

## Ispitivanje mogućnosti digitalne fotografije kao načina detekcije pri TLC kvantitativnoj analizi

---

*Ispitivana je mogućnost upotrebe digitalne fotografije kao načina detekcije pri TLC kvantitativnoj analizi. Fotografije razvijenih hromatograma su korišćenjem MATLAB softverskog paketa prevedene u matrice osvetljenosti a potom u 3D figure. Posmatrani su visina figure, njena zapremna i površina poprečnog preseka na nultoj visini. Određena je standardna devijacija, ispitano moguće prisustvo sistematskog odstupanja metode i utvrđena razlika između ovog načina detekcije i standardnog načina koji koristi TLC skener. Pri tome je utvrđeno da je korišćenje visine pika nepouzđano, korišćenje površine na nultoj visini pika ima manju tačnost i preciznost, a korišćenje zapremine pika daje pouzdanije rezultate. Pri tome je uočeno da je metoda opterećena izvesnim otklanjanjem rezultata ali tome nije pronađen tačan uzrok. Takođe postoji statistički bitna razlika između ovog metoda i klasičnog metoda detekcije. Poželjna je dalja razrada metode i njeno ispitivanje u smislu razvijanja jednostavnijeg softverskog aparata, tako da se može brže i jednostavnije primeniti za terenska merenja*

---

### Uvod

Hromatografija je analitička metoda koja se zasniva na razdvajanju supstanci na osnovu njihovih međusobnih razlika u raspodeli između stacionarne i mobilne faze. Kao takva ona predstavlja metodu kako za razdvajanje supstanci u preparativne svrhe tako i za analizu različitih smeša (Otto 1999).

Tankoslojna hromatografija (Thin Layer Chromatography, TLC), predstavlja veoma brzu, elegantnu i nadasve jeftinu tehniku izuzetne osetljivosti. Kod nje je stacionarna faza naneta na ravnu podlogu, od stakla ili aluminijuma (komercijalno dostupne ploče) u vidu tankog sloja. Deblji slojevi se koriste u preparativne svrhe. Sloj stacionarne faze (sorbenta) je najčešće od silika gela ili aluminijum oksida međutim postoje i razne modifikacije, kao što su reversno fazni RP-18, cijano modifikovani silika gel i sl. (Milovanović 1985).

---

Ana Mijušković (1987), Nikšić, Crnogorska Po b/61, učenica 3. razreda Gimnazije "Stojan Cerović" u Nikšiću  
Vanja Hložan (1987), Novi Sad, Bihačka 13a, učenik 3. razreda Gimnazije "Svetozar Marković" u Novom Sadu

MENTOR:  
Filip Lj. Andrić, Hemijski fakultet Beograd

Kvalitativni sastav neke smeše određuje se na osnovu  $R_F$  vrednosti dobijenih mrlja pošto se hromatogram razvije (1). Pri tome se prilikom hromatografisanja uporedo sa analitom na ploče nanose i standardi koji sadrže one supstance za koje se pretpostavlja da se nalaze u samom analitu. Podudaranje  $R_F$  vrednosti komponenti iz analita sa standardima znači da je reč o istim ili bar strukturno sličnim supstancama

$$R_F = \frac{a}{b} \quad (1)$$

gde je:  $a$  – put koji je prešla supstanca, a  $b$  – front rastvarača

Kvantitativna TLC analiza se zasniva na merenju površine hromatografskih zona (mrlja) tj. površine ili visine pikova dobijenih nakon skeniranja razvijenih hromatograma. Površina i visina pika (i u našem slučaju zapremina) linearne su funkcije količine nanete supstance (2) i utoliko su veće ukoliko je količina nanetog uzorka veća.

$$y = a + bx \quad (2)$$

gde je:  $y$  – površina ispod pika, njegova zapremina ili visina pika,  $x$  – koncentracija uzorka,  $a$  – odsečak na  $y$ -osi kalibracione prave, a  $b$  – koeficijent pravca kalibracione prave.

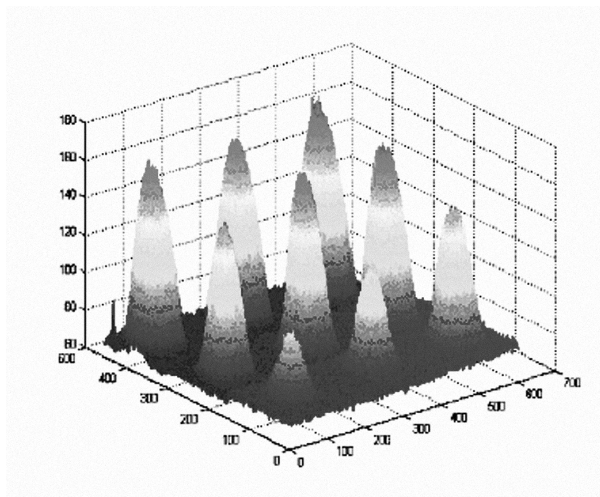
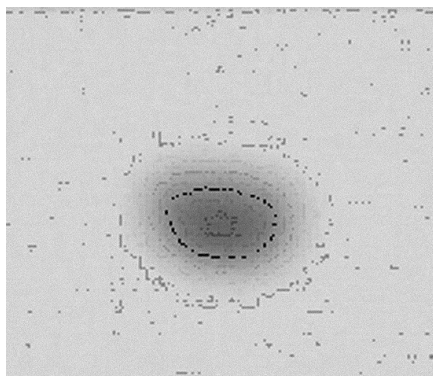
Za merenje intenziteta mrlja i njihovih površina koriste se komercijalno dostupni TLC skeneri (denzitometri). Kako su oni izuzetno skupi, cilj ovog rada bilo je ispitivanje mogućnosti korišćenja digitalne fotografije kao metode detekcije. Prednost ovog načina je u tome što su digitalni aparati značajno jeftiniji, veće su rezolucije od običnih skenera i mogu se, uz pomoć UV lampe, upotrebiti za detekciju mrlja koje su UV aktivne ili na pločicama silika gela koje su impregnirane UV aktivnim supstancama poput ZnS.

Dobijene fotografije su obrađene odgovarajućim softverom i na osnovu toga su konstruisani 3D prikazi. U našem slučaju one su importovane u MATLAB kao matrice osvetljenosti. Za određivanje količine supstance mogu se uzeti površine mrlja, zapremine i visine pikova dobijenih u 3D prikazu (slika 1). Za pozadinski fon, koji je potrebno oduzeti od ostatka slike, uzete su prosečne vrednosti osvetljenosti na donjim delovima pločica, na kojima se mrlje ne nalaze.

Pik dobijen na ovaj način okarakterisan je površinom  $P$  horizontalnog preseka na izvesnoj visini, visinom pika  $h$  koji predstavlja maksimalno zatamnjenje zone i zapreminom pika  $V$  koja se može izračunati na sledeći način:

$$v = \sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^n h_{ij} p_{ij} \quad (3)$$

gde je:  $h_{ij}$  – intenzitet datog piksela u  $i$ -toj koloni i  $j$ -tom redu matrice,  $p_{ij}$  – piksel u  $i$ -toj kolni i  $j$ -tom redu matrice.



## Materijal i metode

Kao model supstance za kvantitativnu analizu uzet je kiselo-bazni indikator metil-crveno. Napravljena je standardna serija rastvora ovog indikatora u 96% etanolu razblaživanjem osnovnog rastvora koncentracije  $c = 0.005 \text{ mol/dm}^3$ .

Za hromatografisanje su korišćene TLC pločice (silika-gel, F254 MERCK) dimenzija 4×6 cm. Na pločice su mikrošpricom nanete mrlje (zapremina uzorka iznosila je  $1.0 \pm 0.1 \text{ } \mu\text{L}$ ) na rastojanju 1 cm od donje ivice i na međusobnom rastojanju od 0.7 cm.

Kao mobilna faza korišćena je dvokomponentna smeša hloraform : etil-metil-keton u zapreminskom odnosu 9:1. Hromatogrami su dobijeni uzlaznom tehnikom, a pločice su pre razvijanja sićene oko 10 minuta. Nakon razvijanja dobijeni hromatogrami su fotografisani digitalnim fotoaparatom (Kodak EasyShare CX7430, 4.0 MPix) sa podjednake razdaljine, vodeći računa da nema bitnijeg variranja osvetljenja. U cilju poređenja sa rezultatima dobijenih metodom fotografisanja date pločice su skenirane na TLC skeneru na talasnoj dužini od 500nm (oblast širokog apsorpcionog maksimuma kiselog oblika indikatora).

## Rezultati i diskusija

Najpre je napravljena standardna serija rastvora indikatora. Koncentracije su date u tabeli 1.

Rezultati su prikazani grafički i tabelarno (tabela 2, slike 2 i 3.)

Površine mrlja (na nultoj visini)  $P_0$  su dobijene izbacivanjem svih piksela veće osvetljenosti od pozadinske (negativi).

Slika 1.

Fotografija izdvojene zone na razvijenom hromatogramu i njoj odgovarajući 3D prikaz dobijen obradom u MATLAB-u

Figure 1.

Photography of the single zone sliced from developed chromatogram and their 3D view generated using MATLAB software.

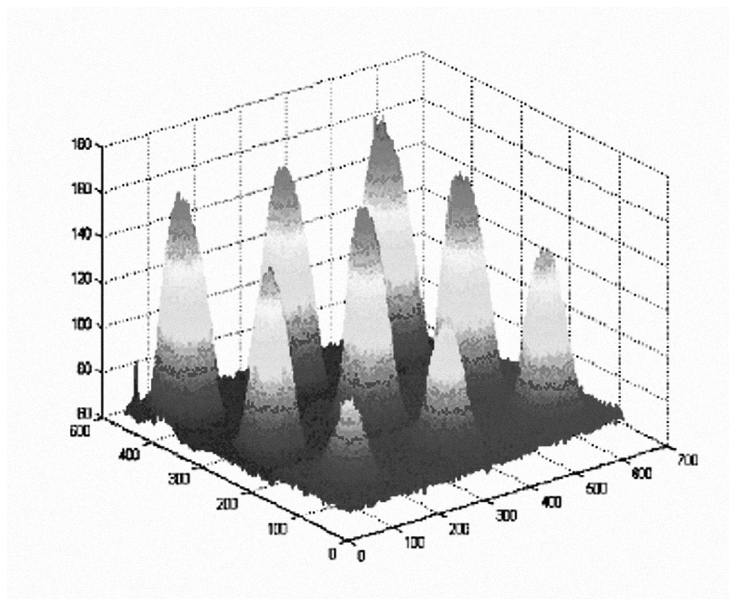
Tabela 1. Zapremina osnovnog rastvora metil-crvenog, etanola i koncentracija metil-crvenog u standardnoj seriji rastvora

Uzorak	Zapremina rastvora metil-crvenog [mL]	Zapremina etanola [mL]	Koncentracija metil-crvenog $10^{-3}$ [mol/dm <sup>3</sup> ]
1	1	9	0.5
2	2	8	1.0
3	3	7	1.5
4	4	6	2.0
5	5	5	2.5
6	6	4	3.0
7	8	2	4.0
8	9	1	4.5
9	10	0	5.0

Tabela 2. Površine zona i zapremine pikova kao i njihove visine za kalibracionu pravu

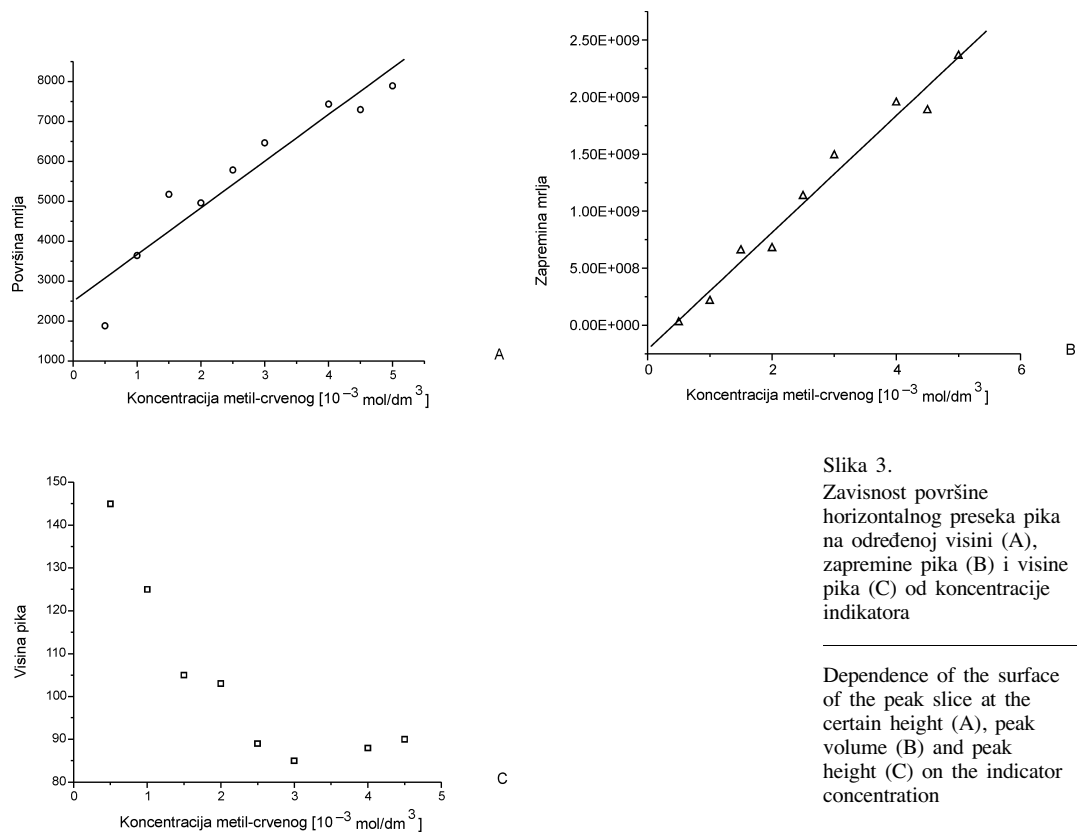
Uzorak	Koncentracija indikatora $10^{-3}$ [mol/dm <sup>3</sup> ]	$P_o$ [pix]	$V$ [pix]	$h$ [pix]
1	0.5	1885	23865985	78
2	1.0	3646	212157094	90
3	1.5	5174	655473364	88
4	2.0	4961	675405423	85
5	2.5	5787	1132423308	89
6	3.0	6467	1486970244	103
7	4.0	7437	1950955647	105
8	4.5	7295	1883911865	125
9	5.0	7894	236195600	145

Sa slike 3 se vidi da postoji linearna zavisnost između površine poprečnog preseka na nultoj visini (slika 3A), odnosno zapremine pika (slika 3B) od koncentracije indikatora. Za ove slučajeve urađena je linearna regresiona analiza, a koeficijenti pravca i odsečci na y-osi dati su tabelarno (tabela 2). Pri tome vredosti Pirsonovog koeficijenta u oba slučaja imaju visoke vrednosti koje prelaze vrednost od 0.98 što ukazuje na veoma visok stepen korelacije. U slučaju visine pika (slika 3C) postoji rastući trend ali zavisnost nije linearna. Odstupanje od linerne zavisnosti može biti uzrokovano činjenicom da su zone dosta široke pa sama visina pika nije dovoljno pouzdan parametar. Za slučaj znatno oštrijih pikova tj. užih zona, mogla bi se očekivati znatno manja odstupanja od linerane zavisnosti.



Slika 2.  
3D prikaz pikova  
dobijenih obradom  
fotografija za kalibracion

Figure 2.  
3D view of peaks  
generated from digital  
photographs of  
chromatograms using  
MATLAB software  
(calculated for  
calibration curve)



Slika 3.  
Zavisnost površine  
horizontalnog preseka pika  
na određenoj visini (A),  
zapremine pika (B) i visine  
pika (C) od koncentracije  
indikatora

Dependence of the surface  
of the peak slice at the  
certain height (A), peak  
volume (B) and peak  
height (C) on the indicator  
concentration

Na osnovu ovoga, u daljem radu kao procena količine supstance uzete su jedino površine horizontalnih preseka na nultoj visini i zapremine pikova.

Tabela 3. Rezultati linearno regresione analize za slučajeve A i B za kalibracionu pravu

	A – površina preseka pika	B – zapremina pika ( $\times 10^8$ )
Koeficijent pravca ( $b$ )	1167	5.13
Odsečak na y-osi ( $a$ )	2497	-2.13

Za istu kalibracionu seriju skeniranjem pločica na TLC skeneru dobijeni su pikovi koji su okarakterisani površinom  $P_s$  i visinom  $h_s$ . Dobijeni rezultati prikazani su u tabeli 4 i slikama 4 i 5.

Tabela 4. Površine ispod pikova i njihove visine dobijene merenjem na TLC skeneru  $\lambda = 500$  nm.

Uzorak	Koncentracija $10^{-3}$ [mol/dm <sup>3</sup> ]	$P_s$ [ $10^{-6}$ Vm]	$h_s$
1*	0.5	224.9	8.8
2	1.0	934.3	40.1
3	1.5	1126.4	49.1
4	2.0	1404.2	60.0
5*	2.5	2367.8	86.1
6	3.0	2188.9	83.6
7*	4.0	1848.8	60.6
8*	4.5	2980.3	92.8
9	5.0	2941.2	93.7

U slučaju linearno regresione analize vrednosti označene zvezdicama u tabeli 4 nisu uzete u razmatranje jer su te mrlje usled dužeg stajanja promenile boju, verovatno usled raspadanja na kiselom sloju silika gela (detekcija zona na TLC skeneru urađena je dva meseca nakon razvijanja pločica).

## Procena preciznosti metode

U cilju procene preciznosti ovog načina određivanja koncentracije ponovljeno je devet merenja na uzorcima jednake koncentracije  $c_t = 0.0025$  mol/dm<sup>3</sup>.

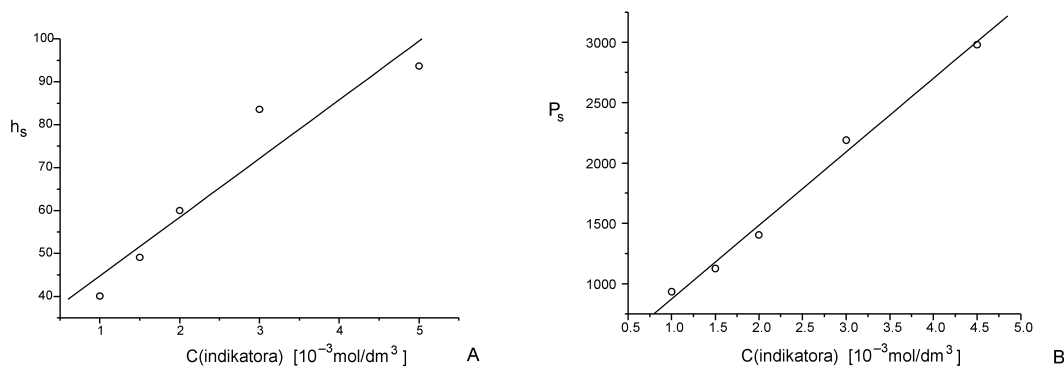


Tabela 5. Ponovljena merenja za tačnu koncentraciju  $C_t = 2.5 \cdot 10^{-3}$  mol/dm<sup>3</sup>. Dobijene koncentracije indikatora izračunate su na osnovu izmerene zapremine ispod pika ili na osnovu površine poprečnog preseka pika na nultoj visini u oznakama  $C_v$  i  $C_p$ .

$C_p \cdot 10^{-3}$ [mol/dm <sup>3</sup> ]	$C_v \cdot 10^{-3}$ [mol/dm <sup>3</sup> ]
3.48	2.43
3.67	2.78
3.96	3.18
3.49	3.56
4.17	2.84
3.37	3.70
4.54	4.16
3.32	2.62
3.48	2.54

Slika 4. Zavisnost visine pika (A) i površine pika (B) dobijenih detekcijom zona TLC skenerom od koncentracije indikatora.

Dependence of the peak height (A) and the peak surface (B) on the indicator concentration. Detection of the single zones using TLC scanner

$$Sd_v = 0.00597, Sd_p = 0.00415$$

Dakle, relativna standardna devijacija ne bi trebalo da prelazi u prvom slučaju više od 23% a u drugom 16%. Za analitičke svrhe ovakva greška je relativno velika, ali ako se uzme u obzir jednostavnost, brzina i mala cena metode onda se može reći da je ovakva preciznost sasvim zadovoljavajuća. Ova merenja su dalje iskorišćena za procenu tačnosti metode. U oba slučaja su izračunate srednje vrednosti koncentracija:

$$\bar{c}_p = 3.72 \cdot 10^{-3} \text{ mol/dm}^3 \text{ i } \bar{c}_v = 3.09 \cdot 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$$

A potom je t-testom urađeno poređenje sa tačnom vrednošću od  $2.5 \cdot 10^{-3}$  mol/dm<sup>3</sup>. Dobijene vrednosti za parametar  $t$  u oba slučaja su prevazilazile tablične vrednosti za nivo poverenja od 95% i dati broj merenja (stepeni slobode), tako da se na osnovu ovoga može zaključiti da oba metoda pokazuju izvesno odstupanje.

## Procena sistematske greške metode korišćenjem t-testa za zavisne uzorke

U cilju dalje procene odstupanja napravljeno je devet uzoraka nepoznatih koncentracija. Metodama površine preseka na nultoj visini i zapremine pika izmerena je koncentracija indikatora, što je označeno  $C_p$  i  $C_v$  redom. Dobijeni rezultati su potom upoređeni sa tačnim koncentracijama  $C_t$ , i koncentracijama koje su izračunate na osnovu podataka dobijenih skeniranjem na TLC skeneru. Ovi rezultati su podvrgnuti uparenom t-testu (Otto 1999; Miller i Miller 2000). Razlog zbog koga je upotrebljen upareni t-test najpre leži u činjenici da se njime ne uzimaju u obzir standardne devijacije (varijanse) dvaju metoda koje se porede što u ovom slučaju predstavlja izuzetnu prednost. Rezultati su prikazani u tabeli 6.

Tabela 6. Vrednosti odstupanja  $C_p$  i  $C_v$  od  $C_t$  (označeno kao  $d_p$  i  $d_v$ )

Nepoznati uzorci	$C_t [10^{-3} \text{ mol/dm}^3]$	$C_p [10^{-3} \text{ mol/dm}^3]$	$C_v [10^{-3} \text{ mol/dm}^3]$	$d_p$	$d_v$
A	2.15	3.40	3.35	1.25	1.20
B	3.60	3.90	4.54	0.60	1.24
C	3.30	3.82	4.49	0.22	0.89
D	2.60	3.14	2.91	0.54	0.31
E	1.75	2.63	2.13	0.88	0.38
F	1.10	1.61	1.21	0.51	0.11
G	2.35	3.66	3.81	1.31	1.46
H	1.25	2.05	1.70	0.80	0.45
I	0.75	1.63	1.25	0.88	0.50

Dobijene su srednje vrednosti odstupanja za obe metode i njihove standardne devijacije:

$$\bar{d}_p = 0.776, Sd_p = 0.353; \bar{d}_v = 0.726, Sd_v = 0.481$$

Na osnovu ovih vrednosti su izračunate vrednosti studentovog parametra  $t$ , jednačinom (4):

$$t = \frac{\bar{d}}{Sd} \sqrt{n} \quad (4)$$

gde je  $n$  – broj merenja.

Dobijene vrednosti ( $t_p = 6.59$ ;  $t_v = 4.53$ ) su veće od tabelarnih (1.80) za ovaj broj stepeni slobode ( $n = 9$ ) i pri stepenu poverenja od 95%.

Na osnovu ovoga sledi da metod u ovom opsegu koncentracija pokazuje izvesno (sistematsko) odstupanje. Uzrok odstupanja složenog je porekla. On pre svega može biti ukorenjen u matematičkoj obradi fotogra-



fija ili u samom eksperimentalnom radu (pripremanje rastvora, nanošenje uzoraka na pločice, razvijanje hromatograma, fotografisanje...). U našem slučaju pretpostavljeno je da nanošenje polaznih mrlja, detekcija i način obrade u softveru mogu biti izvori značajnog odstupanja. Šta od ovih parametara u ovom konkretnom slučaju doprinosi i u kojoj meri teško je reći.

### Poređenje rezultata dobijenih fotografskom detekcijom i detekcijom na TLC skeneru

Urađeno je poređenje dvaju metoda. Metod 1 koji koristi digitalnu fotografiju kao metod detekcije i zapreminu pika pri daljem izračunavanju i metod 2 koji predstavlja klasično skeniranje na TLC skeneru pri fiksnoj talasnoj dužini, pri tome je za izračunavanje uzeta površina ispod dobijenog pika. Takođe je u ovom slučaju za procenu međusobnog odstupanja metoda korišćen upareni t-test. Rezultati su prikazani u tabeli 7.

Tabela 7. Vrednosti odstupanja  $C_V$  dobijenog metodom fotografisanja i obrade u MATLAB – u od  $C_P$  dobijenog pomoću detekcije na TLC skeneru (označeno kao  $d_V$ )

Nepoznati uzorci	$C_P$ (TLC skener) [ $10^{-3}$ mol/dm <sup>3</sup> ]	$C_V$ [ $10^{-3}$ mol/dm <sup>3</sup> ]	$d_V$
A	1.64	3.35	1.71
B	3.76	4.54	0.78
C	2.55	4.49	1.94
D	3.33	2.91	0.42
E	3.32	2.13	1.19
F	0.77	1.21	0.44
G	3.17	3.81	0.64
H	1.81	1.70	0.11
I	0.52	1.25	0.73

Na osnovu jednačine (4) izračunata je vrednost Studentovog parametra  $t$  koja je u ovom slučaju iznosila 4.4. Ova vrednost je veća od tabelarne za nivo poverenja od 95% i dati broj merenja te se stoga može zaključiti da postoje razlike između ova dva metoda detekcije. Potpuno je nebitno da li su vrednosti za nepoznate uzorke dobijene TLC skenerom u skladu sa onim vrednostima koje su uzete za tačne ili ne. Bitno je da se one razlikuju od onih vrednosti dobijenih fotografskom detekcijom. Ovde postoji problem pošto je detekcija zona na TLC skeneru na farmaceutskom fakultetu urađena gotovo dva meseca kasnije pa bi stoga ove rezultate trebalo uzeti sa izvesnom rezervom zbog moguće degradacije hromatografskih zona.

## Zaključak

Digitalna fotografija kao metod za detekciju pri TLC analizi svakako da je jedan od jeftinih i brzih metoda. Obrada dobijenih fotografija je nešto složenija ali upotreba adekvatnog softvera koji bi se mogao napraviti bi znatno ubrzalo čitav postupak. Nekoliko metoda koje su korišćene u ovom radu dale su sledeće rezultate. Metoda visine pikova ne može se koristiti za određivanje koncentracije jer za izuzetno široke mrlje informacija o intenzitetu osvetljenosti samog centra zone ne znači praktično ništa. Upotreba metode zapremina pikova daje nešto tačnije i preciznije vrednosti nego metoda površine preseka pikova. Uzrok tome leži pre svega u softverskoj obradi, naprosto podaci koji uključuju zapreminu pika potpuniji su jer nose informaciju i o intenzitetu mrlje, nego oni koji govore o površini poprečnog preseka na nultoj visini (što su oni veći veća je difuzija supstance, a difuzija svakako zavisi od nanete količine, tj. koncentracije uzorka). Nedostaci fotoaparata pri fotografisanju verovatno se mogu eliminisati upotrebom običnih skenera visokih rezolucija pa bi se u tom slučaju mogli očekivati znatno precizniji rezultati. Postoji izvesno odstupanje rezultata dobijenih detekcijom na TLC skeneru i fotografskom detekcijom. U ovom slučaju ne može se ništa više reći o ovom odstupanju jer je provera rezultata na TLC skeneru urađena skoro dva meseca kasnije pa dobijene rezultate treba uzeti sa izvesnom rezervom.

**Zahvalnost.** Zahvaljujemo se mentoru, Filipu Andriću, koji je predložio ovu temu i svesrdno pomogao oko realizacije ovog projekta.

---

## Literatura

- Harvey D. 2000. Modern analytical chemistry – 1st ed. McGraw-Hill Higher Education
- Milovanović G. 1985. Hromatografske metode odvajanja. Beograd: **IZDAVACH**
- Miller C. J., Miller M. J. 2000. Statistics and chemometrics for analytical chemistry, 4 th edition. Harlow: Person Education
- Miller M. J. 1998. Chromatography concepts and contrasts. Chichester: John Wiley & Sons, Chichester
- Otto M. 1999. Chemometrics, Statistical and Computer Application in Analytical Chemistry. Chichester: Wiley

## Study of the Possibility of Digital Photography Usage as a Mean of Detection of Single Zones in the TLC Quantitative Analysis

The possibility of using digital photography as a mean of detection in TLC quantitative analysis was investigated. The photographs of the given chromatograms were made and transformed into matrices of data using MATLAB software. After that, adequate 3D views were generated and the following parameters were used: peak height, peak volume and surface of the peak slice at the zero height. The method was tested at the presence of the potential bias and compared with the standard procedure which uses the TLC scanner for the detection of single zones. The standard deviation of the method was also estimated. Investigation has shown that the usage of peak height is less reliable; surface of the peak slice at the zero height can be used with bigger standard deviation and bias; peak volume gives more accurate and reliable results. The whole method shows a certain bias for which the source can't be identified. Also, there is a statistically important difference between this method and the classical TLC scanner detection. Further investigation and improvement of the method is desirable in the sense of development of a much more simple software package that can be used quickly and reliably for "outdoor and in situ" measurements.

