

## Porovnanie fotometrického vyhodnocovania chromatogramov v odrazenom a prechádzajúcom svetle

A. PRÍBELA

*Katedra chemickej technológie uhľohydrátov Slovenskej vysokej školy technickej,  
Bratislava*

Jednou z významných techník vyhodnocovania pri rozdeľovacej chromatografii na papieri je fotometrické premeriavanie intenzity a veľkosti chromatografických škvŕn, a to buď priamo na papieri, alebo ich negatívneho obrazu po ofotografovaní chromatogramu. Premeriavanie sa robí alebo v prechádzajúcom [1—4], alebo v odrazenom svetle [5—8]. Podobne fotografovanie možno realizovať pri osvetlení zhora alebo pri presvecovaní chromatogramu.

V literatúre sa uvádzajú výhody a nevýhody vyhodnocovania chromatogramov spomenutými metódami a osobitná pozornosť sa venuje spôsobu osvetlenia [6—8]. Väčšina autorov je toho názoru, že vzhľadom na veľkú opacitu papiera je meranie škvŕn v odrazenom svetle presnejšie. Pri presvecovaní chromatogramu sa nepriaznivo prejavuje najmä nehomogenita chromatografického papiera, ktorá skresľuje základnú (nulovú) čiaru registračného záznamu, čím stanovenie zafažuje ďalšími chybami.

V predloženej práci kriticky porovnávame metódy fotometrického vyhodnocovania chromatogramov premeriavaním škvŕn v prechádzajúcom, resp. v odrazenom svetle priamo na papieri a po ofotografovaní. Pokúsime sa ukázať, že fotometria v prechádzajúcom svetle, najmä pri priamom vyhodnocovaní chromatogramov je za určitých podmienok aspoň taká presná ako meranie v odrazenom svetle.

### Experimentálna časť

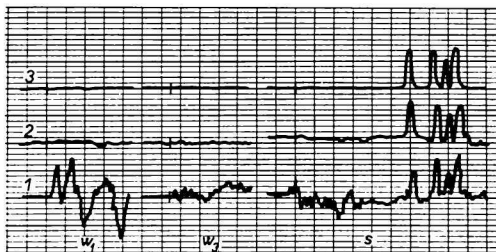
Vplyv štruktúry papierov na rovnomernosť základnej čiary sme sledovali pri troch najpoužívanejších chromatografických papieroch: Schleicher-Schüll 2043 Bm, Whatman 1 a Whatman 3. Čisté chromatografické papiere sme premerali v prechádzajúcom svetle jednak bez použitia filtra, jednak s jedným a dvoma modrými filtrami. Rovnakým spôsobom sme vyhodnotili škvŕny 2,4-dinitrofenylhydrazónov na papieri SS 2043 Bm. Výsledky meraní ukazuje obr. 1. Svetelný tok, dopadajúci na fotočlánok, sme regulovali tak, aby pri rovnakej citlivosti milivoltmetra (EZ-3 — rozsah 0,5 mV, redukcia citlivosti 1/7) dávala chromatografická škvŕna vlnu o rovnakej výške.

Zmes, pozostávajúca z rovnakého váhového podielu aminokyselín (lyzín, kyselina asparágová, glycín, kyselina glutamová, alanín, kyselina  $\gamma$ -aminomaslová, tyrozín, leucín + izoleucín), sme nanášali na papier SS 2043 Bm tak, aby naštarte bolo 1; 3; 6; 10; 15  $\mu$ g každej z uvedených aminokyselín. Zmes sme rozdelili trojnásobne opakovaným vyvíjaním v Partridgeovej sústave. Chromatogramy, vysušené pri laboratórnej teplote, sme detegovali 0,2 % roztokom ninhydrínu v absolútnom etanole a 15 minút zahrievali pri 60 °C v sušiarňi s nútenou cirkuláciou vzduchu.

Obr. 1. Vplyv filtrovaného svetla na rovnomernosť základnej čiary v prechádzajúcom svetle.

W<sub>1</sub> — Whatman 1; W<sub>3</sub> — Whatman 3;  
S — Schleicher-Schüll 2043 Bm.

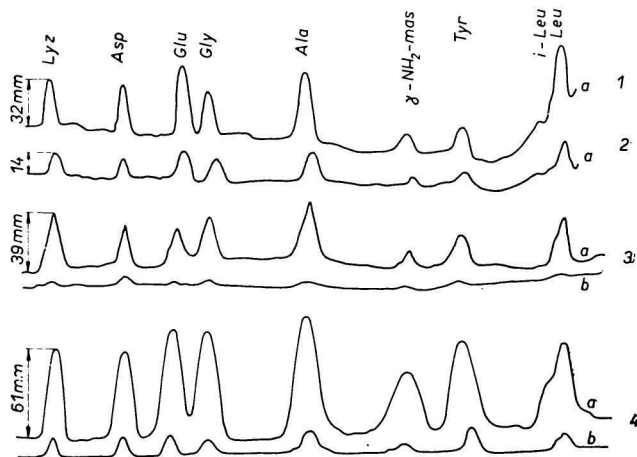
1. biele svetlo; 2. jeden filter; 3. dva filtre. Šum registračného prístroja (bez posunu chromatogramu) po zvislú čiaru.



Podobným spôsobom sme analyzovali zmes cukrov (sacharóza, glukóza, fruktóza). Nanášali sme množstvá zodpovedajúce 2; 6; 12; 20; 30  $\mu\text{g}$  každého cukru. Na detekciu sme použili anilín, difenylamín a kyselinu fosforečnú [8]. Chromatogram sme 5 minút zahrievali pri 80 °C.

Vyvolané chromatogramy sme fotografovali dvojakým spôsobom. Na presvecovanie bola zhotovená skrinka (90 × 55 × 55 cm). Na dne boli pravidelne rozmiestené žiarovky (24 ks 60 W), ktoré cez dve matné sklá presvecovali chromatogram. Na fotografovanie v odrazenom svetle sme použili dve 60 W žiarovky. Expozícia v oboch prípadoch bola 1 s pri clone 8. Fotografovalo sa aparátom Exakta Varex IIa na kinofilm Dokument B. Film po spracovaní sa použil na vyhodnotenie škvŕn na mikrofotometri (Keramos, n. p., Brno).

Ten istý chromatogram sa postrihal na pásy 3 cm široké a vyhodnotil sa priamo v odrazenom svetle na prístroji, ktorý skonštruoval D. Halama [9], za použitia Langeho registračného prístroja a v prechádzajúcom svetle na prístroji vlastnej konštrukcie [10], pomocou registračného prístroja eKB 0—2 mV, resp. EZ-3. Pre aminokyseliny sme použili modrozelené, pre cukry purpurové filtre z Langeho kolorimetra. Praktické aplikácie vy-



Obr. 2. Vyhodnotenie chromatogramov:

1. mikrofotometrom podľa Kohla — chromatogram fotografovaný v prechádzajúcom svetle; 2. ako pri 1 — fotografovaný v odrazenom svetle; 3. fotometer skonštruovaný D. Halamom — chromatogram vyhodnotený priamo z papiera v odrazenom svetle; 4. fotometer vlastnej konštrukcie — chromatogram vyhodnotený priamo v prechádzajúcom svetle.

a) koncentrácia 15  $\mu\text{g}$  každej aminokyseliny; b) koncentrácia 1  $\mu\text{g}$  každej aminokyseliny.

hodnocovania chromatogramov aminokyselín uvedenými prístrojmi sú na obr. 2. Pre porovnanie citlivosti priameho fotometrovania v odrazenom a prechádzajúcom svetle uvádzame krajné koncentrácie 1  $\mu\text{g}$  (krivka *b*) a 15  $\mu\text{g}$  (krivka *a*).

Registračné záznamy sme vyhodnotili podľa výšky a plochy vln. Priemerné hodnoty paralelných stanovení sme štatisticky spracovali. Tvar kalibračných kriviek sledovaných zložiek vo väčšine prípadov vyhovoval rovnici

$$y = ax^b,$$

ktorá po vyrovnaní na tvar

$$Y = \log a + bX$$

(kde  $Y = \log y$  a  $X = \log x$ ) dáva lineárnu závislosť. Regresné priamky každej sledovanej zložky sme počítali z logaritmov koncentrácií  $a$  z výšok, resp. plôch vln. Zo smerodajnej odchýlky ( $s_y$ ) sme vypočítali variačný koeficient ( $v$ ) pre stred sledovaného koncentračného intervalu ( $\bar{x}$ ) podľa vzťahu [11]:

$$v = \frac{s_y}{\bar{x}} \cdot 100 \%$$

Porovnanie presnosti jednotlivých metód je zrejmé z priemerných variačných koeficientov, uvedených v tab. 1.

Tabuľka 1

Porovnanie variačných koeficientov fotometrických metód na vyhodnocovanie papierových chromatogramov

Analyzovaná zložka	Nepriama fotometria				Priama fotometria			
	v prechádzajúcom svetle		v odrazenom svetle		v prechádzajúcom svetle		v odrazenom svetle	
	výška	plocha	výška	plocha	výška	plocha	výška	plocha
kyselina asparágová	3,4	5,0	4,3	2,4	1,2	4,6	5,6	3,3
tyrozín	4,8	6,3	5,6	7,2	3,2	4,3	2,9	8,2
leucín + izoleucín	5,4	3,4	5,1	6,3	4,1	5,7	7,2	4,8
glycín	5,7	6,2	4,9	4,5	2,5	3,8	3,4	5,1
kyselina $\gamma$ -aminomaslová	4,7	5,5	3,5	5,3	3,1	2,8	5,4	3,0
priemer variačných koeficientov	4,8	5,3	4,7	5,1	2,8	4,2	4,9	4,9
glukóza	2,9	5,5	2,6	3,2	1,8	2,5	—	—
fruktóza	4,0	1,9	2,5	2,3	1,6	2,2	—	—
sacharóza	2,5	6,0	2,6	9,5	1,5	3,3	—	—
priemer variačných koeficientov	3,1	4,5	2,6	3,0	1,6	2,7	—	—

Veľkosť plochy obmedzenej vlnou sme určili planimetricky, vážením vystrihnutej krivky a výpočtom plochy z opísaného trojuholníka, resp. kosodĺžnika. Chromatogram kyseliny asparágovej s odstupňovanými koncentraciami sme päťkrát premerali na fotometri [10]. Taktó získané hodnoty sme štatisticky spracovali a výsledky sme zhrnuli do tab. 2.

Tabuľka 2  
Presnosť určovania plochy vln rozličnými spôsobmi

Plocha mm <sup>2</sup>	Trojuholník	Váženie	Planimetrovanie	Výška
	Variačné koeficienty			
8	14,7	24,7	30,1	10,3
40	6,8	13,0	15,4	5,7
156	3,7	2,5	6,5	1,6
532	1,2	3,0	5,4	1,1

### Diskusia

Aby sme pri vlastnom spracovaní chromatogramov vylúčili zdroje chýb, ten istý chromatogram sme vyhodnocovali vždy všetkými spôsobmi. Zásadný význam pre kvantitatívne hodnotenie chromatogramov má kvalita svetla, najmä pri farebných škvrnách, a sčasti aj druh papiera. Jasne to dokazuje obr. 1. Krivka 1 objektívne registruje homogenitu papierov v prechádzajúcom bielom svetle a jej vplyv na záznam registračného prístroja. Krivky 2 a 3 svedčia o rozhodujúcom vplyve filtrovaného svetla na kvalitu záznamu, a to nielen chromatografických škvŕn, ale aj čistého papiera. Pravdepodobne sa tu uplatňuje zníženie citlivosti voči heterogénnej štruktúre použitého papiera. Zo sledovaných chromatografických papierov sa v tomto smere najlepšie osvedčili SS 2043 Bm a Whatman 3. Súčasne tento pokus dokazuje, že prechádzajúce svetlo možno za uvedených predpokladov rovnako dobre použiť ako odrazené svetlo.

Na obr. 2 sú porovnané záznamy, získané priamym a nepriamym fotometrovaním v prechádzajúcom a odrazenom svetle. Fotometrické záznamy pre rovnaké koncentrácie (15 µg), získané v prechádzajúcom svetle (krivky 1 a 4a), sú vyššie než príslušné krivky, zaregistrované pomocou odrazeného svetla (krivky 2 a 3a). Súčasne však účinnejšia filtrácia svetla pomocou troch rovnakých filtrov, ako vyplýva zo záznamu 4, viedla k výraznému zlepšeniu základnej čiary. Naproti tomu pri nepriamej fotometrii v prechádzajúcom svetle základná čiara bola podstatne horšia (krivka 1). Napriek niektorým tvrdeniam o prednostiach vyhodnocovania chromatogramov v odrazenom svetle naše výsledky dokazujú, že za uvedených predpokladov možno dosiahnuť prinajmenšom rovnakú presnosť priamou fotometriou v prechádzajúcom svetle. Týmto spôsobom sa navyše zvyšuje citlivosť stanovenia, ako o tom svedčia krivky 3b a 4b. Aminokyseliny sme dokázali ešte v koncentrácii 0,5 µg, cukry v koncentrácii 1 µg. V porovnaní s údajmi literatúry [6, 7] citlivosť opísaného spôsobu je 5 až 10 násobne vyššia.

Kalibračné závislosti niektorých aminokyselín v prechádzajúcom svetle boli lineárne iba v intervale 1—10  $\mu\text{g}$ . Vyššie koncentrácie (15  $\mu\text{g}$ ), najmä v prípade alanínu, glycínu a kyseliny glutamovej, vykazovali zápornú odchýlku od regresnej priamky. Ukázalo sa, že práve tieto aminokyseliny dávajú najcitlivejšiu reakciu s ninhydrínom [8], to znamená, že pri hornej koncentrácii ich zafarbenie nezodpovedalo Lambert—Beerovmu zákonu. Cukry v celom sledovanom intervale vykazujú lineárny priebeh závislosti medzi ich množstvom a fotometrickou hodnotou.

Nepriama fotometria okrem časovej náročnosti a zdrojov ďalších chýb pri reprodukcii je navyše obmedzene použiteľná pri vyhodnocovaní farebných škvrín. Posledná nevýhoda sa výrazne uplatňuje najmä v prípade škvrín takých farieb, na ktoré je film málo citlivý. Napríklad chromatogram aminokyselín stabilizovaný dusičnanom mednatým so zeleným pozadím a s červenými škvrnami dáva týmto spôsobom neuspokojivé výsledky [6]. Naproti tomu priame fotometrovanie za použitia filtra rovnakého odtieňa ako pozadie markantne zvýši kontrast.

Zaregistrované krivky možno vyhodnotiť niekoľkými spôsobmi. Z hodnôt uvedených v tab. 1 jednoznačne vyplýva, že vyššia presnosť sa dosiahne pri meraní výšok kriviek. Platí to najmä pre kvalitné chromatogramy s pravidelnými škvrnami. Presnosť vyhodnocovania z plochy jednotlivých kriviek je vo všeobecnosti nižšia a závisí od použitej metódy merania plochy. Z troch sledovaných spôsobov (váženie, planimetrovanie a výpočet plochy trojuholníka) najpresnejší sa ukázal posledný. Menej vhodné je zisťovanie plochy vážením vystrihnutých vln a najhoršie výsledky dávalo planimetrovanie. Keďže veľkosť chyby sa znižuje s veľkosťou plochy, citlivejšie prístroje majú lepšie predpoklady pre kvantitatívne vyhodnocovanie.

Z výsledkov štatistického hodnotenia vyplýva, že priemerný variačný koeficient aminokyselín pri priamom meraní chromatogramov v prechádzajúcom filtrovanom svetle sa pohybuje v rozmedzí 1,6—4,2 %, pri ostatných v rozmedzí 2,6—5,3 %. Vcelku lepšie výsledky sa dosiahli pri analyzovaných zmesiach cukrov.

### Súhrn

Porovnáva sa presnosť fotometrických metód vyhodnocovania chromatogramov priamo z papiera a z negatívu v odrazenom a prechádzajúcom svetle. Na meranie sa použil registračný mikrofotometer podľa Kohla, denzitometer, ktorý zhotovil D. Haľama, a fotometer vlastnej konštrukcie.

Sledoval sa vplyv kvality chromatografického papiera na základnú čiaru registračného záznamu pri prechádzajúcom bielom a filtrovanom svetle.

Zistilo sa, že kvalita papiera pri použití dvoch filtrov len málo vplyva na nulovú hodnotu záznamu.

Meranie sa robilo na chromatografovaných zmesiach aminokyselín; resp. cukrov. Registračné záznamy sa vyhodnotili podľa výšky a plochy a výsledky sa štatisticky spracovali. Takmer vo všetkých prípadoch lepšie výsledky sa dosiahli pri meraní výšky vln. Pri priamom vyhodnocovaní v prechádzajúcom svetle sa priemerný variačný koeficient pohyboval v rozmedzí 1,6—4,2 %, pri ostatných metódach v rozmedzí 2,6—5,3 %. V prechádzajúcom svetle sa citlivosť oproti ostatným spôsobom zvýšila 5—10 násobne.

### СРАВНЕНИЕ ФОТОМЕТРИЧЕСКОЙ ОЦЕНКИ ХРОМАТОГРАММ В ОТРАЖЕННОМ И ПРОХОДЯЩЕМ СВЕТАХ

А. Прибела

Кафедра химической технологии углеводов Словацкого политехнического института,  
Братислава

В работе сравнилась точность фотометрических методов оценки хроматограмм прямо на бумаге и из негатива в отраженном и проходящем светах. К измерению применились: регистрационный микрофотометр по Кэлу, денситометр конструкции Д. Галама и фотометр собственной конструкции.

Следилось за влиянием качества хроматографической бумаги на основную линию регистрационной записи при проходящем белом и фильтрованном светах. Показалось, что качество бумаги при применении двух фильтров оказывает незначительное влияние на нулевую величину записи.

Измерение проводилось на хроматографированных смесях аминокислот или сахаров. Регистрационные записи оценивались на основании высот и площадей и результаты обрабатывались статистически. Почти во всех случаях лучших результатов достиглось при измерении высоты волн. При прямой оценке в проходящем свете среднее значение варьирующего коэффициента колеблется от 1,6 до 4,2 %, у остальных методов в смесях от 2,6 до 5,3 %. В проходящем свете повысилась чувствительность в сравнении с остальными методами в 5—10 раза.

### GEGENÜBERSTELLUNG DER PHOTOMETRISCHEN AUSWERTUNG VON CHROMATOGRAMMEN IM REFLEKTIERTEN UND DURCHFALLENDEN LICHT

А. Прибела.

Lehrstuhl für chemische Technologie der Kohlenhydrate an der Slowakischen  
Technischen Hochschule, Bratislava

In der vorliegenden Arbeit wurde die Genauigkeit der photometrischen Methoden der Auswertung von Chromatogrammen direkt vom Papier und vom Negativ im reflektierten und durchfallenden Licht verglichen. Für die Messung wurden folgende Geräte

verwendet: das Registriermikrophotometer nach Kohl, ein von D. Halama angefertigtes Densitometer, und ein Photometer eigener Konstruktion.

Es wurde der Einfluss der Qualität des chromatographischen Papiers auf die Grundlinie der Registrieraufzeichnung bei durchfallendem weissen und filtriertem Licht untersucht. Es hat sich gezeigt, dass die Papierqualität bei Benutzung von zwei Filtern nur sehr wenig auf den Nullwert Einfluss nimmt.

Die Messung wurde an chromatographierten Gemischen von Aminosäuren resp. Zuckern vorgenommen. Die Registrieraufzeichnungen wurden nach der Höhe und Fläche ausgewertet und die Ergebnisse statistisch verarbeitet. In fast allen Fällen wurden bessere Ergebnisse bei der Messung der Wellenhöhe erzielt. Bei der direkten Auswertung im durchfallenden Licht bewegte sich der Variationskoeffizient in den Grenzen von 1,6 bis 4,2 %, bei den übrigen Methoden in den Gemischen von 2,6—5,3 %. Im durchfallenden Licht erhöhte sich die Empfindlichkeit gegenüber den übrigen Verfahren um das 5 bis 10-fache.

#### LITERATÚRA

1. Block R. J., *Anal. Chem.* **22**, 1327 (1950).
2. Hiller E. a spolupracovníci, *Biochem. Z.* **323**, 254 (1952).
3. Wallenfels K. a spolupracovníci, *Angew. Chem.* **65**, 581 (1953).
4. McFarren E. F. a spolupracovníci, *Anal. Chem.* **23**, 1146 (1951).
5. McCready R. M., McComb E. A., *Anal. Chem.* **26**, 1645 (1954).
6. Keil B., *Chem. listy* **48**, 725 (1954).
7. Fellegi J., Sláma L., *Chem. zvesti* **10**, 314 (1956).
8. Hais I. M., Macek K. a spolupracovníci, *Papírová chromatografie*, 287, 422, 450, 745. Nakladatelství ČSAV, Praha 1959.
9. Halama D., *Chem. zvesti* **13**, 254 (1959).
10. Příbela A., *Chem. zvesti* **17**, 689 (1963).
11. Lokvenc F. A. v kniže: A. Kocková-Kratochvílová, *Praktikum technické mikrobiologie*, 282—356. Státní nakladatelství technické literatury, Praha 1954.

Do redakcie došlo 29. 5. 1963

*Adresa autora:*

*Inž. Alexander Příbela, Katedra chemické technológie uhľohydrátov SVŠT, Bratislava, Kollárovo nám. 2.*