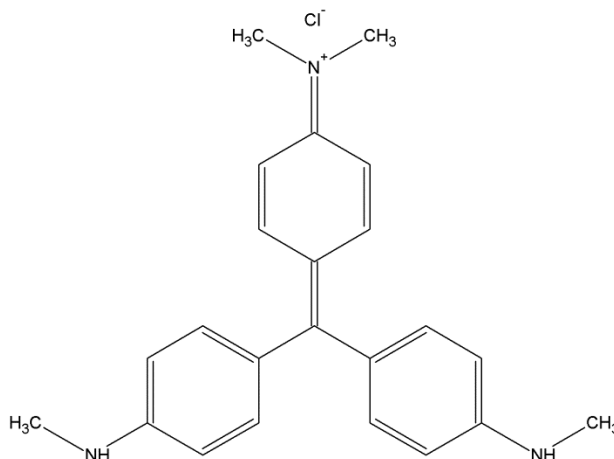


# STANOVENÍ ZELENĚ BRILANTNÍ TENKOVSTVOU CHROMATOGRAFIÍ

## TEORIE:

Zeleň brilantní patří mezi triarylmethanová barviva, je rozpustná ve vodě a v ethanolu. Tvoří malé lesklé krystaly. V roztoku má velmi intenzivní zelenou barvu, využívá se k barvení tkanin. Dále je využívána jako antiseptikum, desinfekce a pro barvení erytrocytů v laboratorní praxi.



Strukturní vzorec zeleně brilantní

Tenkovrstvá chromatografie patří do skupiny separačních metod. Jejím principem je odlišná migrace složek stacionární fázi, tato migrace probíhá na základě adsorpce nebo rozdělování. Separace je prováděna na tenké vrstvě (100 až 200  $\mu\text{m}$ ) stacionární fáze, která je nanášena na tenké skleněné, plastové nebo hliníkové podložce. Mobilní fáze bývají nejčastěji organická rozpouštědla, která se volí dle jejich eluční schopnosti. Na TLC desku se pomocí skleněné kapiláry nebo mikrostříkačky nanáší velmi malé množství vzorku ( $\mu\text{l}$ ) rozpuštěného v těkavém rozpouštědle, který je po dostatečném zaschnutí a následném vložení do vyvíjecí nádoby unášen mobilní fází.

Pro kvantitativní vyhodnocení chromatogramů se využívá denzitometru (skeneru) a vhodného programu, který skvrny převede na píky odečtením intenzity jejich jasu. Plocha píku odpovídá obsahu dané látky.

Základní pojmy používané při práci se skenerem a vyhodnocovacím programem:

Pixel – nejmenší jednotka obrazové informace, která označuje jeden bod digitálního obrazu

Bit – základní jednotka informace, nabývá pouze jedné ze dvou hodnot

Byte – jednotka informace o velikosti osmi bitů

Barevná (bitová) hloubka – označuje počet bitů pro uložení jednotlivého barevného kanálu v jednom pixelu. Se vzrůstající bitovou hloubkou se zvětšuje škála barev, ale také paměťová náročnost.

Rozlišení – udává hustotu obrazové informace, vyjadřuje se v jednotkách dpi. Hodnota dpi udává, kolik pixelů se vyskytuje v délce odpovídající jednomu palci (2,54 cm), zkratka vychází z anglického „dots per inch“.

Jas – koresponduje se svítivostí pixelu. V případě, že je pixel černý, jas nabývá hodnoty 0, v případě pixelu bílého závisí jeho hodnota na bitové hloubce, například pokud je použita bitová hloubka 8, je maximální hodnota jasu 256 ( $2^8$ ).

## **POUŽITÉ VYBAVENÍ:**

*Chemikálie:*

Zeleň brilantní ( $M = 482,64 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ), n-propanol, deionizovaná voda

*Laboratorní pomůcky:*

TLC desky Polygram SIL G/UV<sub>254</sub>, mikrostříkačka Hamilton, mikrozkuhavka Eppendorf, tlustostěnná skleněná vyvíjecí nádoba s víkem, 5ml odměrný válec, měkká tužka, pravitko

*Přístroje a software:*

Skener UMAX AstraScan Slim 20, vyhodnocovací program ScanQuant

## **PRACOVNÍ POSTUP:**

*TLC analýza:*

Pro stanovení připravíme 5 ml roztoku organického barviva (zeleně brilantní) o koncentraci  $0,4 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ . Následným ředěním tohoto roztoku připravíme kalibrační sadu o koncentracích 0,05; 0,1; 0,2; 0,3 a  $0,4 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ . Pro analýzu je dostatečné množství každého roztoku 1 ml.

Na TLC desce typu Polygram<sup>®</sup>SIL G/UV o rozměrech  $40 \times 80 \text{ mm}$  naznačíme přibližně 1,5 cm od spodního okraje tužkou startovní linii, kterou rozdělíme tak, aby na ni bylo možné rovnoměrně nadávkovat šest roztoků.

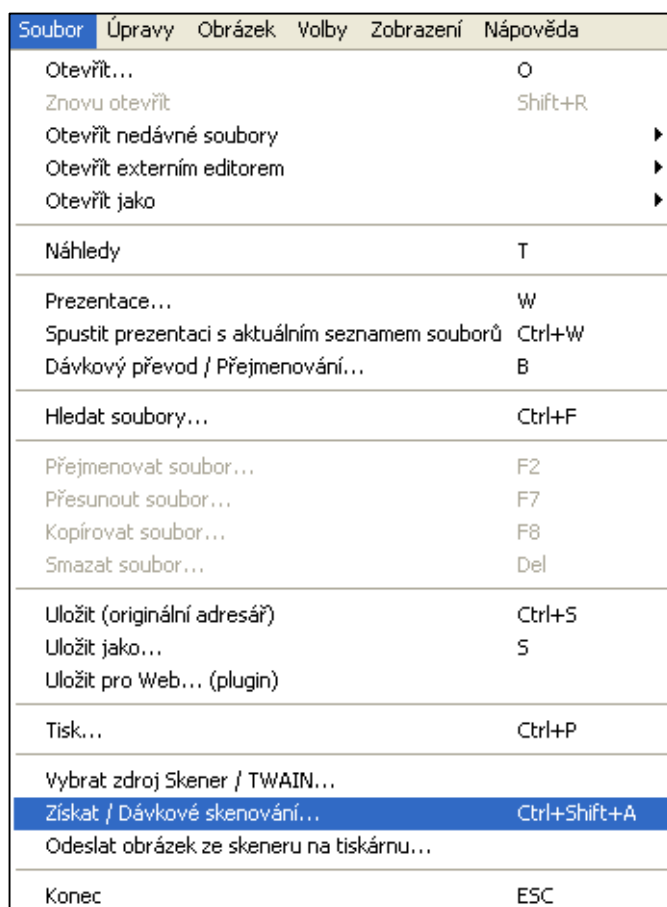
Do tlustostěnné vyvíjecí nádoby připravíme 5 ml mobilní fáze. Mobilní fází je směs n-propanolu a vody v objemovém poměru 9:1. Vyvíjecí nádobu přikryjeme víkem a necháme nasytit parami mobilní fáze.

Na startovní linii nadávkuje pomocí mikrostříkačky Hamilton po 1  $\mu\text{l}$  připravených roztoků o koncentracích 0,05; 0,1; 0,2; 0,3 a 0,4  $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  zeleně brilantní, dalším dávkovaným roztokem bude vzorek o neznámé koncentraci. Dávkování roztoků je jedním z nejdůležitějších kroků celého stanovení, proto musíme dbát na pečlivost při odměřování objemů a obzvlášť na nutnost nadávkovat roztok tak, aby se vytvořila skvrna s co nejmenším průměrem. Po nadávkování roztoků musíme nechat TLC desku důkladně uschnout. Po uschnutí ji vložíme do vyvíjecí nádoby a necháme mobilní fázi vzlínat dostatečnou dobu. V našem případě jde pouze o kvantitativní vyhodnocení, nikoliv o separaci látek, proto analýzu ukončíme, jakmile se skvrny dostanou do vzdálenosti 2 až 3 centimetrů od startovní linie. TLC desku vyjmeme a necháme uschnout.

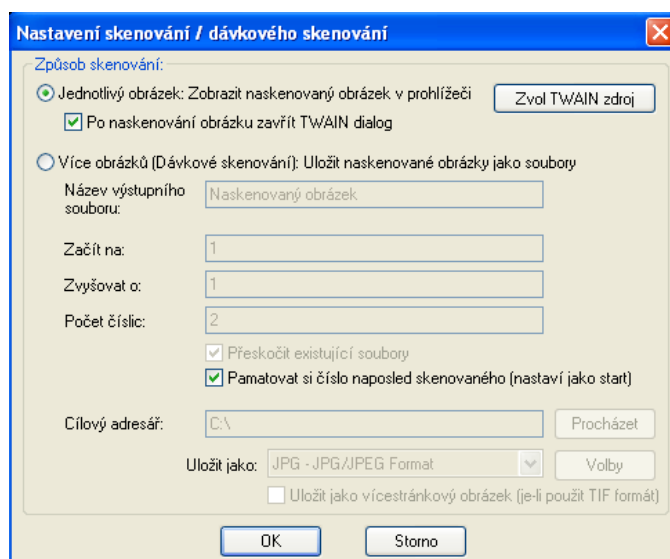
#### *Skenování TLC desky:*

Před vložením TLC desky do skeneru zkontrolujeme a případně zajistíme čistotu jeho skel. TLC desku vkládáme k jedné ze stran skeneru, abychom zajistili skenování ve směru rovnoběžném či kolmém k pohybu mobilní fáze.

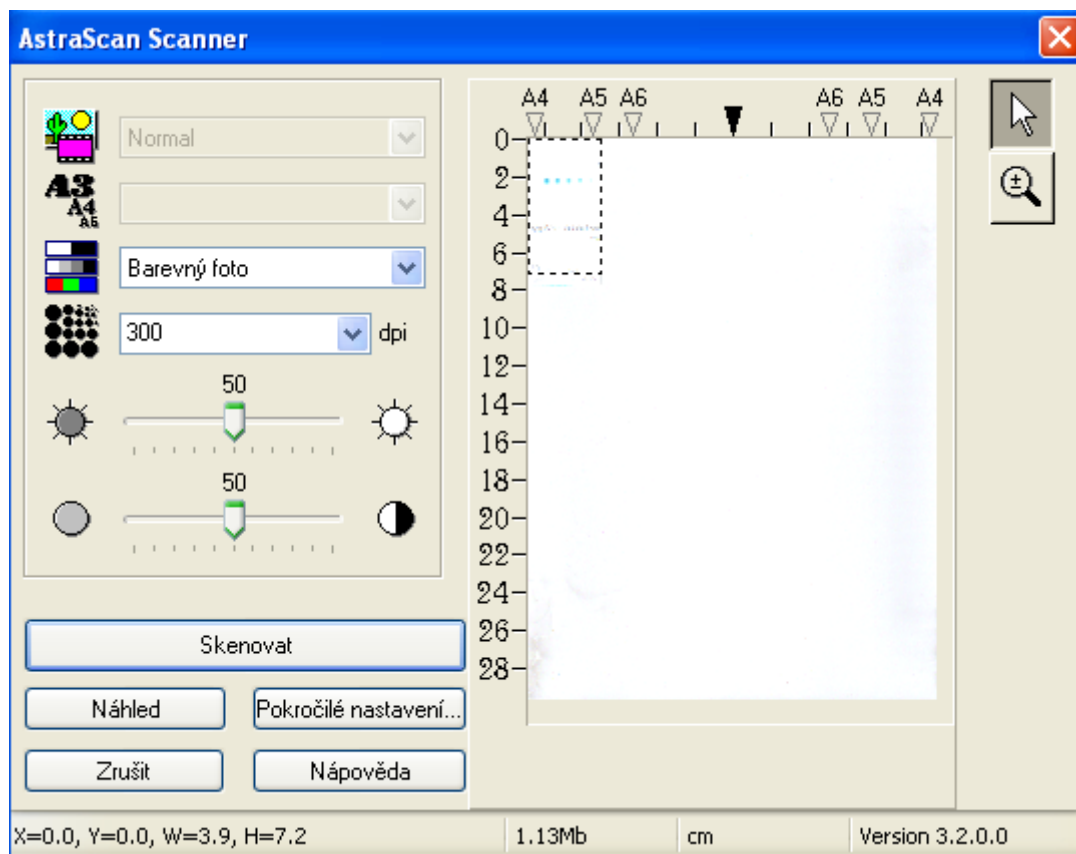
Spustíme program IrfanView a v nabídce „Soubor“ zvolíme možnost „Získat / Dávkové skenování“.



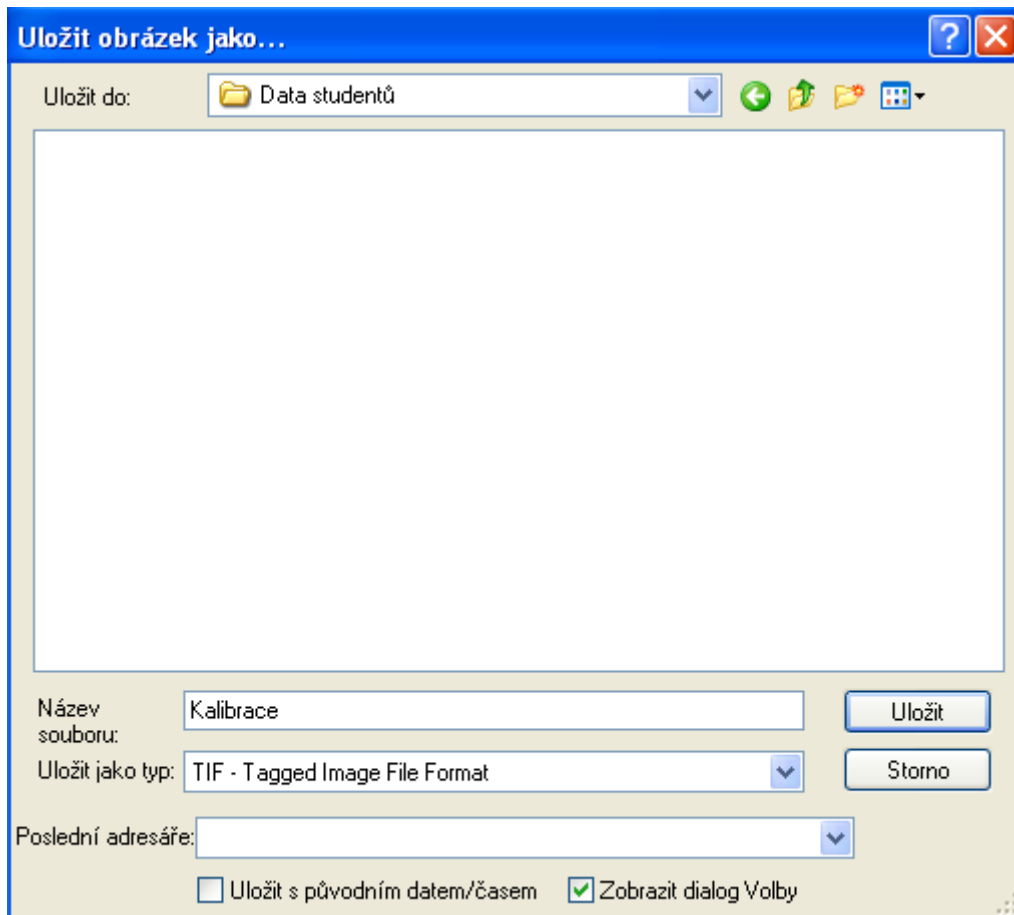
V následujícím okně zvolíme možnost „Jednotlivý obrázek“ a potvrdíme stisknutím „OK“.



Skener nyní automaticky vytvoří náhled, ve kterém označíme oblast TLC desky, nastavíme parametry skenování na „Barevný foto“, rozlišení na hodnotu 300 dpi a stiskem tlačítka „Skenovat“ skenování provedeme.

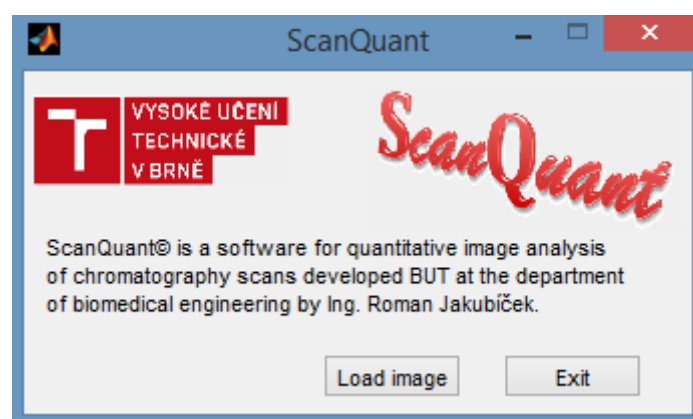


Zobrazí se sken, který volbou možnosti „Uložit jako“ v nabídce „Soubor“ uložíme do příslušné složky ve formátu typu .TIF.

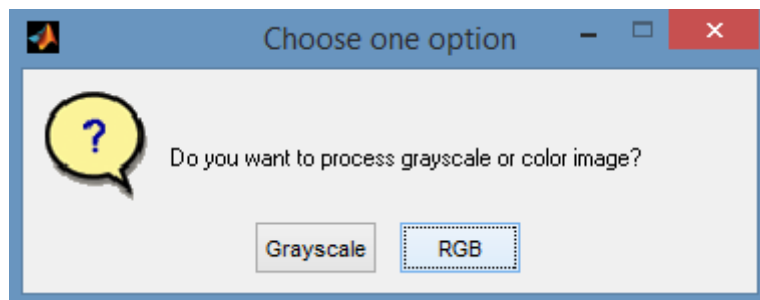


*Vyhodnocení skenu TLC desky:*

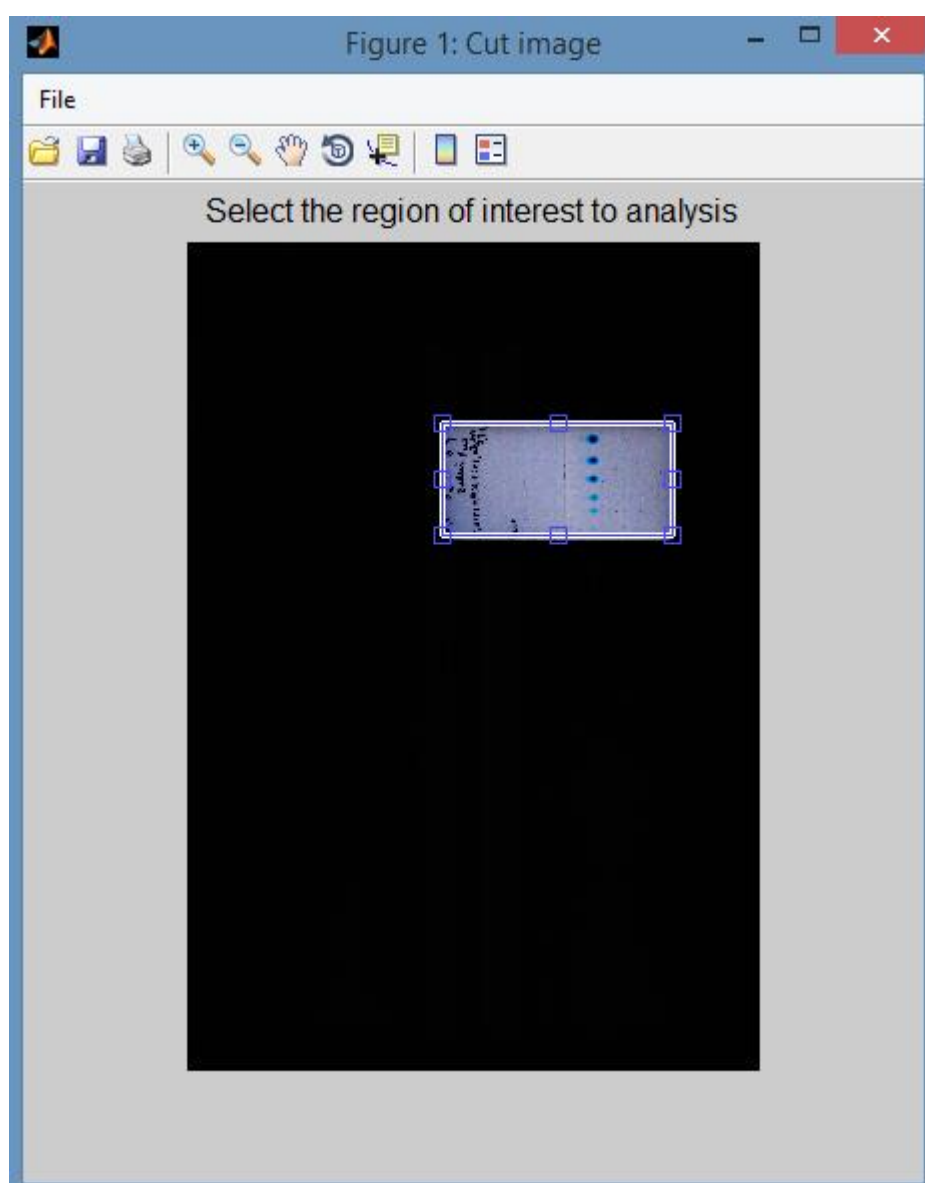
Spustíme program ScanQuant, klikneme na „Load image“ a vybereme požadovaný sken.



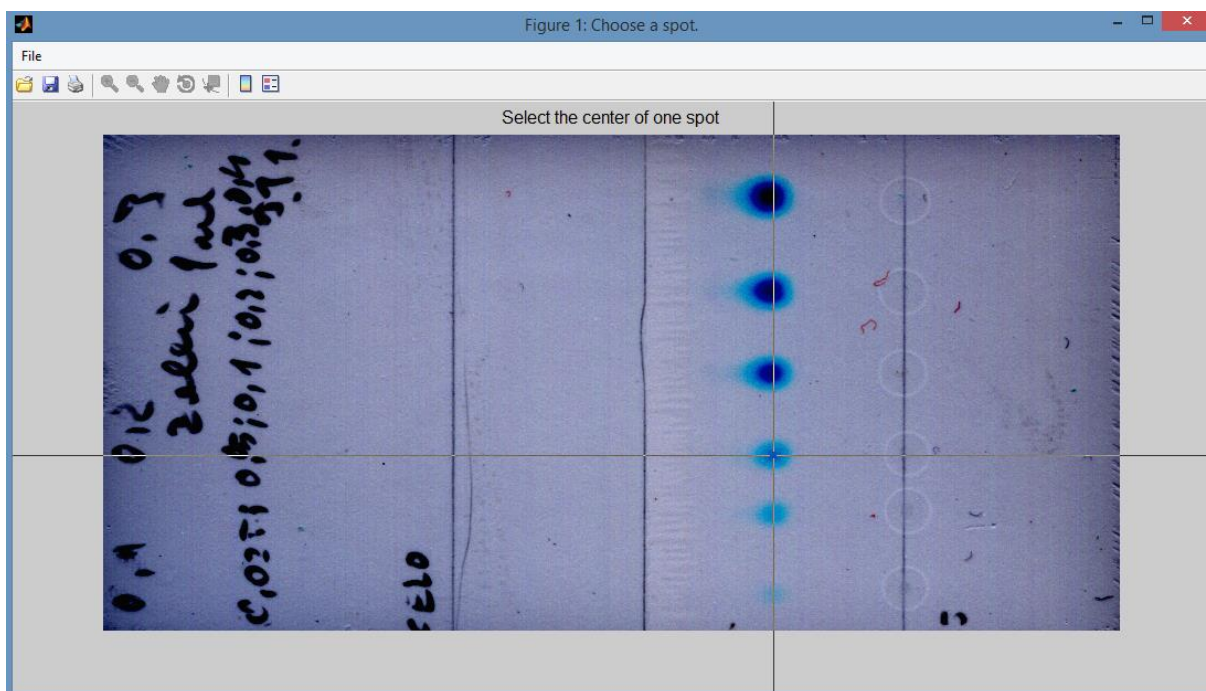
Zvolíme, zda chceme sken zpracovávat ve stupních šedi (Grayscale) nebo barevně (RGB). V této úloze zpracujeme sken oběma způsoby.



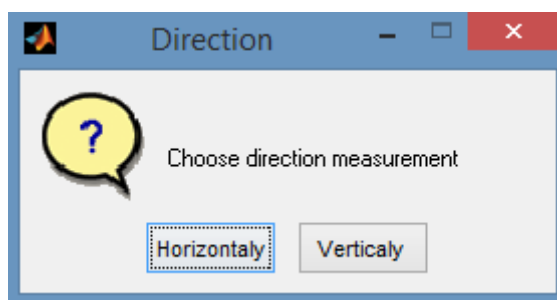
Označíme oblast, ve které se vyskytuje TLC deska, dvojklikem do této oblasti výběr potvrdíme.



Kliknutím na střed skvrny označíme tu, kterou chceme analyzovat.



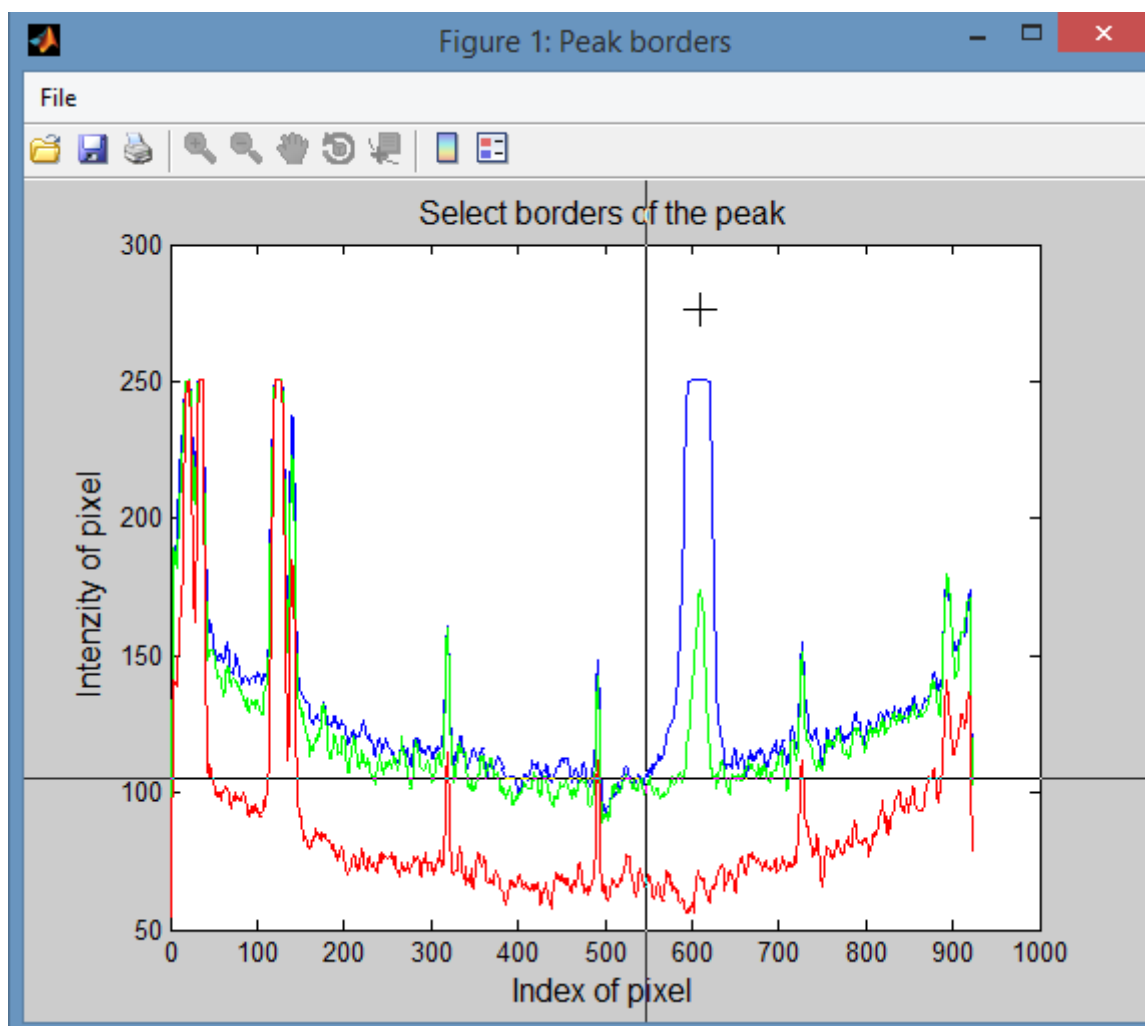
Výběrem „Horizontaly“ zvolíme, že chceme analyzovat ve směru horizontálním, v případě, že potřebujeme analyzovat ve směru vertikálním, vybereme „Vertically“. V této úloze volíme směr tak, aby byl shodný se směrem pohybu mobilní fáze.



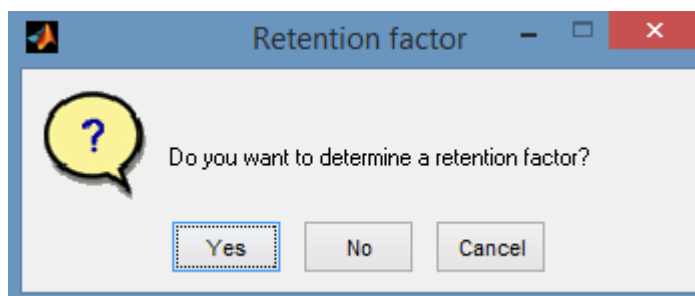
Nyní program odečte hodnoty jasu barevných kanálů pro jednotlivé pixely ve zvolené linii a zobrazí je graficky. Na horizontální ose je vyneseno index pixelu, na vertikální ose jsou hodnoty jasu jednotlivých barevných kanálů. Pík odpovídající označené skvrně je v grafu označen křížkem nad vrcholem.



Označíme hranice píku zeleně brilantní. Jedním kliknutím označíme začátek, druhým konec.

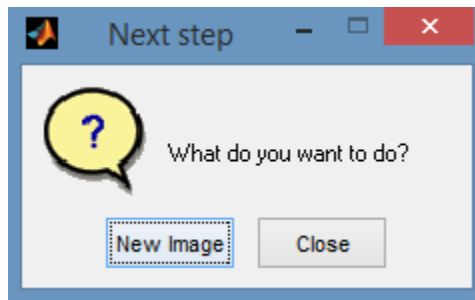


Chceme-li spočítat retenční faktor, zvolíme v dalším okně „Yes“, v opačném případě „No“. V rámci této úlohy retenční faktor spočítáme a uvedeme do protokolu.



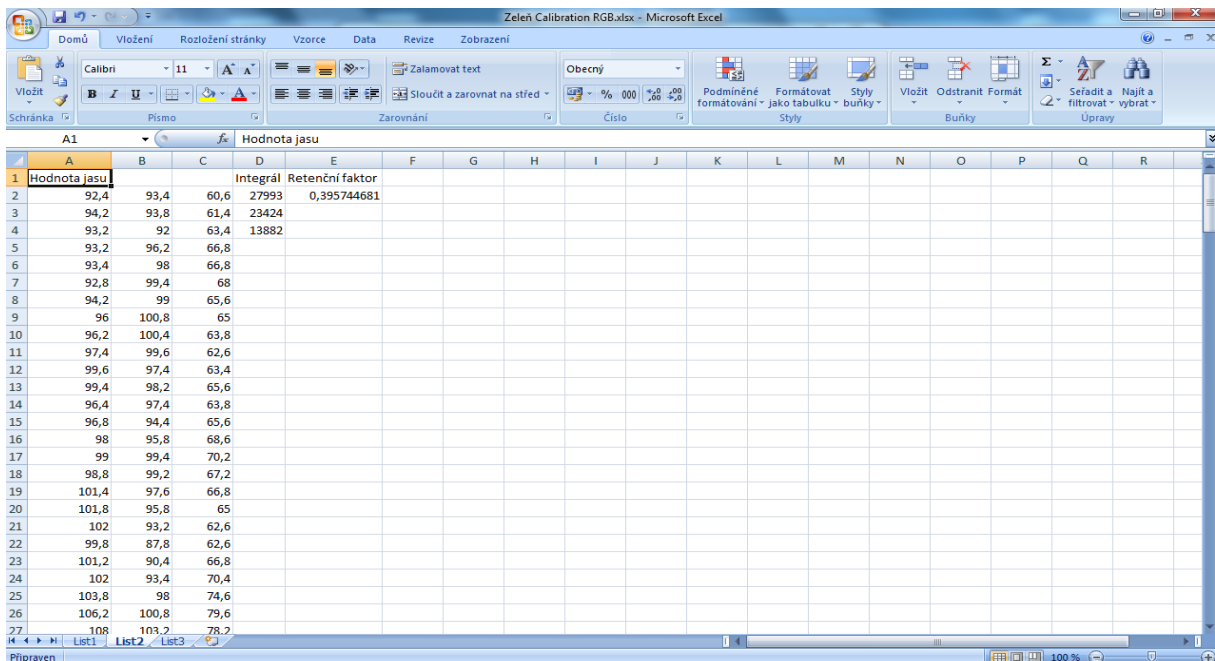


Nahrajeme další sken zvolením „New image“ nebo program ukončíme pomocí tlačítka „Close“.



Výstupem analýzy je soubor ve formátu .xlsx. Při analýze v režimu RGB vypadá následovně:

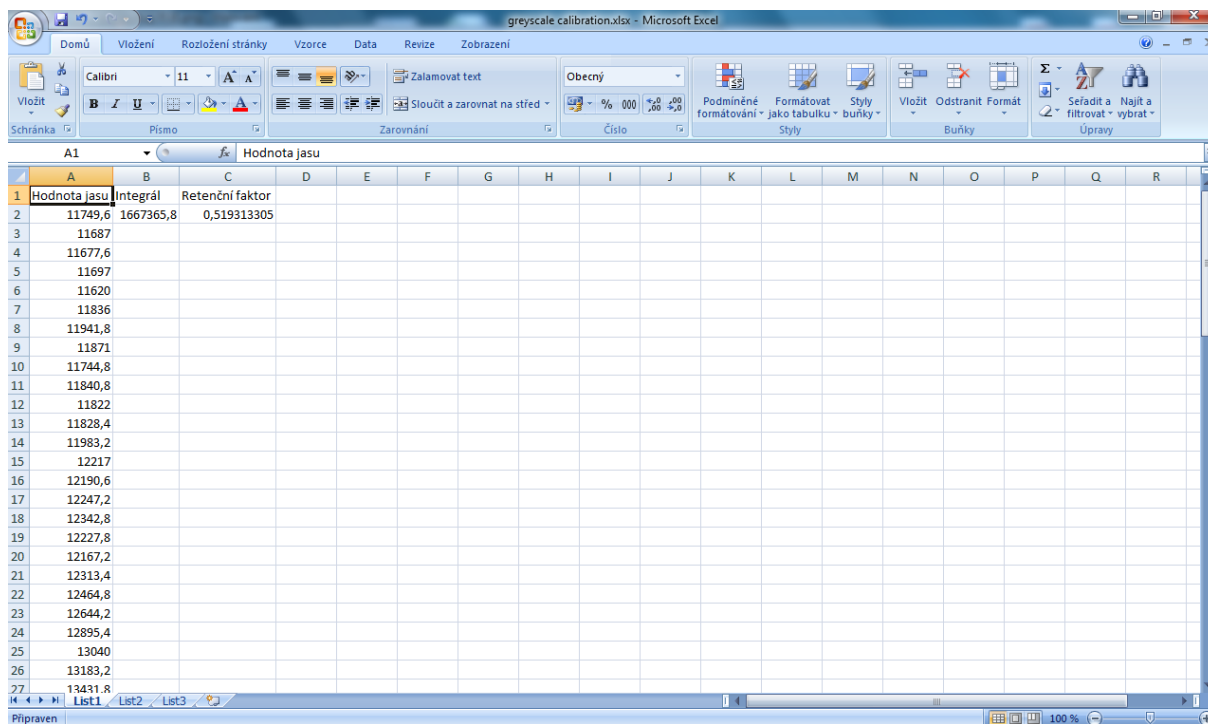
- Každá analýza je uložena na samostatném listu
  - o Ve sloupci A – hodnoty jasu kanálu R
  - o Ve sloupci B – hodnoty jasu kanálu G
  - o Ve sloupci C – hodnoty jasu kanálu B
  - o Ve sloupci D – obsahy ploch pod křivkami v pořadí R, G, B
  - o Ve sloupci E – retenční faktor příslušné látky



	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R
1	Hodnota jasu			Integrál	Retenční faktor													
2	92,4	93,4	60,6	27993	0,395744681													
3	94,2	93,8	61,4	23424														
4	93,2	92	63,4	13882														
5	93,2	96,2	66,8															
6	93,4	98	66,8															
7	92,8	99,4	68															
8	94,2	99	65,6															
9	96	100,8	65															
10	96,2	100,4	63,8															
11	97,4	99,6	62,6															
12	99,6	97,4	63,4															
13	99,4	98,2	65,6															
14	96,4	97,4	63,8															
15	96,8	94,4	65,6															
16	98	95,8	68,6															
17	99	99,4	70,2															
18	98,8	99,2	67,2															
19	101,4	97,6	66,8															
20	101,8	95,8	65															
21	102	93,2	62,6															
22	99,8	87,8	62,6															
23	101,2	90,4	66,8															
24	102	93,4	70,4															
25	103,8	98	74,6															
26	106,2	100,8	79,6															
27	108	103,2	78,2															

V případě analýzy v režimu Grayscale je výstup následující:

- Ve sloupci A – hodnoty jasu šedi
- Ve sloupci B – obsah plochy pod křivkou
- Ve sloupci C – retenční faktor příslušné látky



The screenshot shows a Microsoft Excel spreadsheet titled 'greyscale calibration.xlsx'. The spreadsheet has three columns: 'Hodnota jasu' (A), 'Integrál' (B), and 'Retenční faktor' (C). The data is as follows:

	A	B	C
1	Hodnota jasu	Integrál	Retenční faktor
2	11749,6	1667365,8	0,519313305
3	11687		
4	11677,6		
5	11697		
6	11620		
7	11836		
8	11941,8		
9	11871		
10	11744,8		
11	11840,8		
12	11822		
13	11828,4		
14	11983,2		
15	12217		
16	12190,6		
17	12247,2		
18	12342,8		
19	12227,8		
20	12167,2		
21	12313,4		
22	12464,8		
23	12644,2		
24	12895,4		
25	13040		
26	13183,2		
27	13431,8		

## **VYHODNOCENÍ ANALÝZY A POKYNY PRO ZPRACOVÁNÍ DAT DO PROTOKOLU:**

Každou skvrnu analyzujeme třikrát, a to z důvodu subjektivního označení středu skvrny a hranic píku. Ze získaných dat sestavíme kalibrační přímku závislosti obsahu plochy pod křivkou (při RGB režimu uvažujeme sumu obsahů všech tří ploch) na koncentraci zeleně brilantní. Z rovnice kalibrační přímky vypočítáme obsah zeleně brilantní v neznámém vzorku včetně intervalu spolehlivosti.

Analýzu provedeme v režimu RGB a Grayscale, výsledky mezi sebou porovnáme.

Uvedeme retenční faktor včetně intervalu spolehlivosti.