

UDC 577.165: 004.942: 004.422.81

<http://orcid.org/0000-0002-8471-8129>

<http://orcid.org/0000-0003-1624-4555>

DETERMINATION OF FAT-SOLUBLE VITAMINS CONCENTRATIONS IN BIOLOGICAL SOLUTIONS BY COMPUTER EXPRESS-METHOD

Yu.O. Trydub, *maste*, O.M. Svechnikova, *D.t.s., professor*.

H.S. Skovoroda Kharkiv National Pedagogical University, Kharkiv, Ukraine
kaf-chemistry@hnpu.edu.ua

The paper represents the experimental results of elaboration of qualitative method to determine concentrations of vitamins A, D, and E in liquids and biological fluids by aid of computer analysis of visual data. The H.S. Skovoroda's KNPU Chemistry department staff has been working on a software product for schools under the general name of "ColorKit". The software allows analyzing photo and video files. One of "ColorKit" application directions may be the investigation of liquids and fluids optical densities parameters. Concerning the vitamins solutions, the research primary task was to create a non-polar reagent for each vitamin, so that, the reagent would bind a vitamin and rapidly form a complex of specific color. The intensity of the latter would be proportional to the vitamin concentration, and would be determined by aid of web-camera and the "ColorKit" program. The innovation of reagents preparation was proposed, i.e. saturated solution of SO₃ (for vitamin A), or SO₃ + N₂O₅ (for vitamin D and E) in dichloride-ethane.

The experimental video analysis according to RGB-system established logarithmic dependences of the solution color on vitamin A concentration. The correlation coefficients were equal to 0.95-0.99. The highest magnitude of R was registered for comparison of vitamin A experimental solution color with methylenic blue solution color, which was used as a colorimetric standard for the computer processing of visual data. The analysis of vitamin E video files according to RGB-system established logarithmic dependences of the solution color on vitamin E concentration with low correlation coefficients. The same analysis according to "Black-White" system displayed the linear correlation between the solutions concentrations and their color with R magnitude equal to 0.998. The experimental vitamin D solutions video analysis to "Black-White"-system established a linear correlation in the dependence of solution color intensity on the vitamin concentration, with the high R magnitude, which was equal to 0.94. Of high practical application might be the evaluation of vitamin D solutions concentrations dependence upon the samples brightness.

Thus, algorithm of processing visual effects of vitamins qualitative colored reactions alterations was established by aid of web-camera CNR-WCAM820 and the ColorKit program. The calibration graphs for the vitamin concentrations determination in solutions were obtained. The elaborated method may be recommended to use at school conditions.

Key words: fat-soluble vitamins, computer programs, solution color density, solution concentration.

Визначення концентрацій жиророзчинних вітамінів у біологічних розчинах за допомогою комп'ютерного експрес-методу. Тридуб Ю.О., Свечнікова О.М. – Стаття представляє експериментальні результати розробки кількісного методу для визначення концентрацій вітамінів А, D та Е у біологічних рідинах за допомогою комп'ютерного аналізу

візуальних даних. Колективом кафедри хімії ХНПУ імені Г.С. Сковороди розробляється програмне забезпечення для шкіл під загальною назвою "ColorKit". Програма дозволяє аналізувати фото та відео файли. Один з напрямків застосування програми може бути дослідження параметрів оптичної густини рідин. Стосовно розчинів вітамінів, першим етапом дослідження було створення неполярного реактиву для кожного вітаміну, який зв'язував би вітамін і швидко формував би комплекс специфічного кольору. Інтенсивність останнього була б пропорційна концентрації вітаміну, і визначалась би за допомогою веб-камери та програми "ColorKit". Були запропоновані розроблені реактиви: насичений розчин SO_3 (для вітаміну А), або $\text{SO}_3 + \text{N}_2\text{O}_5$ (для вітамінів D та E) у дихлоретані.

Аналіз експериментальних відео файлів за RGB-системою встановив логарифмічну залежність інтенсивності кольору розчину від концентрації вітаміну А. Коефіцієнти кореляції дорівнювали 0,95-0,99. Найвища величина R була зареєстрована при порівнянні кольору експериментального розчину вітаміну А з кольором розчину метиленового синього, що був взятий за колориметричний стандарт для комп'ютерної обробки візуальних даних. Аналіз відео файлів з вітаміном Е за RGB-системою виявив логарифмічні залежності інтенсивності кольору розчинів від концентрацій вітаміну Е з низькими коефіцієнтами кореляції. Аналіз за чорно-білою системою встановив лінійну залежність між концентрацією розчинів та інтенсивністю їх кольору з величиною R, що дорівнювала 0,998. Аналіз відео з експериментальними розчинами вітаміну D за чорно-білою системою довів наявність лінійної залежності концентрації вітаміну від інтенсивності кольору його розчину з досить високою величиною R (0,94). Дуже практичним при визначенні концентрацій вітаміну в дослідних зразках також може бути аналіз залежності концентрації вітаміну D у калібрувальних розчинах від їх яскравості.

Таким чином, запропоновано алгоритм обробки зображень з метою визначення концентрацій розчину вітамінів за допомогою цифрових побутових фотопристроїв (веб-камери CNR-WCAM820). Були побудовані калібрувальні графіки визначення концентрацій вітамінів у розчинах. Розроблений метод може бути рекомендований для використання в шкільних умовах.

Ключові слова: жиророзчинні вітаміни, комп'ютерні програми, густина кольору розчину, концентрація розчину.

INTRODUCTION

Application of computer-dependent devices and gadgets, as the means helping in school studies, allows inducing inquisitive activity of school students, considering the students' individual interests and abilities, providing the acting approach to educational process organization, simplifying the processing of obtained information. Computer measurement equipment for school biology and chemistry lessons is produced by Ukrainian industry in insufficient quantities, with poor qualities and a narrow spectrum of choosing. Therefore, elaboration of school computer soft- and hardware for laboratory demonstrations, and its innovation in biology and chemistry practical lessons remains to be one of the priority tasks of our educational process [1].

Computer technologies should be not an additional touch, but the inseparable part of the whole educational process, where the former drastically enhances the effectiveness of the latter [2]. The issue of a free computer program "Microsoft Visual Studio Express Edition" has given the opportunity to significantly decrease the cost of school software invention and production [3].

The H.S. Skovoroda's KNPU Chemistry department staff has been working on a software product for schools under the general name of "ColorKit". The software allows analyzing photo and video files. One of "ColorKit" application directions may be investigation of liquids and fluids optical densities parameters [4]. This topic is of great importance, since the prices of photoelectrocolorimeters are high, and, hence, the majority of secondary schools do not possess such equipment. Besides, the modern research devices are hard to understand in terms of principle of their work for an average school student.

The "ColorKit" software is intended to analyze:

- Photography objects in formats of *. bmp; *. jpg; *. jpeg; *. gif; *. tif, as well as photos obtained by a web-camera directly;
- Video data in formats of *. avi; *. mpg; *. mpeg, *.wmv, as well as real time videos obtained by a web-camera directly.

The given program software allows determining:

- Color in the form of R, G, B, sub-pixels magnitudes (R – red, G – green, B – blue); their minimal and maximal indexes, and the magnitudes dispersions;
- Color in the form of H, S, B (H – hue, S – saturation, B – brightness); their minimal and maximal indexes, and the magnitudes dispersions.

For the more effective usage of "ColorKit" program in the school experiment, one has to carefully elaborate the methods of the software application.

The objective of the present study is the elaboration of qualitative method to determine concentrations of vitamins A, D, and E in liquids and biological fluids by aid of computer analysis of visual data (with "ColorKit" program), which could be used at school conditions.

MATERIALS AND METHODS

The main obstacle in identification and determination of fat-soluble vitamins in solutions is that, these compounds have non-polar molecular structure, whereas the reagents, which are supposed to react with them and form colored complexes in quantitative reactions, are mostly polar, hydrophilic (sulfuric and nitric acids, FeCl_3 , FeSO_4 , SbCl_3). Therefore, the research primary task was to create a non-polar reagent for each vitamin, so that, the reagent would bind a vitamin and rapidly form a complex of specific color. The intensity of the latter would be proportional to the vitamin concentration, and would be determined by aid of a web-camera and the "ColorKit" program. After careful consideration of the methods on the vitamins determination represented in the scientific literature, and several preliminary experiments to choose the most colorful reactions, the following procedures and reagents were selected. According to the literature source [5], vitamin A is supposed to react with saturated sulfuric acid with the formation of dense blue color, which is to break down to intense yellow dose-dependently. On practice, the reaction never went that way due to high polarity of sulfuric acid. Therefore, the method was improved with preamble mixing saturated sulfuric acid and dichloride-ethane, as a

non-polar, inert solvent. The latter absorbed SO_3 from the acid, and was used as the complex qualitative reagent for vitamin A identification. When reacting with the vitamin solution, it formed stable blue color, with dose-dependent intensity, easily registered by the web-camera. In the case of vitamin D and E, dichloride-ethane was mixed with saturated sulfuric and nitric acids, to absorb SO_3 and N_2O_5 . Subsequently, the reagent dose-dependently formed the complex of yellow-orange color with the hydrophobic vitamins solutions. The innovation allowed us to operate with minor concentrations of vitamins solutions, due to the high sensitivity of the method.

The research used initial solutions of vitamins (retinol acetate, ergocalciferol, and tocoferol acetate, produced by “Lekchim” company, Uman, Ukraine) for the construction of calibration curves.

The experimental setup included the following units (fig. 1): laboratory palettes or cuvettes with vitamin solutions of different concentrations, which were placed in a box and highlighted with a LED H_4 bulb on the background of white screen. The reaction process was filmed with a web-camera CNR-WCAM820, which was switched on to a mini-laptop Packard Bell ZG6.



Figure 1. General experimental setup

The filmed video was processed by the “ColorKit” computer program and the result was represented by calibration curves.

RESULTS AND THEIR DISCUSSION

The experiments with vitamin A solutions of different concentrations revealed that, the interaction of retinol acetate with SO_3 , dissolved in dichloride-ethane led to the formation of the product of dense blue color, which subsequently turned to

yellow. The higher was the concentration of the vitamin in the solution, the slower was the alteration of the color (fig. 2). Thus, in processing the dynamic visual data, the time of the color change can pinpoint the concentration of the vitamin in the investigated solution. Besides, by aid of the software, a colorimetric experiment of vitamin A concentration determination was performed, where a solution of methylenic blue was used, as a standard sample. The experiment showed the colorimetric measurements to be carried out rapidly and directly after the addition of the reagent to the vitamin solution, in order to avoid the breakdown of the blue complex.

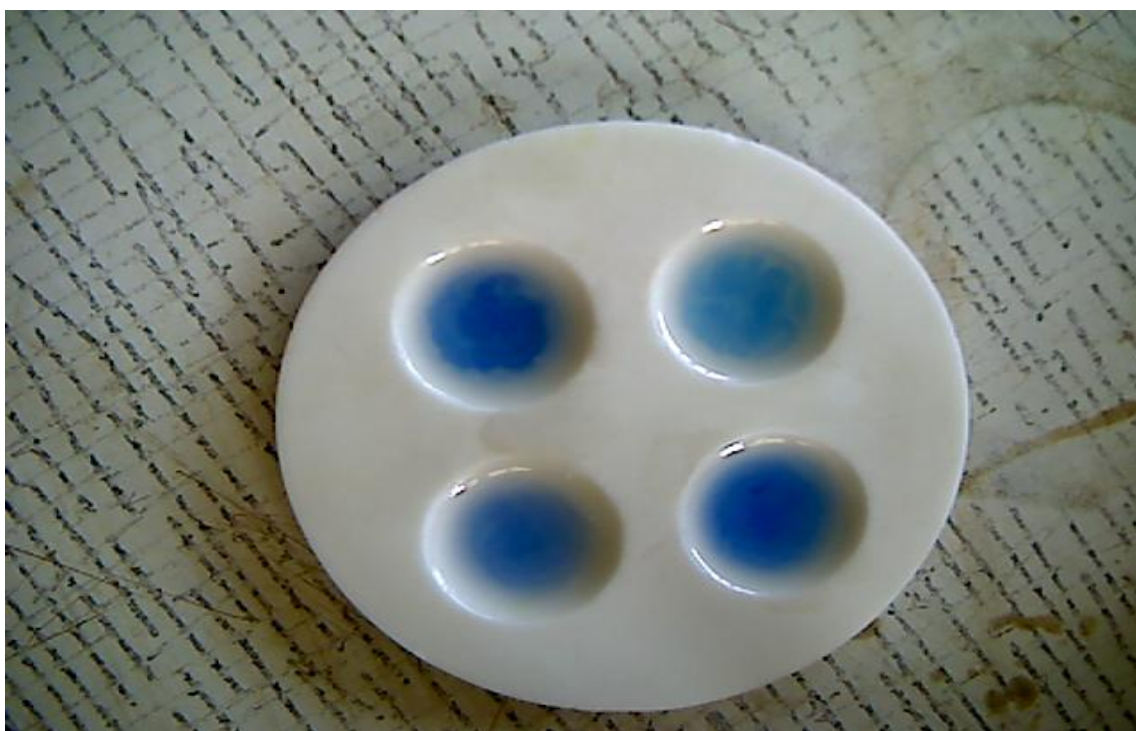


Figure 2. Laboratory palette with vitamin A experimental solutions of different concentrations immediately after the interaction with the reagent

The experimental video analysis by aid of “ColorKit” according to RGB-system established logarithmic dependences of the solution color on vitamin A concentration (fig. 3).

The correlation coefficients were equal to 0.95-0.99. The experimental video analysis by aid of “ColorKit” according to “Black and White” system revealed linear correlation of dependence of solution black-white color and brightness on the vitamin concentration, although the correlation coefficient was pretty low. The highest magnitude of R was registered for comparison of vitamin A experimental solution color with methylenic blue solution color, which was used as a colorimetric standard for the computer processing of visual data.

All vitamin E experimental solutions were added the elaborated reagent (SO_3 and N_2O_5 dissolved in dichloride-ethane). Thus, each experimental cuvette contained 1 ml alpha-tocoferol acetate solution and 3 ml dichloride-ethane solution with

dissolved SO_3 and N_2O_5 . The experiment continued to the complete stop of color development in all the cuvettes (fig. 4).

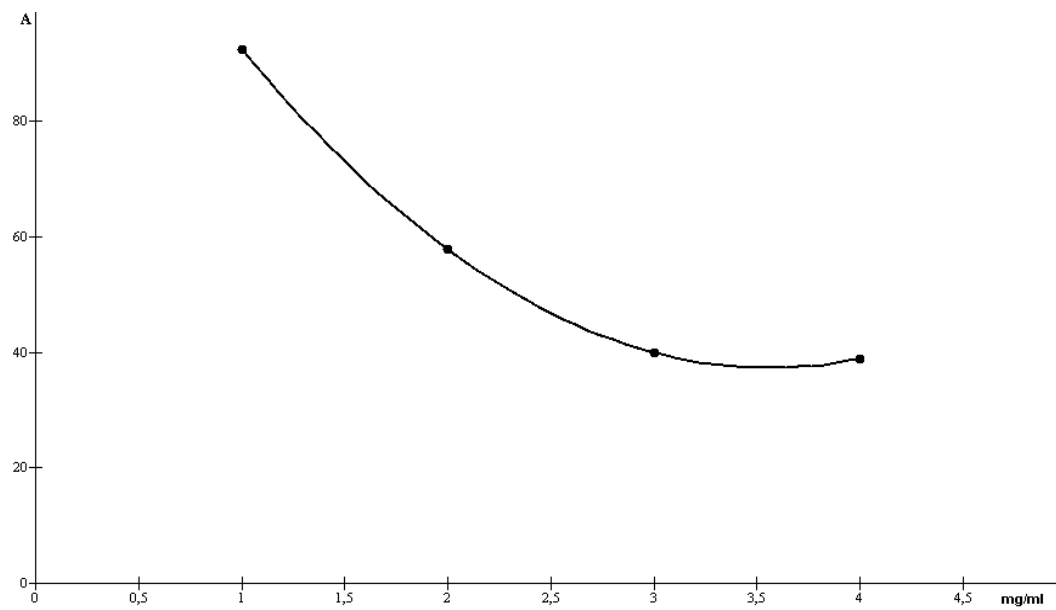


Figure 3. Dependence of vitamin A solutions concentrations on their color, analyzed by ColorKit program (RGB-system, green color)

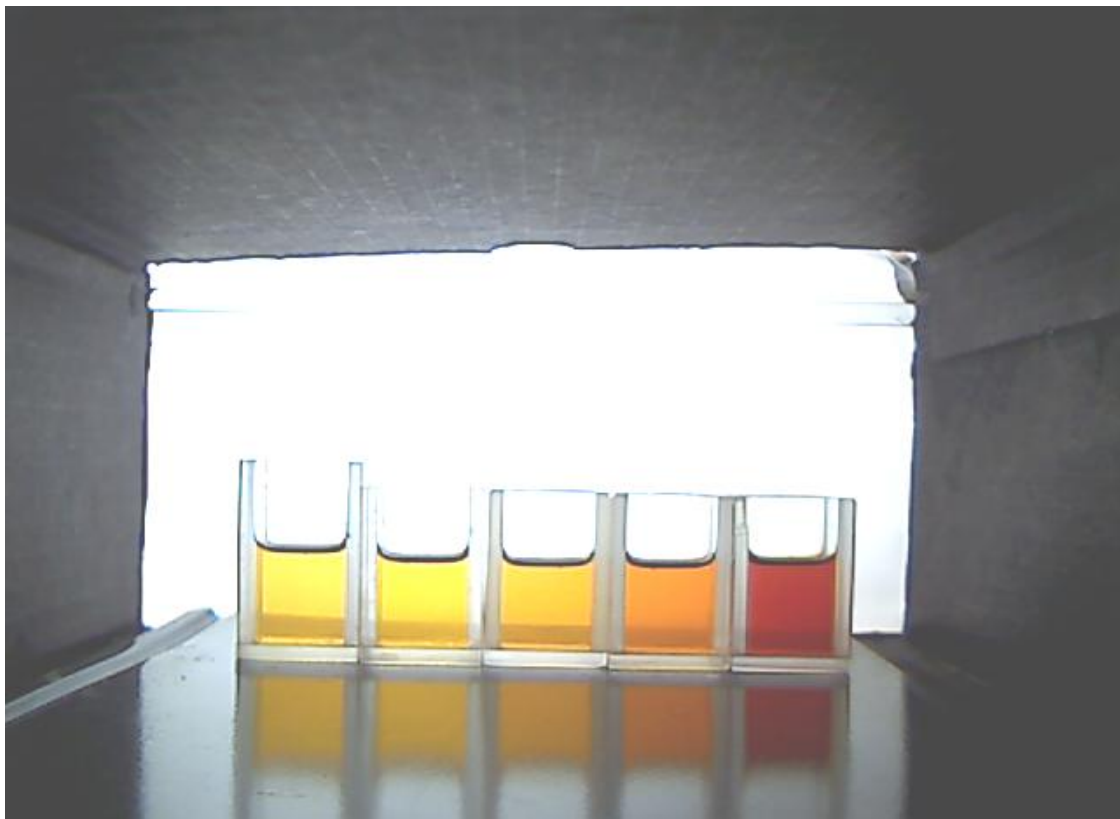


Figure 4. Laboratory cuvettes with vitamin E experimental solutions of different concentrations (end of experiment)

The experimental video analysis by aid of “ColorKit” according to RGB-system established logarithmic dependences of the solution color on vitamin E concentration with low correlation coefficients. The same analysis according to “Black-White” system displayed the linear correlation between the solutions concentrations and their color with R magnitude equal to 0.998 (fig. 5). The evaluation of vitamin E solutions concentrations dependence upon the samples brightness and saturation by the program could be of high practical usage, as well.

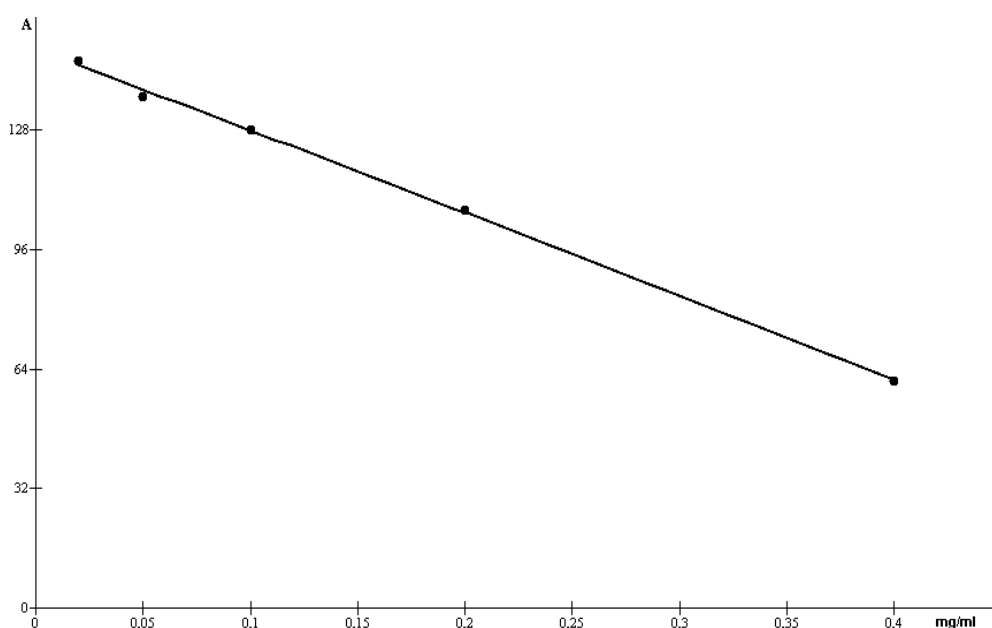


Figure 5. Dependence of vitamin E solutions concentrations on their color, analyzed by ColorKit program (“Black-White”-system)

The experimental pattern of vitamin D concentration determination was completely identical to that of vitamin E with the same reagents and solvent. There were four calibrating samples, placed in cuvettes, as shown on fig. 6.

The experimental video analysis by aid of “ColorKit” according to “Black-White”-system established a linear correlation in the dependence of solution color intensity on the vitamin concentration, with the high R magnitude, which was equal to 0.94 (fig. 7). Of high practical application might be the evaluation of vitamin D solutions concentrations dependence upon the samples brightness.



Figure 6. Laboratory cuvettes with vitamin D experimental solutions of different concentrations (end of experiment)

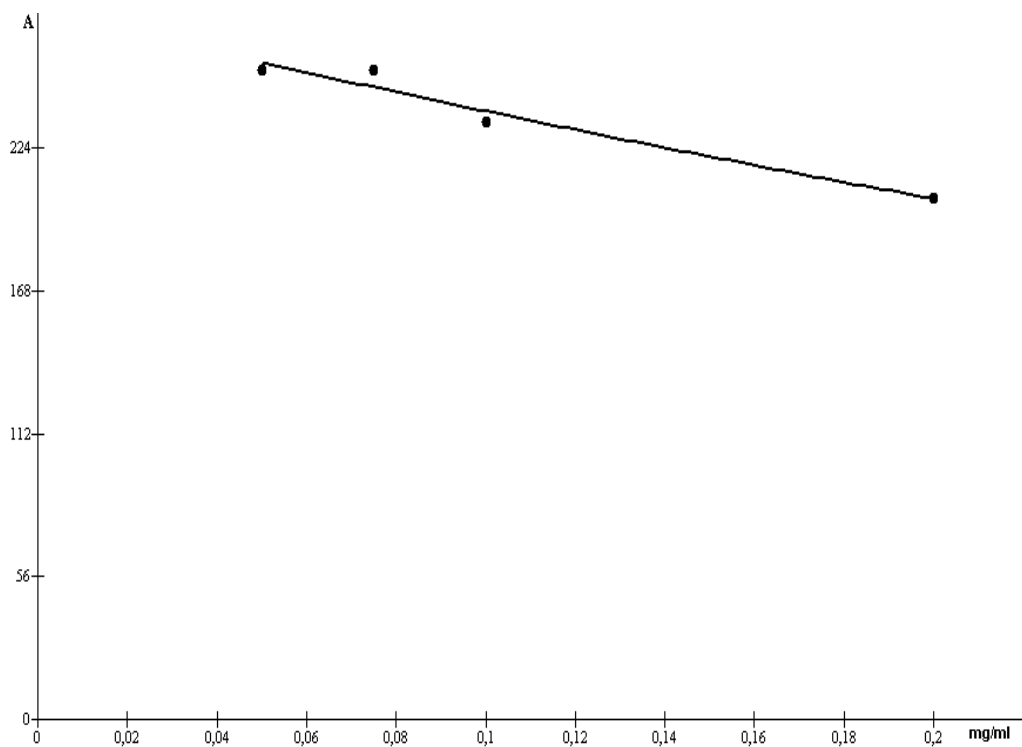


Figure 7. Dependence of vitamin D solutions concentrations on their color, analyzed by ColorKit program ("Black-White"-system)

CONCLUSIONS

1. The method of vitamins A, D, E concentrations determination was elaborated by analyzing solutions color with the usage of ColorKit program. Besides, innovation of reagents preparation was proposed, i.e. saturated solution of SO_3 (for vitamin A), or $\text{SO}_3 + \text{N}_2\text{O}_5$ (for vitamin D and E) in dichloride-ethane.

2. Algorithm of processing visual effects of vitamins qualitative colored reactions alterations was established by aid of web-camera CNR-WCAM820 and the ColorKit program.

3. The calibration graphs for the vitamin concentrations determination in solutions were obtained.

4. The elaborated method may be recommended to use at school conditions.

Literature

1. Свечнікова О.М., Винник О.Ф., Святська Т.М., Грановська Т.Я. Використання комп'ютерних приладів у шкільному хімічному експерименті. Сб. наук. праць «Коришенські читання». Полтава. 2015. С. 86–88.

2. Зайцева С.А., Іванов В.В. Інформаційні технології в освіті. Сб. наук. праць. «Коришенські читання». Полтава. 2015. С. 115–119.

3. Винник О.Ф., Свечнікова О.М., Бойко Є.А., Гриценко Ю.В., Грановська Т.Я. Визначення концентрацій речовин за допомогою програмного засобу „ColorKit”. Всеукраїнська наукова конференція «Актуальні задачі хімії: дослідження та перспективи». Збірник матеріалів конференції. Житомир. 2017. – С. 221–224.

4. Винник О. Ф., Свечнікова О.М., Павленко М.Ю., Козленко О.Ю. Алгоритм роботи модуля “Колориметр” програмного засобу „ColorKit”. Сб. наук. праць «Коришенські читання». Полтава, 2017. С. 61–65.

5. Яковлева М. Н., Осташкова В.В. Методические указания к лабораторным работам по биологической химии. Петрозаводск, 2002. 89 с.

Определение концентраций жирорастворимых витаминов в биологических растворах с помощью компьютерного экспресс-метода. Тридуб Ю.А., Свечникова Е.Н. – Статья представляет экспериментальные результаты разработки количественного метода для определения концентраций витаминов А, D и E в биологических жидкостях с помощью компьютерного анализа визуальных данных. Коллективом кафедры химии ХНПУ имени Г.С. Сковороды разрабатывается программное обеспечение для школ под общим названием “ColorKit”. Программа позволяет анализировать фото и видео файлы. Одним из направлений применения программы может быть исследования параметров оптической плотности жидкостей. Касательно растворов витаминов, первым этапом исследования была разработка неполярного реактива для каждого витамина, который связывал бы витамин и быстро формировал бы комплекс специфического цвета. Интенсивность последнего была бы пропорциональна концентрации витамина, и определялась бы с помощью веб-камеры и программы “ColorKit”. Были предложены разработанные реактивы: насыщенный раствор SO_3 (для витамина А), или $\text{SO}_3 + \text{N}_2\text{O}_5$ (для витаминов D та E) в дихлорэтане.

Анализ экспериментальных видео файлов согласно RGB-системы установил логарифмическую зависимость интенсивности цвета раствора от концентрации витамина А.

Коэффициенты корреляции были равны 0,95-0,99. Самая высокая величина R была зарегистрирована при сравнении цвета экспериментального раствора витамина А с цветом раствора метиленового синего, который был взят за колориметрический стандарт для компьютерной обработки визуальных данных. Анализ видео файлов с витамином Е по RGB-системы выявил логарифмические зависимости интенсивности цвета растворов от концентраций витамина Е с низкими коэффициентами корреляции. Анализ по черно-белой системе установил линейную зависимость между концентрацией растворов и интенсивностью их цвета с величиной R, которая была равна 0,998. Анализ видео с экспериментальными растворами витамина D по черно-белой системе доказал наличие линейной зависимости концентрации витамина от интенсивности цвета его раствора с достаточно высокой величиной R (0,94). Очень практичным при определении концентраций витамина в опытных образцах также может быть анализ зависимости концентрации витамина D в калибровочных растворах от их яркости.

Таким образом предложен алгоритм обработки изображений с целью определения концентраций растворов витаминов с помощью цифровых бытовых фотоприборов (веб-камеры CNR-WCAM820). Были построены калибровочные графики определения концентраций витаминов в растворах. Разработанный метод может быть рекомендован для использования в школьных условиях.

Ключевые слова: жирорастворимые витамины, компьютерные программы, интенсивность цвета раствора, концентрация раствора.