

I.C. Гулий, П.С. Циганков, В.А. Домарецький, П.Л. Шиян, Т.А. Королюк,
К.Є. Королюк
И.С. Гулый, П.С. Цыганков, В.А. Домарецкий, П.Л. Шиян, Т.А. Королюк,
К.Е. Королюк
Hulyi Ivan, Zcigankov Peter, Domaretskiy Vitaliy, Shiyan Peter, Korolyk Tamara,
Korolyk Konstantin

Кількісна хроматографія на папері і в тонкому шарі з використанням комп'ютерних технологій

Количественная хроматография на бумаге и в тонком слое с использованием
компьютерных технологий

Quantitative chromatography on a paper and in a thin layer with use of computer
technologies

Показано можливість використання пакета програм Adobe Photoshop™ для сканування і кількісного аналізу паперових і тонкошарових хроматограм. Для аналізу використано стандартний набір оргтехніки – сканер і комп'ютер із встановленим програмним забезпеченням для оброблення зображень, що особливо зручно в разі проведення досліджень невеликих серій.

Показана возможность использования пакета программ Adobe Photoshop™ для сканирования и количественного анализа бумажных и тонкослойных хроматограмм. Для анализа использован стандартный набор оргтехники – сканер и компьютер, с установленным программным обеспечением по обработке изображений, что особенно удобно при проведении небольших серий опытов.

The opportunity of use of software package Adobe Photoshop™ for scanning and the quantitative analysis paper and thin-layer chromatogram is shown. For the analysis the standard set of office equipment - the scanner and a computer, with the established software on processing images that is especially convenient at carrying out of small series of experiences is used.

Ключові слова: хроматографія на папері, хроматографія в тонкому шарі, комп'ютерне сканування, пікселі

Ключевые слова: хроматография на бумаге, хроматография в тонком слое, компьютерное сканирование, пиксели

Key words: chromatography on a paper and in a thin layer, computer scanning, pixels

«Харчова промисловість», 2000. Вип. 46

Під час дослідження та оптимізації технології приготування спиртових бражок з крохмалевмісної сировини перед авторами постало завдання якісного і кількісного аналізу складу вуглеводів зернового суслу, оцукреного внаслідок ферментативного гідролізу. Склад вуглеводів залежить від технологічних параметрів проведення процесу гідролізу, а саме: температури і рН субстрату, тривалості експозиції, виду сировини, ступеня її подрібнення тощо.

Для проведення досліджень було використано хроматографічний аналіз на папері. Хроматографія на папері й у тонкому шарі - один з найпростіших та універсальних методів розділення мікрокількостей складних багатокомпонентних сумішей неорганічних і органічних сполук.

Особливості проведення якісного і кількісного хроматографічного аналізу на папері та в тонкому шарі розглянуто в багатьох загальновідомих роботах і монографіях.

У кількісному аналізі речовин використовують два основних методи визначення речовини:

- після елюювання її з паперу або шару сорбенту;
- безпосередньо на папері або в тонкому шарі його.

Останній метод є прямим і тому чутливішим до змін концентрації речовин, ніж непрямий метод, в якому елюювання є лише першою стадією визначення. Саме ця перша операція вносить найбільші похибки під час вимірювання.

Прямі методи засновані на визначенні мікро- або нанограмових кількостей речовини в хроматографічній плямі. Вони включають або визначення радіоактивності помічених речовин, або фотометричні методи, серед яких найпоширенішими є фотоденситометричні.

Денситометричні методи засновані на отриманні інформації про різницю в оптичній густині між хроматографічною плямою та навколишнім адсорбентом (відлік за сірою шкалою).

Для вимірювань за методом відображення джерело світла і фотоелемент денсиметра встановлюють під певним кутом один до одного й вимірюють кількість відбитого від хроматограми світла, яке відносять до інтенсивності світла, що падає. Після такого оброблення (сканування) на реєструвальному пристрої з'являються піки. Визначаючи площу цих піків, отримують дані про кількісний склад речовин.

Окремим випадком проведення такої роботи може бути комп'ютерне сканування хроматограм. При цьому зчитується повна кольорова інформація зображення, тобто воно розбивається на так звані пікселі (маленькі крапки). Кожний піксель характеризує чітко визначена числова характеристика щодо його кольору та розміру в складі зображення. Системи сканування та оброблення інформації дають змогу охарактеризувати в числовому вигляді 16 мільйонів кольорів або 256 (від 0 до 255) відтінків сірого кольору - від чорного до білого. Для виконання кількісного аналізу цілком достатньою є роздільна здатність (тобто кількість крапок на одиницю площі) $8,7 \text{ пікс/мм}^2$.

Сучасні комп'ютерні технології дають можливість замінити фотоденсиметри для проведення кількісного аналізу, при цьому використовують не дефіцитне і складне обладнання, а стандартний набір оргтехніки - сканер і комп'ютер із встановленим програмним забезпеченням для оброблення зображень. Це особливо зручно при проведенні дослідів невеликих серій.

Під час проведення роботи використано пакет програм Adobe Photoshop™. Ця програма дає можливість:

відфільтрувати зображення, тобто позбутися фону, що залишається після проявлення хроматограми;

ідентифікувати речовини;

визначити інтенсивність кольору і площу кожної плями, що є базою для подальшого обчислення кількісного вмісту речовин.

Робота була проведена за такою схемою:

1. Комп'ютерне сканування зображення хроматограми.
2. Переведення відсканованого кольорового зображення в зображення у відтінках сірого (grayscale) від 255 для білого до 0 для чорного з роздільною здатністю 75 пікс/мм (рис.1, а).
3. Видалення фону зображення (рис.1, б).
4. Якщо зображення недостатньо контрастні, то, використовуючи команду множення, можна підсилити їхню чіткість (рис.1, в).
5. Обведення за допомогою «олівця» меж плям на зображенні (рис.1, г).
6. Визначення за допомогою функції «Гістограма» кольорової характеристики і площі виділених плям.

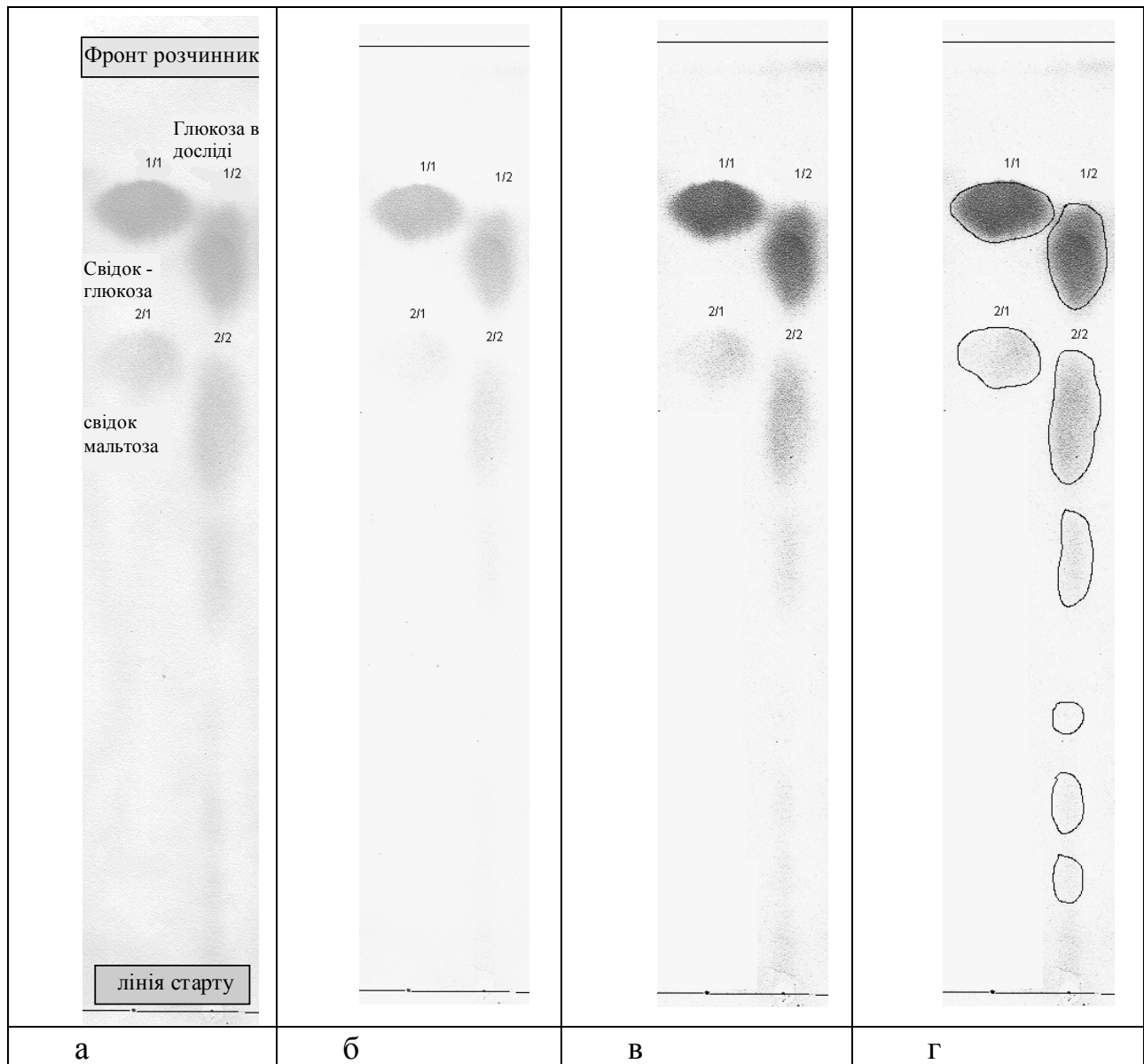


Рис.1. Приклад кількісного оброблення хроматограми на папері (розподілення вуглеводів оцукреного сусла при виробництві спирту з крохмалевмісної сировини)

Гістограма - це графічне зображення тональної якості та рівнів темноти в зображенні (рис.2). Ці графіки відображають кількість пікселів на кожному рівні яскравості. За допомогою гістограм можна розглядати сірі рівні, рівні яскравості пікселів у вибраному зображенні або рівні пікселів в індивідуальних каналах кольору (якщо обробляється кольорове зображення).

Вісь гістограми X (шкала яскравості) відображає значення кольору від чорного (0) до білого (255).

Числові значення у вікні «Гістограма» відображають статистичну інформацію відносно кольорових значень пікселів.

Середнє (Mean) - середнє арифметичне значення яскравості.

Стандартне відхилення (Std Dev) - ширина зони зміни кольору вибраного зображення, тобто міра того, наскільки широко розкидані дані яскравості від середнього значення їх.

Стандартне відхилення визначають з рівняння

$$\text{Std Dev} = \sqrt{n \sum x^2 - (\sum x)^2 / n^2},$$

де n - загальна кількість даних; x – інтенсивність кольору.

Медіана (Median) показує середнє значення в діапазоні кольорових значень.

Пікселі (Pixels) показують загальну кількість пікселів у зображенні .

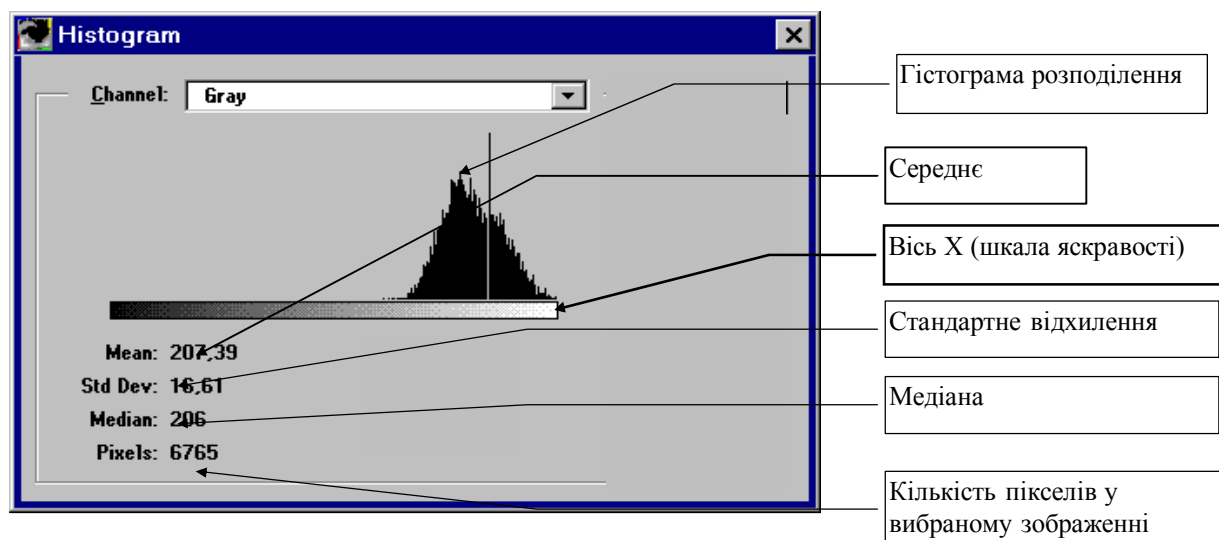


Рис. 2. Вікно «Гістограма» для розрахунку значень інтенсивності кольору з пакета Photoshop 3.0

Результати обробляли порівнянням наведених характеристик плям з характеристиками свідків, кількість яких була задана.

Концентрацію речовин, мг/см, визначали з рівняння, мг/см ,

$$C_i = P_i C_i^{св} \div P_i^{св},$$

де $C_i^{св}$ - відома концентрація речовини i -го свідка, який наносився одночасно з дослідним зразком ; P_i та $P_i^{св}$ - зведені показники кількості i -ї речовини і свідка відповідно, визначаються з рівняння $P = SI / 100$;

$$I - \text{інтенсивність кольору, \%} : I = 100 - I_{0-255} / 2,55;$$

I_{0-255} - інтенсивність за шкалою градації сірого кольору від 0 до 255;

$$S_i - \text{площа плями, см}^2: S_i = \text{SUM}_i / \text{STD};$$

SUM_i - кількість пікселів в i - й плямі; STD - роздільна здатність зображення, пікс/см² .

Результати розрахунків концентрацій речовин згідно із запропонованою методикою наведені в таблиці.

Результати аналізу хроматограми

Якісний аналіз хроматограми			Кількісний аналіз					
Rf	Речовина	Кількість точок	Площа, см ²	Інтенсивність кольору			Концентрація	
				за шкалою 0...255	стандартне відхилення	у % від чорного	Зведений показник	г·10 ⁻⁸
0,96	Свідок глюкоза	2080	2,311	197,16	15,19	22,68	0,52	4,00
0,85	Свідок мальтоза	1441	1,601	227,09	7,83	10,95	0,18	4,00
0,96	Глюкоза	1924	2,138	199,66	13,05	21,70	0,46	3,54
0,85	Мальтоза	1224	1,360	220,37	9,43	13,58	0,18	4,22
0,52	Те саме	1292	1,436	223,36	10,18	12,41	0,18	4,07
0,28	- « -	1282	1,424	231,04	10,77	9,40	0,13	3,05
0,18	- « -	409	0,454	247,29	6,63	3,02	0,01	0,31
0,13	- « -	412	0,458	237,45	8,75	6,88	0,03	0,72

Похибки методу кількісного хроматографічного визначення речовин при застосуванні комп'ютерів для оброблення відеоінформації значною мірою залежать від таких факторів:

точності кількісного нанесення речовин на лінію старту;

якості розділення плям під час руху фронту розчинника;

рівномірності обробки хроматограми проявником;

проміжку часу між проявленням та скануванням хроматограм, який повинен бути щонайменшим.

Висновки.

Слід відзначити, що застосування комп'ютерних технологій дає новий поштовх у відомих і поширених методах хроматографічного аналізу. Цей принцип можна широко використовувати не тільки у дослідженні вуглеводів, а й в аналізі інших складних сумішей харчової, хімічної, мікробіологічної промисловості та в інших напрямках знань.