměnných intenzitou modré (B) nebo zelené (G) barvy z RGB spektra na stupnici od 0 do 255. Intenzita těchto doplňkových barev je přímo úměrná koncentraci analytu ve vzorcích – čím větší je koncentrace, tím menší je intenzita daných barev. Hlavním cílem práce je proto hledání optimálního uspořádání metody využívající DSLR, které poskytne výsledky stanovení co nejbližší datům ze spektrofotometru.

V rámci této práce byl pro stanovení použit DSLR Canon EOS 100D s objektivem Canon Zoom Lens EF-S 18-55 mm f/3.5-5.6 IS STM, který byl uchycen do stativu s vyosenou středovou tyčí. Fotoaparát pak byl kolmo umístěn nad mikrotitrační destičku s kalibračními standardy a vzorky, která byla ze spodu prosvícena LED videosvětlem. S tímto uspořádáním bylo provedeno několik měření, při kterých byly sestaveny kalibrační křivky, u kterých byla podle rovnice regrese a indexu korelace určována přesnost.

Vliv problémů s délkou optických drah skrz mikrotitrační destičku ke snímáči fotoaparátu a s šumem okolo jamek mikrotitrační destičky na kvalitu stanovení byl vyvrácen. Vliv barevné reakce kobaltnatých složek s thiokyanatanem draselným byl experimenty potvrzen, ale bylo navrženo řešení metodou standardního přídatku. Na základě těchto a dalších měření bylo uspořádání metody upraveno a otestováno. Koncentrace analytu v testovacím vzorku stanovená DSLR spektrofotometrií byla 7,43 mg/l, což je hodnota velmi blízká koncentraci stanovené spektrofotometrem HP 8453 (7,31 mg/l). Důležitým výstupem práce je návod pro realizaci stanovení.

**Klíčová slova:** alternativní analytická metoda, spektrofotometrie, úprava uspořádání, optimalizace, DSLR, stanovení koncentrace, železité kationty, analytická chemie, didaktika chemie, laboratorní praktika



## PODĚKOVÁNÍ

Především bych chtěl poděkovat svému vedoucímu práce RNDr. Marku Maturovi, Ph.D. za poskytnuté rady a připomínky k práci. Dále mé díky patří Mgr. Karlovi Kudláčkovi za konzultace, zprostředkování podkladů pro práci, odbornou pomoc při měření a jeho umožnění. Také bych chtěl poděkovat Katedře analytické chemie Univerzity Karlovy v Praze za poskytnutí vybavení a prostor pro práci. V neposlední řadě bych chtěl poděkovat Ing. Romanovi Pihanovi za poskytnuté rady ohledně práce s fotoaparátem, Ing. Davidovi Snopkovi, Ph.D. za pomoc s řešením optických problémů a podsvícení během měření, Filipovi Maškovi za zapůjčení videosvětla pro práci, mým rodičům za pomoc s odběrem vzorků a všem, kteří četli předloženou práci před odevzdáním za jejich připomínky.





# OBSAH

<b>1</b>	<b>ÚVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>TEORETICKÝ ÚVOD</b> .....	<b>3</b>
2.1	Spektrofotometrie .....	3
2.1.1	Molekulová absorpční UV/VIS spektrofotometrie .....	3
2.1.2	Měření absorbance .....	4
	Molární absorpční koeficient .....	4
	Lambertův-Beerův zákon.....	4
	Vícesložkový systém .....	5
	Transmitance.....	5
2.1.3	Spektrofotometr .....	6
2.2	DSLR spektrofotometrické stanovení koncentrace Fe <sup>3+</sup> .....	7
2.2.1	Náhrada spektrofotometru.....	7
2.2.2	Rozdíl oproti molekulové absorpční UV/VIS spektrofotometrii .....	9
2.2.3	Postup práce použitý v roce 2017 .....	10
	Kalibrace metody .....	10
	Příprava vzorků pro analýzu .....	12
	Zjištění intenzity barvy a výpočet koncentrace .....	12
	Statistické vyhodnocení .....	14
2.2.4	Zjištěné problémy ovlivňující stanovení 2017 a jejich řešení .....	14
	Rozdílné světelné podmínky při měření .....	15
	Pipetování vzorku do mikrotitrační destičky .....	15
	Optimální nastavení fotoaparátu .....	16
2.3	Základy práce s fotoaparátem .....	17
2.3.1	Expozice.....	17
	Přexponovaná fotografie .....	17
	Správně exponovaná fotografie .....	17
	Podexponovaná fotografie .....	17
	Exposure Value (EV).....	18
2.3.2	Nastavení fotoaparátu .....	18
	Režim fotografování .....	19
	Nastavení volená při plně manuálním režimu .....	19
	Formát pro ukládání fotografie .....	21
<b>3</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....	<b>23</b>
3.1	Použité chemikálie, nástroje a zařízení .....	23
3.2	Hypotetické problémy provádění stanovení v roce 2017.....	23
	Šum okolo jamek mikrotitrační destičky .....	23
	Dráha světla k čipu fotoaparátu skrz jamky na okraji a uprostřed destičky .....	30
	Nežádoucí barevné reakce thiokyanatanu draselného.....	34

3.3	Optimalizace uspořádání DSLR spektrofotometrie .....	40
	Umístění vzorku.....	41
	Podsvícení vzorků.....	41
	Formát pro ukládání fotografie .....	43
	Počítačový software pro vyhodnocení fotografie .....	44
	Určení přesnosti kalibrace metody.....	45
	Kalibrace metody.....	45
	Standardizace světelných podmínek analýzy.....	52
	Optimální nastavení a umístění fotoaparátu.....	58
	Rozsah stanovitelných koncentrací.....	60
3.4	Testování nového uspořádání na odebraných vzorcích .....	62
3.4.1	Postup práce.....	62
	Odběr vzorků .....	62
	Analýza vzorků.....	62
3.4.2	Vyhodnocení.....	66
3.4.3	Zhodnocení a diskuze .....	67
<b>4</b>	<b>ZÁVĚR.....</b>	<b>68</b>
	<b>LITERATURA.....</b>	<b>71</b>

## SEZNAM OBRÁZKŮ

<b>Obr. 2.1</b>	Schéma absorpce záření.....	5
<b>Obr. 2.2</b>	Obecné schéma spektrofotometru s označenými základními částmi.....	7
<b>Obr. 2.3</b>	Porovnání uspořádání přístrojů při klasické spektrofotometrii a uspořádání přístrojů při DSLR spektrofotometrii.....	9
<b>Obr. 2.4</b>	Znázornění několikanásobného pipetování vzorku do mikrotitrační destičky.....	12
<b>Obr. 2.5</b>	Snímek obrazovky programu RGB Color.....	13
<b>Obr. 2.6</b>	Podexpoze, správná expoze a přeexpoze snímku a histogramy ukazující obsah absolutní bílé/černé ve fotografii.....	18
<b>Obr. 2.7</b>	Volič režimů na fotoaparátu Canon EOS 100D s vysvětlivkami.....	19
<b>Obr. 2.8</b>	Znázornění veličin ze vzorce pro výpočet clonového čísla.....	20
<b>Obr. 2.9</b>	Schéma lamelové (irisové) clony.....	21
<b>Obr. 3.1</b>	Kalibrační přímka sestavená podle intenzit modré (B) barvy zjištěných na fotografii pořízené s vymaskovaným okolím jamek destičky.....	26
<b>Obr. 3.2</b>	Kalibrační přímka sestavená podle intenzit zelené (G) barvy zjištěných na fotografii pořízené s vymaskovaným okolím jamek destičky.....	26
<b>Obr. 3.3</b>	Kalibrační přímka sestavená podle intenzit modré (B) barvy zjištěných na fotografii pořízené bez vymaskovaného okolí jamek destičky.....	27
<b>Obr. 3.4</b>	Kalibrační přímka sestavená podle intenzit zelené (G) barvy zjištěných na fotografii pořízené bez vymaskovaného okolí jamek destičky.....	27
<b>Obr. 3.5</b>	Schéma rozdílu délky dráhy světla mezi různě vzdálenými jamkami v mikrotitrační destičce.....	30
<b>Obr. 3.6</b>	Schéma vzdálenosti vzorků v květech od čočky objektivu fotoaparátu a vzdálenost od vnějších okrajů krajních květů.....	32
<b>Obr. 3.7</b>	Schéma délky optických drah skrze květy k přední čočce objektivu fotoaparátu.....	33
<b>Obr. 3.8</b>	Kalibrační přímka sestavená podle zjištěných intenzit modré (B) barvy ze standardů s obsahem kobaltu.....	38
<b>Obr. 3.9</b>	Kalibrační přímka sestavená podle zjištěných intenzit zelené (G) barvy ze standardů s obsahem kobaltu.....	38
<b>Obr. 3.10</b>	Kalibrační přímka sestavená podle zjištěných intenzit modré (B) barvy ze standardů bez obsahu kobaltu.....	39
<b>Obr. 3.11</b>	Kalibrační přímka sestavená podle zjištěných intenzit zelené (G) barvy ze standardů bez obsahu kobaltu.....	39
<b>Obr. 3.12</b>	Kalibrační přímka sestavená podle intenzity modré (B) barvy z fotografie vyfocené DSLR Canon EOS 100D.....	49
<b>Obr. 3.13</b>	Kalibrační přímka sestavená podle intenzity zelené (G) barvy z fotografie vyfocené DSLR Canon EOS 100D.....	49
<b>Obr. 3.14</b>	Kalibrační přímka sestavená podle intenzity modré (B) barvy z fotografie vyfocené fotoaparátem mobilního telefonu iPhone 5S.....	50
<b>Obr. 3.15</b>	Kalibrační přímka sestavená podle intenzity zelené (G) barvy z fotografie vyfocené fotoaparátem mobilního telefonu iPhone 5S.....	50
<b>Obr. 3.16</b>	Kalibrační přímka sestavená podle absorbance jednotlivých standardů zjištěné spektrofotometrem Hewlett Packard 8453.....	51
<b>Obr. 3.17</b>	Schéma uspořádání jednotlivých částí aparatury při měření.....	53
<b>Obr. 3.18</b>	Uspořádání aparatury během provádění stanovení.....	54

<b>Obr. 3.19</b>	Kalibrační přímka sestavená podle intenzity modré (B) barvy z fotografie vyfocené bez odstínění světla. ....	56
<b>Obr. 3.20</b>	Kalibrační přímka sestavená podle intenzity zelené (G) barvy z fotografie vyfocené bez odstínění světla. ....	56
<b>Obr. 3.21</b>	Kalibrační přímka sestavená podle intenzity modré (B) barvy z fotografie vyfocené s odstíněným světlem. ....	57
<b>Obr. 3.22</b>	Kalibrační přímka sestavená podle intenzity zelené (G) barvy z fotografie vyfocené s odstíněným světlem. ....	57
<b>Obr. 3.23</b>	Kalibrační přímka sestavená podle absorbance jednotlivých standardů zjištěné spektrofotometrem Hewlett Packard 8453. ....	64
<b>Obr. 3.24</b>	Kalibrační přímka sestavená podle intenzity modré (B) barvy použitá při měření. ..	65
<b>Obr. 3.25</b>	Kalibrační přímka sestavená podle intenzity zelené (G) barvy použitá při měření. ..	65

## SEZNAM TABULEK

<b>Tab. 2.1</b>	Podíl jednotlivých činidel v kalibračních standardech použitých při měření v roce 2017 .....	11
<b>Tab. 2.2</b>	Pipetovaný objem vzorku a jednotlivých činidel do 5ml baněk pro analýzu použitý během měření v roce 2017 .....	12
<b>Tab. 2.3</b>	Změna hloubky ostrosti při změně jednotlivých parametrů při fotografování .....	20
<b>Tab. 3.1</b>	Podíl jednotlivých roztoků v použitých standardech při ověřování problému s šumem okolo mikrotitrační destičky .....	24
<b>Tab. 3.2</b>	Nastavení fotoaparátu během ověřování problému s šumem okolo mikrotitrační destičky .....	25
<b>Tab. 3.3</b>	Zjištěné intenzity modré (B) barvy a jejich aritmetické průměry při zamaskovaném okolí jamek a nezamaskovaném okolí jamek.....	28
<b>Tab. 3.4</b>	Zjištěné intenzity zelené (G) barvy a jejich aritmetické průměry při zamaskovaném okolí jamek a nezamaskovaném okolí jamek.....	29
<b>Tab. 3.5</b>	Podíl jednotlivých roztoků ve standardu použitém při ověřování problému s délkou dráhy světla skrz jamky destičky .....	31
<b>Tab. 3.6</b>	Nastavení fotoaparátu během ověřování problému s délkou dráhy světla skrz jamky destičky .....	32
<b>Tab. 3.7</b>	Zprůměrované hodnoty intenzit barev se statistickým vyhodnocením zjištěné při ověřování problému s délkou dráhy světla skrze jamky destičky .....	33
<b>Tab. 3.8</b>	Podíl jednotlivých roztoků a činidel při přípravě standardů s obsahem kobaltu při ověřování hypotetického problému s nežádoucími barevnými reakcemi thiokyanatanu draselného.....	36
<b>Tab. 3.9</b>	Podíl jednotlivých roztoků a činidel při přípravě standardů bez obsahu kobaltu při ověřování hypotetického problému s nežádoucími barevnými reakcemi thiokyanatanu draselného.....	36
<b>Tab. 3.10</b>	Nastavení fotoaparátu při ověřování problému nežádoucích barevných reakcí thiokyanatanu draselného.....	36
<b>Tab. 3.11</b>	Podíl jednotlivých činidel v připravených standardech použitých při ověřování kalibrace metody .....	46
<b>Tab. 3.12</b>	Nastavení fotoaparátu během úpravy kalibrace metody. ....	46
<b>Tab. 3.13</b>	Podíl jednotlivých činidel v připravených standardech použitých pro standardizaci podmínek při měření. ....	52
<b>Tab. 3.14</b>	Nastavení fotoaparátu během ověřování přesnosti stanovení s odstíněným a neodstíněným okolním světlem.....	53
<b>Tab. 3.15</b>	Optimální nastavení fotoaparátu při konkrétních podmínkách ověřené použitím během práce. ....	60
<b>Tab. 3.16</b>	Podíl jednotlivých činidel a roztoků v kalibračních standardech sestavených pro ověřování metody na odebraných vzorcích.....	63
<b>Tab. 3.17</b>	Nastavení fotoaparátu použité při ověřování uspořádání metody na vzorcích. ....	63
<b>Tab. 3.18</b>	Množství jednotlivých roztoků a činidel při přípravě vzorků k analýze. ....	66



## PŘÍLOHY

K práci jsou přiloženy texty, které nejsou součástí závěrečné zprávy. Tyto texty jsou výstupem z práce nebo jeho součástí, nebo dokumentují průběh práce:

- Příloha I**      Písemný záměr předložené práce
- Příloha II**      Článek pojdenávající o práci
- Příloha III**     Návod pro realizaci stanovení DSLR spektrofotometrií vytvořený na základě předložené práce (2018)
- Příloha IV**     Návod pro realizaci stanovení DSLR spektrofotometrií vytvořený pro měření prováděná v roce 2017 (2017)
- Příloha V**      Tabulky s hodnotami použitými pro sestavení kalibračních přímek použitých v experimentální části práce

V textu je na ně odkázáno jako *Příloha* s příslušným římským číslem *I-V*.

## SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

Sr; RSD	Relativní směrodatná odchylka
$L_{1,2}$	Interval spolehlivosti na hladině významnosti 95 %
$R$	Index korelace kalibrační přímky
LOD	Limit detekce (angl. Limit of Detection)
LOQ	Limit kvantifikace (angl. Limit of Quantification)
UV/VIS	Ultrafialová/Viditelná oblast (angl. Ultra Violet/Visible region)
(B)	Intenzita modré barvy
(G)	Intenzita zelené barvy
LED	Světlo emitující dioda (angl. Light Emitting Diode)
AWB	Automatické vyvážení bílé (angl. Automatic White Balance)
WB	Vyvážení bílé (angl. White Balance)
ISO	Citlivost snímače (čipu) fotoaparátu na světlo
DSLR	Digitální zrcadlový fotoaparát (angl. Digital Single-Lens Reflexe Camera)
EV	Expoziční stupeň (angl. Exposure Value)
$\Phi_0$	Vstupní zářivý tok
$\Phi$	Výstupní zářivý tok (neabsorbované záření)
$I_0$	Intenzita vstupního zářivého toku
$I$	Intenzita výstupního zářivého toku (intenzita neabsorbovaného záření)
$l$	Tloušťka absorbujícího prostředí [cm]
$c$	Koncentrace absorbující látky [mg/l] [mol/dm <sup>3</sup> ]
$\varepsilon$	Molární absorpční koeficient [l mol <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> ]
$\lambda$	Vlnová délka světelného toku [nm]
$A$	Absorbance



# 1 ÚVOD

V roce 2017 proběhl na Gymnáziu Přírodní škola, o. p. s. výzkum zabývající se chemickou analýzou minerálních pramenů<sup>1</sup>. Práce byla prováděna v rámci vzdělávacího projektu „Expedice“ ([www.prirodniskola.cz](http://www.prirodniskola.cz); <http://archiv.prirodniskola.cz/expedice/tepelsko2017.html>). Jednou z použitých metod bylo DSLR spektrofotometrické stanovení koncentrace železitých kationtů ve vodě, při které byl spektrofotometr nahrazen digitální zrcadlovkou v kombinaci se softwarem pro vyhodnocení dat (tabulkový software a program schopný určit intenzitu základních barev, na stupnici od 0 do 255, RGB spektra). Jednalo se o alternativní metodu k laboratornímu stanovení koncentrace pomocí klasického spektrofotometru. Detaily lze nalézt v Příloze IV.

Výsledky měření prováděného tímto způsobem byly zatíženy velkou chybou. Nejmenší chyba v měření, vyjádřená pomocí RSD byla 8,59 % [1]. RSD pro ostatní výsledky byla větší než 10 % [1]. Vznik těchto chyb ovlivnilo mnoho faktorů mj. i to, že zvolená metoda byla autory využita poprvé. Velký rozptyl dat a vysoké hodnoty RSD tedy nebyly překvapením.

V rámci práce, jejíž výsledky shrnuje tato zpráva, byla provedena řada změn v uspořádání metody oproti původnímu návodu (Příloha IV) podle kterého byla realizována měření v roce 2017 [1].

Předložená práce se proto zabývá optimalizací této metody. Mohla by totiž být obstojnou alternativou k laboratorním stanovením a našla by uplatnění i ve výuce chemie (např. jako součást laboratorních praktik). Provedení je sice náročnější než na klasickém spektrofotometru, ale náklady jsou relativně nízké (nejlevnější spektrofotometry jsou stále v řádech několika desítek tisíc dražší než základní zrcadlové fotoaparáty). DSLR spektrofotometrie by mohla poskytnout relativně přesné měření tam, kde je vzhledem k vysoké pořizovací ceně nemožné provést měření spektrofotometrem, (např. jednoduchá terénní stanovení žáků ZŠ a SŠ).

Cílem práce je tedy testování a optimalizace uvedené metody pro stanovení železitých kationtů ve vodě, kde se očekává zvýšená koncentrace železa.

---

<sup>1</sup> Závěrečná zpráva z realizovaného výzkumu dostupná z WWW: <http://archiv.prirodniskola.cz/expedice/tepelsko2017/prameny-2017.pdf>. Práce je dále v textu citována jako [1]. Práce je pod samým číslem uvedena v soupisu literatury na konci této zprávy s patřičnými bibliografickými údaji.

Za optimální nastavení je v rámci této práce nadále považováno takové, s jehož použitím bude možné dosáhnout výsledků s co nejmenší chybou stanovení, nebo výsledků co neblíže těm, které stanoví spektrofotometr. Při tom platí, že za přijatelné je možné považovat výsledky s RSD <10 % včetně. Pro ověření získaných dat budou všechna stanovení paralelně provedena také na klasickém spektrofotometru.

Dalším cílem je zjistit možné problémy při stanovení prováděných podle Přílohy IV v roce 2017 [1], ověřit je a určit jejich vliv na stanovení. V rámci předložené práce by měly být ověřovány a vyhodnocovány i další problémy vyvstalé během realizace předložené práce. V rámci této zprávy nejsou separátně vypracovány kapitoly „metodiky/postupu práce“ a „výsledků s diskuzí“, a to především kvůli přehlednosti textu a jeho obsáhlosti.

Každému problému tedy bude věnován samostatný oddíl, ve kterém bude

- a. metodika použitá při řešení konkrétního problému,
- b. vyhodnocení měření, kterým byl problém ověřován,
- c. zhodnocení zjištěných výsledků s jejich diskutováním.

Během testování a optimalizace metody by se mělo podařit zodpovědět následující otázky:

- a. Jaké je optimální uspořádání metody stran fotoaparátu (nastavení fotoaparátu, další příslušenství)?
- b. Jaká je optimální práce s daty (do jakého formátu ukládat fotografie, v čem a jakým způsobem je vyhodnocovat)?
- c. Je žádoucí při analyzování použít podsvícený podklad? Jestliže ano jaký, případně jakého typu?
- d. Do čeho je vhodné během měření umístit analyzovaný vzorek (mikrotitrační destička nebo kyveta)?
- e. Jaký je lineární koncentrační rozsah metody pro stanovení železitých kationtů? Lze metodu použít pro stanovení koncentrace železitých kationtů ve vodách minerálních pramenů?
- f. Jaké jsou možné problémy při stanovení metodou DSLR spektrofotometrie a co je způsobuje?

Zásadním výstupem práce by měl být metodický návod na provedení DSLR spektrofotometrického stanovení. Za nadstandardní by v rámci této práce bylo možné považovat přijetí článku na téma DSLR spektrofotometrie do Chemických listů.

## 2 TEORETICKÝ ÚVOD

### 2.1 Spektrofotometrie

Jedná se o metodu analytické chemie patřící mezi elektromagnetické spektroskopické metody. Spektrofotometrie je analytická metoda, založená na absorpci záření různých vlnových délek spektra vzorkem. Koncentrace analytu ve vzorku je přímo úměrná dle Lambertova-Beerova zákona na pohlceném záření.

Při stanovování koncentrace analytu<sup>2</sup> ve vzorku pomocí spektrofotometrie analytu, je vzorek ozářen elektromagnetickým zářením dané vlnové délky o vstupní intenzitě. Toto záření je pohlcováno molekulami analytu. Zbylé záření, neabsorbované vzorkem, poté dopadá na detektor. Platí, že intenzita prošlého záření je nižší, než intenzita vstupního záření. Detektor odečítá intenzitu dopadajícího záření od intenzity počáteční. Množství absorbovaného záření je pak ideálně úměrné koncentraci zjišťované látky v analytu.

Spektrofotometricky lze tedy stanovovat koncentrace barevně aktivního analytu ve vzorku na základě míry absorpce světla o určité vlnové délce ( $\lambda$ ).

#### 2.1.1 Molekulová absorpční UV/VIS spektrofotometrie

Užívá se pro měření koncentrace analytu podle absorbance záření procházejícího zkoumaným vzorkem podle Lambertova-Beerova zákona nebo Transmittance (viz pododíl 2.1.2). Při známém koeficientu absorpce měřené látky umožňuje změna intenzity procházejícího záření stanovit její koncentraci v roztoku.

V UV/VIS spektrofotometrii lze pracovat s ultrafialovým a viditelným zářením o vlnové délce v rozmezí 10 až 800 nm [2]. Stanovení provádění VIS spektrofotometrií pracují s viditelnou částí spektra mezi 390 a 790 nm. UV spektrum je děleno na *blízkou ultrafialovou oblast* a *vzdálenou ultrafialovou oblast*. Blízká UV oblast je mezi 200 a 400 nm. Vzdálená UV oblast je v rozsahu od 10 do 200 nm - tato oblast není pro spektrofotometrická stanovení běžně využívána [2].

---

<sup>2</sup>**Analyt**- Konkrétní látka (prvek), jehož přítomnost nebo množství je stanovováno metodami analytické chemie.

### 2.1.2 Měření absorbance

Pomocí absorbance je následně možné zjistit koncentraci analytu ve sledovaném vzorku. Zjišťování koncentrace analytu ve zkoumaném vzorku je prováděno podle jednoho z níže uvedených vztahů.

#### **Molární absorpční koeficient**

Vyjadřuje schopnost látky absorbovat světlo. Molární absorpční koeficient je pro každou látku vlastní při různých vlnových délkách  $\lambda$ .

Vypočítává se z rovnice (2.1). Pokud jsou veličiny ze vztahu (2.1) udávány v souladu s IUPAC<sup>3</sup>, tedy koncentrace  $c$  v mol/dm a délka absorbujícího prostředí  $l$  v cm, uvádí se molární absorpční koeficient  $\varepsilon$  v  $l \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  [2]. Je-li koncentrace vyjádřena v jiných jednotkách, je ve vztahu (2.1)  $\varepsilon$  nahrazen absorpčním koeficientem  $a$ , jehož rozměr závisí na udání koncentrace [2].

Molární absorpční koeficient je využíván pro stanovení koncentrace analytu v následujících vztazích.

#### **Lambertův-Beerův zákon**

Lambertův-Beerův zákon (2.1) se využívá ke zjištění absorbance analytu v komplexu a následnému stanovení koncentrace daného analytu.

Vyjadřuje vztah mezi absorbovaným zářením, délkou absorbujícího prostředí a koncentrací analytu ve vzorku [2, 3] (Obr. 2.1), (2.1). Ze zdroje světla vychází monochromatický zářivý tok  $\Phi_0$ . Ten prochází absorbujícím prostředím o tloušťce  $l$  a nepohlčený zářivý tok  $\Phi$  z prostředí vychází. Platí, že  $\Phi < \Phi_0$ . Část neabsorbovaného záření se také odráží od prostředí, ve kterém je zkoumaný vzorek (např. od skla kyvety, kde odraz konkrétně tohoto viditelného záření může činit až 4 % celkového záření [2]).

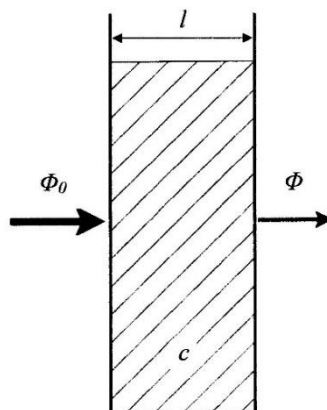
Absorpce nezávisí pouze na tloušťce absorbujícího prostředí, ale také na koncentraci (množství) látky nebo látek, způsobujících absorpci. Tento vztah mezi tloušťkou absorbujícího prostředí, koncentrací absorbující látky a vlastní velikostí absorbance definuje spojený Lambertův-Beerův zákon

$$A = l \cdot c \cdot \varepsilon \quad (2.1)$$

---

<sup>3</sup>IUPAC - International Union of Pure and Applied Chemistry (Mezinárodní unie pro čistou a užitou chemii)

kde  $A$  je absorbance, která je přímo úměrná délce absorbujícího prostředí  $l$  [cm], kterým paprsek prochází a koncentraci  $c$  zjišťované složky ve vzorku [mol/dm] a  $\varepsilon$  je molární absorpční koeficient [ $l \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ]. Molární absorpční koeficient je pro každou látku vlastní.



**Obr. 2.1** Schéma absorpce záření (upraveno podle [2]), kde  $\Phi_0$  je vstupní zářivý tok,  $\Phi$  je výstupní zářivý tok (neabsorbované záření),  $l$  je délka absorbujícího prostředí [cm] a  $c$  je koncentrace zjišťované látky v absorbujícím prostředí.

### Vícesložkový systém

Používá se v případě, kde je nutné podle Lambertova-Beerova zákona ke zjištění míry absorpce provést dvě analýzy při různých vlnových délkách ( $\lambda$ ), z důvodu přítomnosti více absorbujících složek. Pokud se v analyzovaném vzorku vyskytují dvě absorbující složky a více, platí *aditivita dílčích absorbancí*. Celková naměřená absorbance je poté dána vztahem

$$A = l \sum_{i=1}^n \varepsilon_i c_i \quad (2.2)$$

kde  $A$  je zjišťovaná míra absorpce,  $l$  je délka absorbujícího prostředí [cm],  $\varepsilon$  je molární absorpční koeficient [ $l \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ],  $c$  je koncentrace [mol/dm] a  $n$  je počet absorbujících složek ve vzorku.

V případě DSLR spektrofotometrie lze vícesložkový systém nebo dvě analýzy podle Lambertova-Beerova zákona nahradit stanovením koncentrace analytu *metodou standardního přídatku*.

### Transmittance

Tato veličina také hodnotí míru absorpce zářivé energie. Definuje neabsorbované množství záření po průchodu absorbujícím prostředím. Udává se většinou

v procentech [2]. Je dána poměrem intenzitou záření vycházejícího z absorbujícího prostředí  $\Phi$  ke vstupní intenzitě záření  $\Phi_0$ . Transmittance je tedy definována

$$T = \frac{\Phi}{\Phi_0} \quad (2.3)$$

kde  $T$  je transmittance,  $\Phi$  je výstupní intenzita záření (nepohlčené záření) a  $\Phi_0$  je vstupní intenzita.

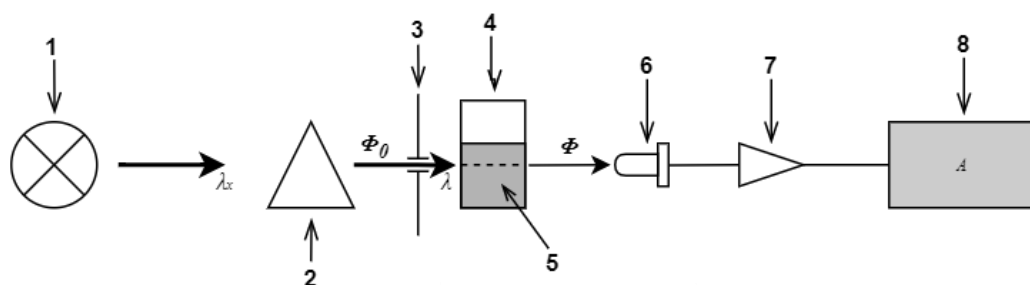
Transmittance roztoku mj. závisí na vlastnostech absorbující látky, vlnové délce procházejícího světla a množství absorbující látky ( $c$  látky v roztoku a  $l$ ). Závislost transmittance na těchto veličinách, při využití monochromatického záření, je definována

$$T = 10^{-l \cdot \varepsilon \cdot c} \quad (2.4)$$

kde  $T$  je transmittance,  $l$  je délka absorbujícího prostředí [cm],  $\varepsilon$  je molární dekadický absorpční koeficient [ $\text{l mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ] a  $c$  je koncentrace absorbující látky [ $\text{mol/dm}^3$ ].

### 2.1.3 Spektrofotometr

Zařízení (Obr. 2.2) se používá při kvantitativní analýze měřením absorbance a případně i ke kvalitativní analýze, při interpretacích spekter (absorpčních maxim a minim). Jeho hlavní součástí je zdroj záření, kterým je pro spektrofotometrii v UV oblasti deuteriová lampa a pro měření ve VIS oblasti halogenová lampa. Světlo je v monochromátoru (dříve hranol nebo pomocí filtrů, dnes častěji mřížka se štěrbinou) rozloženo ideálně na požadovanou vlnovou délku. Záření vybrané vlnové délky poté prochází nastavitelnou clonou, které usměrňuje jeho tok. Záření následně prochází přes kyvetu se zkoumaným analytem, kde je část záření absorbována. Nepohlčené světlo dopadá na detektor. Pomocí softwaru je intenzita dopadajícího záření porovnána s intenzitou zdrojového záření. Zjišťovaná absorbance je počítána podle některého ze vztahů (2.3), (2.4).



**Obr. 2.2** Obecné schéma spektrofotometru s označenými základními částmi (upraveno podle wikiskripta.cz), kde 1 je zdroj záření - žárovka nebo halogenová lampa pro VIS a deuteriová lampa pro UV oblast; 2 je monochromátor - zařízení propouštějící pouze světlo určité vlnové délky (vytvoří z polychromatického záření monochromatické); rozkladným prvkem může být hranol, difrakční mřížka, filtry nebo optická mřížka (pro viditelnou oblast spektra se nejčastěji používá difrakční mřížka); 3 je nastavitelná clona - umožňuje regulaci procházejícího záření; 4 je kyvetový prostor - prostor pro vzorky v kyvetách; používá se skleněná optika (pro VIS oblast), křemenná optika (pro UV oblast), solná optika (pro IR oblast) nebo kyvety z plastu; 5 je analyzovaný vzorek; 6 je detektor - CCD kamera nebo fotodioda; 7 je zesilovač signálu; 8 je výstupní zařízení - software na analýzu dat;  $\Phi_0$  je vstupní zářivý tok o intenzitě  $I_0$ ;  $\Phi$  je výstupní zářivý tok o intenzitě  $I$  - nepohlcené světlo;  $\lambda_x$  je polychromatické záření;  $\lambda$  je monochromatické záření.

## 2.2 DSLR spektrofotometrické stanovení koncentrace $\text{Fe}^{3+}$

Stanovení vlastností vzorku je prováděno digitálním zrcadlovým fotoaparátem v kombinaci se softwarem pro zjištění intenzit základních barev RGB spektra, což dohromady slouží jako alternativa ke spektrofotometru.

Při stanovení koncentrace železitých kationtů je důležitým aspektem intenzita modré a zelené barvy. Po reakci železitých kationtů s thiokyanatanovým aniontem totiž vzniká komplexní sloučenina červené barvy, proto je sledována intenzita absorbované doplňkové barvy (modré a zelené). Na základě intenzit doplňkových barev a přesně sestavené kalibrace je poté možné zjistit obsah železitých kationtů ve sledovaném vzorku. Podle Lambertova Beerova zákona platí, že čím je koncentrace železitých kationtů větší, tím intenzivnější je červená barva komplexu a tím pádem menší intenzita modré a zelené barvy, jelikož červený komplex dané doplňkové barvy absorbuje. Stanovení koncentrace železitých kationtů [mg/l] je pak prováděno přes rovnici regrese v kalibrační přímce.

### 2.2.1 Náhrada spektrofotometru

Vstupní zdroj záření (Obr. 2.3) je nahrazen

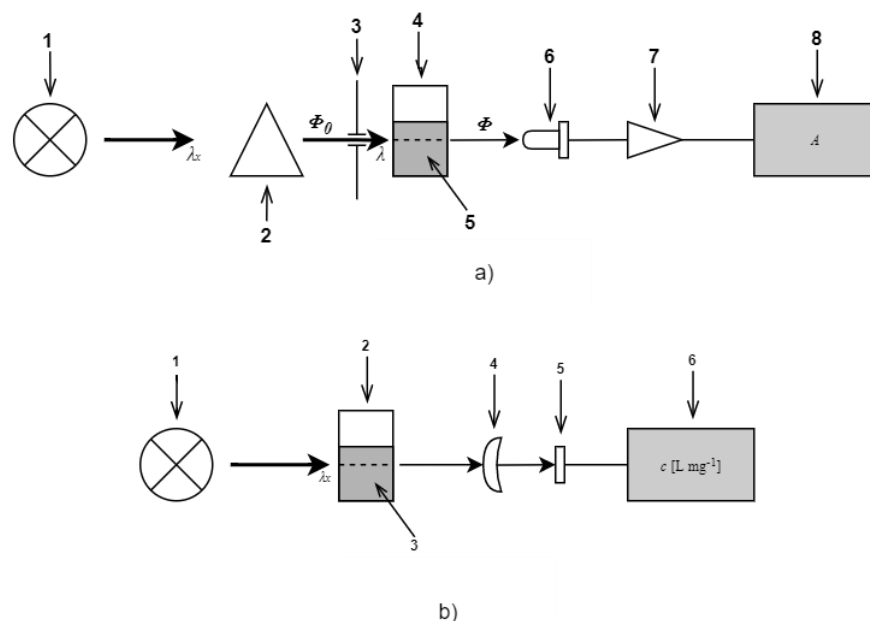
- podsvíceným podkladem s matnicí,
- přirozeným světlem.

Nad zdrojem světla je umístěn analyzovaný vzorek. Detektor spektrofotometru je nahrazen snímačem fotoaparátu (Obr. 2.3). Fotoaparátem je mikrotitrační destička vyfocena. Fotografie je poté nahrána do počítače, kde je dále vyhodnocena podle sestavené kalibrace. Celý proces vyhodnocování probíhá v počítači, kterým je nahrazeno výstupní zařízení spektrofotometru (Obr. 2.3).

Při měření pomocí DSLR je několik zásadních rozdílů (Obr. 2.3):

- a. Při analýze není z polychromatického záření nijak odděleno monochromatické (chybí monochromátor, daná barva světla je vyhodnocena až softwarem).
- b. Záření dopadající na detektor prochází skrze větší množství čoček objektivu oproti fokusační optice ve spektrofotometru.
- c. Při DSLR spektrofotometrii se pracuje s větší částí viditelného spektra, protože je porovnáváno spektrum kalibračních vzorků a vzorků neznámých. Protože vstupní záření je polychromatické, nejsou vlnové délky jakkoliv zohledňovány při výpočtu výsledné koncentrace, pokud ovšem pomineme výpočty prováděné při úpravě obrazu samotným čipem fotoaparátu. Při výpočtu koncentrace tak nejsou použity vztahy (2.1), (2.2), (2.3), (2.4). Koncentrace analytu ve zkoumaném vzorku je prováděna přes kalibrační závislost a rovnici grafu, ve kterém je sestavena kalibrační přímka.





**Obr. 2.3** Porovnání uspořádání přístrojů při klasické spektrofotometrii (a) a uspořádání přístrojů při DSLR spektrofotometrii (b), kde u a) 1 je zdroj záření; 2 je monochromátor; 3 je clona; 4 je kyveta se vzorkem 5; 6 je detektor; 7 je zesilovač signálu; 8 je výstupní zařízení;  $\lambda_x$  je polychromatické záření;  $\lambda$  je monochromatické záření;  $\Phi_0$  je vstupní zářivý tok a  $\Phi$  je výstupní zářivý tok. U b) je 1 zdroj záření; 2 je kyveta se vzorkem 3; 4 je čočka (čočky) objektivu; 5 je snímač fotoaparátu; 6 je výstupní zařízení a  $\lambda_x$  je polychromatické záření o neznámé vlnové délce  $\lambda$ .

V uspořádání DSLR spektrofotometrie nelze nijak docílit rozdělení jednotlivých složek světla a získat monochromatické záření, aniž by byla ovlivněna barevnost fotografie. Jako řešení se tedy nabízí zvolit takové záření, které je tomu monochromatickému nejbližší nebo zvolit záření se stálou a známou vlnovou délkou. Tímto zdrojem záření by mohla být LED (monochromatické záření) nebo laser jedné barvy o určité neměnné vlnové délce.

### 2.2.2 Rozdíl oproti molekulové absorpční UV/VIS spektrofotometrii

Při analýze DSLR spektrofotometrií lze pracovat pouze s VIS částí spektra. UV záření je totiž absorbováno sklem, ze kterého jsou čočky v objektivu fotoaparátu vyrobeny.

Kdybychom chtěli pracovat při analýze s fotoaparátem i v UV oblasti spektra, musely by čočky objektivu být z plastu nebo křemenného skla.

## 2.2.3 Postup práce použitý v roce 2017

### **Kalibrace metody**

Před každým měřením byla prováděna kalibrace pro zjištění kalibrační závislosti (odezva přístroje pro příslušné koncentrace analytu [6]). Obecně platí, že čím vyšší koncentrace analytu ve vzorku, tím je větší absorbance záření. V tomto případě platilo, že čím větší koncentrace železitých kationtů ve vzorku, tím měl komplex po reakci s thiokyanatanem draselným intenzivnější červenou barvu, a tím menší byla při vyhodnocení intenzita modré (B) a zelené (G) barvy.

Pro sestavení kalibrace bylo připraveno několik kalibračních roztoků s rostoucí koncentrací  $c$ . Těchto standardů by mělo být  $\geq 6$  [6]. Díky tomu je možné pokrýt velký koncentrační rozsah. Zároveň vyšší počet standardů je lepší pro větší koncentrační rozsah a pro přesnější kalibraci (díky většímu počtu standardů lze ověřit zachování linearitu kalibrační přímky). Nejnižší a nejvyšší koncentrace kalibračních standardů by měly být zvoleny v takovém rozmezí, aby zahrnovala předpokládanou koncentraci analytu ve zkoumaném vzorku. Jeden z kalibračních roztoků byl *blank*, („slepý vzorek“/blank = kalibrační roztok o nulové koncentraci analytu, který by měl ukazovat hodnoty pozadí).

Sedm standardů, včetně jednoho slepého vzorku, bylo připravováno v 5ml odměrných baňkách. Kalibrační standardy byly připravovány ze zásobních roztoků dusičnanu železitého (10% roztok čistoty p. a., Lach-ner), thiokyanatanu draselného (10% roztok čistoty p. a., Lach-ner) a deionizované vody. Podíl jednotlivých činidel je znázorněn v tabulce níže (Tab. 2.1):

**Tab. 2.1** Podíl jednotlivých činidel v kalibračních standardech použitých při měření v roce 2017 (upraveno podle [1])

označení standardu	c [mg/l]	$V_{\text{Fe}(\text{NO}_3)_3}$ [ $\mu\text{l}$ ]	$V_{\text{KSCN}}$ [ $\mu\text{l}$ ]	$V_{\text{celkem}}$ [ml]
1 (blank)	0,00	0	200	5,00
2	2,50	125	200	5,00
3	5,00	250	200	5,00
4	10,00	500	200	5,00
5	20,00	1000	200	5,00
6	40,00	2000	200	5,00
7	80,00	4000	200	5,00

Do každé 5ml odměrné baňky byl pipetován daný objem zásobního roztoku standardu (dle Tab. 2.1), dále bylo přidáno 200  $\mu\text{l}$  thiokyanatanu draselného a baňka byla doplněna po rysku deionizovanou vodou a protřepána. Standardy pak byly pipetovány do jamek v mikrotitrační destičce v objemu 250  $\mu\text{l}$  kvůli zachování jednotné délky absorbujícího prostředí. Stejná tloušťka všech absorpčních prostředí, která je v molekulové absorpční UV/VIS spektrofotometrii důležitým aspektem (viz pododíl 2.1.2). Každý standard byl nanesen do tří jamek.

Všechny kalibrační standardy byly vyfoceny současně. Fotografie byla nahrána do počítače, kde byla za pomoci programu vyhodnocena. Z jednotlivých kalibračních standardů na fotografii byly vyhodnocovány intenzity modré barvy (B) a zelené barvy (G) z RGB spektra na stupnici od 0 do 255. Tím byly zjištěny intenzity barev příslušící daným koncentracím analytu v kalibračních standardech

Po vyhodnocení byl vytvořen bodový graf, ve kterém byly zaneseny koncentrace analytu ve standardech v závislosti na intenzitě barvy. Body byly pak proloženy přímkou (lineární regrese). Kalibrační přímka byla vytvořena pro každou intenzitu (zelené i modré barvy) zvlášť.

Přesnost kalibrace byla určována pomocí indexu korelace  $R$ , který je odmocninou koeficientu determinace  $R^2$ . Kalibrace byla považována za přesnou, pokud je  $R \geq 0,9900$ .

Kalibrační přímku bylo nutné sestavit nejdříve pouze pro kalibrační standardy kvůli kontrole přesnosti kalibrace. Při stanovení neznámých vzorků bylo ale potřeba

kalibraci stanovit vždy znovu, a to z fotografie, na které byly současně zachycené kalibrační standardy a analyzované vzorky. Tím bylo zajištěno, že podmínky kalibrace odpovídají podmínkám stanovení z neznámého vzorku.

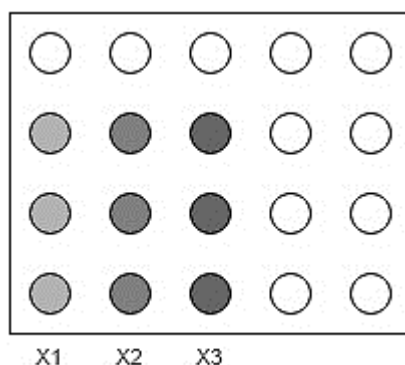
### **Příprava vzorků pro analýzu**

Každý vzorek byl připraven v 5ml odměrné baňce s potřebnými činidly podle tabulky Tab. 2.2. Po aplikaci činidel byla baňka doplněna po rysku deionizovanou vodou.

**Tab. 2.2** Pipetovaný objem vzorku a jednotlivých činidel do 5ml baněk pro analýzu použitý během měření v roce 2017 (upraveno podle [1])

c [mg/l]	V <sub>vzorku</sub> [μl]	V <sub>KSCN</sub> [μl]	V <sub>celkem</sub> [ml]
x	4500	200	5,00

Z baňky byl pak připravený vzorek pipetován do tří jamek mikrotitrační destičky, vždy vedle sebe (Obr. 2.4Obr. 2.4). Do každé jamky bylo pipetováno 250,00 μl vzorku, aby bylo dosaženo stejné tloušťky vrstvy všech vzorků, jako u kalibračních standardů.

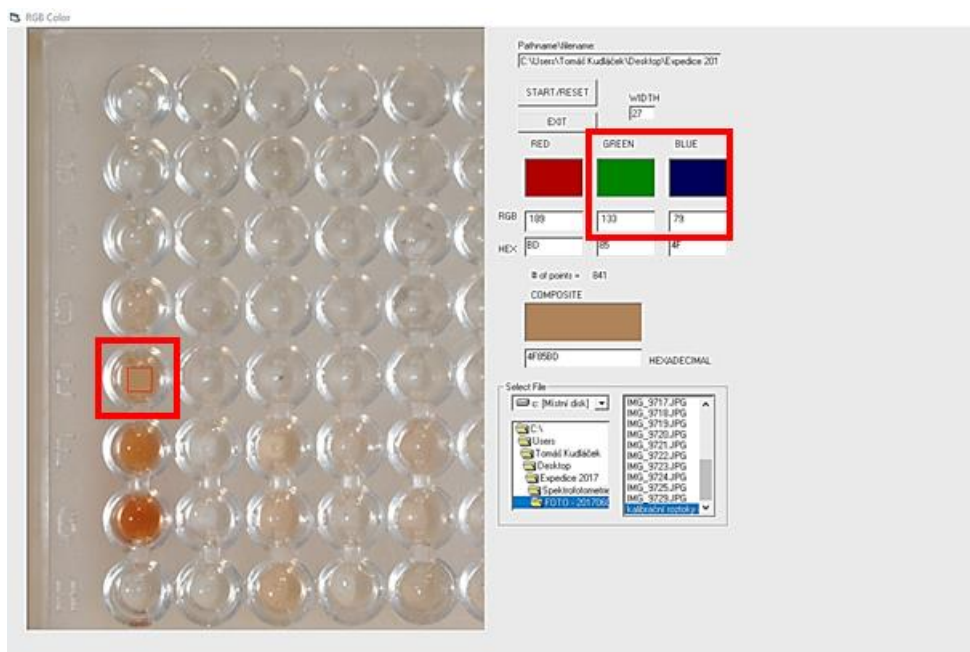


**Obr. 2.4** Znázornění několikanásobného pipetování vzorku do mikrotitrační destičky. X1 je první vzorek; X2 je druhý vzorek; X3 je třetí vzorek (počet vzorků není pevně stanovený, může se lišit u každého měření)

### **Zjištění intenzity barvy a výpočet koncentrace**

Po vyfocení vzorků byla fotografie nahrána do počítače. Zde byla vyhodnocena programem RGB Color (University of Nebraska, Medical Center), který může určit

intenzitu barev z RGB spektra. V programu byla manuálně vybrána co největší možná plocha z jamky v mikrotitrační destičce ve tvaru čtverce (Obr. 2.5). Program pak automaticky určil intenzitu modré (B) a zelené (G) barvy z této oblasti na stupnici od 0 do 255 (Obr. 2.5).



**Obr. 2.5** Snímek obrazovky programu RGB Color (University of Nebraska, Medical Center) pro vyhodnocení fotografie. Vlevo je s vyznačeno místo manuálního výběru bodu, ze kterého budou určovány intenzity barev. Nahoře vpravo je poté vyznačeno místo, kde se pod příslušnou barvou zobrazují automaticky určené intenzity barev z bodu vybraného vlevo na fotografii otevřené v programu.

Ze zjištěné intenzity v každém vzorku byla poté pomocí rovnice kalibrační přímky spočítána koncentrace železitých kationtů. Rovnice regrese je ve tvaru

$$y = ax + b \quad (2.5)$$

kde proměnná  $y$  je intenzita modré (B) nebo zelené (G) barvy, proměnná  $x$  je koncentrace analytu v roztoku [mg/l],  $a$  je směrnice a  $b$  je úsek. Proměnné  $x$  a  $y$  jsou k sobě přímo úměrné. Koncentrace analytu byla počítána pomocí vztahu vycházejícího z rovnice (2.5).

$$x = \frac{y - b}{a} \quad (2.6)$$

Každý pipetovaný vzorek byl vyhodnocován zvlášť podle intenzity modré (B) a zelené (G) barvy. Červený komplex totiž pohlcuje modrou a zelenou barvu. Čím větší je koncentrace železitých kationtů ve vzorku, tím má komplex intenzivnější červenou barvu - tím pádem více absorbuje modrou a zelenou barvu. Na základě

zjištěných intenzit barev bylo možné podle vztahů (2.5) a (2.6) stanovit koncentraci železitých kationtů ve vzorku.

Zjištěné obsahy analytu ve vzorcích byly statisticky zpracovány.

### **Statistické vyhodnocení**

Hodnoty, ze kterých bylo prováděno statistické vyhodnocení, byly vždy tři pro jeden vzorek (Obr. 2.4). Bylo možné, že statistické vyhodnocení bylo prováděno z menšího počtu zjištěných hodnot (<3) a to pokud byla nějaká z naměřených hodnot

- a. záporná (způsobenou chybou v měření),
- b. velmi odlehlá (posuzováno podle Deanova a Dixonova testu na odlehlost výsledků [3]).

Taková hodnota byla pak vyřazena a statistické vyhodnocení bylo prováděno pouze ze dvou. V případě možného použití jen jedné hodnoty nebylo statistické vyhodnocení prováděno. Za odlehlou hodnotu byla označena ta, která se od ostatních lišila v řádu desítek.

Ze zjištěných hodnot obsahu železitých kationtů ve vzorku byl vytvořen medián a zjištěna relativní směrodatná odchylka [%] spolu s intervalem spolehlivosti na hladině významnosti 95 %. K výpočtu byla použita metodika statistického zpracování podle [3].

Vypočítané mediány byly zaneseny do tabulek a zpracovány do sloupcových grafů, kde byly znázorněny chybové úsečky. Chybové úsečky byly vytvořeny z intervalů spolehlivosti.

Z výsledků a použitých kalibračních přímek pro dané měření byly zpětně stanoveny limity měření (LOD a LOQ).

*Přesná metodika práce použitá v roce 2017 je přiložena v Příloze IV.*

#### **2.2.4 Zjištěné problémy ovlivňující stanovení 2017 a jejich řešení**

Při práci bylo vyzkoušeno mnoho nastavení a metoda byla upravena oproti původnímu uspořádání (Příloha IV). Přesto byly výsledky zatížené velkou chybou, která byla nižší než 10 % jen v jednom případě [1] a navzájem se mezi sebou velmi lišily (první odběr v porovnání s kontrolním a s výsledky z minulých let, viz [1]) [1].

## ***Rozdílné světelné podmínky při měření***

V průběhu měření bylo ověřeno, že rozhodujícím aspektem při měření je světlo. To během měření nebylo stejné, protože se měnily venkovní světelné podmínky a nebylo zamezeno přístupu venkovního světla ke vzorkům. Proto bylo nutné, po přesné kalibraci, fotit připravené vzorky spolu s kalibračními standardy. Po vyfocení se z nové fotografie znovu vyhodnotila kalibrační přímka, ze které se zjišťovaly koncentrace železitých kationtů ve vzorcích.

Vliv na přesnost stanovení dále mohla mít špatná kvalita fotografie, kterou zapříčinilo nutné zvýšení citlivosti (ISO) (se kterou se zvýšil i digitální šum) kvůli špatnému světlu v laboratoři. Tento problém byl na místě řešen improvizovaným světelným podkladem. Pro tento podklad byly použity lampy Renkforce Merfy s výkonem 8 W se světelným zdrojem LED o teplotě barvy světla 4000 K, které byly dostupné v laboratoři. Zvolený zdroj světla byl bodový – to mohlo ovlivňovat výsledky měření. Bodové světlo je totiž ostré a nepokrývá tak velkou plochu. Proto bylo nutné opatřit zdroj světla matnicí. Ta byla nahrazena papírem. Zvolená forma matnice ale nevyhovovala kvůli papíru, který po prosvícení vykazoval různou hustotu a tedy i intenzitu bílé barvy.

Tento problém by mohl být řešen dvěma způsoby:

- a. matnicí, která dokáže rozptýlit světlo – na podkladu nebudou vidět prosvícené pigmenty a jednotlivé diody světla,
- b. světelným zdrojem, který nebude příliš ostrý nebo bodový.

Špatný světelný podklad ale může ovlivnit barevnost fotografie - což je nežádoucí (analýza se zakládá na intenzitě barvy). Při klasické spektrofotometrii se pracuje s monochromatickým zářením. V DSLR spektrofotometrii chybí monochromátor - není možné z polychromatického světla získat monochromatické záření. Proto by bylo dobré, aby podsvícený podklad (zdroj záření) byl co nejbližší monochromatickému záření.

## ***Pipetování vzorku do mikrotitrační destičky***

Další aspekt, který ovlivňoval výsledky měření, bylo pipetování vzorku do mikrotitrační destičky. V některých případech bylo pipetování chybné, kvůli nesprávné práci s pipetou. Vznikala tak různě silná vrstva vzorku v jednotlivých jamkách destičky. Větší množství vzorku představuje delší optickou dráhu, kterou paprsek světla musí projít – vzorek více absorbuje. To mělo jistě také za následek

rozdílné hodnoty intenzity barvy vzorku při vyhodnocování, následně pak nepřesné výsledky.

Tento problém by mohl být řešen využitím fixní automatické pipety, která vždy dávkuje stejný objem vzorku a případná chyba pipetování je tedy všude stejná.

### ***Optimální nastavení fotoaparátu***

Měření mohlo výrazně ovlivnit nastavení fotoaparátu. Vzhledem k tomu, že byly vzorky foceny na podsvíceném podkladu, měření a jeho výsledky mohlo velmi ovlivnit nastavení vyvážení bílé. Během analyzování vzorků byla vyzkoušena všechna přednastavená vyvážení bílé (nebylo využito možné „uživatelské nastavení vyvážení bílé“.), kterými u použitého fotoaparátu byla:

- a. „Denní světlo“ pro světlo o teplotě barvy cca 5200 K,
- b. „Stín“ pro světlo o teplotě barvy cca 7000 K,
- c. „Zataženo“ pro světlo o teplotě barvy cca 6000 K,
- d. „Wolframové světlo“ pro světlo o teplotě barvy cca 3200 K,
- e. „Bílé zářivkové světlo“ pro světlo o teplotě barvy cca 4000 K,
- f. „AWB“.

Při použití AWB už ale může docházet k barevným korekcím, které provádí sám přístroj. Tím může dojít k nežádoucí změně barev na fotografii oproti skutečnosti. Tento problém může být řešen manuálním nastavením vyvážení bílé -kalibrace podle bílých, černých a šedých kalibračních destiček.

Výsledky analýzy vzorků mohly být ovlivněny také dalším nastavením fotoaparátu. Tím byla především délka expozice snímku, clona a ISO.

Při vysoké cloně je nutné použít delší expoziční čas, a to může mít za následek rozmazání fotografie (při absenci stativu). Při delších expozičních časech také může docházet k přehřívání čipu, což může ovlivnit barevnost fotografie. Kratšího expozičního času lze dosáhnout zvýšením citlivosti (ISO). To má však negativní dopad na výslednou fotografii - barevný šum a snížení kvality, ztráta detailů.

Jedním z faktorů, které mohly také ovlivnit výsledky měření bylo nastavení *formátu fotografie*. V případě, že byl jako výchozí formát fotografie použit formát JPEG (angl. Joint Photographic Experts Group) docházelo k masivní softwarové úpravě fotky (zejména barevnosti) samotným fotoaparátem.



Tomu lze předejít zvolením formátu RAW, který fotografii vytvoří ze všech dat zachycených snímačem a neprovádí žádné softwarové úpravy (dále viz pododíl 2.3.2).

## **2.3 Základy práce s fotoaparátem**

### **2.3.1 Expozice**

Expozice snímku je *vystavení čipu fotoaparátu světlu*. Mj. expozice označuje celkové množství světla dopadajícího na snímač a z označení *správná expozice*, *podexpozice*, *přexpozice* lze odvodit, jak vypadá výsledná fotografie, co se týče světla. Udává se v EV (angl. Exposure Value). Expozice je ze strany fotoaparátu ovlivněna pouze třemi parametry – délkou expozice snímku, citlivostí (ISO) a clonou [7].

#### ***Přexponovaná fotografie***

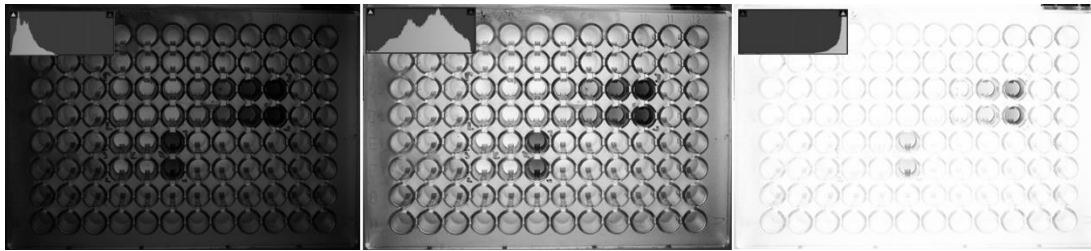
Přexponovanou fotografií bývá ta, která je příliš světlá – čip zachytil příliš mnoho světla. Na této fotografii mj. převládá obsah absolutní bílé, což ukazují histogramy fotografií. Místa s obsahem absolutní bílé jsou ta, kde chybí jakákoliv informace, kromě toho, že zde je absolutní bílá. Příkladem přexponované neboli přesvícené fotografie je Obr. 2.6 vpravo.

#### ***Správně exponovaná fotografie***

Za správně exponovanou fotografii je obvykle označována fotografie, která není ani příliš tmavá, ani příliš světlá. Většina zachycené scény svou expozicí odpovídá realitě. Příklad správně exponované fotografie viz Obr. 2.6 uprostřed.

#### ***Podexponovaná fotografie***

Podexponovanou fotografií je obvykle označována fotografie, která je příliš tmavá (k čipu se nedostal dostatek světla). Na této fotografii mj. převládá obsah absolutní černé, což ukazují histogramy fotografií. Místa s obsahem absolutní černé jsou ta, kde chybí jakákoliv informace, kromě toho, že zde je absolutní černá. Příklad podexponované fotografie viz Obr. 2.6 vlevo.



**Obr. 2.6** Podexpoze, správná expozece a přeexpoze snímku a histogramy ukazující obsah absolutní bílé/černé ve fotografii.

### **Exposure Value (EV)**

Při nastaveném expozičním čase 1 s, ISO 100 a cloně f/1.0 odpovídá 1 EV (expoziční stupeň/hodnota) 0 [8]. EV se měří na záporné logaritmické stupnici se základem 2 [8]. Zvýšení o 1 EV odpovídá polovině propuštěného světla. EV lze zjistit ze vztahu

$$EV = \log_2 \left( \frac{a^2}{t} \right) - \log_2 (ISO) \quad (2.7)$$

kde  $EV$  je expoziční stupeň,  $a$  je clonové číslo,  $t$  je expoziční čas [s] a  $ISO$  odpovídá zvolené citlivosti - číselné hodnotě nastavené na fotoaparátu [8].

### **2.3.2 Nastavení fotoaparátu**

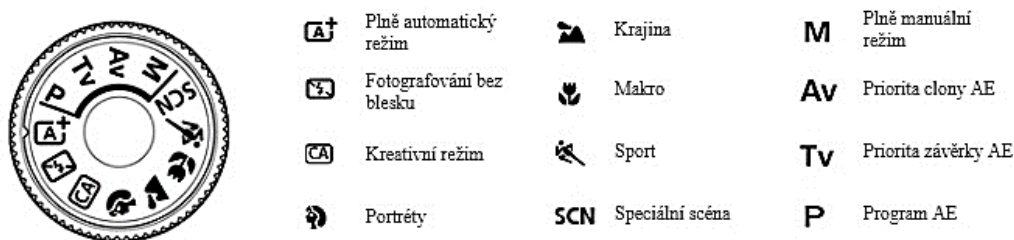
Nastavení fotoaparátu je jedním z faktorů, které ovlivňují výslednou fotografii. Fotografii mimo jiné ovlivňují i objektivy a těla fotoaparátů a jejich snímače.

Při nastavování fotoaparátu je volen *režim fotografování*. Ten ovlivňuje, jak moc nastavení fotoaparátu ovlivní fotograf nebo přístroj. Při zvoleném *manuálním režimu* vše nastavuje fotograf sám. Nastavení fotoaparátu může být voleno tak, aby fotografie odpovídala realitě nebo fotografickému záměru. Mezi tato nastavení, která jsou odlišná u fotoaparátů různých značek i typů, patří tato základní:

- a. délka expozece snímku,
- b. clona,
- c. ISO,
- d. vyvážení bílé,
- e. režim autofocusu,
- f. picture style.

## Režim fotografování

Režimy fotografování bývají standardně voleny na kruhovém voliči režimů (Obr. 2.7). V tom jsou výšečí odděleny *poloautomatické* a *plně manuální režimy* od *plně automatických režimů*.



Obr. 2.7 Volič režimů na fotoaparátu Canon EOS 100D s vysvětlivkami. (Tomáš Kudláček)

## Nastavení volená při plně manuálním režimu

### Délka expozice snímku

Expoziční čas snímku (čas/délka expozice) je udáván v sekundách nebo jejich zlomcích. Expoziční čas udává, jak dlouho je otevřena závěrka zařízení - tedy jak dlouho světlo dopadá na snímač. Čas ovlivňuje podmínky fotografování - jestli je možné držet fotoaparát v ruce nebo je nutné použít stativ. Délka otevření závěrky také ovlivňuje, jestli bude fotografie podexponovaná (tmavá), přexponovaná (příliš světlá) nebo jestli bude expozice správná. Délka expozičního času pro správnou expozici závisí na množství světla na fotografované scéně, cloně a citlivosti (ISO). Delší expoziční časy mohou v důsledku přehřívání čipu způsobovat vznik náhodných chyb záznamu.

### Clona

Jeden ze tří nejdůležitějších parametrů při expozici snímku. Reguluje průchod světla ke snímači fotoaparátu (určuje světelnost objektivu<sup>4</sup>). Spolu s expozičním časem ovlivňuje to, jestli bude fotografie příliš tmavá (podexponovaná), světlá (přexponovaná), nebo jestli bude svou expozicí odpovídat realitě. Pokud je nastaven jeden expoziční čas a je měněna velikost clony, platí že čím větší clona (menší otvor)

<sup>4</sup>**Světelnost objektivu** – Nejnižší clonové číslo, které je možné nastavit na objektivu. Světelnost u objektivů s proměnnou ohniskovou vzdáleností se liší při různých ohniskových vzdálenostech.

tím tmavší fotografie a naopak. Clona ovlivňuje hloubku ostrosti snímku - míra rozostření popředí/pozadí (hloubku ostrosti mj. ovlivňuje ohnisková vzdálenost<sup>5</sup>) (Tab. 2.3).

**Tab. 2.3** Změna hloubky ostrosti při změně jednotlivých parametrů při fotografování (upraveno podle fotoroman.cz)

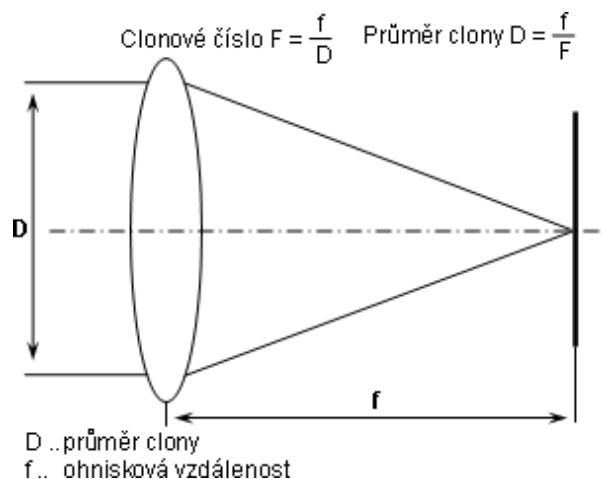
parametr	zvýšení hloubky ostrosti	snížení hloubky ostrosti
clonové číslo	↑	↓
vzdálenost od objektu	↑	↓
ohnisková vzdálenost	↓	↑

Velikost clony je udávána clonovým číslem. To je zjišťováno ze vztahu

$$F = \frac{f}{d} \quad (2.8)$$

kde  $F$  je clonové číslo,  $f$  je ohnisková vzdálenost objektivu a  $d$  je průměr otvoru clony.

Vzájemná závislost parametrů je graficky znázorněna níže (Obr. 2.8).



**Obr. 2.8** Znázornění veličin ze vzorce pro výpočet clonového čísla. (Převzato z fotoroman.cz)

Clona je umístěna v objektivu mezi čočkami - neomezuje pak zorné pole. Většinou se jedná o irisovou clonu, která se skládá z několika lamel (Obr. 2.9).

<sup>5</sup>**Ohnisková vzdálenost** - Vzdálenost čočky objektivu od jejího ohniska. Její poměr s velikostí snímače určuje zorný úhel záběru. Ohnisková vzdálenost je udávána v milimetrech. Podle ohniskové vzdálenosti jsou objektiv děleny do různých kategorií.



Obr. 2.9 Schéma lamelové (irisové) clony. (Převzato z kvd.zcu.cz)

## ISO

ISO je citlivost obrazového snímače na světlo. Čím vyšší je ISO, tím vyšší je citlivost snímáče na světlo a obráceně. Vyšší citlivost bývá používána při fotografování za zhoršených světelných podmínek při absenci stativu - vyšší citlivost umožňuje použití kratších expozičních časů. Zvýšená hodnota ISO může mít za následek snížení kvality fotografie - na fotografii se objeví šum, dojde ke ztrátě detailů, ostrosti a ostrých barevných přechodů.

Ovlivnění kvality fotografie zvýšením citlivosti záleží na fotoaparátu a jeho snímáči. U fotoaparátů s většími snímáči s větším rozlišením nemá zvýšení citlivosti za následek příliš velké zhoršení kvality.

## Vyvážení bílé, picture style

Vyvážení bílé a režimy picture style ovlivňují barevnost fotografie. Vyvážení bílé ovlivňuje teplotu barev fotografie. Picture style ovlivňuje tónování a podání barev fotografie vč. kontrastu a ostrosti. Jedná se o předvolené sady parametrů - je možné i jejich uživatelské upravení.

## **Formát pro ukládání fotografie**

Existuje mnoho různých typů souborů, do kterých lze uložit fotografii. Mezi nejznámější a téměř standardně využívané formáty patří formát JPEG a tzv. RAW.

## JPEG

Jedná se o nejrozšířenější formát, do kterého se fotografie ukládají ztrátovou kompresí. Byl navržen především pro publikování fotografií na webu. Tím pádem se do něj fotografie ukládají tak, aby měl výsledný soubor co nejmenší možnou velikost. Kompresie může vést ke zhoršení kvality fotografie, obzvláště při opakovaném ukládání jedné fotografie do JPEGu může fotografie degradovat.

Díky kompresi fotografie pak ztrácí detaily a jednotlivé pixely mohou být spojovány ve větší - tím pádem pak pixely s různými odstíny barev mohou být zkomprimovány do jednoho pixelu s jiným odstínem barvy.

## RAW

RAW není označení konkrétního typu souboru ale skupiny souborů, jejichž názvy se liší dle výrobce [9]. Tento soubor (fotografie) obsahuje minimálně zpracovaná data zachycená senzorem fotoaparátu a metadata snímku [10]. S formátem RAW nelze pracovat v žádném programu a je proto nutné ho konvertovat do jiného formátu („vyvolat ho“).

Od formátu JPEG se liší tím, že sám o sobě při ukládání neprovádí v těle fotoaparátu žádnou kompresi - tu provádí až uživatel při zpracování fotografie a má tedy nad kompresí/konverzí plnou kontrolu [9, 10]. Obecně RAW obsahuje více nezpracovaných dat oproti JPEGu a tím pádem také umožňuje větší úpravy fotografie v grafickém programu, než je tomu u formátu JPEG [9, 10].

Formát RAW má navíc větší „barevnou/bitovou hloubku<sup>6</sup>“ oproti JPEGu - více zachycených odstínů jedné barvy. Tyto barvy jsou bez komprese, kterou JPEG provádí při ukládání fotografie. Vzhledem k tomu, že RAW soubor není nijak komprimovaný, je tím pádem také větší, než běžný JPEG.

---

<sup>6</sup>**Bitová hloubka** –Někdy také „barevná hloubka“ je číslo, vyjadřující počet odstínů určité barvy přítomné ve fotografii. Uvádí se jako mocnina čísla 2, tím pádem 12 bitová fotografie obsahuje 4096 ( $2^{12}$ ) odstínů jedné konkrétní barvy (v případě černobílé fotografie 4096 odstínů šedé).

## 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1 Použité chemikálie, nástroje a zařízení

Při měření byly použity chemikálie

- a. CRM<sup>7</sup> dusičnanu železitého v 0,5M kys. dusičné o koncentraci 1000±2 mg/l (Merck KGaA),
- b. 10% roztok thiokyanatanu draselného čistoty p. a. (Penta),
- c. chlorid kobaltnatý hexahydrát čistoty p. a..

Tyto byly v některých případech ředěny na jiné koncentrace (viz tabulky přiložené k postupům práce v konkrétních částech textu).

Při přípravě standardů pak bylo použito klasické laboratorní sklo a automatická nastavitelná pipeta o objemu dávkování od 100 µl do 1000 µl s příslušnými špičkami.

Stanovování koncentrací bylo prováděno

- a. spektrofotometrem HP 8453 (Hewlett Packard),
- b. digitálním zrcadlovým fotoaparátem Canon EOS 100D (Canon Inc.) s objektivem s proměnlivou ohniskovou vzdáleností Canon Zoom Lens EF-S 18 - 55 mm f/3.5-5.6 IS STM (Canon Inc.),
- c. mobilním telefonem iPhone 5S (Apple Inc.)

v kombinaci se softwary Adobe Photoshop CS6 (Adobe Systems), RGB Color (University of Nebraska, Medical Center), Microsoft Office Excel 2016 (Microsoft Corporation) a Origin 8 (OriginLab Corp.).

### 3.2 Hypotetické problémy provádění stanovení v roce 2017

Tato kapitola rozebírá možné problémy, definované během rešeršní části předložené práce, které mohly ovlivňovat stanovení prováděná v roce 2017 a jejich výsledky. Pořadí uvedených problémů nijak nesouvisí s jejich významností.

#### ***Šum okolo jamek mikrotitrační destičky***

Čip fotoaparátu snímá kromě plochy jamek s analyzovaným vzorkem také plochu okolo jamek na mikrotitrační destičce. Okolo jamek bývá většinou šum, který ve

---

<sup>7</sup>CRM - Certifikovaný referenční materiál

výsledné fotografii může ovlivňovat barevnost roztoku (např. odražením atp.). To by mohlo mít za následek chybné výsledky.

## Postup práce

Pro ověření bylo připraveno celkem 6 standardů o různých koncentracích vč. blanku. Standardy byly připraveny ze zásobního roztoku dusičnanu železitého, thiokyanatanu draselného a z deionizované vody. Podíl jednotlivých roztoků ve standardech viz Tab. 3.1. Do příslušné koncentrace standardu byl pak dusičnan železitý s 200  $\mu\text{l}$  thiokyanatanu draselného naředěn deionizovanou vodou po rysku v odměrné baňce. Aby mohl být objem dusičnanu železitého dávkován jednou pipetou (kvůli předpokládané chybě dávkování), byly roztoky připraveny podle Tab. 3.1 v různé velkých odměrných baňkách.

**Tab. 3.1** Podíl jednotlivých roztoků v použitých standardech při ověřování problému s šumem okolo mikrotitrační destičky

označení standardu	c [mg/l]	$V_{\text{Fe}(\text{NO}_3)_3}$ [ $\mu\text{l}$ ]	$V_{\text{KSCN}}$ [ $\mu\text{l}$ ]	$V_{\text{celkem}}$ [ml]
0 (blank)	0,00	0	200	5,00
1	5,00	125	200	25,00
2	10,00	100	200	10,00
3	20,00	100	200	5,00
4	40,00	200	200	5,00
5	80,00	400	200	5,00

Od každého standardu poté bylo automatickou nastavitelnou pipetou pipetováno 250  $\mu\text{l}$  do jamek mikrotitrační destičky. Pod tu byl ze spodu přilepen bílý papír jako matnice. Celá destička i s „matnicí“ byla uchycena do stojanu ve výšce cca 10 cm od pracovní plochy, na které ležela LED svítidla - tou byla destička prosvícena. Nad mikrotitrační destičkou byl umístěn fotoaparát, který byl uchycen do stativu s vyosenou středovou tyčí. Standardy v jamkách poté byly vyfoceny

- poprvé s papírem zamaskovanými okolními jamkami,
- podruhé bez zamaskovaných okolních jamek.

Fotografie byly vyfoceny v těsném sledu se stejným nastavením fotoaparátu (viz Tab. 3.2)



**Tab. 3.2** Nastavení fotoaparátu během ověřování problému s šumem okolo mikrotitrační destičky

parametr	nastavení
Délka expozice snímku	1/50 sec
Clonové číslo	f/5.6
ISO (citlivost)	100
WB	Bílé zářivkové světlo (cca 4000 K)
Picture style	F (věrný)
Ohnisková vzdálenost	55 mm

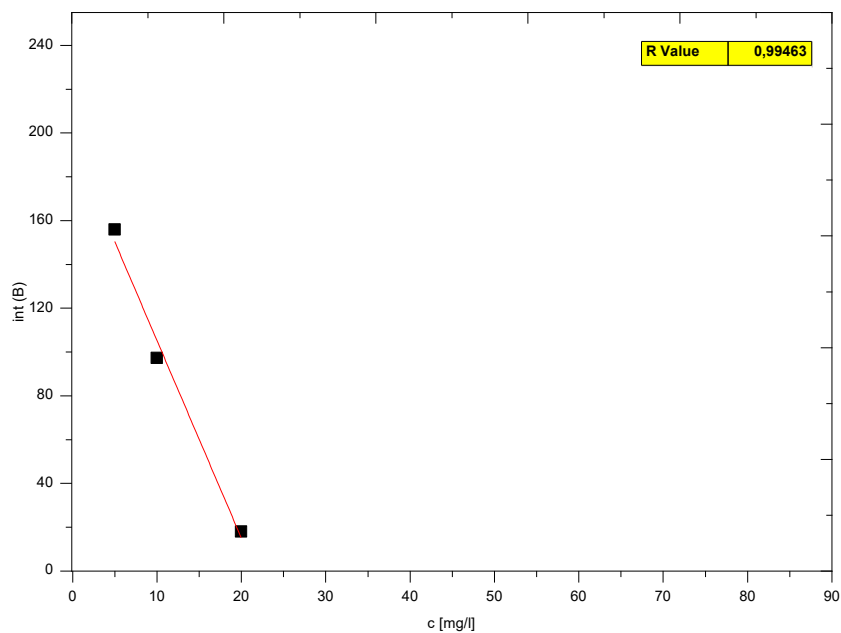
Obě fotografie byly následně nahrány do počítače, kde byla v programu RGB Color z každého standardu v obou případech zjištěna desetkrát intenzita modré (B) a zelené (G) barvy. Zjištěné hodnoty byly zprůměrovány a byly z nich sestaveny čtyři kalibrační přímky - vždy dvě za modrou (B) a zelenou (G) (jedna podle intenzit z fotografie se zamaskovaným okolím a druhá z fotografie bez zamaskování).

### Vyhodnocení

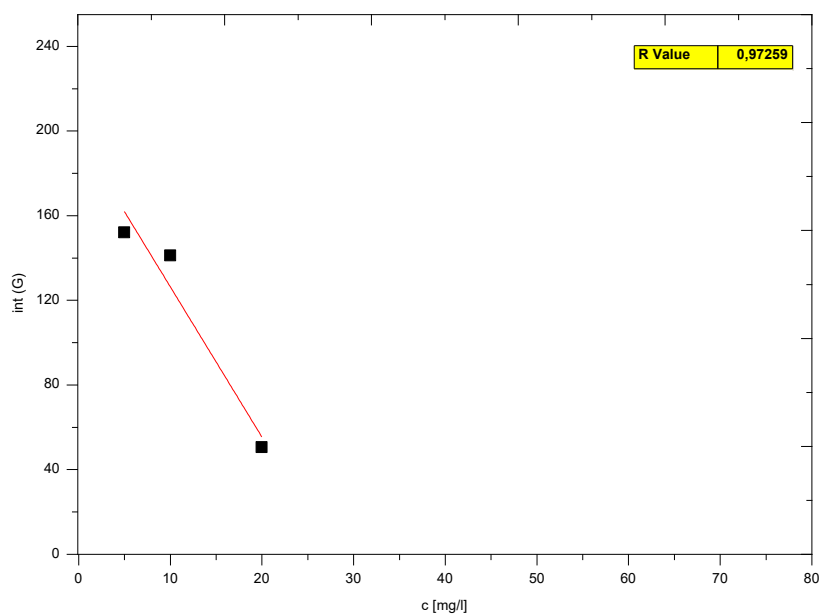
Ze zjištěných intenzit barev (Tab. 3.3 a Tab. 3.4) byly sestaveny kalibrační přímky podobně jako při práci v roce 2017 (viz pododdíl 2.2.3). Vyhodnocení toho, zda je lepší při měření použít papír jako vymaskování okolí jamek probíhalo na základě citlivosti<sup>8</sup> metody podle konkrétní přímky a podle indexu korelace  $R$  dané kalibrační přímky (citlivost lze určit ze strmosti kalibrační přímky nebo ze směrnice  $a$  v rovnici kalibrace).

<sup>8</sup>**Citlivost** je míra schopnosti detekčního zařízení (v tomto případě spektrofotometru nebo fotoaparátu s počítačem) zaznamenat rozdíl v koncentraci analytu.

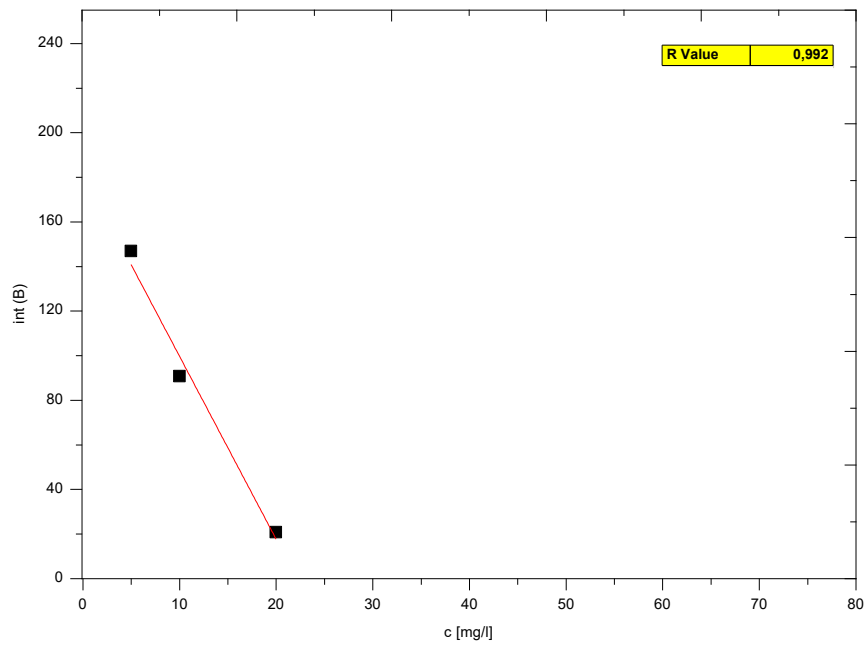
(<https://web.vscht.cz/~poustkaj/APPP%20Charakteristiky%20analytickych%20metod.pdf>)



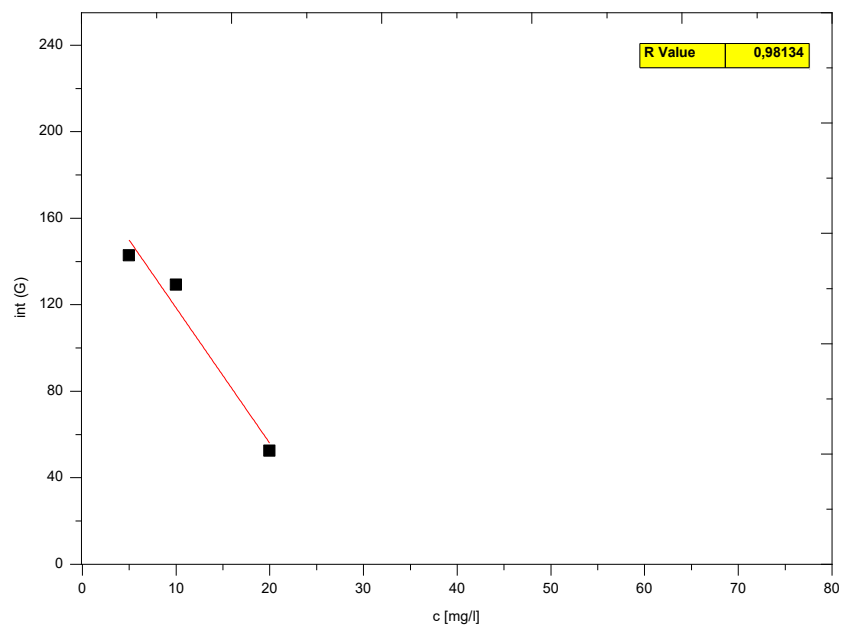
**Obr. 3.1** Kalibrační přímka sestavená podle intenzit modré (B) barvy zjištěných na fotografii pořízené s vymaskovaným okolím jamek destičky.  
 Index korelace  $R$  kalibrační přímky: 0,99463  
 Rovnice kalibrace:  $y = -9,0129x + 195,45$



**Obr. 3.2** Kalibrační přímka sestavená podle intenzit zelené (G) barvy zjištěných na fotografii pořízené s vymaskovaným okolím jamek destičky.  
 Index korelace  $R$  kalibrační přímky: 0,97259  
 Rovnice kalibrace:  $y = -7,1x + 197,4$



**Obr. 3.3** Kalibrační přímka sestavená podle intenzit modré (B) barvy zjištěných na fotografii pořízené bez vymaskovaného okolí jamek destičky.  
 Index korelace R kalibrační přímky: 0,992  
 Rovnice kalibrace:  $y = -8,2057x + 181,8$



**Obr. 3.4** Kalibrační přímka sestavená podle intenzit zelené (G) barvy zjištěných na fotografii pořízené bez vymaskovaného okolí jamek destičky.  
 Index korelace R kalibrační přímky:  
 Rovnice kalibrace:  $y = -6,2629x + 181,2$

**Tab. 3.3** Zjištěné intenzity modré (B) barvy a jejich aritmetické průměry při zamaskovaném okolí jamek a nezamaskovaném okolí jamek

intenzita B, maskování okolo jamky ANO						
označení hodnoty/ standard	1	2	3	4	5	6
1	133	149	100	18	6	2
2	127	161	101	17	5	3
3	141	155	90	18	6	2
4	133	148	99	19	5	2
5	129	163	93	19	5	2
6	143	157	97	16	5	3
7	128	159	101	18	4	2
8	135	158	101	19	5	2
9	146	160	94	18	6	2
10	138	148	96	17	4	2
<b>průměrná hodnota</b>	<b>135,3</b>	<b>155,8</b>	<b>97,2</b>	<b>17,9</b>	<b>5,1</b>	<b>2,2</b>

intenzita B, maskování okolo jamky NE						
označení hodnoty/ standard	1	2	3	4	5	6
1	122	140	98	22	8	4
2	120	139	95	21	7	4
3	120	139	86	19	7	4
4	132	149	83	20	6	4
5	117	152	89	22	6	4
6	128	149	90	20	6	4
7	117	155	82	19	5	6
8	123	144	95	21	6	5
9	135	155	95	22	7	4
10	126	146	94	21	6	5
<b>průměrná hodnota</b>	<b>124</b>	<b>146,8</b>	<b>90,7</b>	<b>20,7</b>	<b>6,4</b>	<b>4,4</b>

**Tab. 3.4** Zjištěné intenzity zelené (G) barvy a jejich aritmetické průměry při zamaskovaném okolí jamek a nezamaskovaném okolí jamek

intenzita G, maskování okolo jamky ANO						
označení hodnoty / standard	1	2	3	4	5	6
1	104	145	142	56	17	4
2	100	159	146	15	14	4
3	112	151	134	52	16	4
4	108	144	146	59	13	3
5	101	160	140	58	13	3
6	113	153	138	51	15	4
7	100	156	137	51	12	4
8	106	154	143	59	13	3
9	116	158	141	51	14	3
10	109	141	144	53	13	3
<b>průměrná hodnota</b>	<b>106,9</b>	<b>152,1</b>	<b>141,1</b>	<b>50,5</b>	<b>14,11</b>	<b>3,5</b>

intenzita G, maskování okolo jamky NE						
označení hodnoty / standard	1	2	3	4	5	6
1	94	140	140	56	17	4
2	94	134	136	56	15	4
3	95	133	124	49	15	4
4	103	145	123	50	14	4
5	93	149	132	51	13	4
6	102	145	130	47	15	4
7	91	150	120	49	11	6
8	96	139	135	55	12	5
9	106	151	128	56	15	4
10	100	142	124	55	13	3
<b>průměrná hodnota</b>	<b>97,4</b>	<b>142,8</b>	<b>129,2</b>	<b>52,4</b>	<b>14</b>	<b>4,2</b>

## Zhodnocení a diskuze

Samotné zamaskování okolí jamek na stanovení vliv nemá. Papírem totiž během měření stále světlo procházelo. Papír kromě toho mohl světlo odrážet do jamek, což by mohlo výsledky více ovlivnit.

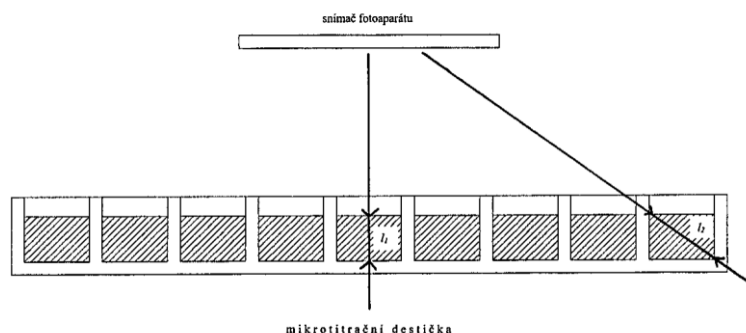
Tomu by bylo možné zabránit použitím černého papíru – tím by se eliminoval šum bílé barvy, který stanovení teoreticky ovlivnit může a zároveň by nedošlo k možnému odrazu světla do jamek destičky.

Během ověřování problému byly zjištěny problémy

- se sestavováním kalibrační přímky, a to zda-li jsou chyby při sestavování kalibrace způsobeny přípravou standardů nebo vyhodnocením. Tento je řešen dále v oddílu 3.3.
- s určováním přesnosti kalibrace podle koeficientu determinace  $R^2$ , který byl použit v roce 2017 [1].

### ***Dráha světla k čipu fotoaparátu skrz jamky na okraji a uprostřed destičky***

Z Lambert-Beerova zákona (2.1) (viz pododíl 2.1.1) je patrné, že zjištění koncentrace analytu ve vzorku závisí na délce absorbujícího prostředí  $l$  [cm]. Při měření klasickou spektrofotometrií je vzorek umístěn do standardních kyvet. U nich je tloušťka zpravidla neměnná. V případě DSLR spektrofotometrie je vzorek umístěn v jamkách mikrotitrační destičky. Dráha světla skrz jamky se vzorkem k detektoru (čipu fotoaparátu) se ale liší - dráha světla procházející skrz jamku uprostřed destičky je kratší než dráha světla procházející skrz jamku na kraji destičky (Obr. 3.5).



**Obr. 3.5** Schéma rozdílu délky dráhy světla mezi různě vzdálenými jamkami v mikrotitrační destičce.  $l_1$  je dráha světla skrz vzorek umístěný uprostřed destičky naproti snímači a  $l_2$  je dráha světla skrz vzorek umístěný na okraji destičky.

Je možné, že tento problém není pro měření zásadní z hlediska velikosti možných odchylek (pokud jsou zjistitelné DSLR spektrofotometrickým stanovením).

## Postup práce

Problém byl ověřován na standardním roztoku připraveném v 5ml baňce o koncentraci železa 10 mg/l. Standard byl připraven ze zředěného zásobního roztoku dusičnanu železitého o výsledné koncentraci 50 mg/l, thiokyanatanu draselného a z deionizované vody. Podíl jednotlivých roztoků ve standardu viz Tab. 3.5:

**Tab. 3.5** Podíl jednotlivých roztoků ve standardu použitém při ověřování problému s délkou dráhy světla skrz jamky destičky

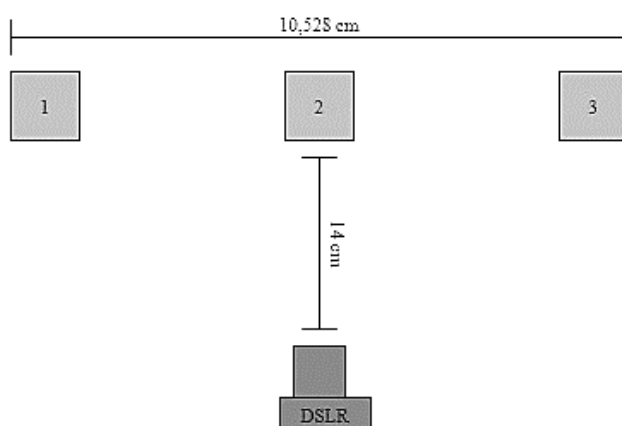
c [mg/l]	$V_{\text{Fe}(\text{NO}_3)_3}$ [ $\mu\text{l}$ ]	$V_{\text{KSCN}}$ [ $\mu\text{l}$ ]	$V_{\text{celkem}}$ [ml]
10,00	1000	200	5,00

Standard byl následně rozdělen do tří spektrofotometrických kyvet, tak aby bylo ve všech kyvetách přibližně stejné množství standardu (na množství v tomto případě nezáleželo, jelikož byly kyvety fotografovány z boku, kde je tloušťka neměnná, a ne z vrchu, kde je tloušťka absorbujiícího prostředí podmíněna množstvím standardu). Kyvety poté byly umístěny před filtrační papír v rozestupech 3, 404 cm (viz Obr. 3.6), což je ve výsledku stejná vzdálenost jako mezi krajními jamkami mikrotitrační destičky (od levého okraje kyvety 1 k pravému okraji kyvety 3).

Uspořádané kyvety byly vyfoceny, přičemž prostřední z nich byla umístěna přímo naproti objektivu fotoaparátu ve vzdálenosti 14 cm od přední čočky objektivu (viz Obr. 3.6). Během fotografování nebyly kyvety podsvíceny. Nastavení fotoaparátu bylo:

**Tab. 3.6** Nastavení fotoaparátu během ověřování problému s délkou dráhy světla skrz jamky destičky

parametr	nastavení
Délka expozice snímku	1/50 sec
Clonové číslo	f/3.5
ISO (citlivost)	100
WB	Bílé zářivkové světlo (cca 4000 K)
Picture style	F (věrný)
Ohnisková vzdálenost	18 mm



**Obr. 3.6** Schéma vzdálenosti vzorků v květech od čočky objektivu fotoaparátu a vzdálenost od vnějších okrajů krajních květů.

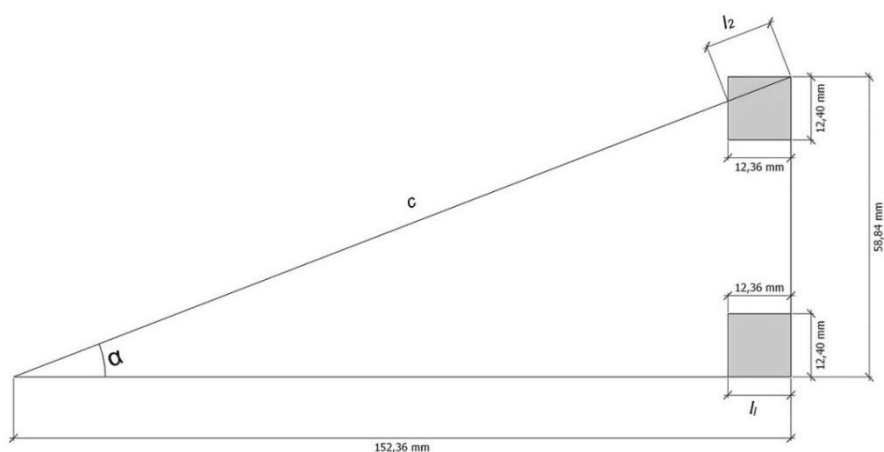
## Vyhodnocení

Fotografie poté byla vyhodnocena v počítači. V programu RGB Color byla v každé květi desetkrát odečtena intenzita modré (B) a zelené (G) barvy.

Ze standardu v každé květi byla v programu RGB Color celkem desetkrát zjištěna intenzita modré (B) a zelené (G) barvy. Ze zjištěných hodnot byly vždy dvě aritmeticky zprůměrovány. Tyto průměry (5 hodnot) poté byly statisticky vyhodnoceny (viz Tab. 3.7). Na základě intervalu spolehlivosti byl zhodnocen vliv na stanovení při fotografování vzorků v mikrotitrační destičce.

Zároveň byla vypočítána optická dráha skrze prostřední a krajní květu. Pro výpočet byl výchozím náčrt na Obr. 3.7





**Obr. 3.7** Schéma délky optických drah skrze kyvety k přední čočce objektivu fotoaparátu

$$\cos(\alpha) = \frac{152,36}{c} = \frac{152,36}{163,3270192} = 0,9328523887 \quad (3.1)$$

$$\cos^{-1}(0,9328523887) = \alpha = 21,11609219^\circ \quad (3.2)$$

$$\cos(\alpha) = \frac{12,36}{x} = 0,9328523887 \quad (3.3)$$

$$\cos(\alpha) = \frac{12,36}{0,9328523887} = x = 13,24968468 \quad (3.4)$$

$$\Delta_l = 13,24968468 - 12,36 \quad (3.5)$$

$$\Delta_l = 0,8896846765 \quad (3.6)$$

Rozdíl mezi optickými dráhami  $l_1$  a  $l_2$  byl po zaokrouhlení 0,8897 mm. Optická dráha  $l_2$  tedy byla o 0,1010 % delší než optická dráha  $l_1$ .

**Tab. 3.7** Zprůměrované hodnoty intenzit barev se statistickým vyhodnocením zjištěné při ověřování problému s délkou dráhy světla skrze jamky destičky

označení hodnot	intenzita B			intenzita G		
	kyveta 1	kyveta 2	kyveta 3	kyveta 1	kyveta 2	kyveta 3
1	38,5	41	40,5	92	99	95
2	41,5	41	41,5	96,5	99	96,5
3	42,5	41,5	43,5	97	100	96,5
4	43,5	42	44	97	102	97,5
5	45,5	42,5	44,5	98	105	99
<b>medián</b>	<b>42,50</b>	<b>41,50</b>	<b>43,50</b>	<b>97,00</b>	<b>100,00</b>	<b>96,50</b>
<b>L<sub>1,2</sub></b>	<b>3,57</b>	<b>0,77</b>	<b>2,04</b>	<b>3,06</b>	<b>3,06</b>	<b>2,04</b>
<b>S<sub>r</sub> [%]</b>	<b>7,08</b>	<b>1,55</b>	<b>3,95</b>	<b>2,66</b>	<b>2,58</b>	<b>1,78</b>

Ke každému mediánu intenzity dané barvy byl připočten nebo odečten příslušný interval spolehlivosti ( $L_1, 2$ ). Základním předpokladem bylo následující očekávání: Pokud budou výsledky všech tří kyvet stejné (jejich odchylky budou statisticky nevýznamné), nemá delší optická dráha krajních kyvet na stanovení vliv. Tento předpoklad se potvrdil (viz Tab. 3.7).

## Zhodnocení a diskuze

Tento problém tedy na stanovení vliv nemá., neboť koncentrace prostřední kyvety se statisticky neliší od koncentrací krajních kyvet (po započítání intervalů spolehlivosti koncentrace střední kyvety zahrnuje koncentrace krajních kyvet). Odlišné hodnoty jsou v rámci možné statistické odchylky měření. Ta v tomto případě byla vždy nižší než 5 % (viz Tab. 3.7), kromě jediného případu, kdy byla RSD 7,08 %. Výpovědní hodnotu pro zhodnocení vlivu na stanovení mají intervaly spolehlivosti ( $L_1, 2$ ), RSD ukazují pouze přesnost měření.

### ***Nežádoucí barevné reakce thiokyanatanu draselného***

Při reakci thiokyanatanu draselného s železitými kationty se roztok zbarví do červena. Thiokyanatan draselný ale také při reakci s kobaltnatými kationty vytváří modrý komplex. Ve vodách zkoumaných v roce 2017 se podle dat z let 2009 a 2011 [5] vyskytovaly stopy kobaltu, který by mohl mít za následek falešně pozitivní výsledky (= větší odezva komplexu při stanovení, ale neodpovídá jí koncentrace železitých kationtů).

Část thiokyanatanu draselného také mohla zreagovat s kobaltem a snížit tak výslednou intenzitu modré (B) a zelené barvy (G).

## Postup práce

Pro ověření problému byly vytvořeny dvě sady standardů - jedna, ve které připravené standardy obsahovaly kromě železitých kationtů také kobaltnaté kationty a druhá, jejíž standardy byly připraveny bez kobaltnaté soli. Standardy obsahující kobalt byly připraveny podle Tab. 3.8 standardy bez kobaltu byly připraveny podle Tab. 3.9

Standardy byly připraveny ze zásobních roztoků dusičnanu železitého, hexahydrátu chloridu kobaltnatého (koncentrace v jednotlivých standardech viz Tab. 3.8 a Tab. 3.9), z thiokyanatanu draselného a deionizované vody.

Z každého standardu poté bylo automatickou nastavitelnou pipetou právě 250  $\mu$ l do jamek mikrotitrační destičky.

Destička pak byla vyfocena fotoaparátem nastaveným podle Tab. 3.10 a následně vyhodnocena v programu Adobe Photoshop (důvod použití tohoto programu místo softwaru RGB Color, který byl použit v roce 2017, je popsán v oddílu 3.3). Destička byla při fotografování podsvícena LED videosvětlem, které od ní bylo vzdáleno 16 cm. Destička byla umístěna na matnici vytvořené ze dvou laminovacích fólií formátu A6 a 1mm čirého plexiskla stejného rozměru. Objektiv fotoaparátu byl na destičku umístěn kolmo ve vzdálenosti 14 cm mezi destičkou a přední čočkou objektivu.

**Tab. 3.8** Podíl jednotlivých roztoků a činidel při přípravě standardů s obsahem kobaltu při ověřování hypotetického problému s nežádoucími barevnými reakcemi thiokyanatanu draselného

označení standardu	c Fe <sup>+3</sup> [mg/l]	V <sub>Fe(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub></sub> [ml]		V <sub>CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O</sub> [ml]		V <sub>KSCN</sub> [μl]	V <sub>celkem</sub> [ml]
		c = 1000 mg/l	c = 50 mg/l	c = 1000 mg/l	c = 50 mg/l		
0 (blank)	0,00	-	0,0	-	0,0	400	5,00
1	1,00	-	0,5	-	0,5	400	25,00
2	2,00	-	1,0	-	1,0	400	25,00
3	5,00	-	1,0	-	1,0	400	10,00
4	10,00	-	2,0	-	2,0	400	10,00
5	20,00	-	4,0	-	4,0	400	10,00
6	50,00	0,5	-	0,5	-	400	10,00

**Tab. 3.9** Podíl jednotlivých roztoků a činidel při přípravě standardů bez obsahu kobaltu při ověřování hypotetického problému s nežádoucími barevnými reakcemi thiokyanatanu draselného

označení standardu	c [mg/l]	V <sub>Fe(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub></sub> [ml]		V <sub>KSCN</sub> [μl]	V <sub>celkem</sub> [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

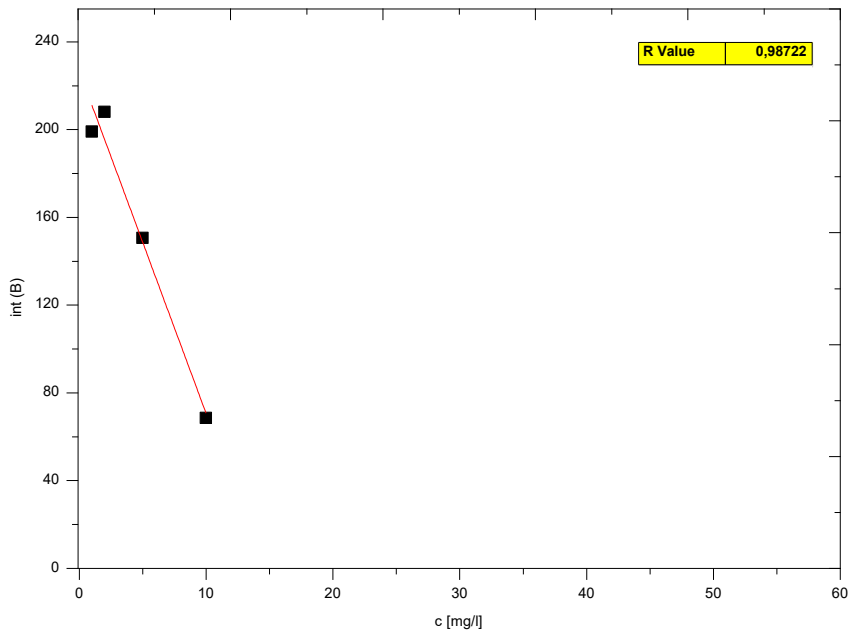
**Tab. 3.10** Nastavení fotoaparátu při ověřování problému nežádoucích barevných reakcí thiokyanatanu draselného.

parametr	nastavení
Délka expozice snímku	1/125 sec
Clonové číslo	f/6.3
ISO (citlivost)	100
WB	Wolframové světlo (cca 3200 K)
Picture style	S (standardní)
Ohnisková vzdálenost	18 mm

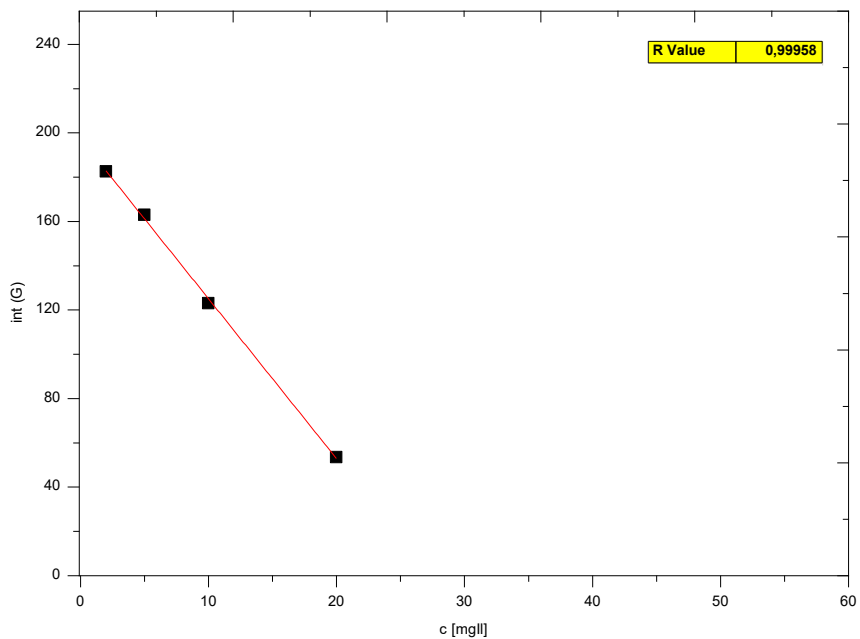
## Vyhodnocení

Z každého standardu byla právě šestkrát zjištěna intenzita barev modré (B) a zelené (G). Z těchto šesti hodnot byl vytvořen medián, ze kterých pak byly vytvořeny bodové grafy. Ty byly proloženy přímkou a body, které neležely na přímce, byly odstraněny. Na základě vytvořených kalibračních přímek (viz Obr. 3.8, 3.9, 3.10, 3.11) byly porovnávány rozdíly v citlivosti metody podle jednotlivých kalibračních přímek. Kalibrační přímky mezi sebou byly porovnány také z hlediska přesnosti, kterou definuje index korelace  $R$  a z hlediska koncentračního rozsahu.

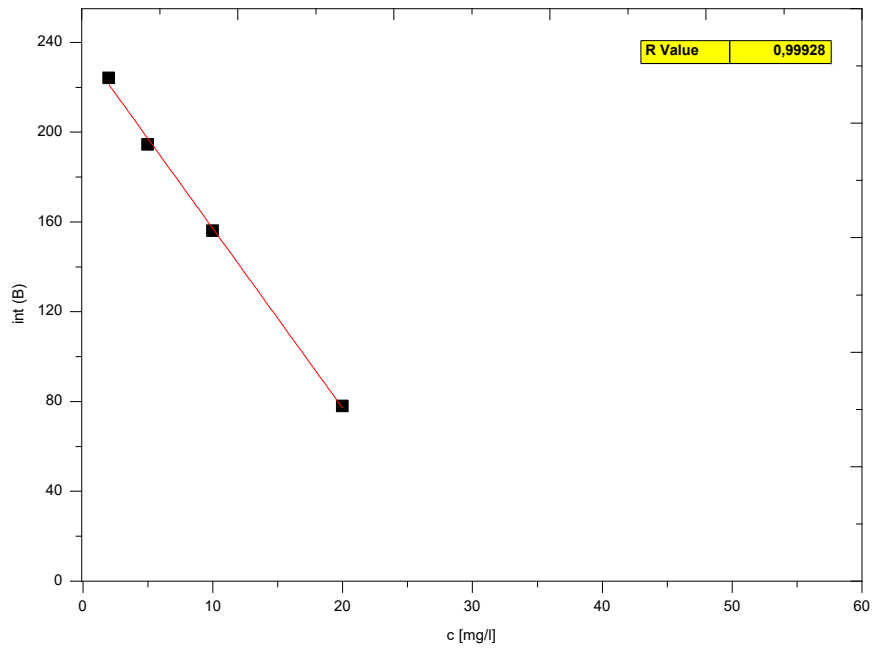
Vyhodnocení vlivu na stanovení, v případě přítomnosti kobaltu v analyzované vodě, probíhalo rovněž podle mediány zjištěných intenzit barev.



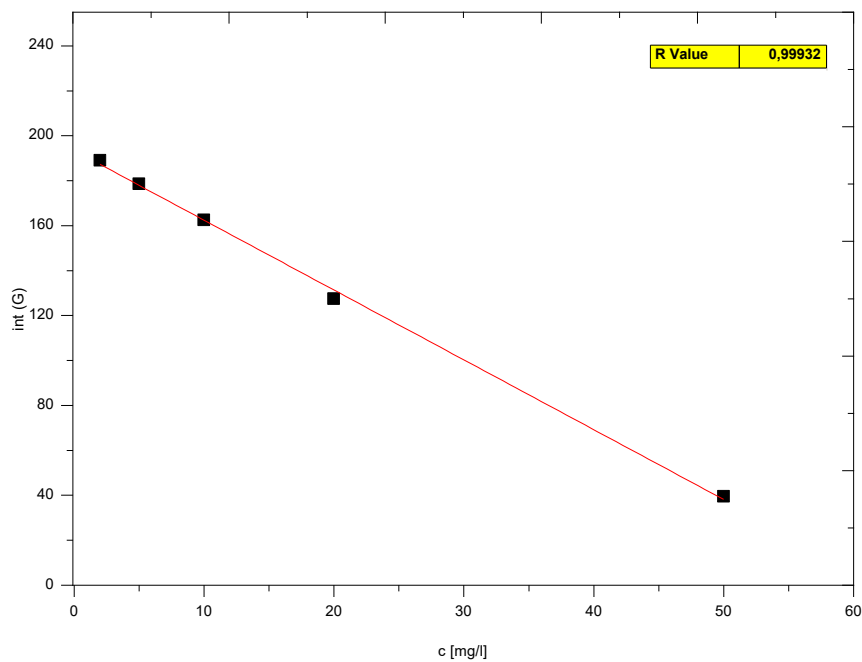
**Obr. 3.8** Kalibrační přímka sestavená podle zjištěných intenzit modré (B) barvy ze standardů s obsahem kobaltu.  
 Index korelace  $R$  kalibrační přímky: 0,98722  
 Rovnice kalibrace:  $y = -44,9x + 358,55$



**Obr. 3.9** Kalibrační přímka sestavená podle zjištěných intenzit zelené (G) barvy ze standardů s obsahem kobaltu.  
 Index korelace  $R$  kalibrační přímky: 0,99958  
 Rovnice kalibrace:  $y = -42,7x + 365,35$



**Obr. 3.10** Kalibrační přímka sestavená podle zjištěných intenzit modré (B) barvy ze standardů bez obsahu kobaltu.  
 Index korelace  $R$  kalibrační přímky: 0,99928  
 Rovnice kalibrace:  $y = -47,65x + 425,2$



**Obr. 3.11** Kalibrační přímka sestavená podle zjištěných intenzit zelené (G) barvy ze standardů bez obsahu kobaltu.  
 Index korelace  $R$  kalibrační přímky: 0,99932  
 Rovnice kalibrace:  $y = -35x + 349,4$

## Zhodnocení a diskuze

Reakce kobaltu s thiokyanatanem draselným ovlivňuje výsledky měření. Standardy obsahující kobaltnaté kationty totiž více absorbovaly (viz mediány intenzit použité pro sestavení kalibračních přímek v Tab. V a VI v Příloze V). Větší absorpci záření komplexy s obsahem kobaltu dokládají i zjištěné intenzity barev, které byly nižší - v komplexu s kobaltem byly místo jedné dvě barevně aktivní složky, na které se navázal thiokyanatan draselný a červená barva komplexu tedy byla velmi intenzivní. Tím pádem byly intenzity modré (B) a zelené (G) barvy nižší.

V případě možného výskytu kobaltu v analyzovaných vzorcích je možné stanovit koncentraci pouze železitých kationtů za pomoci metody standardního přídatku.

Vyhodnocení pak není možné provést pouze z kalibrační přímky jedné barvy, i přes to, že komplex s obsahem kobaltu je po reakci s thiokyanatanem draselným fialový až modrý. Každá kalibrační přímka má totiž svá specifika (viz Obr. 3.8, 3.9, 3.10, 3.11).

Kalibrace sestavená podle intenzity modré (B) barvy je citlivější (viz směrnice  $a$  v kalibrační rovnici u dané přímky), ale je pro nízké koncentrace - vyšší koncentrace byly odlehlé a po proložení přímkou ovlivňovaly přesnost kalibrace vyjádřené jako  $R$ . Vysoké koncentrace (až 50 mg/l) lze stanovovat přes kalibrační přímku sestavenou podle intenzit zelené (G) barvy. Její citlivost je ale mírně nižší.

Při ověřování tohoto problému bylo také zjištěno, že DSLR spektrofotometrie funguje analogicky jako klasická laboratorní spektrofotometrie, kdy se analýza vyhodnocuje při absorpčním maximu, kde je odezva největší, ale samozřejmě lze pracovat s nižším koncentračním rozsahem. Při výběru jiné vlnové délky, kdy není změna signálu tak vysoká, lze pracovat i s koncentrovanějšími vzorky.

### 3.3 Optimalizace uspořádání DSLR spektrofotometrie

V tomto oddílu jsou popsány další problémy zjištěné během realizace předložené práce, jejich řešení a vyhodnocení. Na základě vyhodnocení těchto a problémů popsaných a řešených v oddílu 3.2 bylo optimalizováno uspořádání metody a byl vytvořen návod pro další realizace DSLR spektrofotometrického stanovení (viz Příloha III).



## **Umístění vzorku**

V úvodu práce je nastíněna jedna ze základních otázek: do čeho umístit vzorek během analýzy? Při klasické spektrofotometrii je vzorek pipetován do skleněné kyvety, která má vždy standardní tloušťku stěn. Kyveta je poté vložena do spektrofotometru, kde je vzorek analyzován. Při klasické spektrofotometrii je možné analyzovat každou kyvetu zvlášť po provedení kalibrace, díky standardním podmínkám měření.

V případě DSLR spektrofotometrie jsou vzorky fotografovány digitální zrcadlovkou. A i přes snahu o standardizaci podmínek během fotografování není možné zaručit, aby v případě separátního fotografování každého vzorku nebo kalibračního standardu byly úplně stejné podmínky a nedocházelo tak k odchýlkám. Proto je nutné, aby byly kalibrační standardy fotografovány současně se vzorky, kde každý ze vzorků musí být minimálně třikrát kvůli statistickému vyhodnocení (viz pododíl 2.2.3).

To kyvety neumožňují, jelikož není možné je spojit dohromady a fotografovat pak potřebné množství vzorků a standardů současně. Kyvety jsou zároveň mnohem vyšší než jamky v mikrotitrační destičce. Na fotografii by kvůli tomu nemusely být některé vzorky přes okraje stěn kyvety vidět. Mj. jsou kyvety dražší než mikrotitrační destička a s jejich použitím by došlo i ke zvýšení spotřeby činidel (obsah kyvet je několik ml, zatímco obsah jedné jamky destičky se pohybuje v řádu stovek  $\mu\text{l}$ )

Mikrotitrační destička se zdá jako vhodné řešení, z hlediska možného fotografování většího počtu vzorků. Zároveň se jedná i o způsob umístění vzorku, který byl již vyzkoušen a je nenáročný na náklady. Problémy spojené s mikrotitrační destičkou byly ověřeny a jejich vliv na stanovení byl vyvrácen.

## **Podsvícení vzorků**

S výše diskutovaným způsobem umístění vzorku do kyvet nebo do mikrotitrační destičky souvisí způsob podsvícení vzorků.

Díky podsvícení vzorků je možné eliminovat nežádoucí faktory ze strany fotoaparátu, které vznikají při pořizování fotografie při nedostatku světla, jako je např. nutnost zvýšeného ISO a s tím spojený šum nebo dlouhý čas závěrky a s ním spojená neostrost snímku nebo přehřívání čipu.

Vzhledem k principu obecné spektrofotometrie a DSLR spektrofotometrie je žádoucí, aby podsvícení

- a. mělo neměnnou intenzitu záření,
- b. nevyzařovalo světlo složené z jiných různobarevných světél,
- c. bylo co nejbližší monochromatickému záření, které se přes sadu filtrů nebo difrakční mřížku odděluje z polychromatického záření používaného při spektrofotometrii.

Po zvážení těchto kritérií připadají v úvahu dva zdroje světla – *laser* nebo *LED*. Oba tyto světelné zdroje jsou poměrně dobře dostupné a lze jich najít opravdu mnoho typů s různými specifiky.

Kvůli umístění vzorku do mikrotitrační destičky a využívání fotoaparátu při analýze je možné použít pouze LED podsvícení. Mikrotitrační destička je příliš velká a laserový paprsek by nebyl dostačující ani pro podsvícení jedné z jamek. Při podsvícení laserem by bylo nutné použít více laserů a soustavou různých čoček pak dále upravovat jejich rozptýlení. Ani tak by se nepovedlo rozložit paprsky a získat rovnoměrně souvisle podsvícenou plochu o velikosti destičky. Laserový paprsek by navíc mohl kvůli své intenzitě poškodit čip fotoaparátu.

Je ale smysluplné zabývat se možností podsvícení laserem dále, protože právě u tohoto světelného zdroje pro podsvícení je jistá neměnná vlnová délka záření. Při DSLR spektrofotometrii by bylo navíc možné využít při stanovení dva lasery (modrý a zelený) a výsledky vyhodnocovat na základě intenzity konkrétní barvy.

Při umístění vzorku do mikrotitrační destičky je možné jako podsvícení použít LED videosvětlo. Je dostatečně velké a prosvítí celou plochu destičky. Je možné vybírat z mnoha typů světél, některá pak mají možnost nastavení intenzity záření nebo teploty chromatičnosti (teploty barvy) světla.

## Postup práce

Při práci bylo použito přídavné LED videosvětlo Power Energy Mobile CN-48H. Toto světlo tvoří čtyřicet osm rovnoměrně rozložených diod. Pro analýzu bylo nutné tato bodová světla rozptýlit do jedolité plochy k podsvícení destičky.

K tomuto účelu nemohla posloužit klasická plastová matnice dodávaná se světlem, protože její struktura byla hrubá, což pak po difuzi světla a jeho následném zachycení na fotografii tvořilo různě světlá místa. To by poté mohlo ovlivnit výsledky stanovení. Proto bylo nutné najít jiný filtr/matnici, která by dobře rozptýlila

bodové světlo do jednodílné plochy a zároveň zachovala stejnou intenzitu světla ve všech částech plochy.

## Vyhodnocení

Světlo bylo během měření umístěno 16 cm pod mikrotitrační destičku. Na té byla ze spodu uchycena matnice vytvořená ze dvou laminovacích fólií o formátu A6, které byly kancelářskou svorkou přichyceny k 1mm čirému plexisklu o rozměru destičky.

Světlo během měření problikávalo, což nebylo optimální. Na stanovení to vliv při konkrétních podmínkách nemělo. V případě, že by bylo nutné během fotografování použít delší expoziční čas, mohlo by problikávání světla ovlivnit výsledky.

## Zhodnocení a diskuze

Použitá matnice pro světlo byla vhodná a vzdálenosti mezi destičkou, světlem a fotoaparátem byly optimální.

Dvěma podstatnými problémy bylo problikávání světla a jeho velikost, která nebyla dostatečná, protože světlo nepokrylo jednodílnou světelnou plochou celou destičku.

Mj. světlo nebylo dostatečně velké a neprosvítlo celou destičku. Od středu destička tmavla a zvláště po obvodu se tvořila výrazná vinětace.

Toto světlo také nebylo ideální z hlediska špatných kontaktů u baterie a absence regulace intenzity záření.

Proto by bylo dobré pro měření sehnat jiný typ světla s regulací intenzity a teploty barvy záření - toto bylo jediné pro tuto práci dostupné světlo, vylo tedy používáno i dále v práci.

## **Formát pro ukládání fotografie**

Metoda a její princip stojí na určování koncentrací analytu na základě barvy komplexu. Proto je nežádoucí, aby počítač, který ukládá data do souboru prováděl jakékoliv komprese obrazu, zejména ty barevné. Tímto typem souboru může být formát obecně označovaný jako RAW (viz pododíl 2.3.2) (v případě fotoaparátu použitého pro analýzu v této práci, Canon EOS 100D, se jedná o formát CR2). Zde vyvstává problém následného zpracování/vyhodnocení fotografie. Téměř žádný z programů pro práci s fotografiemi neumí pracovat čistě s obrazem ve formátu

RAW. Proto je nutné fotografie z formátu RAW konvertovat do jiného typu souboru, aby bylo možné fotografii dále vyhodnotit.

Nejvhodnějším formátem do kterého lze RAW konvertovat se jeví soubor PSD. Formát RAW bývá zpravidla 12bitový a formát PSD je schopen i po konverzi barevnou hloubku 12 bitů „udržet“.

Pro konverzi je možné využít jakýkoliv online konvertor souborů. Po konvertování RAW souboru je možné fotografii vyhodnotit v počítačovém programu Adobe Photoshop.

### ***Počítačový software pro vyhodnocení fotografie***

V roce 2017 byl pro vyhodnocování fotografií použit program RGB Color (University of Nebraska, Medical Center) (viz pododdíl 2.2.3 a Obr. 2.5). Ten měl několik zásadních nevýhod:

- a. Program nedokázal zobrazit celou fotografii pro vyhodnocení a bylo ji proto nutné zmenšit v nějakém grafickém programu. Po zmenšení bylo nutné fotografii exportovat, a tím pádem i znovu provést kompresi fotografie a barev.
- b. Otevírání fotografií pro vyhodnocení bylo nepřehledné a uživatelsky nepřívětivé.
- c. Při několikanásobném určování intenzit barev z jednoho místa bylo nutné vždy resetovat vybrané měřicí body. Měřicí body jinak zůstávaly na místě a překrývaly se. To nebylo žádoucí vzhledem k tomu, že měřicí body měly červenou bravu a v případě umístění dalšího měřicího bodu přes ně je program započítával jako součást fotografie - to ovlivňovalo výsledné intenzity barev.

Pro vyhodnocení fotografie a určení intenzity jednotlivých barev RGB spektra na stupnici od 0 do 255 se jeví jako nejvhodnější Adobe Photoshop. Tento program umí otevřít libovolně velkou fotografii, tím pádem je potřebná jen jedna konverze a to z RAWu do formátu PSD, což je formát vytvořený speciálně pro tento program.

V tomto programu je mj. možné kontrolovat, co počítač vyhodnocuje jako bílou barvu a případně i nastavení upravit. Tím pádem lze eliminovat i možné odchylky způsobené špatným nastavením vyvážení bílé.

Adobe Photoshop je placený software. Lze využít zkušební verzi, která je časově omezena na dobu 30 dnů a na jednom počítači ji jako zkušební, neplacenou verzi lze využít pouze jednorázově.

### ***Určení přesnosti kalibrace metody***

Přesnost kalibrace metody lze určit z koeficientu determinace  $R^2$  nebo z indexu korelace  $R$ . V roce 2017 byl pro určení přesnosti kalibrace stanovení použit koeficient determinace  $R^2$ . V této práci je použit index korelace  $R$ , který je odmocninou z koeficientu determinace.  $R$  na rozdíl od  $R^2$  řeší, jak je proměnná  $y$  závislá na proměnné  $x$  v kalibračních rovnicích.

### **Index korelace $R$**

Hodnota indexu korelace  $R$  by měla být  $\geq 0,9900$ , aby byla kalibrace přesná. Kalibrace by byla nejpřesnější, pokud by hodnota  $R$  byla rovna 1 (všechny body na kalibrační přímce by ležely za sebou tak, že by bylo možné je propojit přímkou).

Při porovnávání výsledků by tedy byly přesnější ty, pro jejichž zjištění byla použita kalibrace s hodnotou  $R$  bližší 1. Přesnost výsledků je podmíněna také dalšími aspekty.

### ***Kalibrace metody***

Během předešlých měření byl shledán problém s kalibrací metody, konkrétně se sestavením kalibrační přímky. Kalibrace nebyla přesná kvůli velkému rozptylu hodnot, ze kterých byla sestavována. Bylo nutné zjistit, jestli

- a. chyba vznikla při vyhodnocování fotografie, nastavením fotoaparátu a kompresí,
- b. chyba vznikla již při přípravě standardů,

aby bylo případně upraveno uspořádání metody při vyhodnocování. Při ověřování tohoto problému mj. byla porovnávána

- a. měření prováděná fotoaparátem, kde je možná téměř absolutní kontrola nad veškerým nastavením,
- b. měření prováděná mobilním telefonem, který vše nastavuje automaticky.

## Postup práce

Pro toto měření bylo připraveno celkem 21 standardů podle tabulky Tab. 3.11. Standardy byly připraveny ze zásobního roztoku dusičnanu železitého, thiokyanatanu draselného a z deionizované vody.

**Tab. 3.11** Podíl jednotlivých činidel v připravených standardech použitých při ověřování kalibrace metody.

označení standardu	c [mg/l]	$V_{\text{Fe}(\text{NO}_3)_3}$ [ml]		$V_{\text{KSCN}}$ [ $\mu\text{l}$ ]	$V_{\text{celkem}}$ [ml]
		c = 1000 [mg/l] <sup>1</sup>	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

Každý standard o dané koncentraci byl připraven právě třikrát. Z každého standardu bylo pipetováno 250  $\mu\text{l}$  do mikrotitrační destičky. Ta byla následně umístěna na matnici uchycenou ve dvou stojanech ve výšce 16 cm nad videosvětlem. Ve výšce 14 cm kolmo nad destičkou byl objektiv fotoaparátu. Fotoaparát byl uchycen na stativu s vodorovně vyosenou středovou tyčí.

Destička byla vyfocena s nastavením fotoaparátu viz Tab. 3.12. Pro možné porovnání byla ze stejné vzdálenosti vyfocena i mobilním telefonem (iPhone 5S).

**Tab. 3.12** Nastavení fotoaparátu během úpravy kalibrace metody.

parametr	nastavení
Délka expozice snímku	1/250 sec
Clonové číslo	f/10
ISO (citlivost)	200
WB	Wolframové světlo (cca 3200 K)
Picture style	S (standardní)
Ohnisková vzdálenost	18 mm

Fotografie byly bez další komprese otevřeny v programu Adobe Photoshop CS6, kde byla v každém standardu třikrát měřena intenzita modré (B) a zelené (G) barvy.

Z naměřených hodnot byl pro každý standard vytvořen medián. Tyto byly zaneseny do grafů. Z mediánů zjištěných hodnot byly vytvořeny celkem čtyři kalibrační přímky - kalibrace podle modré (B) a zelené (G) barvy z fotografie pořízené digitálním zrcadlovým fotoaparátem (Obr. 3.12, Obr. 3.13) a kalibrace podle modré (B) a zelené (G) z fotografie pořízené fotoaparátem mobilního telefonu (Obr. 3.14, Obr. 3.15)

Všechny standardy byly zároveň proměřeny na spektrofotometru HP 8453 (Hewlett Packard), aby bylo možné zjistit, jestli byla chyba v přípravě standardů nebo ve vyhodnocení. Z hodnot zjištěných při měření spektrofotometrem byla vytvořena kalibrační přímka a byla zjištěna hodnota indexu korelace  $R$  (viz Obr. 3.16).

Na základě kalibračních přímek byly porovnány rozdíly mezi stanovením prováděným fotoaparátem a stanovením prováděným mobilním telefonem.

## Vyhodnocení

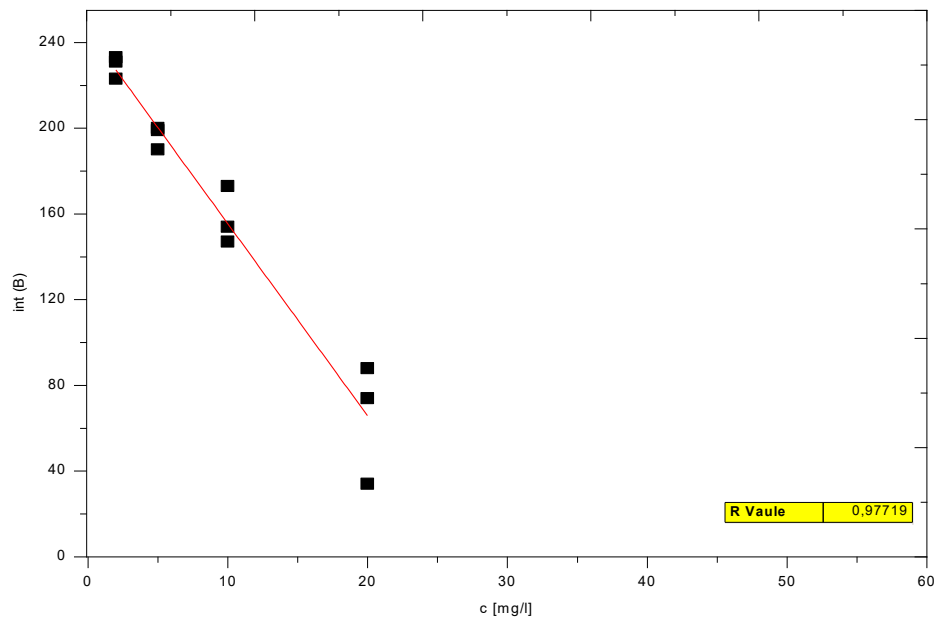
Všechny kalibrační přímky byly vzájemně porovnány.

Jak je vidět na Obr. 3.16 chyba vznikla již v přípravě standardů, jelikož jsou některé hodnoty vzájemně odlehlé. Dále byly porovnány kalibrační přímky sestavené z hodnot naměřených na fotografiích zachycených dvěma různými zařízeními. Kalibrace prováděné z fotografie zachycené digitálním zrcadlovým fotoaparátem jsou vzhledem ke kalibracím podle mobilního telefonu přesnější (viz  $R$  uvedený u Obr. 3.12, 3.13, 3.14, 3.15). Mimo jiné je při použití digitálního zrcadlového fotoaparátu metoda citlivější - to ukazují směrnice v rovnicích přímek grafů (viz Obr. 3.12, 3.13, 3.14, 3.15).

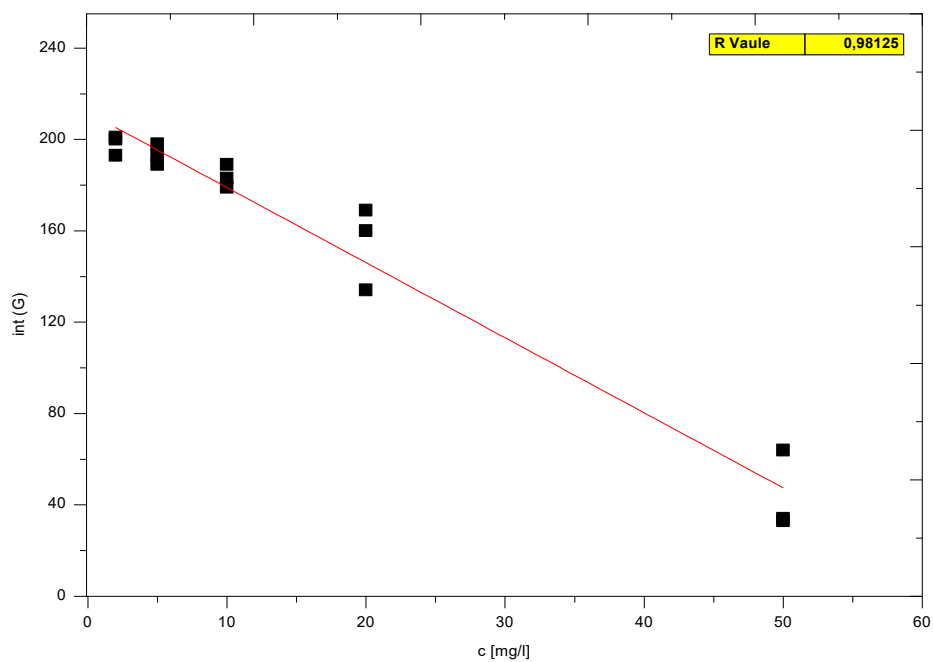
Všechny kalibrační přímky byly bez hodnot zjištěných ve slepých standardech, protože intenzita zjištěná z nich byla vždy nižší než u následujícího standardu s vyšší koncentrací. Při měření spektrofotometrem nebyl jako blank použit standard připravený podle Tab. 3.11, ale deionizovaná voda. Přesto zjištěná absorbance nebyla zahrnuta do kalibrační přímky, kvůli srovnání s dalšími kalibračními přímkami sestavených z hodnot stanovených DSLR spektrofotometrií.

Intenzity barev zjištěné ve standardu s nulovou koncentrací (blank) nekorelovaly s kalibrační závislostí, a proto nebyly použity. Tento problém se již několikrát vyskytl během práce v roce 2017 [1]. Nejspíš je to způsobené tím, že metoda pro tyto koncentrace není příliš citlivá.

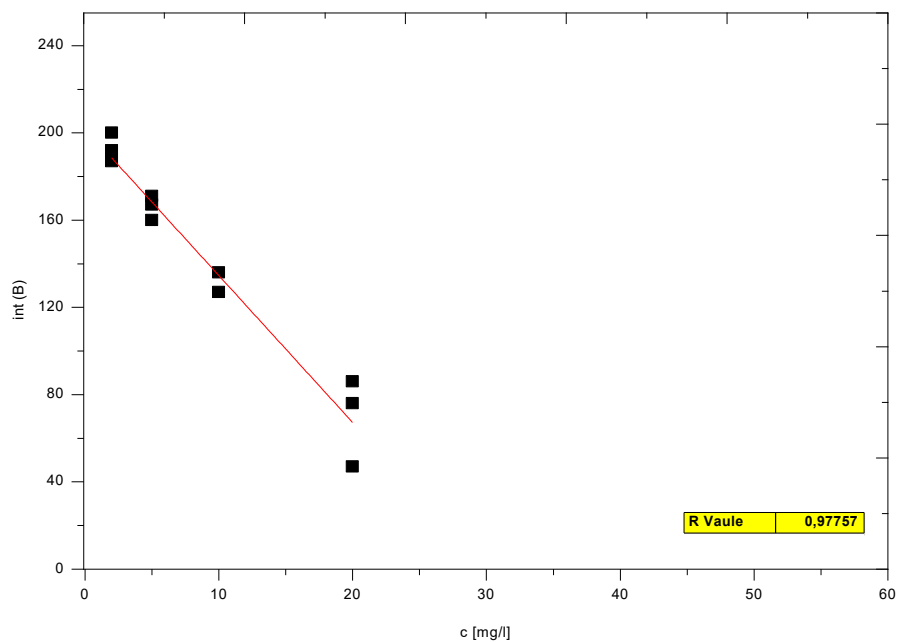




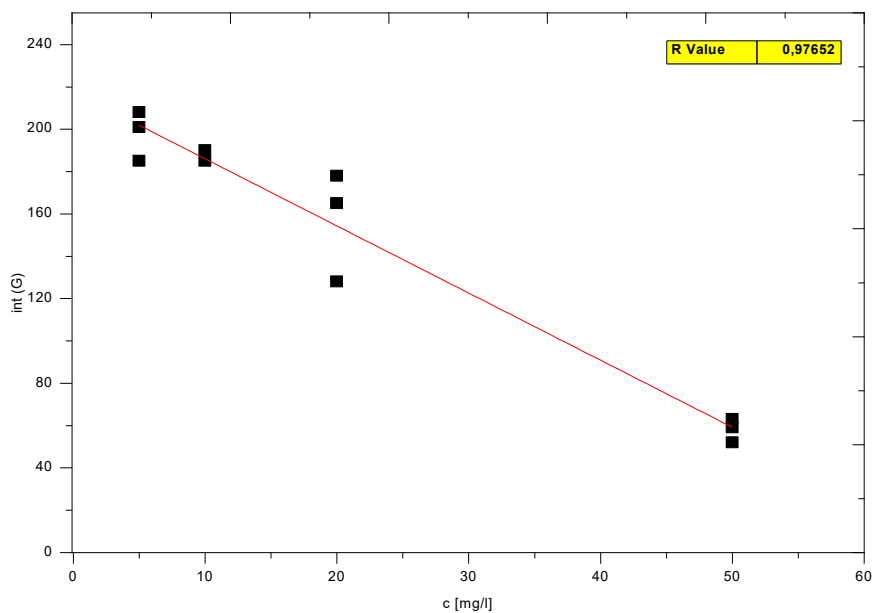
**Obr. 3.12** Kalibrační přímka sestavená podle intenzity modré (B) barvy z fotografie vyfocené DSLR Canon EOS 100D.  
 Index korelace  $R$  kalibrační přímky: 0,97719  
 Rovnice kalibrace:  $y = -16,538x + 385,44$



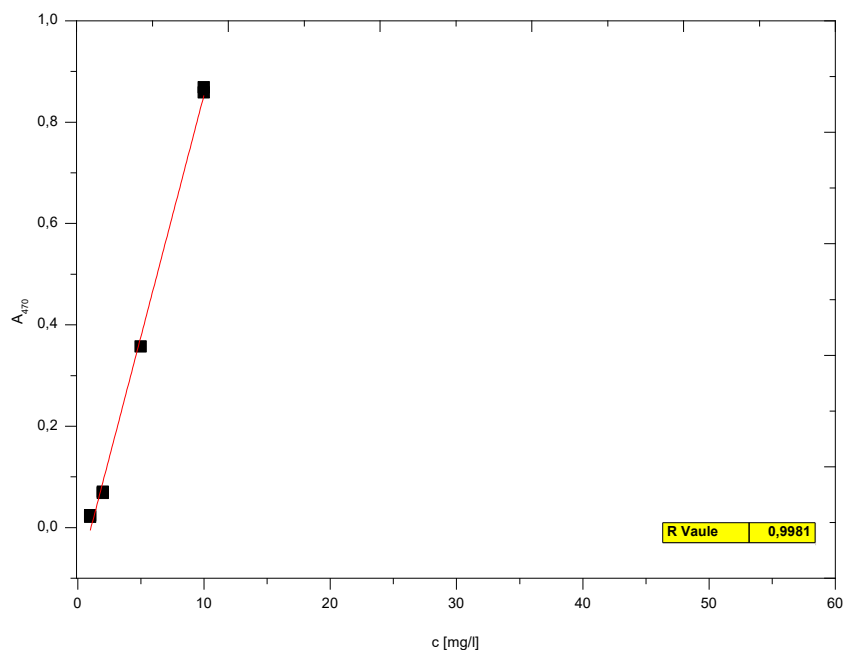
**Obr. 3.13** Kalibrační přímka sestavená podle intenzity zelené (G) barvy z fotografie vyfocené DSLR Canon EOS 100D.  
 Index korelace  $R$  kalibrační přímky: 0,98125  
 Rovnice kalibrace:  $y = -11,211x + 322,76$



**Obr. 3.14** Kalibrační přímka sestavená podle intenzity modré (B) barvy z fotografie vyfocené fotoaparátem mobilního telefonu iPhone 5S.  
 Index korelace  $R$  kalibrační přímky: 0,97757  
 Rovnice kalibrace:  $y = -12,399x + 307,05$



**Obr. 3.15** Kalibrační přímka sestavená podle intenzity zelené (G) barvy z fotografie vyfocené fotoaparátem mobilního telefonu iPhone 5S.  
 Index korelace  $R$  kalibrační přímky: 0,97652  
 Rovnice kalibrace:  $y = -13,685x + 376,14$



**Obr. 3.16** Kalibrační přímka sestavená podle absorbance jednotlivých standardů zjištěné spektrofotometrem Hewlett Packard 8453.  
 Index korelace  $R$  kalibrační přímky: 0,9981  
 Rovnice kalibrace:  $y = 0,0954 + (-0,10143)x$

### Zhodnocení a diskuze

Ukázalo se jako optimální sestavovat kalibraci ze tří sad standardů o koncentracích 0; 1; 2; 5; 10; 20; 50 mg/l, přičemž každý ze standardů je připravený zvlášť. Z každého standardu je poté 250  $\mu$ l pipetováno do mikrotitrační destičky, která je vyfocena a vyhodnocena podle optimálního uspořádání a nastavení popsaného níže.

Výpočet koncentrace analytu ve vzorku je pak prováděn dosazováním zjištěných intenzit podle rovnice grafu kalibrační přímky.

Z porovnání kalibračních přímek pak vychází jako přesnější stanovení prováděná digitálním zrcadlovým fotoaparátem (podle indexu korelace  $R$ ). Při kalibraci z DSLR podle zelené (G) barvy je použit i vyšší koncentrační rozsah.

## Standardizace světelných podmínek analýzy

Je pravděpodobné, že výsledky měření může do značné míry ovlivnit okolní světlo tím, že

- a. má jinou teplotu chromatičnost než světlo, které podsvěcuje vzorky,
- b. může být různé v průběhu měření (pokud se jedná o přirozené denní světlo),
- c. může ovlivnit expozici snímku, který je následně vyhodnocován.

Proto bylo provedeno měření, při kterém byla mikrotitrační destička s připravenými standardy fotografována dvakrát – jednou s odstíněným okolním světlem, podruhé bez. Fotografie poté byly vyhodnoceny a byly zjišťovány rozdíly mezi sestavenými kalibračními přímkami.

### Postup práce

Pro ověření možného ovlivnění výsledků ze stran okolního světla bylo připraveno celkem 21 standardů podle tabulky Tab. 3.13. Standardy byly připraveny ze zásobního roztoku dusičnanu železitého, thiokyanatanu draselného a z deionizované vody.

**Tab. 3.13** Podíl jednotlivých činidel v připravených standardech použitých pro standardizaci podmínek při měření.

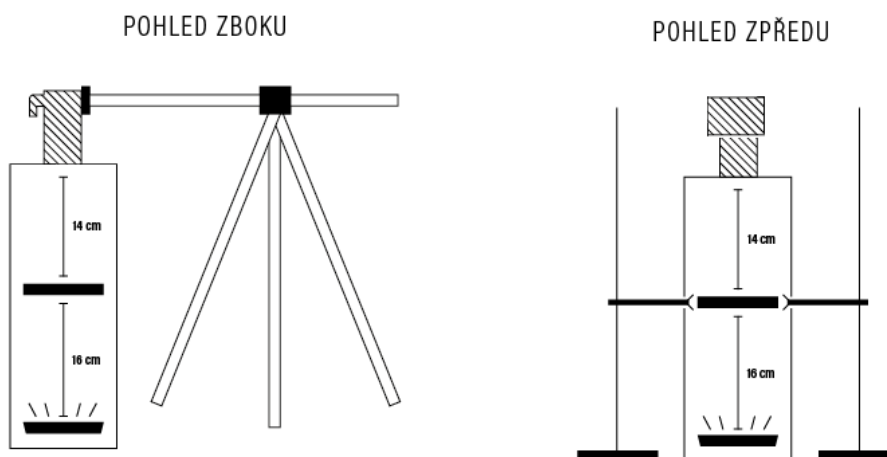
označení standardu	c [mg/l]	$V_{\text{Fe}(\text{NO}_3)_3}$ [ml]		$V_{\text{KSCN}}$ [ $\mu\text{l}$ ]	$V_{\text{celkem}}$ [ml]
		c = 1000 [mg/l]	c = 50 [mg/l]		
0 (blank)	0,00	-	0,00	200	5,00
1	1,00	-	0,50	200	25,00
2	2,00	-	1,00	200	25,00
3	5,00	-	1,00	200	10,00
4	10,00	-	2,00	2000	10,00
5	20,00	-	4,00	200	10,00
6	50,00	0,5	-	200	10,00

Každý standard o dané koncentraci byl připraven právě třikrát. Z každého standardu bylo pipetováno 250  $\mu\text{l}$  do mikrotitrační destičky. Ta byla následně umístěna na matnici uchycenou ve dvou stojanech ve výšce 16 cm nad videosvětlem. Ve výšce 14 cm kolmo nad destičkou byl objektiv fotoaparátu. Fotoaparát byl uchycen na stativu s vodorovně vyosenou středovou tyčí. Nastavení fotoaparátu bylo:

**Tab. 3.14** Nastavení fotoaparátu během ověřování přesnosti stanovení s odstíněným a neodstíněným okolním světlem.

parametr	nastavení
Délka expozice snímku	1/125 sec
Clonové číslo	f/6.3
ISO (citlivost)	100
WB	Wolframové světlo (cca 3200 K)
Picture style	S (standardní)
Ohnisková vzdálenost	18 mm

Fotografování destičky probíhalo v místnosti se zhasnutým osvětlením. Nejprve byla destička vyfocena uchycena do stojanu v místnosti bez jakéhokoliv dalšího odstínění světla. Poté byla fotografována destička podruhé - v tomto případě bylo okolní světlo odstíněno. Destička byla při fotografování umístěna do vertikálně postavené kartonové krabice od bot, kde v horní části byl vyříznutý otvor pro objektiv fotoaparátu (viz Obr. 3.17 a Obr. 3.18). Po stranách krabice byly vyříznuty otvory pro prostrčení držáků, ve kterých byla uchycena destička (viz Obr. 3.17 a Obr. 3.18).



**Obr. 3.17** Schéma uspořádání jednotlivých částí aparatury při měření. V dolní části je vždy LED videosvětlo, uprostřed je mikrotitrační destička se standardy/vzorky a nahoře je fotoaparát uchycený do stativu. (Tomáš Kudláček, Petr Kudláček).



**Obr. 3.18**

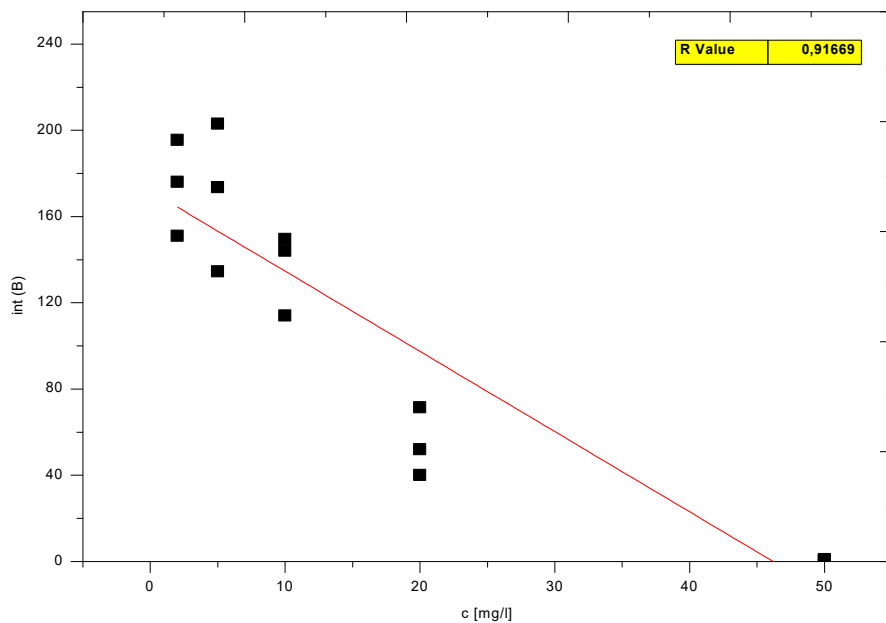
Uspořádání aparatury během provádění stanovení. A - Pohled skrze stativ s uchyceným fotoaparátem na otevřenou krabici s umístěným světlem a destičkou s matnicí uchycenou v držácích; B - Pohled na otevřenou krabici s destičkou s matnicí uchycenou v držácích a videosvětlo; C - Celá aparatura při měření. (Foto: Tomáš Kudláček)

Fotografie byly pořízeny ve formátu CR2. Z toho byly pro vyhodnocení převedeny do formátu PSD a následně vyhodnoceny v programu Adobe Photoshop.

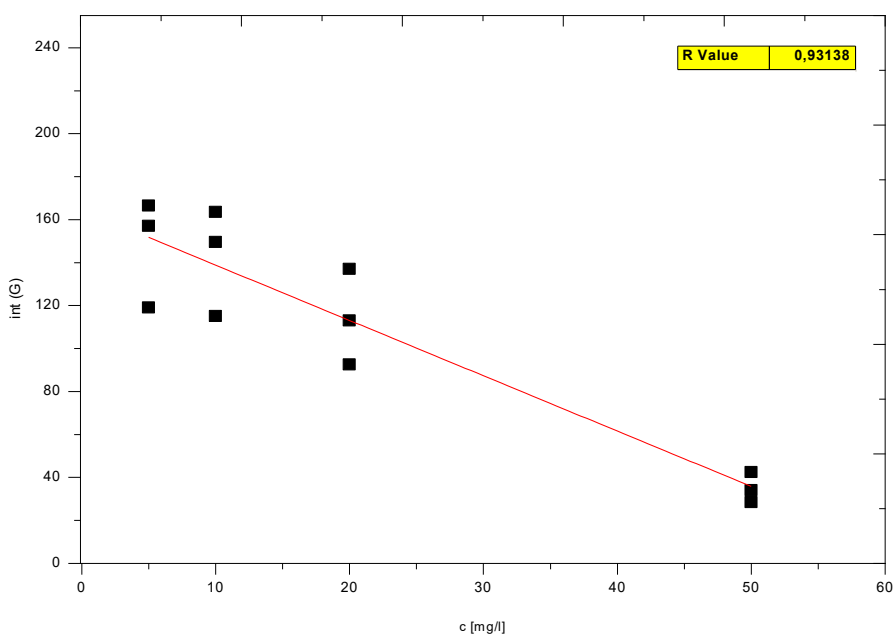
Z každého standardu byly intenzity barev zjišťovány právě šestkrát. Ze zjištěných hodnot byly pro každé standardy vytvořeny mediány, ze kterých byly sestaveny kalibrační přímky a byla zjištěna hodnota indexu korelace  $R$ .

## Vyhodnocení

Kalibrační přímky (viz Obr. 3.19, 3.20, 3.21, 3.22) sestavené z hodnot zjištěných z fotografie bez odstíněného světla byly porovnány s druhou fotografií, na které bylo světlo odstíněno. Z hodnot indexu korelace je patrné, že kalibrační přímky sestavené podle intenzit barev z fotografie s odstíněným světlem byly přesnější.

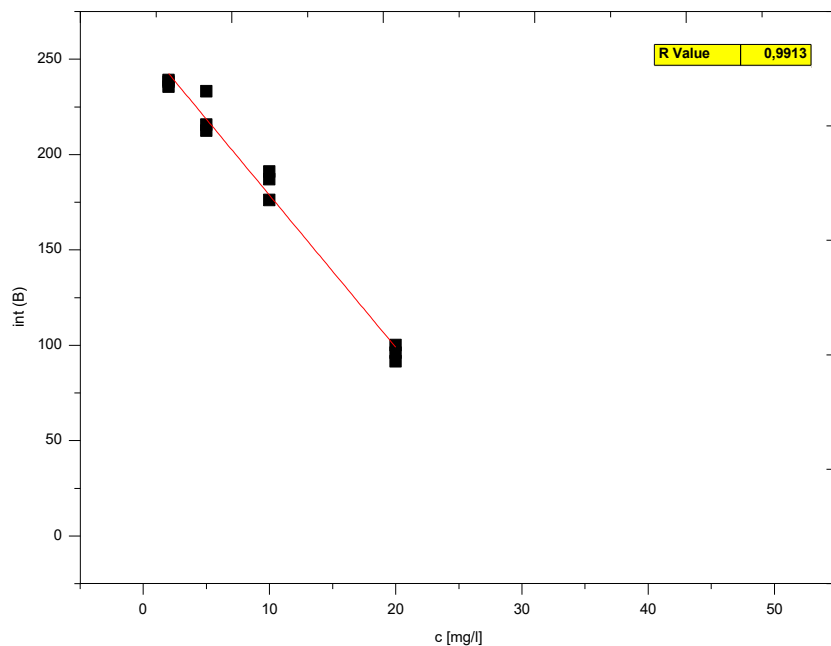


**Obr. 3.19** Kalibrační přímka sestavená podle intenzity modré (B) barvy z fotografie vyfocené bez odstínění světla.  
 Index korelace  $R$  kalibrační přímky: 0,91669  
 Rovnice kalibrace:  $y = -14,236x + 320,64$

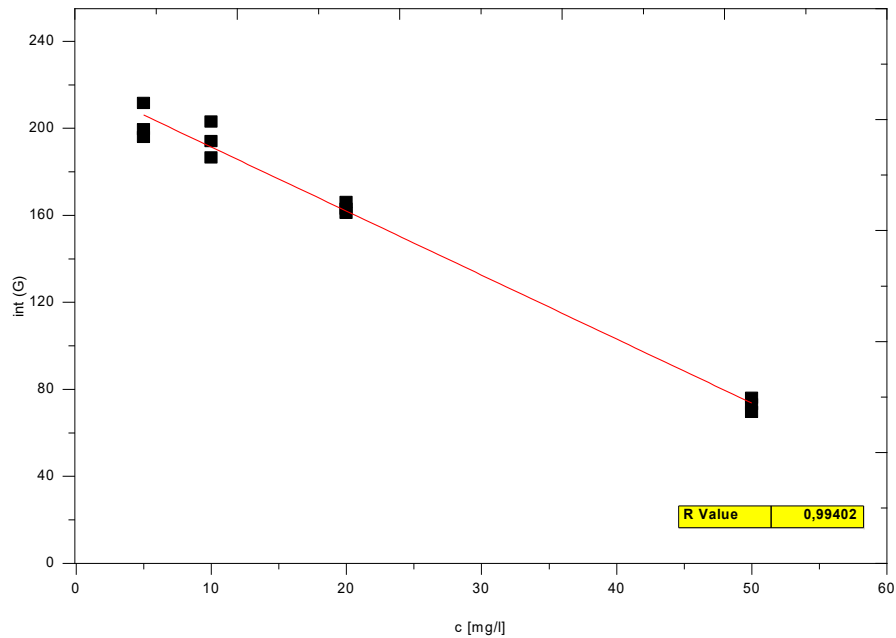


**Obr. 3.20** Kalibrační přímka sestavená podle intenzity zelené (G) barvy z fotografie vyfocené bez odstínění světla.  
 Index korelace  $R$  kalibrační přímky: 0,93138  
 Rovnice kalibrace:  $y = -10,437x + 282,04$





**Obr. 3.21** Kalibrační přímka sestavená podle intenzity modré (B) barvy z fotografie vyfocené s odstíněným světlem.  
Index korelace  $R$  kalibrační přímky:  $0,9913$   
Rovnice kalibrace:  $y = -14,573x + 381,32$



**Obr. 3.22** Kalibrační přímka sestavená podle intenzity zelené (G) barvy z fotografie vyfocené s odstíněným světlem.  
Index korelace  $R$  kalibrační přímky:  $0,99402$   
Rovnice kalibrace:  $y = -13,175x + 375,63$

## Zhodnocení a diskuze

Jak ukazují indexy korelace  $R$  uvedené u kalibračních přímek, tak odstínění světla je vhodné. S odstíněným světlem byl index korelace u kalibrací podle obou barev vyšší než 0,9900. U kalibračních přímek sestavených z hodnot zjištěných z fotografie pořízené bez odstínění byl největší index korelace 0,93138, což je považováno za nepřesnou kalibraci.

Optimální bude nepoužívat k odstínění kartonové krabice apod., ale fotografovat destičku v místnosti bez přístupu jakéhokoliv okolního světla („temná komora“). V případě, že toto není možné ale postačí i způsob, který byl použit při měření.

## ***Optimální nastavení a umístění fotoaparátu***

### Obecné optimální nastavení a uspořádání

Při fotografování je nastaven plně manuální režim, ve kterém jsou následně voleny tyto parametry:

- a. délka expozice snímku (expoziční čas),
- b. clona,
- c. ISO,
- d. vyvážení bílé.

Expoziční čas by měl být co nejkratší, aby nedošlo k chybě stanovení způsobené např. problikáváním světla pod destičkou, které by se při dlouhé expozici mohlo projevit. V případě absence stativu při měření je pro ostré snímky při držení fotoaparátu v ruce krátký čas nezbytností.

Clona by kvůli zachování dostatku světla ve fotografii neměla být maximální, ale zároveň by neměla být nejnižší. Díky vyšší cloně je větší hloubka ostrosti na snímku a jednotlivé jamky destičky zachycené na fotografii budou ostřejší.

ISO (citlivost) nesmí být příliš vysoké, protože při zvýšení citlivosti se na fotografii zároveň zvyšuje digitální barevný šum, který může ovlivnit výsledky stanovení. Míra šumu při zvýšení citlivosti se liší u jednotlivých výrobců fotoaparátů a snímačů v nich.

Celkově by výše uvedené tři parametry při optimálním nastavení měly docílit mírně přexponované fotografie, aby bylo možné dobře vyhodnotit i velmi koncentrované roztoky.

Čtvrtým a velmi důležitým voleným parametrem je vyvážení bílé. To musí svou teplotou chromatičnosti odpovídat teplotě světla, kterým je při měření podsvícena destička. Nejlepší je pravděpodobně ruční nastavení bílé podle konkrétního zdroje světla, ale dostačující jsou i předdefinovaná vyvážení bílé ve fotoaparátech.

Během fotografování je vhodné mít fotoaparát uchycený do stativu s vyoseným středovým sloupkem a objektivem kolmo proti destičce. Optimálním objektivem pro měření je širokoúhlý objektiv, který bude při stanovování nastavený na nejnižší možnou ohniskovou vzdálenost (jedná-li se o objektiv s proměnlivou ohniskovou vzdáleností). Při fotografování by měla být vzdálenost objektivu od destičky právě minimální zaostřovací vzdálenost daného objektivu.

### Optimální nastavení při konkrétních podmínkách

Tato část se zabývá konkrétním nastavením při použití následujícího vybavení:

- a. digitální zrcadlový fotoaparát Canon EOS 100D,
- b. Canon Zoom Lens EF-S 18-55mm f/3.5-5.6 IS STM,
- c. LED Power Energy Mobile CN-48H,
- d. stativ Manfrotto 190XPROB s kulovou hlavou Manfrotto 486RC2.

Nastavení popisovaná dále v textu vychází z uspořádání, kdy je mezi spodním okrajem mikrotitrační destičky a videosvětlem vzdálenost 16 cm a mezi horním okrajem destičky a přední čočkou objektivu je vzdálenost 14 cm (viz Obr. 3.17). Fotoaparát je v tomto případě uchycen na stativ s vyosenou středovou tyčí a objektiv je kolmo k mikrotitrační destičce.

Při fotografování je fotoaparát nastaven na plně manuální režim. V tom se následně zvolí vyvážení bílé tak, aby co nejlépe odpovídalo teplotě barvy použitého světla pro podsvícení. Dále je vhodné použít vyšší clonu (ne maximální možnou), aby byla celá destička na fotografii dobře ostrá (cca  $f/5.6 - 8$ ). Citlivost (ISO) je vhodné nastavit na co nejnižší (50 - 200), aby na fotografii nebylo příliš digitálního šumu, který může ovlivnit výsledky stanovení. Délka expozice snímku je nastavována po ostatních parametrech tak, aby výsledná expozice snímku byla mírně vyšší (max. +1EV). Při použití stativu a kvalitního, neproblikávajícího světla je možné použít i delší expoziční časy. Při fotografování je také vhodné kvůli zamezení automatickým barevným korekcím při ukládání fotografie použít RAW formát.

Fotografování destičky je vhodné provádět v místnosti bez přístupu denního světla a bez přítomnosti jiných zapnutých zdrojů světla než daného LED videosvětla, které podsvěcuje destičku (obdoba temné komory). Pokud není možné fotografování v takové místnosti provést, může posloužit kartonová krabice, která má v horní části pouze otvor na objektiv a po stranách jsou otvory pro držák, kterými je uchycena destička. Výška dané krabice musí být rovna výše uvedeným vzdálenostem mezi destičkou, světlem a objektivem fotoaparátu.

Nastavení fotoaparátu lze také shrnout do tabulky níže (Tab. 3.15):

**Tab. 3.15** Optimální nastavení fotoaparátu při konkrétních podmínkách ověřené použitím během práce.

parametr	nastavení
Délka expozice snímku	1/125 sec
Clonové číslo	f/6.3
ISO (citlivost)	100
WB	Wolframové světlo (cca 3200 K)
Picture style	S (standardní)
Ohnisková vzdálenost	18 mm

## ***Rozsah stanovitelných koncentrací***

### Postup práce

Rozsah stanovení DSLR spektrofotometrií byl určován na základě kalibračních přímek, indexu kalibrace  $R$  a jejich vyhodnocování.

### Vyhodnocení

V kalibračních přímkách vždy byly odlehlé nejnižší koncentrace (0 a 1 mg/l) a nejvyšší koncentrace (50 mg/l, výjimečně 20 mg/l) - tyto většinou neležely na prokládané přímce závislosti a při jejich započítání do kalibrační přímky se projevíly v indexu korelace  $R$  tak, že snižovaly přesnost kalibrační přímky a tudíž i samotného stanovení.

Nejvyšší koncentrace kalibračních standardů (50 mg/l) nebylo ani možné vyhodnotit. Intenzita červené barvy byla totiž tak vysoká, že při vyhodnocování byla intenzita modré barvy (B) v tomto standardu většinou 0 (záporné hodnoty neexistují v RGB prostoru), výjimečně 1 – 2. Intenzita zelené (G) se pohybovala okolo 6 – 9.

Rozsah stanovení je tedy přibližně 2 – 30 mg/l, přičemž nejnižší chyby při stanovení budou u stanovování koncentrací kolem 5 – 10 mg/l.

### Zhodnocení a diskuze

Lineární koncentrační rozsah lze obecně stanovit podle indexu korelace  $R$ . Čím více je jeho hodnota blíží 1,00, tím je rozsah stanovitelných koncentrací lineárnější.

Vzhledem k tomu, že jsou koncentrace určovány z logaritmické funkce, tak není možné stanovit příliš vysoké koncentrace (cca 40 – 50 mg/l), protože ty již neposkytují úměrnou odezvu.

Příliš nízké hodnoty také nelze přesně stanovit, protože s velkou pravděpodobností mohou znamenat zachycený šum zařízení.

### **3.4 Testování nového uspořádání na odebraných vzorcích**

Po zjištění a ověření všech problémů během stanovení bylo vytvořeno optimální uspořádání metody byl vytvořen návod pro realizaci stanovení (viz Příloha III). Návod byl aplikován při ověřování optimalizovaného uspořádání na třech odebraných vzorcích. Ve vzorcích bylo paralelně provedeno stanovení spektrofotometrem z důvodu srovnání výsledků z obou metod.

#### **3.4.1 Postup práce**

##### ***Odběr vzorku***

Pro ověření nastavení metody byl použit vzorek vody z pramenu Korek (železitý) v Šáreckém údolí.

Vzorek byl odebrán do 100ml skleněné lékové lahvičky. Ta byla vymyta deionizovanou vodou, zředěnou kys. chlorovodíkovou a acetonem. Před odběrem vzorku byla několikrát promytya odebíranou vodou.

Vzorek v lahvičce byl zakonzervován 1 ml 65% kys. dusičné. Po konzervaci byla lahvička se vzorkem uložena do chladicího boxu.

##### ***Analýza vzorku***

##### **Kalibrace metody**

Pro měření byla provedena kalibrace sestavená ze 7 standardů, z nichž každý byl připraven dvakrát. Standardy byly připraveny podle Tab. 3.16 ze zásobního roztoku dusičnanu železitého, thiokyanatanu draselného a z deionizované vody.

**Tab. 3.16** Podíl jednotlivých činidel a roztoků v kalibračních standardech sestavených pro ověřování metody na odebraných vzorcích

označení standardu	c [mg/l]	$V_{\text{Fe}(\text{NO}_3)_3}$ [ml]		$V_{\text{KSCN}}$ [ $\mu\text{l}$ ]	$V_{\text{celkem}}$ [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

Z každého standardu bylo pipetováno 250  $\mu\text{l}$  do jamek mikrotitrační destičky. Destička byla položena na matnici vytvořenou ze dvou laminovacích fólií a 1mm čirého plexiskla. Destička i s matnicí poté byla uchycena do stojanu kdy byla vzdálenost mezi jejím dolním okrajem a videosvětlem právě 16 cm. Při práci byla destička umístěna do upravené kartonové krabice (podrobněji popsáno výše v oddílu 3.3), kde byl vyříznut otvor na objektiv na držáky destičky.

Destička se standardy byla vyfocena fotoaparátem nastaveným podle tabulky níže (Tab. 3.17). Při fotografování byl fotoaparát připevněn na stativu s vyosenou středovou tyčí. Fotografie byla ukládána do formátu JPEG a CR2 (RAW).

**Tab. 3.17** Nastavení fotoaparátu použité při ověřování uspořádání metody na vzorcích.

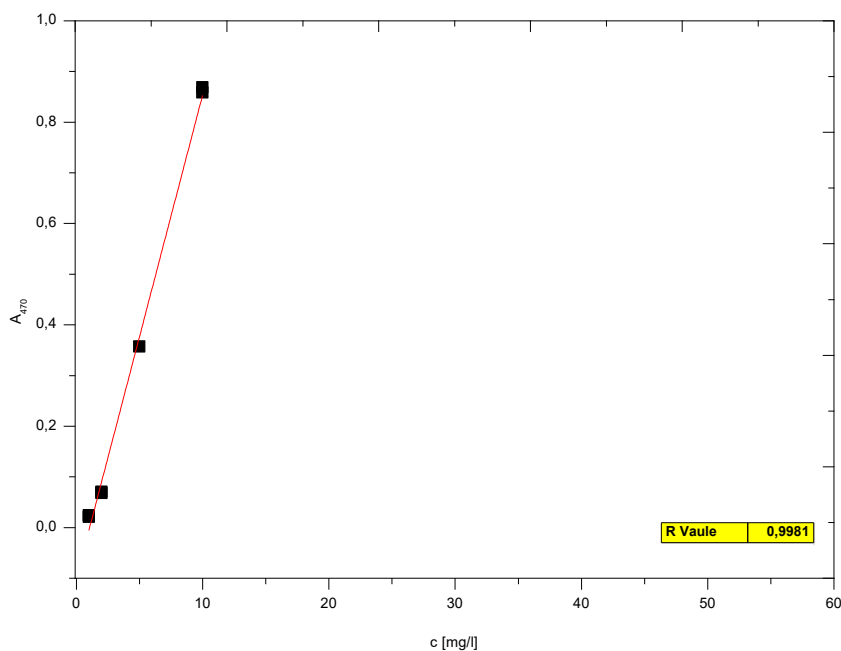
parametr	nastavení
Délka expozice snímku	1/125 sec
Clonové číslo	f/6.3
ISO (citlivost)	100
WB	Wolframové světlo (cca 3200 K)
Picture style	S (standardní)
Ohnisková vzdálenost	18 mm

Fotografie ve formátu CR2 byla převedena do formátu PSD a otevřena v programu Adobe Photoshop CS6. Zde byly nástrojem „kapátko“ s otevřeným dialogovým oknem vyhodnoceny intenzity modré (B) a zelené (G) barvy v jednotlivých standardech.

Intenzita modré (B) i zelené (G) barvy byla v každém standardu zjištěna právě šestkrát. Z každých šesti hodnot byl pro standard o dané koncentraci vytvořen medián. Medián byl vytvořen ze standardů z obou sestavených sad. Mediány byly použity při sestavení kalibračních přímk, jejichž přesnost byla určována z hodnoty indexu korelace  $R$ . Kalibrační přímky s použitým rozsahem kalibrace c 1 - 10 mg/l byly porovnány s kalibrační přímkou sestavenou z absorbance naměřené na spektrofotometru (viz Obr. 3.23).

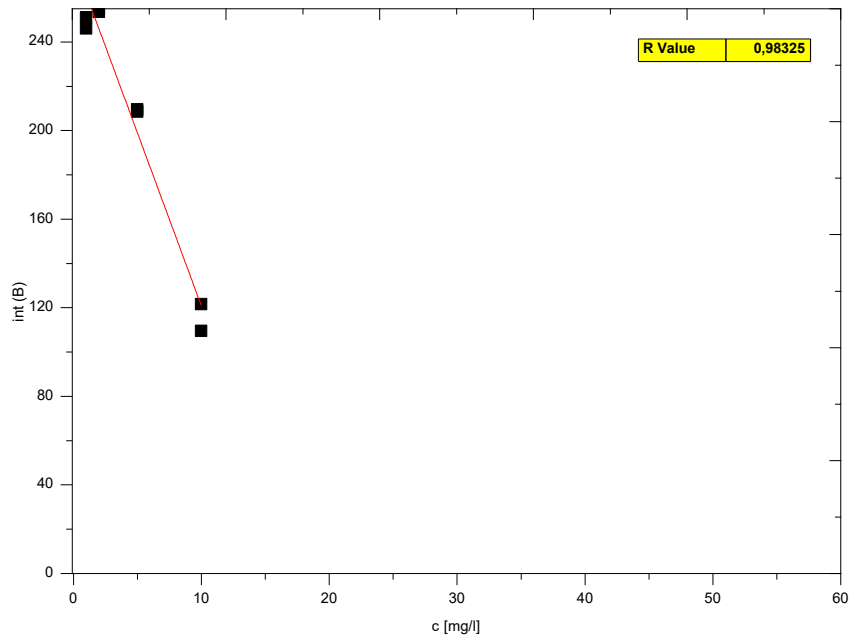
Pro zjištění koncentrace železitých kationtů v analyzovaných vzorcích pak byly použity kalibrační přímky s jiným kalibračním rozsahem podle intenzity modré (B) barvy než podle intenzity zelené (G) barvy - rozsah kalibrace byl vybrán takový, při kterém byla nejvyšší hodnota indexu korelace  $R$  (kalibrace byla nejpřesnější). Použité kalibrační přímky jsou znázorněny bodovými grafy na Obr. 3.24 a Obr. 3.25.

Přesnost kalibrace byla ověřena na spektrofotometru (viz Obr. 3.23).

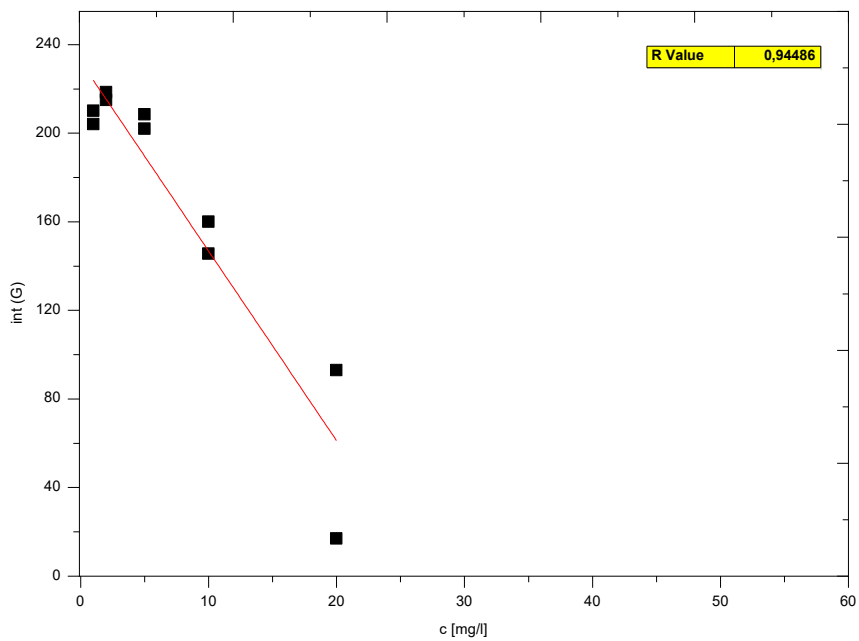


**Obr. 3.23** Kalibrační přímka sestavená podle absorbance jednotlivých standardů zjištěné spektrofotometrem Hewlett Packard 8453.  
Index korelace  $R$  kalibrační přímky: 0,9981  
Rovnice kalibrace:  $y = 0,0954 + (-0,10143)x$





**Obr. 3.24** Kalibrační přímka sestavená podle intenzity modré (B) barvy použitá při měření.  
 Index korelace  $R$  kalibrační přímky: 0,98325  
 Rovnice kalibrace:  $y = -15,625x + 277,13$



**Obr. 3.25** Kalibrační přímka sestavená podle intenzity zelené (G) barvy použitá při měření.  
 Index korelace  $R$  kalibrační přímky: 0,94486  
 Rovnice kalibrace:  $y = -8,5616x + 232,42$

## Příprava vzorku, analýza vzorku

Vzorek byl pro analýzu připraven v 5ml odměrné baňce. Do baňky byly pipetovány právě 4 ml vzorku (viz Tab 3.18). K těm bylo automatickou nastavitelnou pipetou přidáno 200  $\mu$ l thiokyanatanu draselného a po rysku pak deionizovaná voda (viz Tab. 3.18).

**Tab. 3.18** Množství jednotlivých roztoků a činidel při přípravě vzorků k analýze.

c [mg/l]	V <sub>vzorku</sub> [ $\mu$ l]	V <sub>KSCN</sub> [ $\mu$ l]	V <sub>celkem</sub> [ml]
x	4000	200	5,00

Z baňky bylo do jamky mikrotitrační destičky ke kalibračním standardům pipetováno 250  $\mu$ l vzorku. Destička byla uchycena do stojanu, podsvícena a vyfocena s nastavením fotoaparátu použitým při kalibraci metody (viz Tab. 3.17) - **Tab. 3.17**) - fotografování kalibračních standardů a vzorků probíhalo zároveň.

Fotografie byla pro vyhodnocení převedena do formátu PSD a v programu Adobe Photoshop CS6 byla vyhodnocena. Pro zjištění intenzit barev byl použit nástroj „kapátko“ s otevřeným dialogovým oknem.

Z jamky se vzorkem byla intenzita modré (B) i zelené (G) barvy zjištěna právě šestkrát. Ze zjištěných hodnot byl vytvořen medián. Z toho byla pomocí rovnice grafu kalibrační přímky vypočítána koncentrace železa ve vzorku v mg/l.

Vzorek byl zároveň při vlnové délce 470 nm přeměřen na spektrofotometru Hewlett Packard 8453.

### 3.4.2 Vyhodnocení

Stanovená koncentrace byly porovnány s tou, kterou při vlnové délce 470 nm stanovil spektrofotometr. Protože byl vzorek připraven a analyzován pouze jednou, nebylo provedeno statistické vyhodnocení.

Spektrofotometrem stanovená koncentrace železa ve vzorku odebraném v prameni Korek byla 7,31 mg/l. Podle kalibrace sestavené z intenzit zelené (G) barvy (viz Obr. 3.25) byla ve vzorku DSLR spektrofotometrií stanovena koncentrace 7,43 mg/l.

### 3.4.3 Zhodnocení a diskuze

Upravené uspořádání metody (viz Příloha III) bylo testováno na jednom odebraném vzorku. Práce si kladla za cíl dosáhnout s upraveným uspořádáním metody

- a. výsledků s RSD max. 10 %,
- b. výsledků blízkých těm, které stanoví spektrofotometr.

Při otestování nebylo prováděno statistické vyhodnocení, jelikož byl vzorek připraven a analyzován pouze jednou.

Koncentrace analytu v odebraném vzorku, která byla stanovena DSLR spektrofotometrií byla velmi blízká té, kterou stanovil klasický spektrofotometr. Lišily se pouze v řádu jedné desetiny.

Testování na vzorku lze tedy označit jako úspěšné a použité uspořádání jako optimální.

## 4 ZÁVĚR

Během této práce bylo provedeno několik měření, při kterých byly hledány možné problémy při stanovení a bylo vytvářeno nové uspořádání metody, s nímž by bylo možné dosáhnout naplnění cílů nastavených v úvodu práce.

Nové uspořádání metody bylo později testováno na jednom odebraném vzorku. Stanovená koncentrace byla velmi blízká obsahu železa ve vzorku, který stanovil spektrofotometr. Tím se povedlo naplnit cíl položený v úvodu práce.

Na základě práce byla vytvořena jednoduchá metodika ke stanovení koncentrace železitých kationtů DSLR spektrofotometrií, přiložená k této práci jako příloha III. Kromě metodiky byl napsán článek pojednávající o práci, který byl poslán do Chemických listů (viz Příloha II).

Výsledky práce lze mimo jiné shrnout prostřednictvím odpovědí na otázky položené v úvodu práce:

*a. Jaké je optimální uspořádání metody stran fotoaparátu (nastavení fotoaparátu, další příslušenství)?*

Při měření je vhodné použít stativ s vyositelnou středovou tyčí. Díky němu je zaručena stejná vzdálenost od vzorků při fotografování a kolmost objektivu ke vzorkům. Měření je ale možné provést i bez stativu, případně je možné stativ nahradit laboratorním stojanem apod..

Při práci je důležité mít co největší kontrolu nad fotoaparátem, aby prováděl co nejméně automatických změn nebo nastavení. Proto je vhodné zvolit plně manuální režim. V něm je pak zásadním nastavením vyvážení bílé. To musí odpovídat použitému podsvícení co nejlépe (nejlepší je pak ruční kalibrace vyvážení bílé před každým měřením pomocí fotografických bílých destiček při daném světle).

Dále je také nezbytné nastavit nejnižší možnou hodnotu citlivosti (ISO), aby bylo na fotografii co nejméně barevného šumu, který může ovlivnit hodnoty intenzit barev, ze kterých je poté stanovována koncentrace železa.

*b. Jaká je optimální práce s daty (do jakého formátu ukládat fotografie, v čem a jakým způsobem je vyhodnocovat)?*

Optimálním formátem pro uložení fotografie ve fotoaparátu je formát obecně označovaný jako RAW. Pro vyhodnocení se velmi osvědčilo využít program

Adobe Photoshop. Právě do formátu PSD, který je podporovaný Photoshopem je možné konvertovat RAW fotografii, aniž by došlo ke změně barvy či k jiné nežádoucí kompresi dat. Pro zjištění intenzit barev je pak použit nástroj „kapátko“ a jeho dialogové okno, ve kterém se zobrazují zjišťované intenzity.

Adobe Photoshop má nevýhodu toho, že se jedná o placený software. Je ale možné využít jeho 30 denní zkušební lhůtu.

Pro konečné zpracování intenzit, vyhodnocení a stanovení koncentrace je možné použít jakýkoliv tabulkový software.

*c. Je žádoucí při analyzování použít podsvícený podklad? Jestliže ano jaký, případně jakého typu?*

Během práce byly vytvářeny standardní podmínky pro provedení stanovení. Vzhledem k tomu, že při stanovení hraje velkou roli světlo, bylo nutné odstínit denní světlo nebo osvětlení místnosti, ve které je stanovení prováděno. Toho bylo dosaženo analyzováním vzorků v jakési „temné komoře“. S tím byl spojen nedostatek světla pro pořízení fotografie. Proto by musel být nedostatek světla kompenzován zvýšením hodnoty ISO (citlivosti) a delším expozičním časem u fotoaparátu, což s sebou nese v práci zmíněná negativa.

Proto je dobré použít podsvícený podklad, konkrétně LED videosvětlo, z důvodů popisovaných výše v textu. Videosvětlo použité při této práci nebylo úplně vhodné, jelikož kvůli špatným kontaktům problikávalo.

*d. Do čeho je vhodné během měření umístit analyzovaný vzorek (mikrotitrační destička nebo kyveta)?*

Při měření v rámci předložené práce bylo zjištěno, že pro umístění vzorků analyzovaných DSLR spektrofotometrií je mikrotitrační destička. Je v ní možné fotografování většího počtu vzorků. Zároveň se jedná i o způsob umístění vzorku, který byl již vyzkoušen, a možné problémy spojené s umístěním vzorku do mikrotitrační destičky popsané výše byly co se týče vlivu na stanovení vyvráceny.

Mj. je mikrotitrační destička levnější než kyvety, kterých by pro analýzu bylo potřeba opravdu mnoho kvůli nutnému provedení současného fotografování kalibrace sestávající se z několika sad standardů a samotných vzorků.

e. *Jaký je lineární koncentrační rozsah metody pro stanovení železitých kationtů? Lze metodu použít pro stanovení koncentrace železitých kationtů ve vodách minerálních pramenů?*

Lineární koncentrační rozsah metody byl určen z kalibračních přímek sestavených během práce. Z těch je vidět, že koncentrace stanovitelné DSLR spektrofotometrií jsou cca 2 – 40 mg/l. U nižších stanovených koncentrací je velmi pravděpodobné, že se jedná o šum zařízení. U koncentrací >40 mg/l není možné koncentrace přesně vyhodnotit, jelikož jsou intenzity doplňkových barev v příliš koncentrovaných komplexech moc malé. Zároveň koncentrační rozsah >40 mg/l pak již není lineární.

DSLRL spektrofotometrií lze stanovovat koncentrace železa ve vodách, kde se očekává zvýšený obsah železa (ten může indikovat barva nebo chuť vody pramene). Tyto se zvýšeným obsahem železa mohou být povětšinou vodami minerálních pramenů.

Touto metodou (a pravděpodobně ani klasickou laboratorní spektrofotometrií) není možné stanovit obsah železa v kohoutkové nebo balené vodě. Tyto typy vod jsou odželezovány, jelikož zvýšená koncentrace železa negativně ovlivňuje sensorické a užité vlastnosti těchto vod.

f. *Jaké jsou možné problémy během stanovování DSLR spektrofotometrií a co je způsobuje?*

Zásadní problémy při stanovení koncentrace DSLR spektrofotometrií mohou být dva

- a. reakce thiokyanatanu draselného s kationty kobaltu,
- b. počet přípravy vzorků pro analýzu.

Metoda je určena především ke stanovení koncentrace železa v minerálních pramenech, kde je však možný výskyt i látek obsahujících kobalt. Ten také barevně reaguje s činidlem používaným při analýze a komplex poté více absorbuje. Při vyhodnocení bychom tak vyhodnocovali koncentraci obou látek, a ne pouze železa.

Tento problém lze řešit použitím metody standardního přídavku během analyzování.

Kromě zjišťování koncentrace železitých kationtů je prováděno statistické vyhodnocení dat, při kterém se mj. zjišťuje přesnost výsledků udávaná v podobě RSD. Ta ale může být velmi vysoká kvůli provádění vyhodnocení z malého počtu hodnot. Tomu lze předejít tím, že budou vzorky pro analýzu připraveny každý min. třikrát a statistické vyhodnocení tedy bude provedeno ze tří hodnot.

## LITERATURA

- [1] EŠKA M., CHVOSTA S., JELŠÍK T., KUDLÁČEK T., ŘEHÁK D., SLAPNÍČKA J., ZAPLETAL K. (2017): *Základní chemický a fyzikální rozbor přírodních minerálních pramenů v okolí Mariánských Lázní* [online]. [cit. 2017-12-03] Dostupné z WWW: <http://archiv.prirodniskola.cz/expedice/tepelsko2017/prameny-2017.pdf>
- [2] ZÝKA a kol. (1988): *Analytická příručka: Díl II*. Vydavatelství SNTL/Alfa Praha, 4. upr. vyd., 832 str., ISBN 04-611-88
- [3] UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE, PřF Katedra analytické chemie (2004): *Základní praktikum z analytické chemie* [online]. [cit. 2017-10-30]. Dostupné z WWW: <https://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/praktikum.pdf>
- [4] NĚMCOVÁ I., ČERMÁKOVÁ L., RYCHLOVSKÝ P. (2004): *Spektrometrické analytické metody I*. Nakladatelství Karolinum Praha, 2. vyd., 166 str., ISBN 80-246-0776-X
- [5] DRMOTA A., ADAMCOVÁ D. (2013): *Vlastnosti minerálních vod lesních a neudržovaných pramenů v okolí Mariánských Lázní* [online]. [cit. 2018-01-16]. Dostupné z WWW: [http://archiv.prirodniskola.cz/profilove-prace/2012-2013/maturita\\_drmota\\_prameny\\_130701.pdf](http://archiv.prirodniskola.cz/profilove-prace/2012-2013/maturita_drmota_prameny_130701.pdf)
- [6] OPEKAR F., JELÍNEK I., RYCHLOVSKÝ P., PLZÁK Z. (2007): *Základní analytická chemie: Pro studenty, pro něž analytická chemie není hlavním studijním oborem*. Nakladatelství Karolinum Praha, 3. dotisk 1. vyd., 201 str., ISBN 978-80-246-0553-1
- [7] PIHAN R. (2012): *Expoziční základy* [online]. [cit. 2018-02-03]. Dostupné z WWW: [http://www.fotoroman.cz/tech2/expozice1\\_zaklad.htm](http://www.fotoroman.cz/tech2/expozice1_zaklad.htm)
- [8] PIHAN R. (2013): *Porozumění správné expozici: Expoziční hodnota (Exposure Value, EV)* [online]. [cit. 2018-02-05]. Dostupné z WWW: [http://www.fotoroman.cz/tech1/exposure\\_basic.htm#Expozi%C4%8Dn%C3%AD](http://www.fotoroman.cz/tech1/exposure_basic.htm#Expozi%C4%8Dn%C3%AD)
- [9] FRASER B. (2004): *Understanding Digital RAW Capture* [online]. [cit. 2018-06-26]. Dostupné z WWW: [https://www.adobe.com/digitalimag/pdfs/understanding\\_digitalrawcapture.pdf](https://www.adobe.com/digitalimag/pdfs/understanding_digitalrawcapture.pdf)
- [10] PIHAN R. (2008): *Vše o formátu RAW – 1. díl* [online]. [cit. 2018-08-02]. Dostupné z WWW: <https://www.digimanie.cz/vse-o-formatu-raw-1dil/2182>





