
EXPERIMENTÁLNA TECHNIKA

**JEDNODUCHÝ FOTOMETER NA KVANTITATÍVNE VYHODNOCOVANIE
PAPIEROVÝCH CHROMATOGRAMOV V ODRAZENOM SVETLE**

J. FELLEGI, L. SLÁMA

Výskumný ústav priemyslu celulózy v Bratislave

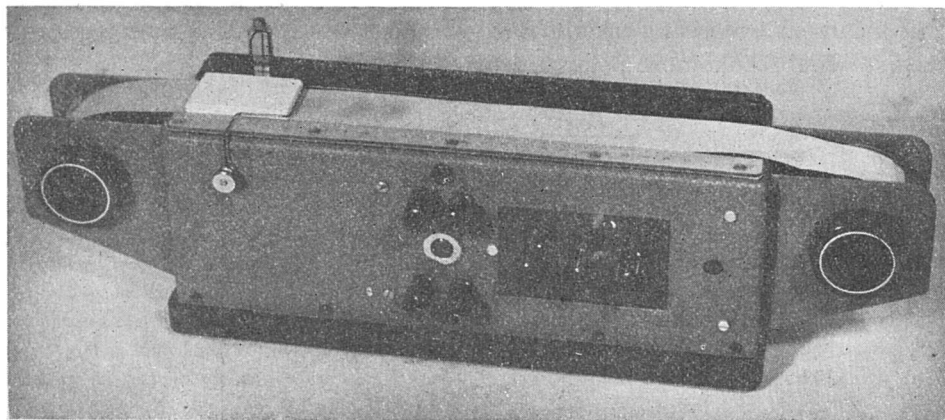
Papierová chromatografia otvorila nové možnosti v chémii polysacharidov, lebo umožňuje jednoduchým spôsobom stanoviť kvantitatívne i kvalitatívne jednotlivé cukry v zložitých zmesiach polysacharidových hydrolyzátoov [1]. Jednoduchými klasickými metódami (polarimetria, refraktometria) možno stanoviť len zmes dvoch cukrov. Zmes viacerých cukrov sa musí oddeľovať zrážaním fenyhydrazínom a jeho derivátmi. Oddeľovanie fenyhydrazónov je veľmi zdĺhavé a nepresné, lebo cukry sú chemicky veľmi príbuzné.

Papierová chromatografia umožňuje spoľahlivo pracovať aj s niekoľkými miligramami vzorky. Kvantitatívne stanovenie sa obyčajne robí po eluovaní škvŕn titračne [1, 2, 3] alebo fotokolorimetricky [1, 4, 5, 6]. Podmienkou tohto spôsobu je, aby škvrny boli dobre oddelené. Preto nie je možné stanoviť *d*-glukózu vedľa *d*-galaktózy a *l*-arabínózu vedľa *d*-manózy, ktorých R_F sa len málo líšia, v dôsledku čoho sú len čiastočne oddelené. Rastlinné polyózy obsahujú obyčajne *d*-glukózu, *d*-galaktózu, *l*-arabínózu, *d*-manózu, *l*-ramnózu a urónové kyseliny. Preto sa hľadali spôsoby, ktoré by umožnili stanoviť takéto zmesi na jednorozmerných chromatogramoch. McFarren [7] použil Blockovu [8, 9] metódu. Absorpciu svetla škvŕnami meria priamo na papieri posunovaním pásika pred štrbinou a registráciou intenzity prechádzajúceho svetla. Takto možno stanoviť *d*-glukózu vedľa *d*-galaktózy, avšak rušivo pôsobí nerovnomernosť papiera. Gustafsson, Sundman a Lindh [10] fotografujú chromatogram na kinofilm v odrazenom svetle a negatív vyhodnocujú na Zeissovom mikrofotometri ručným alebo automatickým posunovaním [11].

Tieto spôsoby vykazujú určité nevýhody. V prvom prípade, pri priamom vyhodnocovaní chromatogramu je nesprávne merať absorpciu svetla škvŕnou chromatogramu, lebo chromatografické papiere sú málo mleté, a preto nerovnomerného priehľadu, čo ovplyvňuje celkovú absorpciu svetla. Zo získaného diagramu nemožno presne zistiť absorpciu pozadia, lebo namiesto priamky, ktorá by v ideálnom prípade mala vyjadrovať absorpciu dokonale rovnomerného papiera, získa sa značne zvlnená krivka. V druhom prípade pri fotografovaní chromatogramu sa ďalšie chyby vnášajú reprodukciou a celý postup je značne zdĺhavejší.

Pri priamom vyhodnocovaní chromatogramov v odrazenom svetle sa využil

poznatok, že povrch papiera je opticky omnoho rovnomernejší. Chromatografický papier má veľkú opacitu, je nepriehľadný, a pretože optické vlastnosti papiera sú ovplyvnené najmä povrchom a len v menšej miere jeho vlastnou hmotou, pozadie chromatogramu pozorované v odrazenom svetle je rovnomernejšie a hodnoty jeho svetlosti ležia na priamke (obr. 1). Náš prístroj, zhotovený



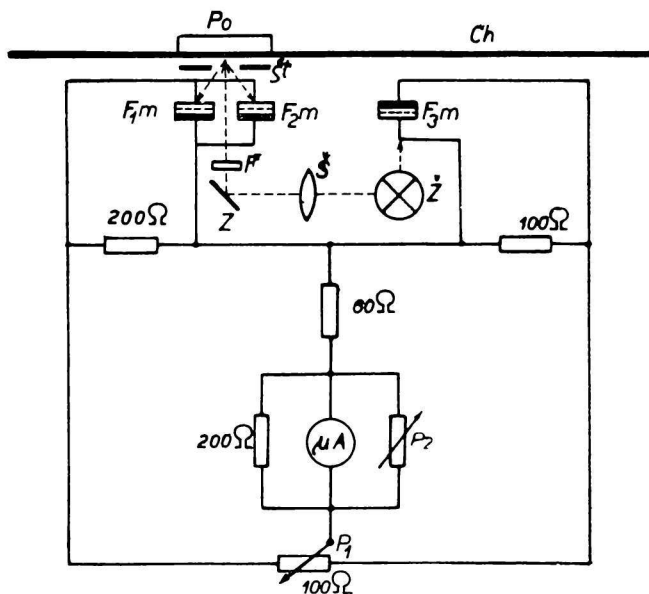
Obr. 1. Celkový pohľad na fotometer.

pre tento spôsob, umožňuje automatickú registráciu intenzity odrazeného svetla bez toho, že by sa chromatogram najprv fotografoval, a dáva hodnoty lineárne závislé od množstva stanovovaných látok. V poslednom čase vyhodnocujú chromatogramy v odrazenom svetle aj iní autori [13, 14, 15].

Chromatografia sa robí na papieri Whatman 1 a Whatman 4. Na papier sa naniesie 2,5 μ l roztoku, ktorý obsahuje 10–100 γ každého z analyzovaných cukrov. Súčasne so vzorkami sa chromatografujú aj štandardy čistých cukrov v množstvách od 10–100 γ . Vyvíja sa dvojstupňove. Najprv sa 16 hodín vyvíja sústavou butanol — pyridín — voda (10 3 3), ktorá čiastočne oddeľuje glukózu od galaktózy [12], a po vysušení sa 18 hodín vyvíja sústavou butanol — kyselina octová — voda (5 1 4), ktorá oddeľuje ostatné cukry. Ak je prítomné veľké množstvo manózy vedľa malého množstva *l*-arabinózy, odporúča sa vyvíjať jednodupňove 36 hodín v sústave butanol — kyselina octová — voda. Niekedy je výhodné na oddelenie *l*-arabinózy od *d*-manózy použiť sústavu etylacetát — kyselina octová — voda (9 2 : 2). Deteguje sa anilínftalátom ponorným spôsobom [4] tak, že kyselina ftalová sa pridáva do kyslej sústavy (2,5 g na 100 ml) a vysušený chromatogram sa ponorí do éterového roztoku anilínu (2 ml anilínu na 100 ml éteru). Suší sa 5 minút pri teplote 105 °C. Všetky vzorky a im prislúchajúce štandardy treba sušiť naraz, najlepšie na jednom drevenom ráme, aby sa odstránil vplyv teploty a času.

Z hotového chromatogramu sa vystrihnú pásiky o šírke 3,5 cm tak, aby škvrny boli v strede pásika. Chromatogramy treba fotometrovať do 48 hodín po detekcii, lebo anilín spôsobuje tmavnutie papiera a tým sa znižujú kontrasty.

Prístroj sa skladá zo svetelného zdroja, ktorého svetlo prechádza úzkou štrbinou a dopadá v normále na papierový chromatogram. Odrazené svetlo sa meria fotónkami a po kompenzácii napätia kompenzačnou fotónkou sa výsledné napätie meria na zrkadlovom galvanometri alebo sa priamo registruje v registračnej fotokomore polarografu.



Obr. 2. Schéma fotometra.

Ž = žiarovka, Š = šošovka, Z = zrkadlo, F = filter, F_1 , F_2 = merné fotónky, F_3 = kompenzačná fotónka, Št = štrbina, Ch = chromatogram, Po = podklad, P_1 = delič napätia, P_2 = menlivý odpor, μA = mikroampérmeter.

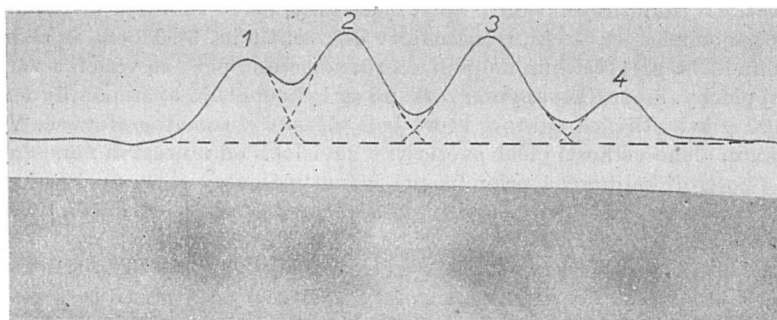
Ako svetelný zdroj v prístroji (obr. 2) sa použila žiarovka Ž (6 V, 30 W), ktorá je napájaná zo stabilizovaného jednosmerného zdroja s nulovým odporom. Svetlo prechádza na meracej strane šošovkou Š, odráža sa zrkadlom a prechádza výmenným farebným filtrom F. Napokon svetlo dopadá v normále na skúšaný chromatogram Ch úzkou štrbinou Št o dĺžke 30 mm, nastaviteľnou na šírku 1—3 mm. Papier je k štrbine pritláčaný podkladom Po. Chromatogramom odrazené svetlo dopadá v priemernom uhle 45° na 2 obdĺžnikové selénové hradlové fotónky F_{1m} a F_{2m} (typ VÚPEF 20 × 40 mm) umiestené rovnobežne so štrbinou prístroja. Ďalšia fotónka F_k osvetľovaná priamo žiarovkou slúži na kompenzáciu napätia merných fotónok — na nastavenie rozsahu registračného prístroja.

Pri dopade svetla na chromatogram časť svetla sa odrazí, časť sa absorbuje v papieri a časť preniká papierom. Preniknuté svetlo sa odráža alebo absorbuje na podklade. Preto

treba za štrbinou vytvoriť rovnomerný podklad. Ďalšou funkciou podkladu je, aby sa papier rovnomerne pritláčal k štrbine, lebo intenzita odrazeného svetla závisí aj od vzdialenosti papiera od fotónky. Ako podklad sa môže použiť čierna dutina alebo biela keramická platnička. Biela platnička má tú výhodu, že na bielom podklade je odraz od papiera väčší a kontrasty medzi škvrnou a papierom sú zreteľnejšie. Nevýhodou je, že odraz závisí aj od tlaku platničky na papier. Medzi platničkou a papierom nie je dokonalý optický kontakt, avšak na niektorých miestach sa vytvorí vzduchová vrstva. Svetlo prenikajúce papierom sa neodráža priamo od platničky, ale najprv prechádza vrstvou vzduchu, v dôsledku čoho je odraz menší. Silnejším pritlačením platničky nastáva lepší optický kontakt a tým aj väčší odraz. Ak platnička tlačí na papier len svojou vlastnou váhou, podmienky merania sú reprodukovateľné. Čierna dutina ako podklad nie je taká citlivá na tlak, ale odraz je menší, slabo sa prejavujú slabšie škvrny. Meranie je však spoľahlivejšie.

Pred meraním sa prístroj vyciachuje deličom napätia P_1 a odporom P_2 na 2 štandardy, z ktorých tmavší má oniečo menšiu svetlosť ako najtmavšia škvrna prichádzajúca do úvahy a svetlejší má oniečo väčšiu svetlosť ako pozadie chromatogramu, t. j. čistý papier po detekcii. Pásik chromatogramu sa na jednej strane zataží zavesením 5 g závažia tak, aby voľný koniec pásika visel vo vertikálnej polohe po ľavom boku prístroja a celý pásik bol rovnomerne pritláčaný na štrbinu. Druhý koniec pásika je pomocou jemného vlákna pripevnený na okraj registračnej fotokomory polarografu. Otáčaním registračnej fotokomory sa navíja vlákno a tým sa súčasne posunuje pásik chromatogramu. Tak sa dosiahne dĺžková zhoda škvrn na chromatograme s príslušnými krivkami svetlosti na registračnom papieri. Môže sa merať aj ručným posunovaním po 2 mm, meraním hodnôt na zrkadlovom galvanometri (napr. galvanometer Langeho fotokolorimetra) a zapisovaním hodnôt na grafický papier.

Posunovaním pásika pred štrbinu a registráciou intenzity odrazeného svetla sa získa krivka svetlosti chromatogramu. Na osi úsečiek je naznačený posun a na osi poradnic hodnoty svetlosti (obr. 3). Rovná časť krivky svetlosti vyjadruje svetlosť pozadia a jednotlivé vlny svetlosť škvrn. Na obrázku je svetlosť značená opačne, lebo maximum vln odpovedá minimálnej svetlosti. Z obrázkov je jasné, že pozadie pri meraní svetlosti je

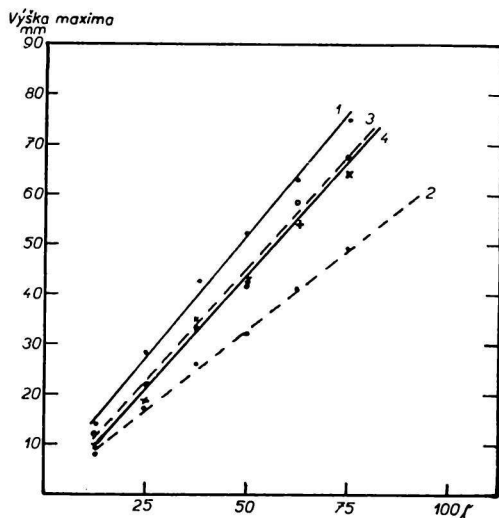


Obr. 3. Krivka svetlosti chromatogramu.

Na obrázku dĺžková zhoda škvrn a kriviek svetlosti nie je úplná, lebo kryt registračnej fotokomory, na ktorú sa natáča vlákno posunujúce chromatogram, má väčší polomer ako bubon, na ktorom je upevnený registračný papier. 1. galaktóza, 2. glukóza, 3. manóza, 4. xylóza.

dostatočne rovnomerné. Treba však dbať, aby sa vyhodnocoval aj dostatočne dlhý úsek čistého papiera bez škvŕn, aby bolo možné zistiť priemernú svetlosť pozadia.

Pred vlastným vyhodnotením kriviek svetlosti treba najprv graficky určiť priemernú svetlosť pozadia zakreslením priamky, ktorá sa čo najviac približuje jednotlivým hodnotám svetlosti. Vlastné vyhodnotenie sa môže urobiť zmeraním výšky maxim alebo zistením plochy svetlosti, t. j. plochy zovretej priemernou svetlosťou pozadia a vlnou prislúchajúcou niektorej škvŕne. Prvý spôsob je omnoho rýchlejší, predpokladá však, aby škvŕny boli rovnomerné a súmerné a celá séria chromatogramov bola vyvíjaná a detego-



Obr. 4. Kalibračné priamky.

1. galaktóza, 2. glukóza, 3. xylóza, 4. manóza.

vaná za úplne rovnakých podmienok. Ak sú škvŕny pretiahnuté a nesúmerné, treba zistiť plochu svetlosti jednotlivých škvŕn. Splývajúce vlny, ktoré vznikajú meraním svetlosti nedostatočne oddelených škvŕn, treba najprv dokresliť (obr. 3). Plocha sa zisťuje planimetrovaním alebo prekreslením na papier s rovnomernou plošnou váhou a vážením vystrihutej plochy. S analyzovanými vzorkami sa vyhodnocujú aj štandardy v množstve od 10—100 γ jednotlivých cukrov, ktoré boli súčasne chromatografované. Vynesením výšky maxim alebo veľkosti plôch svetlosti v závislosti od množstva nanosených štandardov sa zostrojí kalibračná priamka pre jednotlivé cukry (obr. 4). Pre každú sériu chromatogramov treba zostrojiť osobitnú kalibračnú priamku, lebo každá priamka platí len pre jeden pokus.

Hoci závislosť svetlosti škvŕn od koncentrácie meraných látok je logaritmická, úpravou elektrického obvodu sa dosiahne taká kompenzácia, že údaj prístroja v rozmedzí od 10—100 γ jednotlivých cukrov lineárne závisí od koncentrácie meraných látok. Selénová hradlová fotónka dáva lineárnu závislosť od osvetlenia iba vtedy, ak pracuje do skratu, t. j. ak je zapojená na merač elektrický prístroj s nulovým vnútorným odporom. Ak sa však odpor zväčší, je táto závislosť parabolickou funkciou. V našom prístroji úpravou odporov zapojených paralelne na fotónky (odpor 200 ohmov na merné fotónky F_{1m} a F_{2m} a odpor 100 ohmov na kompenzačnú fotónku F_k) a sériového odporu a paralelných

odporov zapojených na merací prístroj (sériový odpor 60 ohmov, paralelné odpory 200 ohmov a menlivý odpor P_2) sa dosiahne lineárny údaj celého prístroja.

Koeficient korelácie medzi množstvom meraných látok a maximom krivky, resp. veľkosťou plochy svetlosti je $r = 0,98-0,99$, teda je to prakticky lineárna závislosť. Činiteľ premenlivosti celého merania je 5 %, maximálne 7 %. Dolná hranica kvantitatívneho stanovenia podľa tejto metódy je 10 γ a horná hranica 100 γ . Na závalu je však veľký nadbytok niektorých cukrov pri malom množstve iných cukrov. Stanovenie galaktózy je silne rušené päťnásobným nadbytkom glukózy a stanovenie *l*-arabínózy sedemnásobným nadbytkom *d*-manózy.

Orientačne sme preskúšali vyhodnocovanie papierových chromatogramov aminokyselín a získali sme vyhovujúce krivky. Predpokladáme, že náš prístroj je vhodný aj na stanovenie aminokyselín a iných látok, ktoré sa dajú oddeliť papierovou chromatografiou, ako aj na vyhodnocovanie elektroferogramov sér, cukrov a iných látok.

Súhrn

Doterajšie spôsoby kvantitatívnej papierovej chromatografie eluovaním škvŕn nedovoľujú stanoviť látky, ktoré sa nedokonale oddeľujú (napr. *d*-glukózu vedľa *d*-galaktózy). Priama fotometria meraním absorpcie chromatogramov je nepresná, lebo chromatografické papiere nie sú dostatočne rovnomerné. Fotografovaním a vyhodnocovaním negatívov sa celý proces predĺži a vnášajú sa chyby reprodukciou. Povrch papiera je omnoho rovnomernejší, preto sme zostrojili prístroj na vyhodnocovanie chromatogramov v odrazenom svetle. Pásik chromatogramu sa posunuje pred štrbinou, cez ktorú dopadá na chromatogram prúžok svetla. Intenzita odrazeného svetla sa meria dvoma selénovými hradlovými fotónkami pod priemerným uhlom 45°. Registráciou intenzity odrazeného svetla sa získajú krivky svetlosti, na ktorých výšky maxim, resp. plochy svetlosti sú úmerné koncentrácii látky na chromatograme. Závislosť je logaritmická, ale úpravou elektrického obvodu prístroja sa získajú lineárne údaje. Týmto prístrojom možno na jednorozmerných chromatogramoch kvantitatívne stanoviť *d*-galaktózu, *d*-glukózu, *d*-manózu, *l*-arabínózu, *d*-xylózu a *l*-ramnózu v množstvách od 10 do 100 γ . Činiteľ premenlivosti merania je 5–7 %. Predpokladá sa, že týmto prístrojom možno stanoviť aj iné látky oddelené papierovou chromatografiou a vyhodnocovať i elektroferogramy.

ПРОСТОЙ ФОТОМЕТР ДЛЯ ОЦЕНИВАНИЯ БУМАЖНЫХ ХРОМАТОГРАММ В ОТРАЖЕННОМ СВЕТЛЕ

Я. ФЕЛЛЕГИ, Л. СЛАМА

Исследовательский институт целлюлозной промышленности в Братиславе

Выводы

До сего времени существующие способы количественной бумажной хроматографии элюацией пятен не позволяют определять вещества, которые трудно от себя отделить

(напр. *d*-глюкоза в присутствии *d*-галактозы). Прямая фотометрия при помощи измерения абсорбции хроматограмм является не точной, потому что хроматографическая бумага не является достаточно равномерной. Фотографированием и оценением негативов процесс определения будет замедлен, кроме того получаются ошибки, вызванные репродукцией. Поверхность бумаги гораздо равномернее а поэтому мы сконструировали прибор для оценивания хроматограмм в отраженном свете. Полоска хроматограммы посовываетея перед щелью, через которую на хроматограмму падает полоска света. Интенсивность отраженного света измеряется двумя селеновыми фотоэлементами под средним углом 45°. Регистрацией интенсивности отраженного света получают кривые, на которых высота максимума или же площади озвещения являются пропорциональными концентрации вещества на хроматограмме. Зависимость является логарифмической, но приспособлением электрического округа прибора получают линейные показания. Этим прибором можно на одномерных хроматограммах количественно определить *d*-галактозу, *d*-глюкозу, *d*-маннозу, *l*-арабинозу, *d*-ксилозу и *l*-рамнозу в количестве от 10 до 100 γ . Фактор переменности измерения равняется 5—7 %. Можно предположить, что при помощи этого прибора будет возможным определить и другие вещества, разделенные при помощи бумажной хроматографии и оценить их электрофореграммы.

Поступило в редакцию 20. I. 1956 г.

EINFACHES PHOTOMETER ZUR AUSWERTUNG VON PAPIERCHROMATOGRAMMEN IM ZURÜCKGESTRAHLTEN LICHT

J. Fellegi, E. Sláma

Forschungsinstitut der Zelluloseindustrie in Bratislava

Zusammenfassung

Die bisherigen Verfahren der quantitativen Papierchromatographie durch Elution der Flecken erlauben es nicht, gewisse Stoffe zu bestimmen, die sich nur unvollkommen abtrennen (wie z. B. *d*-Glucose neben *d*-Galactose). Die direkte Photometrie durch Messung der Absorption der Chromatogramme ist ungenau, denn die chromatographischen Papiere sind nicht genügend gleichmässig. Durch das Photographieren und Auswerten der Negative wird der gesamte Prozess verlängert und durch die Reproduktion werden Fehler hineingetragen. Die Papieroberfläche dagegen ist viel gleichmässiger, weshalb die Autoren ein Gerät zur Auswertung der Chromatogramme im reflektierten Licht gebaut haben. Der Streifen des Chromatogramms lässt sich in diesem Gerät vor einem Spalt verschieben, durch welchen auf das Chromatogramm ein Lichtstreifen fällt. Die Intensität des zurückgestrahlten Lichts wird mittels zweier Selen-Sperrschichtphotocellen unter einem Durchschnittswinkel von 45° gemessen. Durch Registrierung der Intensität des zurückgestrahlten Lichts werden Helligkeitskurven erhalten, in welchen die Höhen der Maxima bzw. die Helligkeitsflächen im proportionalen Verhältnis zur Konzentration der Stoffe im Chromatogramm stehen. Diese Abhängigkeit ist eine logarithmische, aber durch eine besondere Anordnung der elektrischen Stromführung des Gerätes werden lineare Angaben erhalten. Mittels dieses Apparates wird es ermöglicht, auf eindimensionalen Chromatogrammen quantitativ *d*-Galactose, *d*-Glucose, *d*-Mannose, *l*-Arabinose, *d*-Xylose und *l*-Rhamnose in Mengen von 10 bis 100 γ zu bestimmen. Der Veränderlichkeitsfaktor der Messung

beträgt 5—7 %. Es besteht die Voraussetzung, dass mittels dieses Gerätes auch andere durch Papierchromatographie getrennte Stoffe bestimmt und auch Elektropherogramme ausgewertet werden können.

In die Redaktion eingelangt den 20. I. 1956

LITERATÚRA

1. Hais M., Macek K., *Papírová chromatografie*, Praha 1954, 286—287.
2. Flood A. E., Hirst E. L., Jones J. K. N., *J. chem. Soc.* 1948, 1679.
3. Hirst E. L., Jones J. K. N., *J. chem. Soc.* 1949, 1659.
4. Sundman J., Saarnio J., Gustafsson Ch., *Pap. ja Puu B* 33, 115 (1951).
5. Borel E., Hostettler F., Deuel H., *Helv. chim. Acta* 35, 115 (1952).
6. Duff R. B., Eastwood D. J., *Nature* 165, 848 (1950).
7. McFarren E. F., Brand K., Rutkowski H. R., *Anal. Chem.* 23, 1146 (1951).
8. Block R. J., *Science* 108, 608 (1948).
9. Bull H. B., Hahn J. W., Baptist V. H., *J. am. chem. Soc.* 71, 550 (1949).
10. Gustafsson Ch., Sundman J., Lindh. Th., *Pap. ja Puu* 33, 1 (1951).
11. Saarnio J., Niskasaari E., Gustafsson Ch., *Suomen Kemist. B* 25, 25 (1952).
12. Lea D. C., *TAPPI* 37, 393 (1954).
13. Keil B., súkromné oznámenie.
14. McCready R. M., McComb D. A., *Anal. Chem.* 26, 1645 (1954); *Abs. Papier* 9, L 53 (1955).
15. Turba F., *Chromatographische Methoden der Proteinchemie*, Berlin 1955.

Došlo do redakcie 20. I. 1956