

CHROMATOGRAFICKÉ METÓDY*

KAREL MACEK

Výzkumný ústav pro farmacii a biochemii v Praze

Vývoj biochémie v minulom storočí a v prvých desaťročiach tohto storočia bol značne zdržovaný nedostatkom špeciálnych biochemicko-analytických a preparačných metód. Nebola k dispozícii metóda, ktorá by dovoľovala sledovať pri metabolizme pohyb gamových množstiev látok často štruktúrne veľmi blízkych, a tak sa biochémia v tejto dobe zaoberala prevažne statickou časťou. Až zavedenie biochemických metód, z ktorých azda najpodstatnejšou mierou sa uplatnili metódy chromatografické, spôsobilo prudký a nečakaný rast biochémie. Po druhej svetovej vojne najväčší podiel na tomto vývoji má chromatografia a elektroforéza na papieri; možnosti oboch týchto metód sa v poslednom čase ešte zvýšili spojením s metódou použitia rádioaktívnych izotopov. Táto papierová chromatografia a papierová elektroforéza rádioaktívnych látok začína dnes tvoriť základ akejkoľvek biochemickej práce a o niekoľko rokov stane sa zaiste najbežnejšou biochemickou technikou.

Význam chromatografických metód pre biochémiu som zdôraznil preto, že tu tieto metódy vznikli a ešte dnes sú stále najrozšírenejšie v biochemických laboratóriách. Ich použitie sa však neobmedzuje len na biochémiu; dnes majú už svoje miesto v medicíne, farmácii, potravinárstve, poľnohospodárskom výskume, vo fyzikálno-chemických laboratóriách, v organickej syntéze, analytických laboratóriách, začínajú sa uplatňovať ako prevádzkové kontrolné metódy v továrňach atď. Pre chromatografické metódy sú charakteristické slová Arne Tiselie [13]: „Je veľmi zriedkavým zjavom pre novú techniku, aby prenikla do všetkých oblastí širokého poľa vedy. Takúto výnimku tvoria práve metódy chromatografické, pre ktoré by sme dnes už len ťažko hľadali nejaké odvetvie chémie, kde by doteraz neboli úspešne aplikované; a pritom sú ich možnosti stále ešte ďaleko od toho, aby mohli byť v najbližšej dobe vyčerpané.“

Dnes sa máloktorá iná metóda môže pochváliť takou obľubou ako chromatografia. Svedčí o tom bohatá literatúra, ktorá zahrňuje asi 6500 prác, z ktorých celé dve tretiny sú venované chromatografii na papieri a elektroforéze na papieri. Ešte väčšiemu rozšíreniu chromatografických metód, predovšetkým v odboroch ležiacich mimo biochémie, je na závalu jednak to, že sa s nimi študenti — okrem malých výnimiek — ešte stále nestretávajú ani na vysokých školách, a jednak je to nedostatok súbornej literatúry, najmä knižnej, kde by boli zachytené všetky chromatografické práce. Hľadanie literatúry po jednotlivých časopisoch je pri takom veľkom množstve prác zdĺhavé a pri dnešnom

*Tento referát bol prednesený na chromatografickom kurze, ktorý usporiadalo Poverenieťvo zdravotníctva v Bratislave v dňoch 22.—24. októbra 1953.

nedostatku odbornej literatúry pre mnohých pracovníkov celkom nemožné. V poslednom čase vyšlo niekoľko málo prác, ktoré zachycujú bibliografiu o adsorpčnej chromatografii [17, 21], chromatografii výmeny iónov [128], chromatografii na papieri [151, 181] a elektroforéze na papieri [312].

Tento súborný referát si nemôže nijako robiť nárok na úplnosť; pri uvedenom počte prác by to bolo nemožné a celkom zbytočné, pretože je to úlohou jednak knižnej literatúry, jednak niektorých prehľadných referátov. Jeho úlohou je zoznámiť pracovníkov všetkých odborov s elementárnymi základmi chromatografických metód. Stručne preberieme teóriu, najmä teóriu rozdeľovacej chromatografie, ktorou sa nedávno v tomto časopise zaoberal R. Smrč [87]; oniečo podrobnejšie sa budeme zaoberať metodickou časťou. Z aplikácií vyberieme len niektoré typické príklady. Z literatúry uvedieme všetku literatúru knižnú a prehľadné referáty, ďalej práce základného významu, najmä pokiaľ ide o časť metodickú, a z aplikácií uvedieme len niektoré najnovšie významnejšie práce.

Prv než pristúpime k rozdeleniu chromatografie do jednotlivých skupín, musíme si predovšetkým nejako definovať, čo považujeme za chromatografickú metódu. Všeobecne môžeme povedať, že všetky chromatografické metódy sú založené na *rozdielnej migrácii rozpustenej látky v polyfázovom systéme*. Weil a Williams [40] definujú chromatografiu ako „proces, kde dochádza k rozdeleniu zmesi látok separáciou všetkých alebo aspoň niektorých zložiek tejto zmesi v koncentračných zónach vo fázach, ktoré sú odlišné od tých, v ktorých bola táto zmes pôvodne prítomná, bez ohľadu na podstatu síl, ktoré spôsobujú pohyb látky z jednej fázy do druhej alebo z jedného bodu do druhého v tej istej fáze“.

Jednotlivé chromatografické techniky si podľa experimentálneho usporiadania rozdelíme do dvoch skupín:

- A. stĺpcová chromatografia,
- B. chromatografia na papieri.

Z niekoľkých dôvodov, ktoré uvedieme neskoršie, zaradíme ešte ako tretiu skupinu:

- C. elektroforézu na papieri.

A. Stĺpcová chromatografia

Pri stĺpcovej chromatografii dochádza k nepretržitému reverzibilnému rozdeľovaniu rozpustených látok obyčajne medzi dve nemiešateľné fázy, z ktorých jedna nepohyblivá (štacionárna) je navrstvená do stĺpca a druhá sa cez ňu pohybuje (mobilná fáza). Najväčší význam dosahujú tie systémy, kde nepohyblivá fáza je tuhá alebo kvapalná. Podľa výberu tejto nepohyblivej fázy a sú-

časne podľa povahy síl, ktoré určujú distribúciu rozdeľovanej látky medzi obidve fázy, rozlišujeme chromatografiu adsorpčnú, kde štacionárna fáza je tuhá a k oddeľovaniu látok dochádza na základe rôznej adsorpcie oddeľovaných látok na túto tuhú fázu, ďalej chromatografiu rozdeľovaciu s nepohyblivou kvapalnou fázou, kde k oddeľovaniu dochádza na základe rôznych rozdeľovacích koeficientov oddeľovaných látok medzi dvoma systémami nemiesateľných rozpúšťadiel, a napokon chromatografiu výmeny iónov, kde je oddeľovanie založené na rozdielnej výmene iónov látok na stĺpci prirodzených alebo umelých ionexov. Okrem týchto troch hlavných skupín jestvuje ešte niekoľko menších skupín (vysolovacia chromatografia, chemická chromatografia, elektrochromatografia a i.), ktoré však okrem nepatrných výnimiek nie sú také dôležité ako prvé tri skupiny.

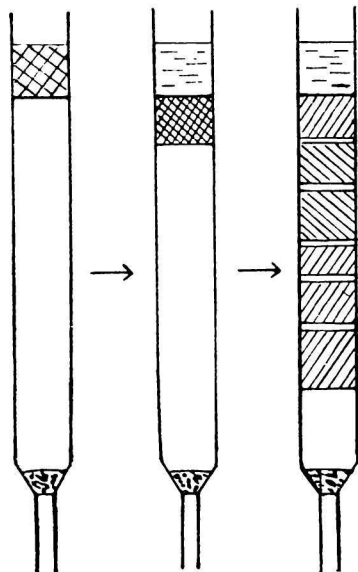
Toto rozdelenie je, pravda, schematické, lebo prevažnú väčšinu látok používaných ako štacionárna fáza by sme mohli dobre zaradiť do dvoch i troch uvedených skupín. Pri daných experimentálnych podmienkach sa však obvykle uplatňuje prevažne iba jeden z uvedených typov, takže toto rozdelenie má svoj význam.

I. Adsorpčná chromatografia

Je všeobecne známe, že pri styku dvoch fáz sa účinkom medzipovrchových síl hromadia v medzifázi látky z jednej alebo oboch fáz, čiže ako hovoríme, dochádza k *adsorpcii*. Tento zjav je veľmi obvyklý pri styku plynov alebo roztokov s tuhou fázou, ktorú nazývame adsorbivom, a oddávna sa používa v chemických laboratóriách na odstraňovanie nežiadúcich zložiek roztoku (napr. na odfarbovanie roztokov karborafinom) alebo naopak na skoncentrovanie potrebnej látky na adsorbivadle. Adsorpciu v tomto zmysle možno teda v optimálnom prípade využiť na oddelenie dvoch látok, z ktorých jedna sa na použitom adsorbivadle silne adsorbuje, druhá však nie. V minulom storočí sa konali pokusy navrstviť adsorbivadlo v rúrke do stĺpca a oddeľovať potom látky v roztoku nalievaním na takto pripravený stĺpec. Avšak tieto pokusy nemohli byť úspešné pre preparatívne oddeľovanie látok, lebo stály prítok roztoku látok nedovoľoval dokonalé oddelenie: pri tomto usporiadaní bolo najvyššie možné získať v čistom stave len časť látky, ktorá sa najmenej adsorbavala, takže pretekala prvá stĺpcom.

Radikálnu zmenu v týchto pokusoch priniesol až rok 1903, keď sa ruskému botanikovi M. S. Cvetovi [23] podarilo využiť adsorpciu na oddelenie niekoľkých látok v roztoku. Preberieme si klasický Cvetov pokus: Cvet si pripravil stĺpec z jemne rozpráškovaného uhličitanu vápenatého a na takto pripravený stĺpec nalial petroléterový extrakt zeleného listia. Na rozdiel od predchádzajúcich pracovníkov však tento roztok nenalieval ďalej na stĺpec, ale po na-

adsorbovaní roztoku premýval stĺpec čistým petroléterom. Pritom pozoroval, že pôvodne naadsorbovaný pigment sa premývaním petroléterom rozdelil na rad pásov alebo zón, ktoré putovali po stĺpci rôznou rýchlosťou: najpomalšie sa pohyboval žltý pás, potom dva zelené a najrýchlejšie boli tri žlté pásy. Týmto pokusom sa dokázalo, že chlorofyl je zložený pigment, a súčasne sa získal veľmi jednoduchý spôsob na jeho oddeľovanie. Schematicky by sme mohli (vetov klasický pokus znázorniť asi takto:



Obr. 1.

Čvet túto svoju prácu v tom istom roku publikoval pod názvom *O novej kategórii adsorpčných zjavov a o ich použití v biochemickej analýze*. Novú metódu pomenoval metódou chromatografickou, lebo sa spočiatku zdalo, že sa dá použiť len pre farebné látky. V nasledujúcich rokoch chromatografiu ďalej rozvíjal, vysvetlil a zhrnul jej princípy v monografii o prirodzených farbivách.

Napriek veľkým možnostiam, ktoré chromatografia v tom čase prinášala, okrem malých výnimiek sa nerozširovala a na celých dvadsaťpäť rokov sa na ňu zabudlo. Až r. 1931 ju opäť uviedol Kuhn so spolupracovníkmi — najmä v chémii karotenoidov — a odvtedy sa začína jej rozmach, ktorý vrcholí v čase okolo druhej svetovej vojny.

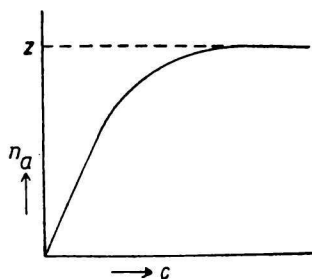
Aby sme dobre porozumeli chromatografi a mohli ju lepšie využiť, budeme sa najskôr zaoberať teoretickými základmi adsorpčnej chromatografie. Základom adsorpčnej chromatografie je adsorpcia, ktorá odlišuje tento typ

chromatografie od chromatografie rozdeľovacej a chromatografie výmeny iónov. Táto adsorpcia spočíva v hromadení látky prítomnej v jednej fáze do hraničnej oblasti medzi dvoma fázami, t. j. do tzv. medzifázia. Adsorbovanú látku v tomto medzifázi pútajú zásadne dva druhy síl: sú to predovšetkým sily van der Waalsove, ktorými sa vzájomne priťahujú molekuly plynov a kvapalín; táto adsorpčná väzba je veľmi labilná a nazývame ju fyzikálnou adsorpciou. Druhý typ sú sily chemické, pri uplatňovaní ktorých hovoríme o tzv. chemisorpcii; táto väzba je omnoho pevnejšia. Pri adsorpčnej chromatografii sa oveľa častejšie uplatňuje prvý druh síl; výskyt chemickej väzby je vo väčšine prípadov nežiadúci.

Pri adsorpčnej chromatografii pracujeme so sústavou tuhá fáza — roztok; množstvo adsorbovanej látky sa v tomto systéme mení s jej koncentráciou v roztoku. Tento rovnovážny stav pri danej teplote možno vyjadriť krivkou, ktorá sa po svojom objaviteľovi nazýva *Langmuirovou adsorpčnou izotermou*. Langmuir si predstavuje celý povrch tuhej fázy rozdelený na elementárne plôšky, z ktorých každá môže pútať nanajvýš jednu molekulu adsorbovanej látky; tieto plôšky sa postupným zvyšovaním koncentrácie látky v roztoku postupne obsadzujú, až sa povrch nasýti. Ďalším zvyšovaním koncentrácie látky v roztoku už nemôže dochádzať k ďalšej adsorpcii, pretože všetky plôšky sú už obsadené. Langmuirova adsorpčná izoterma bola odvodená teoreticky a jej rovnica je:

$$n_a = \frac{z \cdot \omega \cdot c}{1 + \omega \cdot c}$$

kde n_a znamená počet mólov adsorbovanej látky na jednotku plochy alebo na jednotku hmoty, z je maximálny počet mólov, ktoré zodpovedajú úplnému nasýteniu povrchu adsorbovanou látkou, ω je adsorpčný koeficient, charakteristický pre adsorpčnú schopnosť uvažovanej látky na použitom adsorbavadle, a c značí koncentráciu látky v roztoku. Grafickým znázornením tejto rovnice je hyperbola (obr. 2).

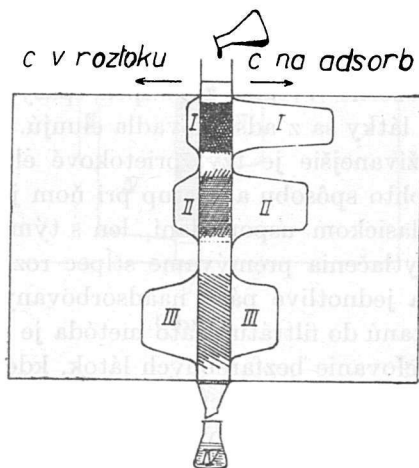


Obr. 2.

Z Langmuirevej rovnice vyplýva, že pri nízkej koncentrácii možno v menovateľovi člen $\omega \cdot c$ vzhľadom na jednotku zanedbať, takže n_a je potom priamo úmerné koncentrácii; adsorpčná izoterma je teda v tejto oblasti priamkou, čo je výhodné pre rozdelenie niekoľkých látok v stĺpci. Naopak pri vyššej koncentrácii možno zanedbať v menovateľovi jednotku vzhľadom na výraz $\omega \cdot c$, takže vykrátením zlomku dostaneme rovnicu, kde $n_a = z$, t. j. maximálnemu počtu mólov látky, ktorá sa môže na stĺpec naadsorbovať. Ako ďalej ukážeme, tento prípad je pre rozdelenie niekoľkých látok menej priaznivý.

Pri premývaní stĺpca čistým rozpúšťadlom, alebo ako hovoríme pri *vyvíjaní* chromatogramu, naadsorbovaná látka sa sčasti rozpúšťa, pretekajúcim rozpúšťadlom je nesená na ďalšie zrnko adsorbavdia, kde sa opäť naadsorbuje, a tento reverzibilný proces prebieha pri vyvíjaní nepretržite. Počet týchto elementárnych aktov by sme si mohli zhruba vypočítať [8]. Vezmime napr. stĺpec adsorbavdia dlhý 30 cm; zrníčka majú v priemere asi 0,01 cm. Pri vyvíjaní teda dochádza tritisíkrát k adsorpcii a desorpcii, kým látka pretečie do filtrátu. Uvedený prípad možno prirovnať napr. k destilácii, kde obyčajnú destilačnú aparatúru nahradíme destilačnou kolónou s veľkým počtom poschodí.

Na stĺpci teda máme vždy v rovnováhe látku naadsorbovanú a rozpustenú. Podiel časti naadsorbovanej k časti rozpustenej závisí od tvaru adsorpčnej izotermy a možno ho z nej aj ľahko vypočítať. Čím má látka strmšiu adsorpčnú izotermu, tým sa silnejšie adsorbuje a tým sa súčasne pomalšie pohybuje na stĺpci. Podmienkou pre dobré rozdelenie niekoľkých látok na stĺpci je, aby sa adsorpčná rovnováha ustalaovala rýchle, lebo inak by dochádzalo k difúziám



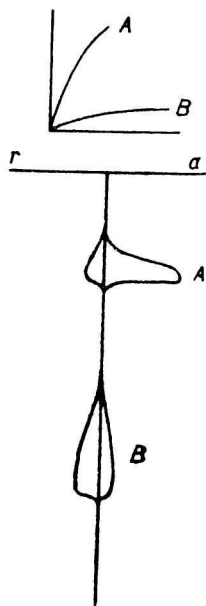
Obr. 3.

pásov, čo by bolo rozdeleniu na závalu. Slabá difúzia však nastáva takmer v každom prípade.

Uvažujme teraz o ideálnom prípade, keď adsorpčnou izotermou je priamka. K rozdeleniu dvoch látok na stĺpci môže dôjsť iba v tom prípade, keď adsorpčné izotermy majú rôznu smernicu. Príkladom by mohli byť tri látky, z ktorých látka I má najstrmšiu izotermu (zvíera najväčší uhol s osou x), látka III má izotermu s najmenším sklonom (s osou x zvíera najmenší uhol) a látka II stojí uprostred. Prevedme si teraz uvedené izotermy na pomery na stĺpci (obr. 3).

Schéma ukazuje, že látka I (s najstrmšou izotermou) je najsilnejšie držaná adsorbavdom, zatiaľ čo látka III (s najmenším sklonom izotermy) adsorbuje sa najslabšie, a preto postupuje najrýchlejšie.

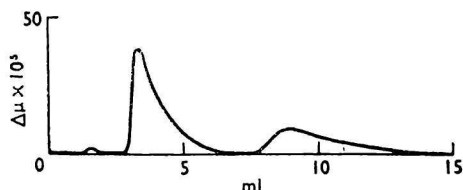
Na začiatku sme si ukázali, že reálna adsorpčná izoterma má tvar hyperboly. V uvažovanom úseku je teda povrch adsorbavdla nasýtený, zvyšok látky už nemôže do tohto povrchu vstúpiť, čo má za následok jednak zrýchlenie pásu, jednak oneskorenie tohto zvyšku látky za hlavným pásom, alebo ako hovoríme, tvorbu chvostov. Schematicky by sme mohli znázorniť takýto chromatogram látok A a B asi takto (obr. 4).



Obr. 4. Reálna adsorpčná izoterma látok A a B (hore) a zodpovedajúce pomery na stĺpci (dolu), kde r – koncentrácia látok v roztoku, a – koncentrácia na adsorbavdle.

Doteraz sme uvažovali o adsorpcii a oddeľovaní látok, ktoré sme dosiahli premývaním stĺpca čistým organickým rozpúšťadlom, t. j. *elučným vyvíjaním*. Tento spôsob sa pri adsorpčnej chromatografii používa najčastejšie, lebo preň nie je potrebné nijaké zariadenie. Prakticky sa toto elučné vyvíjanie robí tak, že sa roztok látok naleje na stĺpec, po naadsorbovaní sa vyvíja rozpúšťadlom, v ktorom je oddeľovaná látka rozpustená, a po dostatočnom rozdelení sa nechá stĺpec vyschnúť, adsorbent s vytvorenými pásmi sa pozorne vytlačí zo stĺpca, pásy sa mechanicky rozrežú a látky sa z adsorbavdla eluujú. Výhodnejšie a dnes používannejšie je tzv. prietokové elučné vyvíjanie. Princíp tohto spôsobu a postup pri ňom je úplne rovnaký ako pri klasickom usporiadaní, len s tým rozdielom, že namiesto vytlačenia premývame stĺpec rozpúšťadlom tak dlho, až sa jednotlivé pásy naadsorbovaných látok postupne dostanú do filtrátu. Táto metóda je výhodná najmä pre oddeľovanie bezfarebných látok, kde nepoznáme ich polohu na stĺpci: po prietoku oddelene zachycujeme určité stále objemy filtrátu, v ktorých potom stanovujeme niektorú z fyzikálno-chemických konštánt (optickú aktivitu, index lomu, pH roztoku a pod.), alebo roztok odparíme, zväžíme

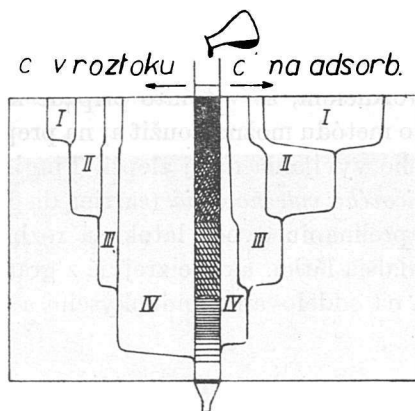
sušinu a stanovujeme prípadne bod topenia. Ak v závislosti od poradia frakcií graficky vyjadríme niektorú z týchto hodnôt, môžeme kvalitatívne i kvantitatívne zistiť zloženie zmesi. Taký príklad rozdelenia zmesi kyseliny laurovej a palmitovej [13] je zrejmý z obr. 5.



Obr. 5. Elučná analýza zmesi kyseliny laurovej a palmitovej v etanole na stĺpci aktívneho uhlia.

Registrácia sa robí interferometrickou metódou (podľa Claessona [13]).

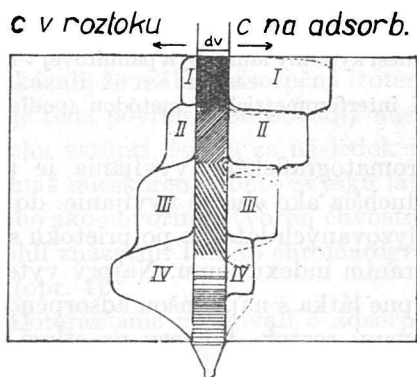
Druhým typom chromatografického vyvíjania je tzv. *frontálna analýza*. Táto metóda je jednoduchšia ako elučné vyvíjanie: do adsorpčnej rúrky vlievame stále roztok analyzovaných látok a po prietoku sledujeme koncentráciu eluátu najčastejšie meraním indexu lomu. Najprv vyteká zo stĺpca čisté rozpúšťadlo, potom postupne látka s najmenšou adsorpčnou schopnosťou atď., až nakoniec vyteká nalievaný roztok. Pomery na stĺpci pri frontálnej analýze [41] si môžeme opäť schematicky znázorniť (obr. 6).



Obr. 6.

Grafickým znázornením závislosti zistenej koncentrácie od objemu roztoku po prietoku bude stupňovitá krivka, kde každý stupeň znamená preniknutie novej látky do filtrátu. Táto metóda sa prirodzene nedá použiť na preparatívne oddeľovanie, ale má svoje výhody pri analytickom stanovení.

Konečne tretím typom vyvíjania je typ *vytesňovací*. Metóda je podobná ako pri vyvíjaní elučnom, lenže namiesto premývania stĺpca organickými rozpúšťadlami sa stĺpec premýva roztokom látky, ktorá sa silnejšie adsorbuje ako oddeľované látky; táto silnejšie adsorbovaná látka potom vytesňuje zo stĺpca ostatné slabšie adsorbované látky. Pritom dochádza na stĺpci k reťazovitému vytesňovaniu a zo stĺpca vytekajú frakcie, ktoré obsahujú čisté látky. Tieto možno znova sledovať napr. interferometricky. Znázorníme si opäť schematicky oddeľovanie zmesi troch látok II, III, IV na stĺpci; vytesňovalo sa látkou I (obr. 7).



Obr 7.

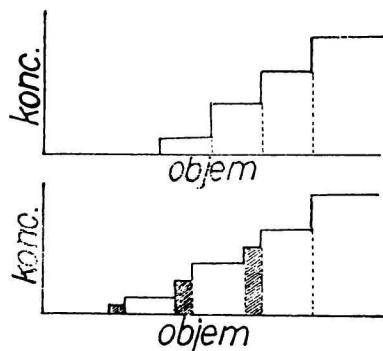
Grafickým vyjadrením dostaneme krivku podobnú krivke pri frontálnej analýze, avšak s tým rozdielom, že v tomto prípade každý stupeň označuje individuálnu látku. Túto metódu možno použiť aj na preparačné účely.

Metódu vytesňovacieho vyvíjania ďalej zlepšil Tiselius a Hagdahl [34] zavedením metódy *nosičového vytesňovania* (carrier displacement). Aby sa pri vytesňovaní zabránilo prelínaniu dvoch látok na rozhraní pásov, vkladá sa medzi tieto pásy vždy ďalšia látka, ako je zrejmé z grafu na obr. 8. Táto metóda sa zaviedla najmä na oddeľovanie aminokyselín a peptidov na stĺpci aktívneho uhlia.

Zariadenie a materiál

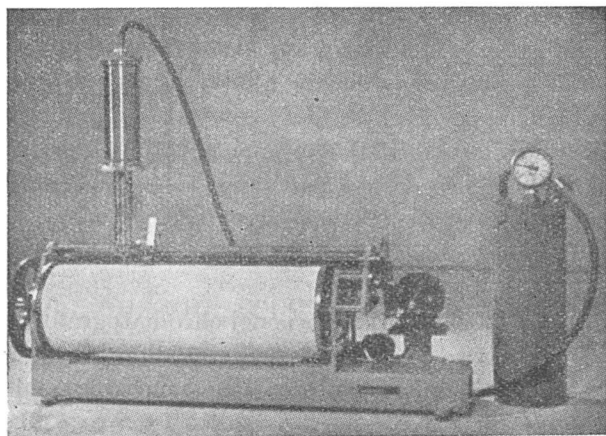
Takmer vo všetkých prípadoch vystačíme s jednoduchou sklenenou rúrkou na dolnom konci zúženou, do ktorej vkladáme kúsok vaty na zadržanie adsorbodavla. Potom do rúrky nalievame suspenziu adsorbodavla vo vhodnom organickom rozpúšťadle; ďalšou možnosťou je naliať rozpúšťadlo do zazátkovanej rúrky a nasypať adsorbodavlo do rozpúšťadla. Dôležitou podmienkou je, aby bol stĺpec po celej dĺžke pravidelný, bez trhliniek. Preto sa dnes už celkom

upúšťa od používania výjev alebo naopak od pretlaku na zrýchľovanie vyvíjania. Adsorbent necháme v rúrke usadiť a nadbytok rozpúšťadla zlejeme, až je nad horným koncom stĺpca vrstva rozpúšťadla len asi 1 cm vysoká. Potom opatrne, aby sa nezvíril stĺpec, nalievame roztok oddeľovaných látok a po vsiaknutí do stĺpca premývame čistým organickým rozpúšťadlom. Treba dávať pozor, aby horný koniec stĺpca nikdy nevyschol, lebo by sa tým tvorili trhlinky.



Obr. 8. Grafické znázornenie vytesňovacieho vyvíjania (hore). Na dolnom grafe je zrejмый princíp nosičového vytesňovania (podľa Tiselie [13]).

Pri prietokovej elučnej chromatografii je výhodné nataviť na spodný zúžený koniec rúrky kohútik, ktorým môžeme regulovať rýchlosť toku, prípadne môžeme vyvíjanie ľahko prerušiť. Pre adsorpčnú chromatografiu väčšieho množstva látok odporúča Herout [1] používať široké sklenené rúrky, ktoré vsadzuje do Büchnerovho lievika a stmelí sadrou alebo iným vhodným tmelom.



Obr. 9. Prístroj na analýzu na mikrokolóne (podľa Drakea [27]).

Pre prácu v mikromeradle zostrojil Drake [27] prístroj, ktorý je na obr. 9. Pod chromatografickým stĺpcom je umiestený valcový bubon, na ktorom je navinutý filtračný papier. Tento bubon sa otáča a súčasne sa pohybuje paralelne podľa osi. Kvapky odkvapkávajúce zo stĺpca dávajú na filtračnom papieri oválne škvryny, ktoré možno detegovať vhodným činidlom. V prípade, že by sa bubon pohyboval iba pozdĺž svojej osi, bez otáčania, bolo by potom možné nakvapkané látky podrobiť priamo chromatografii na papieri.

Dôležitou otázkou pri adsorpčnej chromatografii je voľba vhodného adsorpčného materiálu. Ako adsorbovadlo možno teoreticky použiť každú práškovitú látku, ktorá nie je rozpustná v použítom organickom rozpúšťadle, ani s ním nereaguje. V princípe rozoznávame dva typy adsorbodiel: polárne čiže *hydrofilné*, ktoré sú najrozšírenejšie, a nepolárne čiže *hydrofóbne*, ktorých jediným používaným zástupcom je aktívne uhlie. Z hydrofilných adsorbodiel je najrozšírenejší *kysličník hlinitý*, ktorý si v laboratóriu pripravíme niekoľkohodinovým žiňaním hydroxydu hlinitého pri 300—400° C. Podľa stupňa vyžihania získavame kysličník hlinitý o rôznej aktivite. Preto Brockmann [25] zaviedol jeho testovanie pomocou šiestich azofarbív: podľa zachytenia jednotlivých farbív na stĺpci kysličníka hlinitého sa určuje jeho aktivita a označuje sa rímskymi číslicami I—V najaktívnejší je kysličník hlinitý I, bežne používaný kysličník hlinitý má aktivitu II. Predpis na prípravu kysličníka hlinitého a jeho testovanie pozri napr. v zborníku *Chromatografie* [1]. Technický kysličník hlinitý obsahuje alkálie, najmä uhličitan sodný; Merkov kysličník hlinitý pre chromatografiu obsahuje malé množstvá hlinitanu sodného, takže vo vodnej suspenzii reagujú oba alkalicky. Vo väčšine prípadov nie je to oddeľovaniu na závalu, skôr naopak. Iba pri niektorých kyslých látkach je táto alkalita škodlivá, lebo tieto látky sa na začiatku stĺpca zachycujú pevnou chemickou väzbou a nedajú sa vymyť. Práve tak sa môžu niektoré látky vplyvom tejto alkality rozkladať (steroidy, antibiotiká, niektoré alkaloidy a pod.). V tomto prípade je vhodné premývať kysličník hlinitý zriedenou kyselinou chlorovodíkovou, chloridové ióny vymyť destilovanou vodou a potom vyžiháť.

Okrem kysličníka hlinitého [36], ktorý sa používa ako najsilnejšie adsorbovadlo, ako slabšie adsorbodlá sa používajú rôzne zlúčeniny vápnika, napr. uhličitan vápenatý, šťavelan vápenatý, kysličník vápenatý a pod., ďalej kysličník alebo uhličitan horečnatý, rôzne kremičitany hlinité a mnoho iných látok.

Rovnako dôležitou zložkou pri adsorpčnej chromatografii je voľba vhodného organického rozpúšťadla. Je dôležitým pravidlom, aby použité rozpúšťadlo bolo čisté, najlepšie predestilované, lebo stopy nečistôt a vlhkosť znečisťujú analyzované látky a dezaktivujú adsorbovadlo. Trappe [35] usporiadal chromatografické rozpúšťadlá do tzv. eluotropického radu. Na prvom mieste sú

tu rozpúšťadlá nepolárne alebo slabo polárne, ďalej nasledujú rozpúšťadlá postupne polárnejšie, ktoré sú zároveň dobrými elučnými prostriedkami: hexán, cyklohexán, tetrachlórmetán, trichlóretylén, toluén, benzén, chloroform, éter, etylacetát, acetón, propanol, etanol, metanol, voda a pyridín. Z tohto radu sa však bežne používa len skrátený eluotropický rad, t. j. petroléter, benzén, chloroform, éter, acetón a metanol. Pri elučnom vyvíjaní postupujeme spravidla tak, že stĺpec najprv premývame v málo polárnom rozpúšťadle a potom postupne pridávame polárnejšie rozpúšťadlá. Koncentráciu polárnejšej zložky pri vyvíjaní možno zvyšovať i plynule, čo nazývame gradientovým elučným vyvíjaním; v niektorých prípadoch je tento postup výhodnejší.

Pre úplnosť sa ešte zmienime o ozrejmění čiže detekcii oddeľovaných látok v stĺpci. Dnes už táto detekcia priamo na stĺpci nemá taký význam ako v prvých rokoch používania chromatografie, lebo sa väčšinou používa prietoková chromatografia, kde oddeľované látky stanovujeme až v eluáte. Pri klasickej adsorpčnej chromatografii bolo však potrebné látky na stĺpci nejako ozrejmiť. Metód bolo mnoho; z najpoužívanejších uvádzame aspoň pozorovanie fluoreskujúcich látok v ultrafialovom svetle alebo naopak impregnáciu adsorbovadla fluoreskujúcou látkou, takže analyzovaná látka sa pri pozorovaní v ultrafialovom svetle prejavovala ako tmavý pás na fluoreskujúcom pozadí [24].

Použitie

Adsorpčnú chromatografiu možno použiť pri izolácii látok a pri identifikácii.

Pri *izolácii* možno chromatografiu použiť predovšetkým na rozdelenie zmesi látok štruktúrne blízkyh (najmä izomérov), na skoncentrovanie materiálu zo zriedených roztokov a konečne na čistenie látok. Pri *identifikácii* je najrozšírenejším spôsob porovnania neznámej látky so štandardom, čo pripomína bod topenia zmesi; ak ide o tú istú látku, musí na stĺpci so štandardom tvoriť jediný pás. Adsorpčná chromatografia je dôležitá aj pri riešení *štruktúry* látok. Zistilo sa, že jestvuje vzťah medzi molekulovou konštitúciou a adsorptivitou látok. Pri chromatografii na polárnych adsorbovadlách zvyšujú niektoré polárne skupiny adsorpčnú schopnosť chromatografovaných látok. Brockmann a Volpers [26] usporiadali tieto skupiny do radu s klesajúcou adsorptivitou:

-COOH, -CONH₂, -OH, -NH₂, -COOCH₃, -N(CH₃)₂, -NO₂, -OCH₃, -H, -Cl.

Treba pripomenúť, že sa ďalej uplatňuje aj počet týchto skupín a ich poloha; veľký význam má aj množstvo a poloha dvojityh a trojityh väzieb. Takmer každý chemický zásah do štruktúry sa môže rozpoznať chromatograficky.

Obzvlášť veľký význam mala adsorpčná chromatografia pre rozvoj chémie karotenoidov. Ukážeme si to na príklade niekoľkých známejších karotenoidov, ktoré sa v pomerne veľkej molekule líšia iba počtom a usporiadaním dvojitých väzieb pri celkove rovnakom elementárnom zložení [18].

Tab. 1. Adsorpcia niektorých karoténov (v klesajúcom rade)

látka		dvojité väzby	z toho konjugované
lykopén	$C_{40}H_{56}$	13	11
γ — karotén	$C_{40}H_{56}$	12	11
δ — karotén	$C_{40}H_{56}$	12	10
β — karotén	$C_{40}H_{56}$	11	11
α — karotén	$C_{40}H_{56}$	11	10

Dnes sa adsorpčná chromatografia najviac používa na oddeľovanie farebných látok rastlinného, ako aj živočíšneho pôvodu, ďalej na izoláciu vitamínov a hormónov prevažne steroidnej štruktúry, na izoláciu alkaloidov z prírodného materiálu a na izoláciu antibiotík. Pri námeľových alkaloidoch sa adsorpčná chromatografia dokonca používa i priemyslove. Inak je zatiaľ v *priemysle* snaha vyhýbať sa chromatografickým postupom, najmä pre veľkú spotrebu organických rozpúšťadiel a ešte nedokonalé zariadenie. V analytike stratila dnes adsorpčná chromatografia po zavedení chromatografie na papieri svoje bývalé postavenie; významne sa tu však uplatňuje aj dnes ako frakčná metóda, najmä pre stanovenie látok v prirodzenom materiáli.

O adsorpčnej chromatografii bolo napísaných niekoľko kníh [16—22] a prehľadných referátov [28, 30, 31, 41, 43]; úplná bibliografia chromatografických prác z rokov 1938—1949 je v knihe L. Zechmeistera [21] a E. Lederera [17] a novšie práce v prehľadoch H. H. Straina [10—12]; aplikáciou adsorpčnej chromatografie vo farmácii sa zaoberá prehľadný referát K. Macka [32] a M. W. Patridgea [7]. Z prehľadných referátov o použití v chémii steroidov treba menovať prácu T. Reichsteina a C. W. Shoppeeho [33].

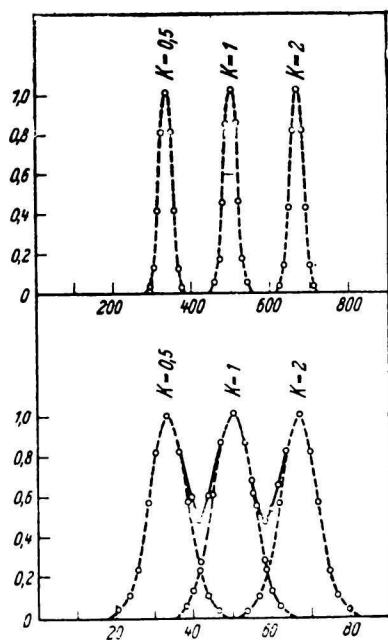
II. Rozdeľovacia chromatografia

Pri rozdeľovacej chromatografii sa na oddelenie dvoch alebo viacej látok využíva ich rozdielny rozdeľovací koeficient medzi dve nemiešateľné rozpúšťadlá. Toto rozdelenie možno vyjadriť Nernstovým vzťahom:

$$\frac{c_S}{c_L} = \alpha = \text{konšt.},$$

kde c_S je koncentrácia látky v jednej fáze, c_L koncentrácia v druhej fáze a α je tzv. rozdeľovací koeficient. Z tejto rovnice je zrejmé, že rozdeľovacou izotermou bude priamka.

V prípade dvoch látok, ktoré majú dostatočne rozdielne rozdeľovacie koeficienty, možno ich oddelenie dosiahnuť vytrepávaním medzi dve nemiešateľné rozpúšťadlá; toto oddelenie však nebude nikdy úplné. Ak sa tieto dve látky svojimi rozdeľovacími koeficientmi veľmi nelíšia, bude možné dosiahnuť ich oddelenie iba vtedy, ak budeme vytrepávanie niekoľkokrát za sebou opakovať. V najjednoduchšom prípade možno na takéto opakované vytrepávanie použiť rad oddeľovacích lievikov a do každého z nich dať jednu fázu, napr. S. Do prvého oddeľovacieho lievika pridáme ešte jednu fázu L, v ktorej je rozpustená rozdeľovaná zmes. Po pretrepaní prvého oddeľovacieho lievika prepustíme fázu L do ďalšieho oddeľovacieho lievika a do prvého oddeľovacieho lievika pridáme čistú fázu L; celý tento postup sa viackrát opakuje podľa počtu oddeľovacích lievikov. Oddelované látky, ktoré sú rozpustnejšie v rozpúšťadle S, budú sa hromadiť v prvých oddeľovacích lievikoch, kým látky rozpustnejšie v rozpúšťadle L sa budú hromadiť v posledných oddeľovacích lievikoch; látka, ktorej rozdeľovací koeficient sa bude rovnať jednej, bude sa hromadiť práve uprostred radu oddeľovacích lievikov. Čím viac bude oddeľovacích lievikov, tým dokonalejšie bude rozdelenie zmesi látok. Schematicky je to pre oddelenie troch látok s rozdeľovacími koeficientmi $\alpha = 0,5, 1,0$ a $2,0$ znázornené na obr. 10.



Obr. 10. Protiprúdové vytrepávanie troch látok s rozličnými rozdeľovacími koeficientmi ($= K$).
Na hornom grafe je znázornené vytrepávanie v 800 rúrkach, na dolnom iba v 80 (podľa Cramera [150]).

Teoretické i praktické závery tohto *protiprúdového vytrepávania* boli odvodené v prácach A. J. P. Martina a R. L. M. Syngeho [77]. Za tieto práce, ktoré viedli k zavedeniu rozdeľovacej chromatografie a chromatografie na papieri, boli autori r. 1952 odmenení Nobelovou cenou. Títo autori prišli však čoskoro na geniálnu myšlienku preniesť nepohyblivú fázu S v oddelovacích lievikoch na práškovitý materiál, ktorý je silne hydrofilný. Bol to najprv silikagél, ktorý napojili vodou a dali do stĺpca podobne, ako sme si ukázali pri adsorpčnej chromatografii. Týmto stĺpcom nechali pretekať organickú vrstvu L, čo malo za následok rovnaký oddelovací efekt ako veľmi vysoký počet oddelovacích lievikov. Celkové pokusné usporiadanie je analogické s elučným vyvíjaním pri adsorpčnej chromatografii: opäť dochádza ku kontinuitnému sledovaniu rovnovážnych reakcií, avšak oddelovanie na rozdiel od adsorpčnej chromatografie sa dosahuje na základe rozdielnych rozdeľovacích koeficientov a použitý silikagél neslúži ako adsorbent, ale ako nosič štacionárnej fázy S, ktorou vo väčšine prípadov býva voda.

Teoretické odvodenie rozdeľovacej chromatografie nedávno uverejnil v Chemických zvestiach R. Smrž [87].

Zariadenie a materiál

Zariadenie je celkom podobné ako pri adsorpčnej chromatografii. Z *nosičov štacionárnej fázy* sa po prvýkrát použil silikagél (v laboratóriu si ho pripravíme z obchodného vodného skla, ktoré zrážame kyselinou chlorovodíkovou; silikagél používaný v laboratóriách do exsikátorov je pre tento účel nevhodný), ktorý sa obvykle napája 50—55% vody. Silikagél ako nosič má však tú nepríjemnú vlastnosť, že sa súčasne uplatňuje aj ako adsorbent. Preto r. 1943 Martin a Syngé [78] obrátili pozornosť na práškovitú celulózu, ktorá mala výhodnejšie vlastnosti. A odtiaľ bol už len krok k nahradeniu stĺpca celulózy prúžkom filtračného papiera, čo dalo vznik rozdeľovacej chromatografii na papieri. Táto metóda, ktorá sa svojim experimentálnym usporiadaním líšila od stĺpcovej chromatografie, čoskoro sa odtrhla od rozdeľovacej chromatografie a dnes ju zaraďujeme do samostatnej skupiny chromatografie na papieri, ktorá nielen svojimi možnosťami, ale aj svojím rozšírením predstihla skupinu stĺpcovej chromatografie. Okrem uvedených nosičov je ešte veľmi rozšírený škrob, menej kremelina a iné látky.

Pokiaľ ide o *rozpúšťadlovú* sústavu, musíme vždy brať do úvahy dve fázy: zakotvenú a pohyblivú. Obvykle býva jedna z oboch fáz polárna,¹ druhá menej polárna alebo nepolárna. Najčastejší je prípad, keď zakotvená fáza je polárna:

¹ Správnejšie by bolo hovoriť skôr o rozpúšťadlách schopných tvoriť s rozpustenými látkami intermolekulové vodíkové mostíky, t. j. prakticky o rozpúšťadlách hydrofilných.

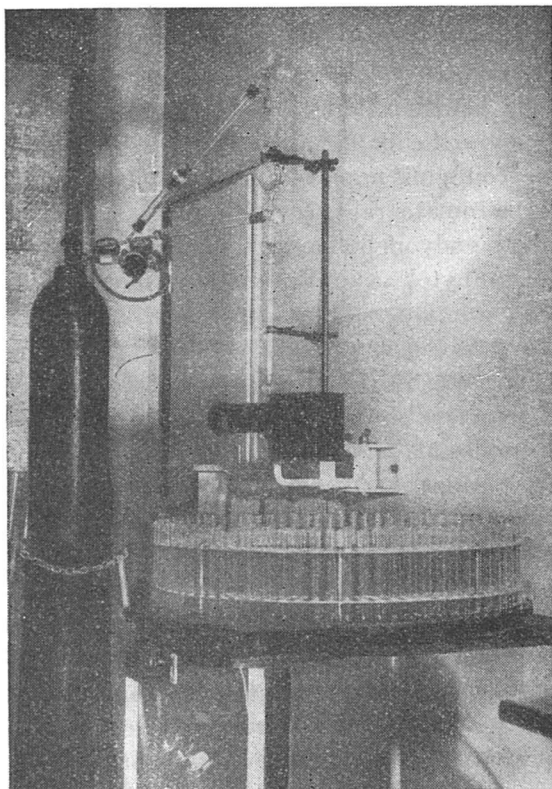
najbežnejším polárnym rozpúšťadlom je voda. Pohyblivú fázu v týchto prípadoch tvorí väčšinou n-butanol, chloroform, etylacetát a iné rozpúšťadlá. Tento spôsob vyvíjania je výhodný na oddeľovanie látok, ktoré majú rozdeľovací koeficient posunutý v prospech štacionárnej vodnej fázy; nevhodný je pre látky rozpustnejšie v organickom rozpúšťadle, lebo potom sa tieto látky vymývajú s čelom organického rozpúšťadla. Pre tieto látky musíme potom rozloženie oboch fáz modifikovať. Ako nepohyblivú fázu použijeme nepolárne alebo málopolárne rozpúšťadlo a ako mobilnú fázu naopak rozpúšťadlo polárne. Tento spôsob nazývame obrátenie fáz; postupuje sa pri ňom tak, že sa žiadaná nepolárna fáza (napr. petrolej alebo vazelína) naleje na stĺpec, alebo sa na nosič nepohyblivej fázy, obvykle na práškovitú celulózu, vopred zachytí tuhá látka alebo viskózna tekutina, ktorá môže zachytiť málo polárne rozpúšťadlo. Boldingh [45] to riešil tak, že na celulózu zachytil kaučuk, na ktorý potom zachytil benzén a oddeľoval tak etylestery mastných kyselín, pričom na vyvíjanie použil metanol alebo metanol s acetónom. Práve tak možno na tento účel použiť silikónovanú celulózu alebo kremelinu [69,1].

Rúrku možno nosičom plniť naplavením v organickom rozpúšťadle, podobne ako pri adsorpčnej chromatografii; častejšie sa však používa utĺkanie nosiča s potrebným obsahom vody alebo naplavenie nosiča v štacionárnej fáze, ktorá sa potom zleje a jej nadbytok sa zo stĺpca vytesní mobilnou fázou.

Pri rozdeľovacej chromatografii na stĺpci používame takmer vo všetkých prípadoch prietokové elučné vyvíjanie. Jednotlivé frakcie hodnotíme podobným spôsobom ako pri adsorpčnej chromatografii a výsledky opäť zaregistrujeme graficky. Rozdeľovacia chromatografia v porovnaní s adsorpčnou chromatografiou sa najviac uplatnila na oddeľovanie homológov.

Pri aplikáciách prichádza do úvahy oddeľovanie niekedy desiatich až dvadsiatich látok vedľa seba. Na dosiahnutie úplného oddelenia je často potrebné pripraviť si stĺpec dlhý i niekoľko metrov a odoberať značné množstvá frakcií. Keďže ide väčšinou aj o kvantitu, treba frakcie odoberať v presných objemoch; to vyžaduje, aby pri takejto chromatografii sedel laboratórny pracovník celkom málo využitý i niekoľko dní. Preto sa v minulých rokoch skonštruovali prístroje, ktoré automaticky zachytávajú a vymieňajú frakcie. Pri všetkých typoch týchto prístrojov tvorí základ kruhovitá doska, na ktorej sú v kruhu umiestené skúmavky alebo baničky, do ktorých sa zberajú frakcie. Najbežnejšie sa používajú *automatické zberáče frakcií*, pri ktorých chromatografický stĺpec je umiestený stabilne, ale doska so zbernými nádobami sa otáča. Toto otáčanie môže byť alebo kontinuálne, alebo diskontinuálne. V prvom prípade sa na skúmavky nataví akýsi lievik, ktorý siaha až k susednej skúmavke, takže roztok odkvapkávajúci z chromatografickej rúrky nemôže odkvapkávať medzi dve skúmavky [44]. V druhom prípade ide vždy o posun iba o jednu nádobku;

tento diskontinuitný posun sa deje po dodaní impulzu motoru, ktorý otáča kolesom, a je riešený buď pomocou spínača, ktorý je ovládaný hodinovým strojom [49], alebo sa frakcie odvažujú [61], alebo pri najdokonalejšom zberači podľa Moora a Steina [88] sa jednotlivé kvapky registrujú fotočlánkom a počítačom impulzov. Tento prístroj znázorňuje obr. 11. Menej sa používajú prístroje, kde koleso s nádobkami je umiestené pevne a otáča sa rameno, do ktorého odkvapkávajú kvapky z chromatografického stĺpca [44]. Fajkoš [55] skonštruoval prístroj na základe otáčajúcej sa dosky a sifónu [66], ktorý odmeriava frakcie; k tomuto prístroju je zároveň pripojená vyhrievaná destilačná komora, ktorá súčasne zahusťuje získané frakcie.



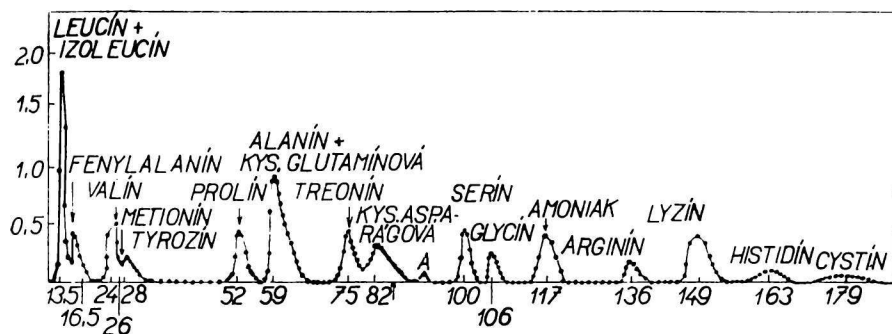
Obr. 11. Automatický zberač frakcií podľa Moora a Steina [88] z Výskumného ústavu pre farmáciu a biochémiu v Prahe.

Kvapka, ktorá vyteká z chromatografickej rúrky do podstavenej skúmavky, prechádza fotočlánkom s počítačom impulzov. Impulzy sa sčítajú a po dosiahnutí nastaveného počtu kvapiek sa uvedie do pohybu páka, ktorá pootočí kruhový nosič skúmaviek. Chromatografická rúrka má zariadenie, ktoré umožňuje chromatografiu pretlakom inertného plynu.

(Foto J. Chrást.)

Použitie

Rozdeľovacia chromatografia sa zaviedla na analýzu aminokyselín vzniknutých hydrolyzou bielkovín. V tejto oblasti mala doteraz aj najväčšie úspechy. K najvyššej dokonalosti ju vo svojich prácach priviedli Moore a Stein, ktorým sa na stĺpci škrobu podarila separácia i kvantita osemnástich aminokyselín. Oddelenie je zrejmé z obr. 12.



Obr. 12. Rozdeľovacia chromatografia aminokyselín na stĺpci škrobu podľa Moore a Steina [81].

Ako rozpúšťadlo sa použila sústava n-butanol—n-propanol — 0,1N-HCl (1 : 2 : 1) a od šípky po 82. frakciu sústava n-propanolu s 0,5N-HCl (2 : 1). Čísla na osi *x* značia mililitre eluátu, pri ktorých prechádza maximum uvedených aminokyselín, čísla na osi *y* značia milimóly aminokyselín.

Okrem oddeľovania aminokyselín sa rozdeľovacia chromatografia uplatňuje pri kvantite zmesi cukrov (najmä pri stanovení štruktúry rozličných polysacharidov). ďalej pri oddeľovaní organických kyselín, alifatických alkoholov, steroidov purínových látok a i. Zásadne možno všetky látky, ktoré sa oddeľujú pri chromatografii na papieri, rozdeliť chromatografiou na stĺpci práškovitej celulózy.

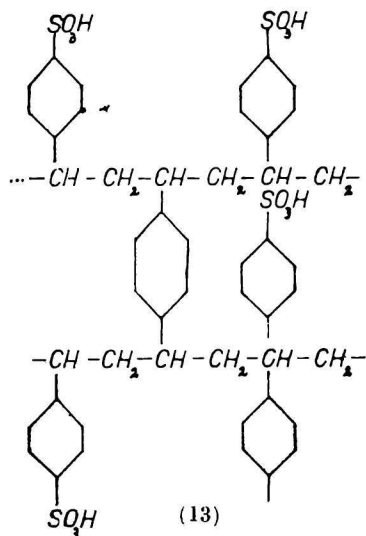
Rozdeľovacou chromatografiou sa zaoberá iba málo kníh [1, 2, 92] a niekoľko prehľadných referátov [56, 70, 75, 93]; donedávna sa v týchto referátoch spojovala rozdeľovacia chromatografia na stĺpci s chromatografiou na papieri. Práce, ktoré sa zaoberajú technikou, boli uvedené na inom mieste; z aplikácií uvádzame najdôležitejšie práce o aminokyselinách a peptidoch [67, 69, 72, 76—78, 80, 81, 84—86, 88, 90, 91], cukroch [63, 64], organických kyselinách [45, 46, 50, 52, 54, 65, 71, 74, 79, 83], alkoholoch [62], steroidoch [47, 68, 82], antibiotikách [60, 89], alkaloidoch [53] a i. [73]. Detailnejšie odkazy sú uvedené v prehľadných referátoch a knihách.

III. Chromatografia výmeny iónov

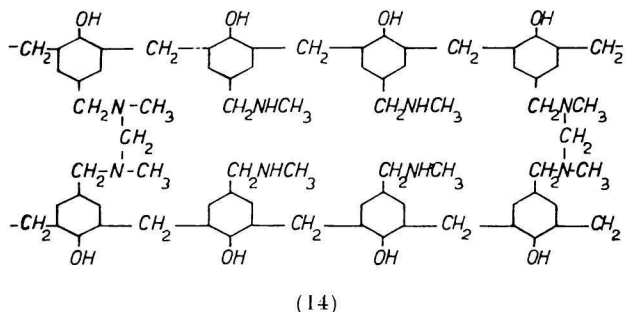
Možnosť použitia vymieňačov iónov na demineralizáciu vody je známa v laboratóriách i v prevádzke už viac ako jedno storočie. K ich rozšíreniu však dochádza až r. 1935, keď Adams a Holmes kondenzáciou formaldehydu s fenolsulfónovými kyselinami pripravili umelé živice, ktoré mali výhodnejšiu výmennú schopnosť ako pôvodne používané prirodzené hlinítkremičitany. Výroba syntetických organických vymieňačov iónov najrôznejších typov vedie najmä v posledných niekoľkých rokoch k prudkému rozmachu tohto typu chromatografickej metódy.

Pod názvom vymieňačov iónov alebo ionexov si dnes predstavujeme vysokomolekulové látky prirodzené alebo umelé, ktoré sú schopné v roztokoch elektrolytov zamieňať rozličné ióny. Dnes sú oveľa rozšírenejšie ionexy umelé, syntetické, a preto sa v ďalšom budeme zaoberať prevažne nimi. Ionexy delíme na vymieňače, ktoré sú schopné vymieňať katióny (sú to tzv. *katexy*), a na vymieňače, ktoré vymieňajú anióny (tzv. *anexy*). Túto výmenu pri katexoch spôsobujú kyslé skupiny, najmä skupiny $-SO_3H$, $-COOH$ a fenolická skupina $-OH$; pri anexoch sú to zásadité skupiny $-NH_2$, $-N(CH_3)_2$ a i. Tieto skupiny môžu byť viazané buď priamo na aromatickom jadre, alebo v bočnom reťazci. Tieto živice sa väčšinou pripravujú kondenzáciou amoniaku s príslušným fenolom alebo s kyselinou fenolsulfónovou; ak ide o anexy, kondenzáciou formaldehydu s aromatickým amínom. Je však možná aj kondenzácia napr. styrénu s vinylchloridom a nasledujúca sulfonácia.

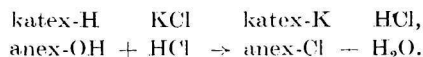
Ako príklad možno tu uviesť štruktúru najmodernejších katexov, ktoré sú založené na styrénovej báze a sú dodatočne sulfónované [137].



Podobným príkladom môže byť aj živica anexového typu [125]:



Funkciu katexu a anexu si môžeme schematicky znázorniť takto:



Ak teda premývame katex, na ktorom sú zachytené vodíkové ióny (hovoríme, že katex je v H-cykle), roztokom napr. chloridu draselného, zachycujú sa na živici ióny draslíka a stĺpcom preteká kyselina chlorovodíková. Obdobný prípad nastáva aj pri premývaní anexu. Stĺpec ionexu môže byť v akejkoľvek forme; napr. katex môže byť v Na-forme a môže sa na ňom vymieňať aj vápnik za sodík. O výmene iónov rozhoduje predovšetkým veľkosť elektrostatických síl, ktorými sú ióny viazané na polárne skupiny príslušného ionexu. Z toho dôvodu ióny o vyššom mocenstve vytesňujú ióny o nižšom mocenstve; ak ide o ióny s rovnakým mocenstvom, uplatní sa objem iónu: ióny s menším objemom budú vytesňovať ióny s väčším objemom. Práve preto možno ionexy použiť na chromatografickú separáciu.

Chromatografia výmeny iónov sa teda hodí na separáciu látok *disociujúcich*, či už anorganických alebo organických. Ak ide o látky nedisociujúce, možno často použiť napr. tvorbu rôznych komplexov čím potom možno oddeľovať aj tieto látky.

Zariadenie a materiál

Zariadenie sa vôbec nelíši od zariadenia používaného pri ostatných typoch stĺpcovej chromatografie. Ako pri rozdeľovacej chromatografii aj v tomto prípade sa uplatňujú automatické zberače frakcií.

Dôležitá je však voľba *vhodného ionexu*. Pre chromatografické účely sa najlepšie osvedčujú ionexy typu *Amberlite* a *Dowex*. Tieto živice treba však najprv uviesť v stĺpci do príslušného cyklu: do H-cyklu sa katex uvedie premytím kyselinou chlorovodíkovou, kým do OH-cyklu premývaním amoniakom, načo

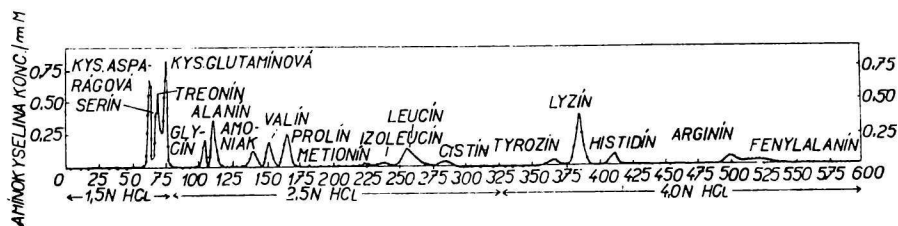
sa dôkladne premývajú vodou. Na takto pripravený stĺpec sa potom nalieva roztok látok, ktoré chceme oddeliť, a po ich zachytení v hornej časti stĺpca látky opäť vyvíjame. *Vyvíjanie* možno robiť podobným spôsobom ako pri adsorpčnej chromatografii, a to elúciou. Na elúciu sa však používajú roztoky rozličných tlmivcov. Partridge [130—135] vo svojich prácach na oddeľovaní aminokyselín dáva prednosť vytesňovaciemu vyvíjaniu; aminokyseliny zo stĺpca silne kyslej živice vytesňuje amoniakom, kým zo zásaditej živice kyselinou chlorovodíkovou. V tomto prípade znova dochádza k reťazovému vytesňovaniu na stĺpci.

Použitie

Chromatografia na ionexoch sa dnes používa jednak na účely preparačné, jednak na účely analytické. Pri preparácii sa ionexy používajú predovšetkým na skoncentrovanie látok z prirodzeného materiálu, ako aj na čistenie látok. Požiadavky kladené na akosť ionexov v tomto prípade nie sú také veľké ako pri použití v analýze, najmä pri stanovení kvantitatívnom.

V tomto referáte sa budeme zaoberať skôr analytickými aplikáciami. Chromatografia výmeny iónov mala a azda má najväčší význam pri oddeľovaní *vzácných zemín* [104, 108, 109, 139], pretože až dodnes bolo toto oddeľovanie jedným z najťažších. Na vyvíjanie týchto látok sa použila vytesňovacia chromatografia kyselinou citrónovou, s ktorou vzácne zeminy dávajú komplexy. V poslednom čase mal tento spôsob veľký význam pri oddeľovaní a získavaní čistých transuránov [8].

V organickej analýze sa s úspechom použila chromatografia výmeny iónov predovšetkým pri kvantitatívnom stanovení *aminokyselín* [95—97, 106, 123, 140], najmä v hydrolyzátoch bielkovín, kde táto metóda patrí dnes k najlepším. Separácia aminokyselín na stĺpci sulfónovaného katexu polystyrénového typu (*Dowex 50*) je znázornená na obr. 15.



Obr. 15.

Elúcia sa deje kyselinou chlorovodíkovou so stúpajúcou koncentráciou [123].

Ako sme už spomenuli, Partridge [130—135] používa na oddeľovanie aminokyselín vytesňovacie vyvíjanie v troch stupňoch:

1. Hydrochloridy aminokyselín sa oddeľujú na stĺpci polystyrénového ka-
texu a aminokyseliny sa vytesňujú roztokom NaOH. Tento stupeň sa používa
na izoláciu zásaditých aminokyselín: arginínu, lyzínu a hydroxylyzínu.

2. Eluát kyslých a neutrálnych aminokyselín sa frakciuje na stĺpci *Zeo
Karb 215*; v tomto prípade sa vytesňuje zriedeným amoniakom. Získajú sa
tým zmiešané frakcie, ktoré sa oddeľujú individuálne, a to

3. na stĺpci silne zásaditého anexu *Dowex 2*, kde sa vytesňujú zriedenou ky-
selinou chlorovodíkovou. Tento spôsob možno s výhodou použiť aj na prepa-
račné získavanie kryštalických aminokyselín.

V poslednom čase sa ionexová chromatografia dobre uplatňuje v analytike
cukrov [105, 118, 147], ktoré sa prevádzajú na borátové komplexy, najmä však
sa uplatňuje pri kvantitatívnej analýze rozličných *alkaloidov* [112, 114, 115,
136, 145].

Niekoľko prác bolo venovaných aj chromatografii peptidov a proteínov
[102, 107, 129, 138], purínových látok [98, 146] a i. [94, 110, 113, 116, 117,
126, 127].

Ionexom bolo venovaných niekoľko knižných publikácií [121, 125] a nie-
koľko prehľadných referátov [100, 101, 103, 111, 119, 137, 141—143]. Úplnú
bibliografiu analytických aplikácií prednedávnom publikoval Osborn [128].

B. Chromatografia na papieri

Chromatografia na papieri v dnešnom slova zmysle vznikla r. 1944 zo stĺp-
covej rozdeľovacej chromatografie na práškovitej celulóze a mala slúžiť najmä
na identifikáciu aminokyselín v mikromeradle. Dnes patrí chromatografia
na papieri k najbežnejšej biochemickej analýze. To malo za následok, že sa
niektorí autori začali podrobnejšie zaoberať históriou chromatografických
metód. V literatúre sa dnes rozpútal boj o chromatografické prvenstvo [29,
185, 262]. Pokiaľ ide o chromatografiu na papieri, vyšlo jej zavedenie podľa
Deckerä [167] z troch ideí:

1. použitie papiera pre analytické účely,
2. oddeľovanie látok kapilárnym putovaním na pórovitom médiu,
3. zlepšením týchto oddeľovacích efektov použitím techniky elučného vy-
víjania.

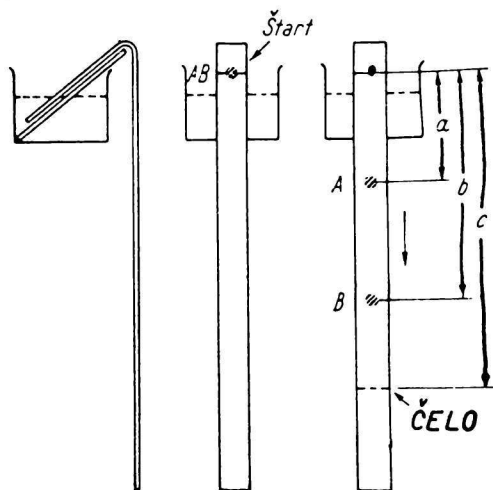
Runge prvý používal papier na to, čo by sme dnes nazvali *zrážacou analýzou*
na papieri (Tüpfelanalyse). Jeho považujú Weil a Williams [262] za vlast-
ného zakladateľa chromatografie na papieri. Ďalšou vývojovou fázou bola
kapilárna analýza, ktorej zakladateľom bol Schoenbein. Jeho metódu doko-
nane prepracoval jeho žiak Göppelsröder. Schoenbeinovi bol veľmi jasný
význam tejto rodiacej sa metódy. V závere svojej prvej práce o kapilárnej

analýze r. 1861 uviedol [4]: „Verím, že dosiahnuté výsledky majú svoj význam a budú slúžiť najmä analytikom ako kvalitatívna metóda v takých prípadoch, kde nemožno použiť ostatné metódy a činidlá, ako je to napr. pri zmesi rozpustených organických pigmentov.“ Tento druh analýzy využíva zjav že roztok napr. farebných látok kvapnutý na papier rozpíja sa zo stredu škvŕny na všetky strany, pričom sa jednotlivé farbivá oneskorujú za najrýchlejšie postupujúcim rozpúšťadlom. Tento spôsob bol neskôr modifikovaný tak, že sa prúžok filtračného papiera jedným koncom ponoril do roztoku oddeľovaných látok; rozpúšťadlo s oddeľovanými látkami potom kapilárnymi silami vzlínalo týmto papierom, čím nastávalo čiastočné oddelenie. Tento spôsob je vlastne zhodný s frontálnou analýzou; na stĺpec sa tak isto nalieva stále rovnaký roztok látok a do filtrátu prichádza najprv látka najmenej adsorbovaná, potom postupne látky silnejšie sa adsorbujúce. Povedali sme si však už, že túto metódu nemožno použiť na preparatívne účely, pretože v čistom stave možno takýmto spôsobom získať len najrýchlejšie putujúcu látku. A tu je práve významný Cvetov objav, že látky možno oddeľovať vymývaním *čistým organickým rozpúšťadlom*. Dnes nás udivuje, že to trvalo tak dlho, kým bola kapilárna analýza spojená s Cvetovým vyvíjaním. Tento posledný krok musel takmer 40 rokov čakať na svoje uskutočnenie. Boli to predovšetkým práce Consdenove, Gordonove a Martinove [164], ktoré považujeme dnes za klasické, pretože tvoria *vedecký základ chromatografie na papieri*. Práca Liesegangova [208], uverejnená takmer súčasne, nebola už taká úspešná.

Skôr ako sa budeme zaoberať mechanizmom chromatografie na papieri, v krátkosti si objasníme jej *princíp*. Analyzovaná látka v roztoku sa kvapne na filtračný papier v množstve ca 1—100 μg a po uschnutí sa papier vloží do skleneného žliabku s čistým organickým rozpúšťadlom tak, aby nanosená látka bola niekoľko cm pod hladinou rozpúšťadla. Papier si zo žliabku kapilaritou nasáva rozpúšťadlo, pričom je nanášaná látka rôznou rýchlosťou unášaná po papieri. Len čo čelo rozpúšťadla dosiahne spodný koniec papiera, preruší sa vyvíjanie, rozpúšťadlo sa nechá odpariť a škvŕna oddeľovanej látky sa ozrejmní, čiže deteguje nejakou obvyklou špecifickou farebnou reakciou. Celé toto zariadenie musí prirodzene byť v uzavretom priestore, aby sa organické rozpúšťadlo na takej veľkej ploche neodparovalo.

Pri chromatografii na papieri podobne ako pri rozdeľovacej chromatografii predpokladáme predovšetkým *rozdeľovací dej* oddeľovanej látky medzi dve navzájom nemiešateľné rozpúšťadlá. Podmienkou dobrého tvaru škvŕn bude teda lineárna rozdeľovacia izoterma. Rýchlosť putovania oddeľovanej látky po papieri možno vyjadriť tzv. koeficientom R_F , čo je pomer vzdialenosti stredu putujúcej škvŕny od štartu k vzdialenosti čela putujúcej mobilnej fázy od štartu. (Na obr. 16 $R_F = a/c$.) Tieto hodnoty R_F sa môžu pohybovať od 0 do 1.

Pri rozdeľovacej chromatografii sme odvodili, že pohyb oddeľovanej látky bude závisieť od smernice priamky čiže od rozdeľovacieho koeficienta. Pohyb skvrny nepriamo závisí od rozdeľovacieho koeficienta. Ak je teda látka rozpustnejšia v štacionárnej fáze, na chromatograme bude putovať pomalšie. Ak by teda bola mnohonásobne rozpustnejšia v zakotvenej fáze než napr. v pretekajúcej fáze butanolickej, po skončení vyvíjania bola by látka na štarte v mieste nanesenia, kým pri mnohonásobne vyššej rozpustnosti v butanole než vo vode putovala by s čelom rozpúšťadla. V prvom prípade by mala $R_F = 0$, v druhom $R_F = 1$.



Obr. 16. Schematické naznačenie chromatografie dvoch látok A a B podľa Cramera [150]. R_F látky A bude a/c a R_F látky B bude b/c .

To by bol, pravda, ideálny príklad, keby obidve fázy boli na papieri prítomné v pomere 1 : 1. Na papieri však býva v skutočnosti v prevahe jedna z obidvoch fáz. V prípade butanolu nasýteného vodou uvádza Consden a spol. [164], že prierez butanolicou vrstvou je 3 až 4-krát väčší ako prierez štacionárnou fázou. Pri počítaní hodnoty R_F musíme teda okrem rozdeľovacieho koeficienta vziať do úvahy ešte *prierez* jednak štacionárnej fázy, ktorý označíme A_S , jednak mobilnej fázy, ktorý označíme A_L . Uvedení autori vo svojej prvej práci odvodili vzťah pre výpočet hodnôt R_F , prípadne prevrátením vzťahu pre R_F získali vzorec pre výpočet rozdeľovacieho koeficienta α z vykonanej chromatografie.

Vzťah pre R_F je:

$$R_F = \frac{1}{1 + \alpha A_S/A_L},$$

vzťah pre α je:

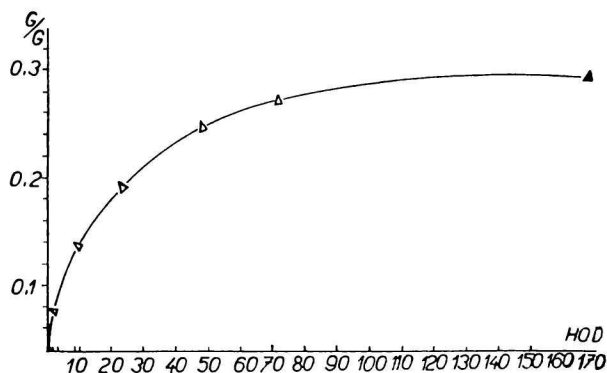
$$\frac{A_L}{A_S} \left(\frac{1}{R_F} - 1 \right).$$

Prvý výraz možno použiť pri úvahe, či v určitej sústave možno oddeliť dve alebo viac látok, ktorých rozdeľovacie koeficienty poznáme, z druhého výrazu možno zase naopak pre neznámu látku vypočítať napr. z množstva $1 \mu\text{g}$ jej rozdeľovací koeficient. Tento druhý výraz bol súčasne dôkazom správnosti teórie R. Consdena a spol. [164], že pri chromatografii na papieri sa uplatňuje rozdeľovanie medzi dve kvapalné fázy a nie adsorpcia. Dokázalo sa to týmto pokusom: niekoľko aminokyselín sa chromatografovalo na papieri v sústave *n*-butanolu nasýteného vodou. Tým sa zistili ich hodnoty R_F , avšak na vypočítanie ich rozdeľovacieho koeficienta bolo ešte treba zistiť hodnoty A_L a A_S . Tieto hodnoty nemožno zatiaľ priamo merať; Consden a spolupracovníci ich vypočítali tak, že suchý papier, na ktorom sa chromatografovalo, zvážili pred vyvíjaním a po skončení vyvíjania. Rozdiel váh znamená váhu butanolu a vody na papieri. Podľa medzinárodných kritických tabuliek pri použitej teplote vyvíjania sa viaže na celulózu 22% vody, z čoho môžeme butanol určiť nepriamo. Tak sa zistil pomer A_L/A_S a tým aj rozdeľovací koeficient, ktorý bol v zhode s rozdeľovacími koeficientmi spomenutých aminokyselín, ktoré zistili priamym meraním England a Cohn.

Neskoršie rôzni autori vo svojich prácach zistili odchýlky vypočítaného rozdeľovacieho koeficienta od koeficienta, ktorý sa zistil chromatografiou na papieri. Najvýraznejšie odchýlky sa zistili pri aromatických aminokyselinách. Tieto odchýlky sa prisúdili adsorpcii. Podľa Martinovej neskoršej práce [216] však nesmieme usudzovať, že zakotvenou fázou je len voda; Martin predpokladá, že cukorné reťazce „amorfného“ podielu celulózy sú voľne pohyblivé, takže štacionárnu fázu tvorí vlastne pomerne dosť koncentrovaný roztok cukru vo vode. Rozdeľovací koeficient je potom prirodzene iný ako rozdeľovací koeficient v čistej vode. Dnes považujeme v mnohých prípadoch adsorpciu pri chromatografii na papieri za vec úplne samozrejmu, avšak s tým, že hlavným dejom pri vyvíjaní je rozdeľovanie medzi dve kvapaliny.

Z teórie A. J. P. Martina a spol. [164, 216] vyplývajú niektoré významné možnosti, ako napr. možnosť predvídať rozdelenie látok na papieri, zisťovať rozdeľovací koeficient neznámej látky z gamových množstiev; súčasne je však zrejmé, akú významnú úlohu má pomer A_L/A_S na pohyblivosť škvŕn. Táto otázka úzko súvisí s otázkou *sýtenia komory*. Komora, v ktorej prebieha chromatografia, býva obvykle sýtená parami mobilnej, ako aj štacionárnej fázy, aby sa tieto rozpúšťadlá nemohli odparovať. Zároveň sa však má papier sýtiť vodou, ktorá potom slúži ako štacionárna fáza. Pretože však rovnováhy v plynnej fáze prebiehajú veľmi pomaly, dĺžka sýtenia komory má veľký význam na veľkosť hodnoty R_F . Závislosť sýtenia papiera vodou, ktorá bola nasýtená butanolom, je zrejmá z grafu na obr. 17. Z grafu vidieť, že papier nie je nasýtený vodou ani po týždni sýtenia. Ak vyvíjame v komore čerstvo nasýtené

vodou, bude sa papier málo sýtiť vodou, bude teda mať pomerne malú hodnotu prierezu štacionárnou fázou a hodnoty R_F budú pomerne vysoké. Ale ak budeme komoru dlhší čas sýtiť, prípadne ak do nej dáme papier na sýtenie niekoľko hodín pred vyvíjaním, bude prierez štacionárnou fázou väčší, v dôsledku čoho sa znížia hodnoty R_F . Takýmto spôsobom nám teda teória A. J. P. Martina a spol. môže vysvetliť, prečo napr. pri vyvíjaní atropínu môžeme dostať v jednom prípade hodnoty R_F 0,90 a pri dlhšom sýtení komory a sýtení papiera pred vyvíjaním hodnotu iba 0,56 [244].



Obr. 17. Grafické znázornenie závislosti sýtenia papiera vodou od doby sýtenia.

Technika

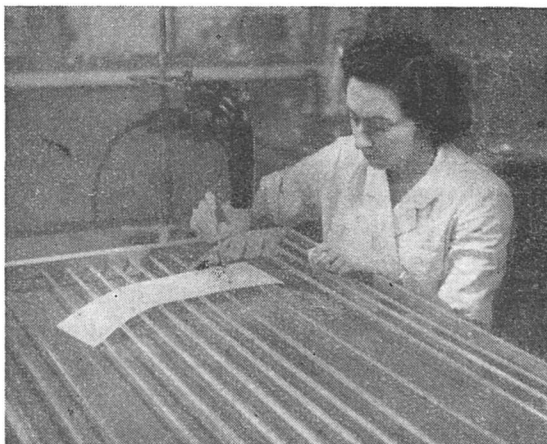
Jednotlivé čiastkové operácie opíšeme tak, ako prichádzajú za sebou pri chromatografii na papieri. Predovšetkým to teda bude voľba vhodného nosiča štacionárnej fázy — *filtračného papiera*. Consden a spol. mali vcelku šťastie, že na prvé chromatografické pokusy použili práve filtračný papier Whatman 1, ktorý sa až dodnes považuje za najlepší a najpoužívanejší papier. Možno povedať, že kto má papier Whatman 1, nemusí sa už viac zaoberať otázkou papiera.

Aké podmienky kladieme na chromatografický papier? Papier pre chromatografické účely [201] musí byť vyrobený z najhodnotnejšieho papiernického materiálu — z lintersu; je to nespriadateľný chĺpkovitý podrast bavlny. Tento materiál sa volí preto, aby papier neobsahoval nijaké látky extrahovateľné organickými rozpúšťadlami a aby neobsahoval ťažké kovy. Všetky tieto látky môžu byť na závalu preto, lebo môžu znižovať alebo úplne zabrániť farebnej detekcii, alebo môžu (napr. ťažké kovy, najmä meď) tvoriť s oddeľovanými látkami komplexy, ktoré putujú inou rýchlosťou. Ďalšie výhodné alebo nevýhodné vlastnosti získava papier pri spracovaní. Tu sa už uplatňuje jeho štruktúra. Z vlastností dobrého papiera kladieme dôraz na vhodnú sáciu výšku

a ďalej na pravidelný, nanajvýš jemne obláčikovitý povrch. Nepravidelnosti v povrchu sa môžu uplatňovať jednak pri toku rozpúšťadla, jednak pri kvantitatívnom vyhodnocovaní chromatogramu. Ďalej nemá mať papier pokiaľ možno adsorpčné vlastnosti.

Všetkým týmto podmienkam vyhovuje vcelku papier Whatman 1. Pre niektoré účely možno tak isto použiť papier Whatman 4, ktorý má výhodu v tom, že tečie omnoho rýchlejšie ako Whatman 1. Táto výhoda je však na druhej strane neutralizovaná tým, že tvar škvŕn nebýva okrúhly, ale väčšinou tvorí škvŕny oválne predĺžené, čo môže byť niekedy na škodu dobrej separácii. Pre kvantitatívne účely má byť výhodný silnejší papier Whatman 3 MM. Z nemeckých papierov Schleicher-Schüll je najvýhodnejší papier č. 2043 b, ktorý sa svojimi vlastnosťami takmer vyrovná papieru Whatman 1. U nás sa zatiaľ vyrába malé množstvo papiera v neratovickej Spolane a v papierňach vo Veľkých Losinách. Obidva tieto papiere možno núdzovo použiť na chromatografické účely. Čo do rýchlosti toku a oddeľovania látok mohli by sme ich porovnať k papieru Whatman 4. Ich nevýhodou je však prítomnosť dosť veľkého množstva nečistôt, najmä organického pôvodu, a veľká variabilita medzi rôznymi šaržami. Podrobnejšiu prácu o týchto papieroch publikoval Hais [186]. Papiere Whatman i Schleicher-Schüll sa k nám stále ešte dovážajú, hoci v obmedzenom množstve.

Po výbere vhodného papiera si tužkou označíme miesto štartu a miesta, kde *nanesieme vzorky* analyzovaných látok. Je prirodzené, že na štartovnú čiaru môžeme podľa veľkosti papiera (ktorá sa riadi veľkosťou komory) nanieť ľubovoľné množstvo analyzovaných vzoriek. Tieto vzorky však treba umiestiť

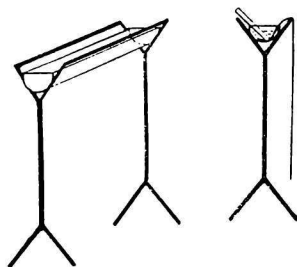


Obr. 18. Nanášanie analyzovaných vzoriek na filtračný papier; schnutie sa urýchľuje fônom.

dostatočne ďaleko od seba, aby jednotlivé vzorky nesplynuli. Túto vzdialenosť volíme obvykle na 3—4 cm. Vzorky nanášame na papier položený na tyčinkách, ktoré sú zapustené do dreveného rámu (obr. 18), mikropipetou, injekčnou striekačkou alebo štetčekom. Množstvo nanášanej vzorky sa riadi jej koncentráciou a počtom prítomných látok. Väčšinou to býva 10—200 μl , v niektorých prípadoch, keď sa analyzovaná látka vyskytuje len vo veľmi nízkej koncentrácii, musíme nanášať aj 1 ml. Naniest celé množstvo tekutiny nie je možné, pretože by sa škvŕna príliš rozpila. Preto nanášame po malých kvantách, škvŕnu necháme zaschnúť a nanášame ďalší podiel. Vysušovanie sa najlepšie urýchľuje fúkaním horúceho vzduchu. Najlepšie skúsenosti máme so sušením pomocou kádernického vysušovača vlasov (föhnu). Toto nanášanie vzoriek vyžaduje najdlhšiu aktívnu dobu pri chromatografovaní na papieri.

Po nanesení vzoriek dáme papier do *komory*, kde sa deje vyvíjanie. Tvar a veľkosť komory sa riadi spôsobom vyvíjania, a preto sa o nich zmienime pri vyvíjaní. Zásadne rozoznávame tri spôsoby vyvíjania, ktoré sa navzájom líšia tým, v akej polohe sa na papieri pohybuje rozpúšťadlo používané ako mobilná fáza.

Najdlhšie sa pri papieri používa vyvíjanie *zostupné*. Ešte dnes sa najčastejšie používa v laboratóriách, hoci vyžaduje z možných spôsobov vyvíjania relatívne najkomplikovanejšie zariadenie. Toto zariadenie sa skladá zo skleneného podstavca, na ktorom je upevnený sklenený žliabok. Do tohto žliabku sa dáva mobilná fáza. Chromatogram sa do žliabku obyčajne upevňuje pomocou tyčinky (obr. 19). Spôsob zostupného vyvíjania sa v chromatografických la-



Obr. 19. Stojan so žliabkom používaný na zostupné vyvíjanie (podľa Ž. Procházku [226]).

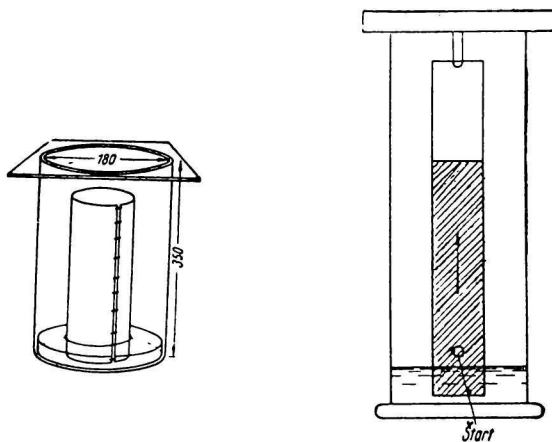
boratóriách udržuje najmä preto, že dovoľuje vyvíjať „na prietok“. Veľmi často totiž narážame na prípady, keď veľmi výhodné rozpúšťadlové systavy, ktoré dobre oddeľujú a dávajú okrúhle škvŕny, spôsobujú len malý pohyb oddeľovaných látok. V tomto prípade nenecháme čelo rozpúšťadla dotiecť iba na dolný okraj, ale necháme rozpúšťadlo z dolného okraja papiera odkvapkávať. Aby sa nerušil tok a aby kvapalina po celej šírke odkvapkávala, na dolnom

okraji papiera sa vystrihnú zuby. Takýto chromatogram sa potom môže nechať bežať aj tri týždne. Tento spôsob vyvíjania sa najviac používa v chémii cukrov.

Inou takouto modifikáciou zostupného vyvíjania je opakované vyvíjanie. Má rovnakú úlohu ako prietoková chromatografia. Toto vyvíjanie sa deje tak, že chromatogram normálne vyvíjame, a keď dosiahne čelo dolného okraja, vyberieme ho, osušíme a opäť vyvíjame v tom istom smere. Toto možno opakovať niekoľkokrát za sebou. Výhoda tohto spôsobu v porovnaní s prietokovým vyvíjaním je v tom, že nám nijaká rýchlejšia látka nemôže z papiera utiecť.

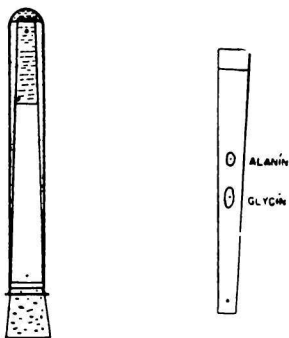
Pri oddeľovaní aminokyselín z bielkovinových hydrolyzátov sa zasa stretávame s prípadom, keď treba stanoviť asi dvadsať látok vedľa seba, z ktorých niektoré majú podobné hodnoty R_F . Väčšinou majú tieto látky v inej sústave rozpúšťadiel iné hodnoty R_F , čo možno využiť na úplnú separáciu týchto látok dvojrozmernou chromatografiou. Postup je tento: Vezme sa štvorcový hárok papiera a do jeho ľavého horného rohu nakvapkáme analyzovanú vzorku. Chromatogram potom vyvíjame obvyklým zostupným vyvíjaním. Keď čelo dôjde dolu, vyberieme papier z komory a necháme rozpúšťadlo odpariť. Potom papier obrátíme o 90° a vyvíjame v druhom smere, kolmom na smer prvého vyvíjania, inou sústavou rozpúšťadiel (obr. 28).

Druhým typom je vyvíjanie *vzostupné* alebo *vzlínavé*. Výhoda tohto usporiadania je v tom, že nevyžaduje nijakú aparatúru. Pri pôvodnej metóde Williamsovej a Kirbyovej [150] sa vzorky analyzovaných látok nanesú asi 5 cm od dolného okraja papiera, papier sa potom stočí do valca a bočné hrany sa zošijú nitou alebo kancelárskou zošívачkou. Tento papier sa potom priamo postaví do misky s organickým rozpúšťadlom, umiestenej vo vhodnej



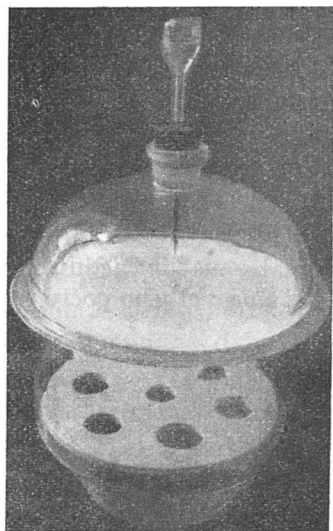
Obr. 20. Zariadenie pre vzostupné vyvíjanie. V ľavo je pôvodné zariadenie podľa Williamsa a Kirbyovej [150], vpravo je papier zavesený na veko komory (podľa Cramera [150]).

komore alebo valci. Pri inej úprave možno papier zavesiť napr. na veiko komory a na dno opäť naliať organické rozpúšťadlo (obr. 20). Fučík a Procházka [174] vyvíjajú vzostupne vo fľaši od uhoriek, kde je papier pripevnený širokou korkovou zátkou; nám sa pri analýze námeľových alkaloidov ako komora najlepšie osvedčila fľaša na mlieko. Na metódu vzostupného vyvíjania možno použiť aj skúmavku, kde je horný koniec prúžku upevnený v zátku skúmavky (obr. 21) [235, 236]. Nevýhoda tejto metódy spočíva v tom, že v jednej skúmavke možno analyzovať iba jednu vzorku. Výhodou je možnosť pohodlného a rýchleho vyskúšania veľkého počtu rozpúšťadlových kombinácií.

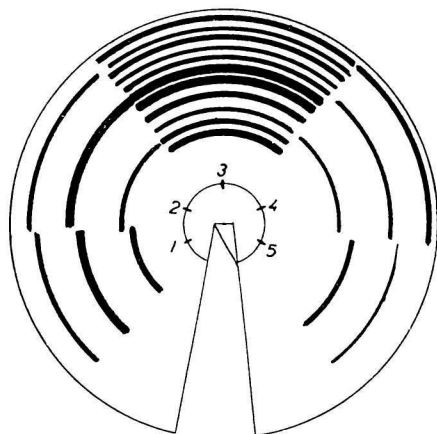


Obr. 21. Skúmavková mikrometóda vzostupného vyvíjania podľa Rocklanda a spol. [235].
 Vľavo zariadenie pre vyvíjanie, vpravo detegovaný chromatogram zmesi alanínu a glycínu.

Konečne tretím typom, ktorý sa najmä v tomto roku začína veľmi rozširovať, je *vyvíjanie kruhové*, známe už v minulom storočí pri kapilárnej analýze. Opäť ho zaviedol Rutter [237], ale najväčšiu zásluhu o jeho rozšírenie má Giri [176—179]. Kruhové vyvíjanie možno najlepšie robiť v prázdnom exsikátore; kruhový papier s látkou nanosenou do stredu sa vloží medzi veiko a spodnú časť exsikátora. Sústavu rozpúšťadiel možno mikrobyretou umiestenou v tubuse exsikátora nakvapkávať do stredu nanesej škvry (obr. 22), alebo možno papierovým knôtom, ktorý je prestrčený stredom škvry, nasávať rozpúšťadlo z dna exsikátora. V papierovom kruhu možno vystrihnúť i pásik, ktorým si papier podobne ako knôtom nasáva rozpúšťadlo z podstavenej misky. Pri vyvíjaní sa namiesto škvŕn vytvárajú kruhové pásy, výhoda ktorých v porovnaní so škvŕnami získanými pri ostatných typoch vyvíjania je v tom, že sú omnoho užšie, čo veľmi často umožňuje stanoviť dve látky, ktoré by pri ostatných typoch vyvíjania splynuli v jednu škvŕnu. Donedávna sa táto metóda málo používala preto, že ňou bolo možné analyzovať iba jednu vzorku. Túto ťažkosť prekonáva nový spôsob Giriho. Do stredu kruhového filtračného papiera sa tužkou označí kruh o priemere asi 4 cm, na ktorý možno naniesť až



Obr. 22. Kruhové vyvíjanie v exsikátore.
Rozpúšťadlo sa nakvapkáva z mikrohyrety na nanesenú škvrnu. (Foto G. Zimmermann.)



Obr. 23. Schematické znázornenie kruhového vyvíjania, kde sa v papieri vystrihol pásik, ktorým si papier nasáva rozpúšťadlovú sústavu. Na papier sa naniesli roztoky cukrov (ako prvá je uvedená látka najpomalšia):

1. rafinóza, galaktóza, xylóza; 2. melibióza, glukóza, ribóza; 3. zmes všetkých 11 cukrov;
 4. maltóza, sorbóza, ramnóza; 5. sacharóza, arabinóza.
- Použilo sa opakované vyvíjanie (2×) v sústave n-butanol — acetón — voda (2 : 1) a detegovalo sa anilíndifenylamínfosfátom (podľa Giriho a Nigama [177]).

osem vzoriek látky. Z jednotlivých nanesených látok dostaneme pri vyvíjaní pásy v tvare kruhového výseku (obr. 23).

S otázkou vyvíjania prirodzene najtesnejšie súvisí otázka výberu vhodnej *sústavy rozpúšťadiel*. Za vhodnú považujeme tú sústavu, v ktorej R_F analyzovaných látok leží medzi 0,05—0,9, pričom R_F hodnoty dvoch oddeľovaných látok sa majú líšiť aspoň o 0,05. V prípade nízkych R_F a vyvíjania na prietok možno však stanoviť vedľa seba aj látky s R_F líšiacim sa o 0,03. Škvrny látok majú byť okrúhle a nemajú za sebou zanechávať chvosty. Rozpúšťadlo nemá robiť ťažkosti pri odstraňovaní z papiera a jeho zvyšky nesmú rušiť detekciu.

Podľa povahy oddeľovaných látok môžeme sústavy rozpúšťadiel rozdeliť do 4 skupín [Decker, 167]:

1. Pre silne hydrofilné látky, t. j. také, ktoré sa omnoho lepšie rozpúšťajú vo vode ako napr. v alkoholických rozpúšťadlách, je najvýhodnejšie použiť nižšie alifatické alkoholy s rôznym obsahom vody (10—40%).

2. Stredne hydrofilné látky, ktoré sú obvykle oniečo rozpustnejšie v nižších alkoholoch, najlepšie sa oddeľujú v butanoličných sústavách. prípadne v sústavách s etylacetátom, benzénom a pod.

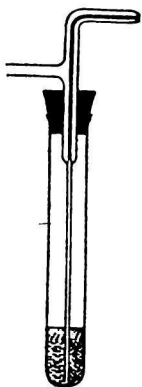
3. Lipofilné látky sú charakterizované nerozpustnosťou vo vode a rozpustnosťou v organických rozpúšťadlách. Na ich vyvíjanie nemožno použiť obvyklé sústavy, kde štacionárna fáza je tvorená vodou. Jednou z možností oddeliť ich je impregnácia papiera polárnejším organickým rozpúšťadlom, napr. metanolom, propylénglykolom, formamidom a i. Papier sa impregnuje buď tak, že sa komora nasýti príslušným organickým rozpúšťadlom (pri zakotvení nižších alkoholov), alebo v prípade formamidu alebo propylénglykolu sa papier niekoľkokrát pretiahne roztokom týchto látok v prehavom organickom rozpúšťadle: toto rozpúšťadlo sa rýchle odparuje a papier je potom impregnovaný žiadanou polárnejšou fázou. Na týchto papieroch sa obvyčajne vyvíja benzénom, toluénom alebo chloroformom. Tento spôsob sa dnes najviac používa pri oddeľovaní málo polárnych látok. Ďalšiu možnosť prináša napojenie papiera menej polárnou organickou fázou: tento spôsob „obrátenia fáz“ sme prebrali v kapitole o rozdeľovacej chromatografii; inú modifikáciu obrátenia fáz opisali Košťiř a Slavík [204]: pri ich metóde sa papier acetyluje a na acetylovaný papier sa zachytáva nepolárne rozpúšťadlo a opäť sa vyvíja polárnou fázou. Tretí spôsob je vlastne prenesenie adsorpčnej chromatografie na papier: papier sa impregnuje anorganickým adsorbivom, takmer výlučne kyslíčnikom hlinitým. Táto impregnácia [242] sa robí tak, že sa papier premyje roztokom síranu hlinitého, nadbytok kvapaliny sa odsaje medzi dvoma filtračnými papiermi a umiesti sa do komory nasýtenej parami amoniaku. Vo filtračnom papieri sa jemne vyzráža hydroxyd hlinitý, ktorý sa aktivuje zahrievaním papiera na vyššiu teplotu. Na takto pripravenom papieri sa potom vyvíja rovna-

kými rozpúšťadlami, ako sme uviedli v kapitole o adsorpčnej chromatografii. Výhodou tejto metódy je veľmi ľahká možnosť jej prenesenia na stĺpec kyslíčnika hlinitého, nevýhodou je tvorba pretiahnutých adsorpčných škvrn.

4. Kyseliny a zásady robia ťažkosti najmä tým, že na papieri dochádza k ich čiastočnej disociácii a tým k tvorbe chvosta. Túto disociáciu možno potlačiť použitím kyslých rozpúšťadlových sústav na vyvíjanie kyselín a zásaditých sústav na vyvíjanie zásad.

Pre rozpúšťadlá platí prirodzene to isté, na čo sme upozornili pri stĺpcovej chromatografii, že totiž musia byť vždy čisté, najlepšie čerstvo predestilované. Pri sústavách, ktoré obsahujú butanol alebo iné alifatické alkoholy a silnú organickú kyselinu, treba brať do úvahy, že po určitej dobe dochádza k esterifikácii týchto alkoholov, čím sa v nich znižuje rozpustnosť vody, a to má za následok zmenu pohyblivosti oddeľovaných látok. Sústavy sa pripravujú (pokiaľ sa inak neuvádza) tak, že rozpúšťadlo zmiešame v udaných pomeroch v oddeľovacom lieviku, dôkladne pretrepeme a po oddelení obidvoch vrstiev použijeme vrstvu organického rozpúšťadla na vyvíjanie; komoru sýtíme obidvoma vrstvami.

Okrem vyvíjania je pri papierovej chromatografii najdôležitejšie odkrytie látky na papieri, t. j. *detekcia*. Detekciu možno uskutočňovať jednak na základe fyzikálnych vlastností látky (z tejto skupiny je najrozšírenejšie objavenie látok na základe ich fluorescencie v ultrafialovom svetle ortuťovej výbojky), jednak chemickými reakciami alebo aplikáciou rozličných činidiel. V prípade, že reakciou vznikajú produkty málo rozpustné v použítom roztoku, možno činidlá aplikovať kúpaním. Najobvyklejšie je však postriekanie chromatogramu rozprašovačom.



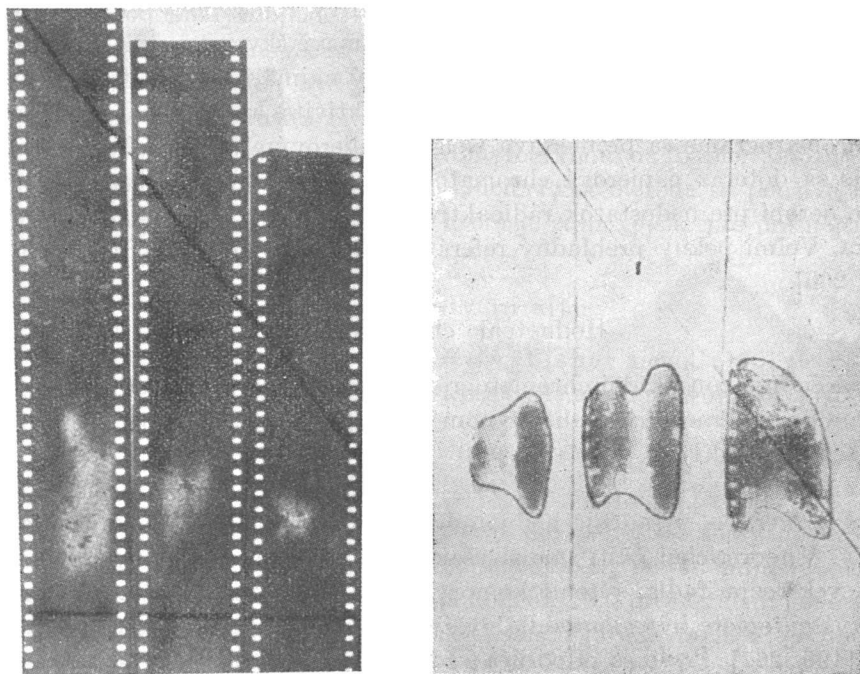
Obr. 24. Rozprašovač na chromatografickú detekciu (podľa Cramera [150]).

Na postrek možno použiť rozprašovač na voňavku alebo rozprašovač špeciálne pripravený pre chromatografické účely (obr. 24); možno použiť aj výrobok Stopangin-SPOFA. Do rozprašovača zavádzame obyčajne stlačený vzduch z bomby alebo za použitia kompresora (možno použiť aj olejovú výevu v obrátenej funkcii). Možno, pravda, fúkať aj ústami, ale tento spôsob je menej vhodný, pretože postrek nie je pravidelný.

Zo všeobecne používaných *nešpecifických detekčných činidiel* treba menovať detekciu acidobázickými indikátormi (najviac sa používa brómfenolová alebo brómtymolová modrá), ktorými odkrývame nielen kyseliny a zásady, ale aj amfotéry, ďalej detekciu založenú na oxydácii alebo redukcii, pričom sa zmena farby buď detekčného činidla, alebo detegovanej látky mení (najviac sa používa amoniakálny dusičnan strie-

borný alkalický manganistan draselný, trifenyltetrazóliumchlorid a i.), a napokon nešpecifickú detekciu jódom, ktorým sa mnoho látok rôzne zafarbuje. *Špecifické činidlá* rozoberieme v osobitnej časti tejto kapitoly.

Osobitnú skupinu detekcií tvoria *enzymatické* a *bioautografické metódy*. Enzymatické metódy sa používajú pre dôkaz enzýmov, menej sa používajú pre dôkaz substrátu. Prakticky sa tento spôsob detekcie robí napr. u amyláz tak, že papier postriekame roztokom škrobu, inkubujeme niekoľko hodín vo vlhkej komore a po uschnutí postriekame roztokom jódu; miesta amyláz sa roztokom nefarbí, takže sa javia ako biele škvrny na fialovobelasmom pozadí. Veľmi efektná je detekcia proteáz: na vlhký papier priložíme kinofilm (emulziou na papier) a opäť necháme niekoľko hodín inkubovať. Proteázy rozložia želatínu v emulzii, čo sa prejaví spriehľadnením filmu, a zároveň sa toto rozložené miesto prilepí na chromatogram, takže sa po redukcii striebra objavia šedivé škvrny (obr. 25).



Obr. 25. Príklad enzymatickej detekcie trypsinu.

Na chromatogram sa po skončenom vyvíjaní priložil kinofilm; po vhodnej dobe inkubácie sa miesto, kde je lokalizovaný trypsin, prejaví spriehľadnením emulzie. Po odlepení filmu dostávame šedivé škvrny na bielom podklade.

Sústava: 40%-ný etanol, 1,5%-ný NaCl.

Pri bioautografickej metóde sa chromatogram po vyvolaní položí na agarovú pôdu, kde je naočkovaný citlivý mikrób, pre ktorý je napr. hľadaný vitamín potrebným rastovým faktorom; agarová pôda je kompletná, s výnimkou detegovaného vitamínu. Mikrób potom vyrastie len na mieste, kde je lokalizovaný hľadaný vitamín. Táto metóda sa používa najmä pri papierovej chromatografii vitamínov a antibiotík, kde naopak mikrób v mieste antibiotika nenarastie. Značnou prednosťou bioautografickej metódy je jej citlivosť, ktorá býva 100—10 000-krát väčšia než pri detekcii chemickej.

Inou špeciálnou detekciou je odkrytie látok označovaných rádioaktívnymi izotopmi. Papierová chromatografia rádioaktívnych látok sa najviac používa pri sledovaní enzymatických reakcií; veľmi podstatnou mierou prispela k vysvetleniu štúdia fotosyntézy; rozšírená je pri sledovaní osudu liečiv v organizme. Chromatografická technika sa pri použití rádioaktívnych látok nelíši od normálnej chromatografickej techniky; je odlišná iba v otázke detekcie. Rádioaktívne látky možno detegovať tzv. autorádiografickým spôsobom, pri ktorom sa chromatogram po vyvíjaní priloží na citlivý röntgenový film; po dlhšej dobe sa na tomto filme po vyvolaní objavia tmavé škvrny na mieste, kde bola rádioaktívna látka. Druhý spôsob, používaný najmä na kvantitatívne stanovenie, je metóda rádiometrická, kde rádioaktivita lokalizovaná v škvrnách na chromatograme sa premeriava Geiger-Müllerovým alebo iným počítacom. U nás sa doteraz papierová chromatografia rádioaktívnych látok vo väčšej miere nerobí pre nedostatok rádioaktívnych izotopov, najmä rádioaktívneho uhlíka. Veľmi pekný prehľadný referát o tejto metóde mal Hais [188] a i. [209, 260].

Hodnotenie chromatogramu

Konečnou fázou každej chromatografie je kvalitatívne, prípadne aj kvantitatívne hodnotenie. Pri kvalitatívnom hodnotení robíme závery:

1. z pohybu škvrny,
2. z detekcie.

Pohyb škvrn sa vyjadruje hodnotami R_F , ktoré sa často udávajú ako konštanty. V teoretickej časti sme si však ukázali, že na ich hodnoty má vplyv napr. vek rozpúšťadla, sýtenie komory, ďalej sa významne uplatňuje teplota (pri vyššej teplote býva spravidla vyššie R_F), dĺžka chromatogramu a iné faktory [196, 267]. Preto sa odporúča vždy nechať súbežne putovať látku štandardnú, prípadne ju naniesť k analyzovanej látke (obdoba zmesového pásu pri adsorpčnej chromatografii). Niekedy je výhodné, najmä ak vyvíjame na prietok, používať tzv. hodnoty R_X , čo je pomer vzdialenosti škvrny od štartu ku vzdialenosti najrýchlejšie putujúcej škvrny. Tieto hodnoty R_X majú tú výhodu, že na ne nemá podstatný vplyv vek rozpúšťadla, teplota a pod. K druhému

bodú možno pripomenúť, že ak škvrna hľadanej látky nereaguje s použitým detekčným činidlom, neobsahuje hľadanú látku alebo aspoň ju neobsahuje v množstve väčšom, ako je citlivosť použitého činidla. Toto pravidlo má však svoje výnimky, lebo reakciu látok môže ovplyvniť rozpúšťadlová sústava alebo prítomnosť iných látok v roztoku.

Záverom ku kvalitatívnemu hodnoteniu chromatogramu možno odporúčať, aby sa nikdy nevyvodzovali závery z jediného chromatogramu, ale aby sa identifikácia látok robila najmenej v dvoch rozpúšťadlových sústavách. Súčasne nikdy nespoliehajte na hodnoty R_F ; skôr môžeme dôverovať hodnotám R_X , ale najlepšie je vždy použiť štandard zmiešaný s podobnými látkami, aké sú obsiahnuté v analyzovanej vzorke.

Donedávna sa niektorí chemici pozerali na chromatografiu na papieri skepticky, pretože ju považovali za metódu výlučne kvalitatívnu. Najmä v posledných troch rokoch bola však *kvantitatívna chromatografia na papieri* v niektorých odvetviach tak prepracovaná, že ju možno nielen porovnať s bežnou kvantitatívnou analýzou, ale túto môže dokonca predstihnúť. Ako príklad uvediem kvantitu aminokyselín v bielkovinových hydrolyzátoch, kvantitu cukrov v polysacharidových hydrolyzátoch a najmä kvantitu penicilínu. Azda najpresnejšou je tu kvantita za použitia rádioaktívnych izotopov.

Kvantitatívne stanovenie látok chromatografiou na papieri možno robiť dvojakým spôsobom: in situ alebo po elúcii. Prvá metóda sa používa najmä pre rýchle stanovenie, druhá metóda, ktorá je zdĺhavejšia, pre presnejšie stanovenie.

1. Metódy in situ

a) Stanovenie podľa *plošnej veľkosti škvŕn*. Fisher a spol. [170] zistili empirický vzťah medzi plošnou veľkosťou škvŕny (A) a množstvom látky v škvŕne (q), ktorý možno vyjadriť rovnicou:

$$\log q = k \cdot A,$$

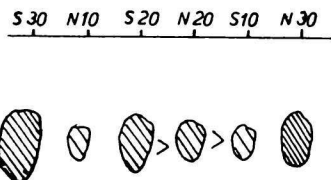
kde k je konštanta, experimentálne zistená pre jednotlivé analyzované látky. Pri tejto metóde, ktorá je zo všetkých uvedených metód najjednoduchšia, treba však vždy udržiavať konštantné podmienky, z ktorých menujeme predovšetkým nanášanie rovnako veľkých škvŕn na štart, ďalej teplotu, rovnomerný postrek pri detekcii atď.

b) Kvantita podľa *intenzity škvŕny*. Chromatogram sa vydeteguje ako v predchádzajúcom prípade a vyhodnocuje sa fotometricky. Obyčajne sa to robí tak, že sa papier buď ručne, alebo automaticky pohybuje pred štrbinou fotobunky od štartu k čelu a priepustnosť alebo adsorpcia sa registruje v závislosti od R_F . Aby sa znížila adsorpcia papiera a zvýšila jeho priepustnosť, prúžok sa oby-

čajne premastuje parafínovým olejom. Táto metóda je výhodná najmä pre vyhodnocovanie papierových elektroferogramov sérových bielkovín.

Do tejto skupiny možno zaradiť aj tzv. ultrafialovú papyrografiu [191], kde sa škvrny registrujú bez chemickej detekcie v ultrafialovom svetle ortufovej výbojky spôsobom, ako sme vyššie uviedli.

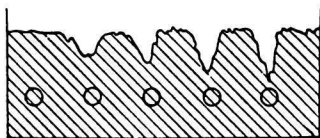
c) Vizuálny odhad *plošnej veľkosti a intezity škvŕny*. Táto metóda sa používa predovšetkým v tých prípadoch, keď nám ide o rýchly približný kvantitatívny odhad, pričom chceme dostať lepšie výsledky ako v prípade *a*. Ide tu najmä o hodnotenie surovej zmesi viacerých látok z prirodzeného biologického materiálu. Najjednoduchšie sa táto analýza robí prostým porovnaním neznámej zmesi látok so štandardným radom. Dokonalejšou je metóda zostupných kvánt analyzovanej vzorky a vzostupných kvánt štandardu. Táto metóda sa veľmi dobre osvedčila Francovi a Haisovi [171] najmä pre kvantitu aminokyselín v bielkovinových hydrolyzátoch, pri analýze organických kyselín, chloramfenikolu, pri pelentánových látkach a i. Jej princíp je zrejmy z obr. 26.



Obr. 26. Schéma zisťovania kvantít vizuálnym odhadom plošnej veľkosti a intezity škvŕny podľa Franca a Haisa [171].
s — štandard, N — analyzovaná látka, číslice značia nanesený objem roztoku.

Rovnako veľké škvrny analyzovanej vzorky sa nanášajú na párne miesta na štarte vo vzostupnom rade 10, 20, 30 μ l a na nepárne miesta sa nanáša v zostupnom rade porovnávací vzorka známeho zloženia (30, 20, 10 μ l). Na chromatograme po detekcii potom porovnáваме veľkosť a intenzitu vždy dvoch susedných škvŕn. Odchýlka pri tejto metóde býva maximálne 5—10%.

d) *Retenčná analýza*. Princíp tejto metódy, ktorú zaviedol Wieland [257], je zrejmy z obr. 27. Chromatogram po vyvíjaní otočíme o 90° a necháme po



Obr. 27. Princíp Wielandovej retenčnej analýzy (podľa Cramera [150]).

ňom vzlínať roztok činidla, ktoré reaguje s látkou na chromatograme. Keď čelo vzlínajúceho roztoku dôjde ku škvrne, zadržuje sa v mieste škvorny, čím vzniká cípovitá medzera, ktorej veľkosť je úmerná množstvu látky v škvrne. Premeraním tejto plochy zistíme množstvo analyzovanej látky.

2. Metódy po elúcii

Pri týchto metódach môžeme analyzovanú látku eluovať bez predchádzajúcej detekcie, alebo napr. pri tvorbe zafarbených škvŕn až po detekcii. V prvom prípade musíme však poznať polohu škvŕny neznámej látky; obyčajne sa to robí tak, že sa niekoľko škvŕn tej istej látky naniesie na štart a po skončení vyvíjania sa krajné pružky vždy s jednou analyzovanou látkou odstrihnú a tie sa detegujú. Podľa polohy škvŕn sa potom eluuje stredná nedetegovaná časť. Postup pri tejto elúcii je obvykle analogický ako pri chromatografickom vyvíjaní, ktoré možno prípadne modifikovať tým, že pružky pritlačíme medzi dve skielka alebo sklené dosky. V eluáte možno stanoviť látky bežnými mikrokvantitatívnymi metódami. Keďže obvykle pracujeme s množstvom asi 100 μg , veľmi často sa používa kolorimetria alebo spektrálna fotometria eluátov, ktorá nevyžaduje väčšie množstvo látok. Dost výhodná je aj kombinácia chromatografie na papieri s polarografiou.

Okrem týchto metód možno v prípade papierovej chromatografie rádioaktívnych látok použiť pre kvantitu spomínané už rádiometrické metódy alebo vyhodnocovanie biologickým alebo enzymatickým testom.

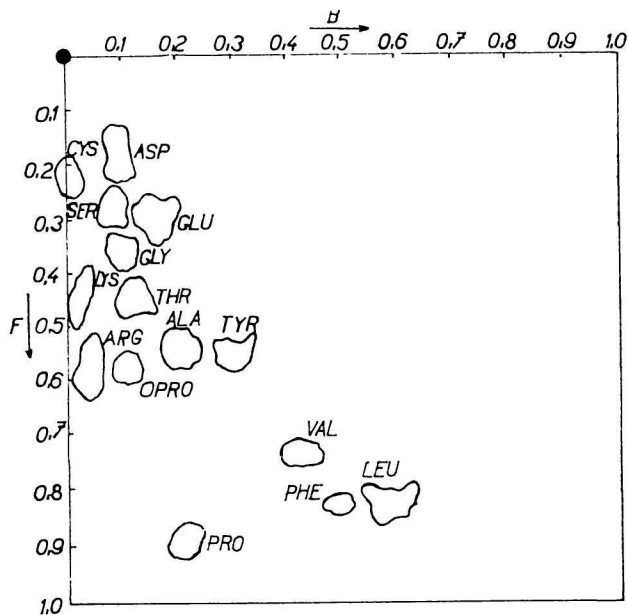
Ku všetkým uvedeným metódam stanovenia po elúcii treba pripomenúť, že podmienkou dobrých výsledkov je úplné oddelenie látok na papieri; v prípade, že sa dve škvŕny i len nepatrne dotýkajú, nemožno tieto metódy použiť a treba sa obrátiť k metódam *in situ*, kde to nie je toľko na závädu.

Aplikácia

Aminokyseliny [168a, 195, 197]. Oddelovanie aminokyselín je časovo najstarším a zároveň najpoužívanejším odvetvím chromatografie na papieri. Veľmi dôležitou pri chromatografii na papieri je voľba vhodnej rozpúšťadlovej sústavy. Pre analýzu aminokyselín z hydrolyzátoŧ sa ešte aj dnes najčastejšie používa dvojrozmerová chromatografia: v jednom smere sa vyvíja feňolom s amoniakom a v druhom smere obvykle n-butanolom s kyselinou octovou. Charakteristický dvojrozmerový chromatogram je na obr. 28. Dvojrozmerová chromatografia je však menej výhodná pre kvantitatívne stanovenie. Hais a spol. [190] odporúčajú pri kvantitatívnom stanovení aminokyselín v hydrolyzátoch vyvíjať jednosmerne v sústave t-butanolu s borátovým tľmičom

o pH = 8,5 a komplexonom III, pričom sa tak isto aj pH papiera ustalaže uvedeným tmičom. Touto metódou sa dobre oddelí leucín, izoleucín, fenylalanín, metionín, valín, tyrozín, prolín, alanín, treonín (obr. 29). Zvyšujúce aminokyseliny sa oddelia v sústave fenolu s fosfátovým tmičom o pH = 12 a komplexonom III. Dobrou sústavou pre polárnejšie aminokyseliny je butanol s kyselinou mravčou a pre menej polárne butanol s benzylalkoholom a tmičom o pH = 8,5 [214]. Komplexon sa do uvedených sústav pridáva preto, aby viazal ťažké kovy z papiera, ktoré by inak tvorbou komplexov rušili pohyb aminokyselín po papieri.

Aminokyseliny sa detegujú takmer výlučne ninhydrínom, ktorý môžeme nazvať ideálnym detekčným činidlom. Je citlivý na aminokyseliny v množstve okolo 1 μg . S väčšinou aminokyselín reaguje modrým až fialovým zafarbením, iba s prolínom a hydroxyprolínom dáva žltú škvrnu. Okrem ninhydrínu, ktorý je špecifický pre všetky aminokyseliny, možno použiť ešte celý rad špecifických detekčných činidiel. Najdôležitejšie z nich je Paulyho činidlo, diazotovaný

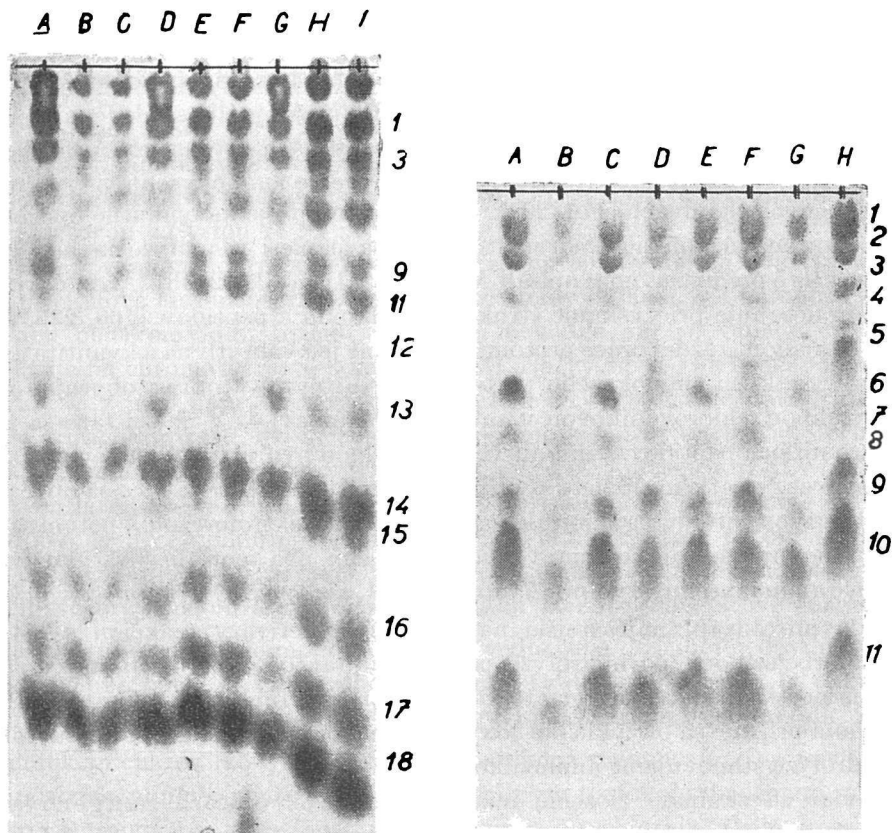


Obr. 28. Dvojrozmerový chromatogram zmesi aminokyselín.

Najprv vyvíjame sústavou sekundárny butanol — kyselina mravčia — voda (75 : 15 : 10), označené B, v druhom smere 80%-ným vodným fenolom, označené F.

CYS — cystín, ASP — kyselina asparágová, SER — serín, GLU — kyselina glutamínová, GLY — glycín, LYS — lyzín, THR — treonín, ARG — arginín, OPRO — oxyprolín, ALA — alanín, TYR — tyrozín, PRO — prolín, VAL — valín, PHE — fenylalanín, LEU — leucín a izoleucín.

Veľku veľmi podobný chromatogram dostaneme, ak použijeme sústavu n-butanolu s kyselinou octovou a vodou (podľa H. Zahna a F. Cramera [150]).



Obr. 29. Príklady dobrých sústav pre oddelenie aminokyselín v bielkovinových hydrolyzátoch a súčasne ukážka kvantít podľa Franca a Haisa [171].

I. lyzín, 2. histidín, 3. arginín, 4. asparagín, 5. metionín, 6. serín, 7. glycín, 8. kyselina asparágová, 9. treonín, 10. kyselina glutamínová, 11. alanín, 12. prolín (jeho žltá škvrna nebola fotograficky zachytená), 13. tyrozín, 14. valín, 15. metionín, 16. fenylalanín, 17. izoleucín, 18. leucín.

Vľavo: sústava terciárneho butanolu s borátovým tlmáčom o $\text{pH} = 8,5$ a komplexonom III. A, D, G je 30, 20 a 10 μl štandardnej zmesi aminokyselín, B, C—E, F—H, I sú vždy dve analyzované vzorky nanášané vo vzostupnom kvante 10, 20 a 30 μl . Na chromatograme sa porovnávajú vždy dve susedné škvrny o rovnakej intenzite zafarbenia a rovnakej veľkosti plochy.

Vpravo: sústava n-butanolu s kyselinou mravčou a vodou (75 15 10). Na štart je nanášaný štandardný roztok aminokyselín v zostupnom množstve 30, 25, 20 a 10 μl (A, C, E, G) a analyzovaný roztok vo vzostupnom množstve 10, 20, 25 a 30 μl (B, D, F, H).

Vyvíjanie na prietok 74 hodín. (Chromatogramy I. M. Haisa a Z. Franca.)

sulfanilamid, pre histidín a tyrozín; metionín a cystín sa odкрývajú jodoplatičitanom draselným, prolín a hydroxyprolín izatínom a arginín sa deteguje Sakaguchiho činidlom (zmes α -naftolu s močovinou; chromatogram sa po postriekaní týmto činidlom postrieka ešte roztokom brómu v hydroxyde sodnom).

Nižšie peptidy možno oddelovať tým istým spôsobom ako pri chromatografii aminokyselín. Pre vyššie peptidy a bielkoviny je výhodnejšie oddelovanie elektroforézou na papieri. Chromatografiu na papieri možno použiť všade tam, kde sa aminokyseliny vyskytujú. Výskyt aminokyselín sa sledoval v rastlinnom materiáli, v plesniach, kvasinkách, baktériách a vírusoch. V medicíne sa chromatografia na papieri používa na stanovenie aminokyselín v krvi, moči a v rozličných tkanivách [175, 202]. Na tomto mieste je nevyhnutné upozorniť aj na zaujímavú aplikáciu chromatografie na papieri v analýze maliarskych spojív, ktoré prednedávnom opísali Macek a Hamsík [213b]. Azda najväčší význam dosahuje pri výskume štruktúry bielkovín a peptidov [160, 239, 250, 251]. Základom každej práce pri tomto výskume je kvalitatívna a kvantitatívna analýza všetkých aminokyselín po totálnej hydrolýze, ktorá sa obyčajne robí 6*N*-kyselinou chlorovodíkovou v zatavenej skúmavke. V ďalšej fáze sa robí analýza nižších peptidov, vzniknutých parciálnou hydrolýzou bielkoviny (kyslou alebo enzymatickou); tieto peptidy treba najprv frakcionovať, čo sa obyčajne robí stĺpcovou chromatografiou alebo preparačnou elektroforézou, a potom sa pri nich stanovuje poradie prítomných aminokyselín. Na tento účel sa využívajú koncové aminokyseliny s voľnou skupinou -NH₂ alebo -COOH, ktoré sa v prvom prípade prevádzajú najčastejšie na dinitrofenylderiváty reakciou s 2,4-dinitrofluórbenzénom (po hydrolýze peptidu má takto označená aminokyselina iné vlastnosti a možno ju chromatografiou na papieri ľahko identifikovať) [198], v druhom prípade sa obvykle karboxyl redukuje na alkoholickú skupinu, takže po hydrolýze stanovujeme aminoalkohol [172].

Najviac sa skúmalo zloženie inzulínu, najmä v prácach Sangerových [238—240], ďalej zloženie hypofyzárnych hormónov, rôznych vaječných bielkovín, krvnej a svalovej bielkoviny atď.

Bielkoviny a enzýmy sú makromolekuly a teda nemôžeme u nich predpokladať rozdeľovanie medzi polárne a nepolárne organické rozpúšťadla. Pri chromatografii týchto látok sa využíva tzv. vysolovacia adsorpcia, t. j. podpora adsorpcie znížením rozpustnosti proteínov napr. vyvíjaním vodným alkoholom, acetónom alebo rôzne koncentrovanými roztokmi solí. Chromatografia na papieri bola celkom úspešná pri oddelovaní enzýmov; oddelovali sa amylázy z rôzneho zdroja, napr. amyláza pankreatická, kľíčková diastáza a takadiastáza za použitia sústavy etanol — 3%-ný NaCl. Na detekciu sa používa enzymatická detekcia, ako sme sa o nej zmienili vo všeobecnej časti. Pokiaľ ide o sérové bielkoviny, elektroforéza na papieri je nepomerne lepšou metódou, hoci sa v minulých rokoch objavilo niekoľko chromatografických prác. Najlepšou sa tu zdá Zimmermannova práca [268], kde sa oddeľujú albumíny od globulínov v sústave obsahujúcej vodu, nasýtenú butanolom s malým množstvom propanolu a dodekansulfónanom sodným. Nemožno však od-

sudzovať ani práce Franklinove a Quastelove [173], ktorí používajú dvoj-
rozmerovú chromatografiu a vyvíjajú rôznymi roztokmi solí a cukrov za po-
užitia povrchovo aktívnych látok.

Cukry [166, 168b, 222, 224, 233]. Papierová chromatografia týchto látok
je dnes popri aminokyselinách najrozšírenejším úsekom. Z rozpúšťadlových
sústav najrozšírenejšie sú systavy butanolické, najmä sústava n-butanolu s ky-
selinou octovou a vodou (4 : 1 : 5), kde majú cukry nízke hodnoty R_F , ale
pritom sa navzájom dobre oddeľujú. Preto sa na ich vyvíjanie používa pre-
važne prietoková chromatografia alebo opakované vyvíjanie. V butanolických
sústavách platí pravidlo, že čím väčšia je molekula analyzovaného cukru,
tým putuje na chromatograme pomalšie [193]. Najvyššie R_F budú mať mono-
sacharidy (a z nich napr. pentózy vyššie než hexózy), pomalšie putujú disa-
charidy, trisacharidy atď. Ak chceme stanoviť oligosacharidy o troch až šiestich
cukorných jednotkách, musíme vyvíjať aj týždeň. Pre skrátenie analýzy týchto
dôležitých látok navrhli nedávno Bayly a Bourne [156] prevedenie oligo-
sacharidov na korešpondujúce N-benzylglykozylamíny, ktoré potom dávajú
oveľa vyššie hodnoty R_F . Okrem butanolu s kyselinou octovou sa najlepšie
osvedčili systavy fenolu s amoniakom, kolidín alebo etylacetátové systavy.

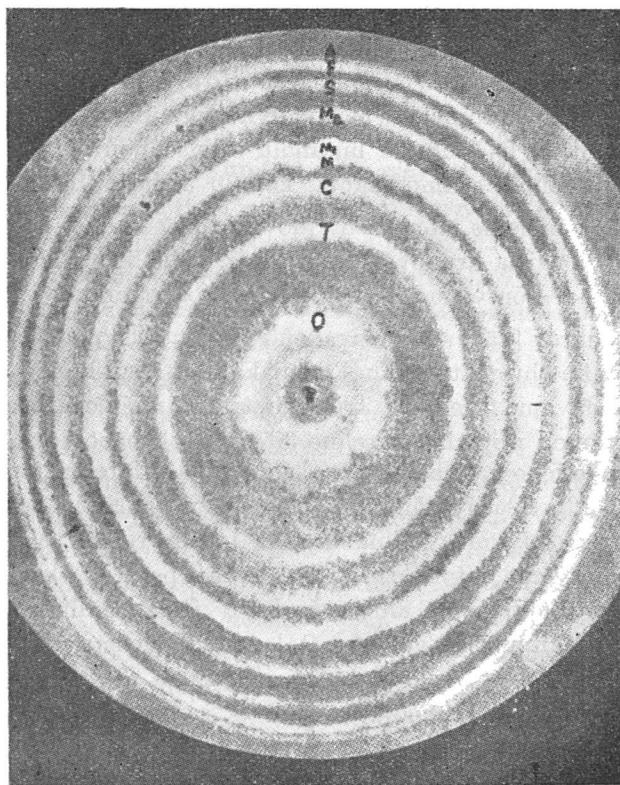
Azda najlepšie oddelenie monosacharidov vedľa seba dosiahol nedávno Giri
a spol. [177] za použitia kruhového vyvíjania. Oddelil vedľa seba 11 cukrov
v sústave butanol-acetón-voda (20 : 70 : 10) pri opakovanom vyvíjaní (obr. 23).

Na detekciu cukrov [253] sa využíva ich redukčná schopnosť, čo sa predtým
robilo postriekaním chromatogramu amoniakálnym roztokom dusičnanu strie-
borného. Dnes dávame prednosť trifenyltetrazóliumchloridu alebo kyseline
3,4-dinitrosalicylovej, prípadne kyseline 3,5-dinitrobenzoovej. Zo špecifických
čindiel používame fenoly alebo amíny, ktoré dávajú farebné zlúčeniny s deri-
vátmi furfuralu, ktoré sa uvoľňujú zo škvŕn cukru zahriatím so silnými mine-
rálnymi alebo organickými kyselinami. Tak možno rozlíšiť aldózy od ketóz;
medzi aldózami môžeme potom ešte určiť, či ide o pentózy alebo ketózy. Dnes
najpoužívanejším čindlom na aldózy je kyslý ftalan anilínu (pripravuje sa
zmiešaním čistého anilínu s kyselinou ftalovou). Po postriekaní reagujú pen-
tózy červeno, aldohexózy hnedožltlo. Pre ketózy sa nám najlepšie osvedčila
močovina s kyselinou chlorovodíkovou. Inak sa používajú rozličné fenoly,
ako *a*-naftol, naftorezorcínol a i.

Z aplikácií treba spomenúť veľmi početnú skupinu prác, ktoré sa zaoberajú
štruktúrou polysacharidov [210]. Z týchto novších prác uvádzame aspoň vý-
skum štruktúry polysacharidovej zložky látky krvnej skupiny A [223] a ky-
seliny hyalurónovej. Pokiaľ ide o stanovenie voľných cukrov, veľa prác bolo
venovaných rastlinám, najmä stanoveniu voľných cukrov v potravinách, v poľ-

nohospodárstve a i. [212, 221, 234, 254]; v živočíšnom materiáli sa cukry stanovujú najmä v krvi a moči.

Alkoholy aldehydy a ketóny [150]. Tejto skupine sa doteraz venovalo menej pozornosti, pretože na stanovenie týchto látok existujú iné citlivé metódy (najmä polarografia). Tieto látky sa len v nepatrnom množstve vyskytujú v prirodzenom materiáli a vo väčšine prípadov sa im neprpisuje nijaký zvláštny význam pre organizmus. Keďže ide o kvapaliny, z ktorých veľká časť je ešte veľmi prchavá, chromatografujú sa po prevedení na rozličné deriváty; alkoholy väčšinou na 3,5-dinitrobenzoáty alebo xantogenáty, alifatické aldehydy a ketóny na 2,4-dinitrofenylhydrazóny. Jednoduchšia je chromatografia aromatických aldehydov.



Obr. 30. Kruhová papierová chromatografia organických kyselín podľa Giriho a spol. Vyvíjalo sa sústavou n-butanolu s kyselinou mravčou a vodou (30 21 30) a detegovalo sa roztokom brómkrezolovej zelene.

O — kyselina šťavelová, T — kyselina vínna, C — kyselina citrónová, M — kyselina jablňná, M₁ — kyselina maleínová, M₂ — kyselina malónová, S — kyselina jantárová, F — kyselina fumarová, A — kyselina adipová.

Organické kyseliny tvoria pomerne veľkú skupinu látok s častým používaním chromatografie na papieri. Kyseliny obvykle rozdeľujeme do troch skupín, ktoré sa navzájom odlišujú metódou:

a) *Mastné kyseliny* [153]; pri nižších mastných kyselinách je na závalu ich prchavosť (preto sa chromatografujú ako soli, najlepšie etylamínové alebo sodné), pri vyšších mastných kyselinách zasa ich nerozpustnosť v polárnych rozpúšťadlách. Možnosťou ich oddelenia sa zaoberali viaceré práce, ale až dve posledné, ako sa zdá, budú úspešné: papier sa impregnuje olivovým olejom a ako rozpúšťadlo sa použije vodný etanol. Touto metódou sa oddelovala kyselina palmitová, stearová, olejová a iné [245].

b) Ďalšiu skupinu tvoria *organické hydroxykyseliny, kyseliny dikarbónové a trikarbónové* [162, 249]. Ich ťažkosť spočíva v tom, že ako voľné kyseliny sú na chromatograme disociované, čo sa prejavuje tvorbou chvostov, ktoré znemožňujú dobrú separáciu. Tomu možno čeliť pridaním silnej kyseliny do rozpúšťadlovej sústavy, ktorá túto disociáciu potlačí (obr. 30). Z rozpúšťadlových sústav je najvhodnejší butanol s kyselinou octovou a vodou. Tieto látky možno detegovať postrekom papiera acidobázickým indikátorom, najčastejšie brómfenolovou alebo brómtymolovou modrou. Pretože sa na potlačenie disociácie používajú kyslé rozpúšťadlové sústavy, je potrebné, aby sa po skončení vyvíjajúcej prchavá kyselina z rozpúšťadlovej sústavy nechala z papiera vyprchať a až potom sa papier postriekal slabozalkalizovaným indikátorom.

c) Poslednú skupinu tvoria *ketokyseliny*, ktoré sa takmer výlučne vyvíjajú po prevedení na 2,4-dinitrofenylhydrazóny v sústavách butanolickej obvykle s prídavkom amoniaku [169, 255].

Chromatografia na papieri sa významne uplatňuje najmä pri sledovaní enzymatických dejov, na klinikách sa používa na stanovenie ketokyselín v krvi a moči a ak sa osvedčí aj papierová chromatografia vyšších mastných kyselín, bude to neobyčajne cenný prínos, lebo pre tieto kyseliny neexistuje doteraz nijaká iná vhodná metóda.

Fenoly [155]. Na ich vyvíjanie sa obvykle používa sústava butanolu s kyselinou octovou, do ktorej sa pridáva malé množstvo glykolu alebo krezolu s kyselinou octovou. Ich detekcia je veľmi jednoduchá. Fenoly sa odkrývajú postrekom chloridom železitým, s ktorým tvoria rôzne farebné škvrny, alebo diazotovanou kyselinou sulfanilovou. Chromatografia na papieri sa použila pri štúdiu týchto látok v rastlinách, ďalej pri metabolizme rôznych liečiv (ako napr. v obsiahlej štúdiu o pelentane [187]), pri analýze fenolu v moči, možno ju použiť v laboratóriách organickej syntézy a i.

Steroidy [153, 219, 241, 242]. Na ich rozdeľovanie sa dnes používajú prevažne sústavy, kde je zakotvené polárnejšie organické rozpúšťadlo (obvykle to býva formamid alebo propylénglykol), a na vyvíjanie sa používa benzén

s chloroformom. Ďalšou možnosťou je použitie adsorpčnej chromatografie na papieri (s papierom impregnovaným hydroxydom hlinitým) alebo prevedenie steroidov na vhodné deriváty, napr. Girardove T-hydrazóny pre steroidné ketóny.

Z detekčných metód [205] je pre redukujúce steroidy najvhodnejšou detekcia trifenyltetrazóliumchloridom; pre neredukujúce steroidy sa používa alebo nešpecifická reakcia s jódom, alebo detekcia koncentrovanou kyselinou sírovou a sledovanie fluorescencie v ultrafialovom svetle [265]. Postup pri detekcii je tento: Na sklenú dosku nalejeme v tenkej vrstve kyselinu sírovú, položíme na ňu chromatogram a zvrchu ju prikryjeme ďalšou sklenenou doskou. Pozorujeme fluorescenciu v ultrafialovom svetle a svietiace škvrny ihneď zakreslíme tužkou na sklo, ktoré prikryva chromatogram, a potom ich prekreslíme na papier. Táto metóda sa výborne osvedčuje pri stanovení estrogénnych látok z biologického materiálu.

Chromatografiu steroidov bolo v poslednom čase venovaných veľmi mnoho prác. Analyzovali sa rozličné steroly, estrogény [265], gestagény, androgény a 17-ketosteroidy, najviac však kortikoidy [266], ďalej sa oddeľovali steroidné glykozidy a steroidné kyseliny [229].

Puríny a pyrimidíny [161]. Štúdiu nukleínových kyselín a ich zložkám — purínom a pyrimidínom — venovala sa v poslednom čase veľká pozornosť pre ich biologický význam. Chromatografia na papieri prispela tu značnou mierou pri riešení štruktúry nukleínových kyselín; na základe chromatografických poznatkov sa dnes celý rad autorov stavia proti tetranukleotidovej teórii, podľa ktorej majú byť jednotlivé bázy prítomné v ekvimolárnych pomeroch. Chromatografia na papieri umožnila aj sledovanie nukleínových kyselín v mikroorganizmoch, čo nebolo pred jej zavedením možné.

Z rozpúšťadlových sústav sú najvhodnejšie butanolicke rozpúšťadlá. Na detekciu sa používa alebo silná fluorescencia v ultrafialovom svetle, alebo sa deteguje dusičnanom strieborným a dvojchrómanom draselným. V miestach purínov alebo pyrimidínov zostávajú po premytí kyselinou dusičnou červené škvrny, lebo vzniknuté komplexné deriváty s purínmi alebo pyrimidínmi sú i v tejto kyseline nerozpustné. Kvantita sa obyčajne robí spektrofotometricky po elúcii škvŕn z papiera.

Alkaloidy [218, 220, 243]. Pri papierovej chromatografii týchto látok pôsobí ťažkosť väčšia rozpustnosť alkaloidov v mobilnej fáze a ďalej ich disociácia. Týmto poruchám možno zabrániť a pohyb alkaloidov možno spomaliť úpravou pH rozpúšťadlových sústav (okyslením) alebo impregnáciou papiera anorganickými soľami. Zo sústav je najrozšírenejší butanol s kyselinou octovou alebo chlorovodíkovou na obyčajnom papieri alebo na papieri impregnovanom octanom sodným, prípadne chloridom draselným. Na detekciu je naj-

výhodnejšie Dragendorffovo činidlo, obsahujúce zásaditý dusičnan bizmutitý. Chromatografia na papieri sa opäť najviac používa v odbore, kde doteraz chýba iná vhodná metóda: pri námelových alkaloidoch [157, 213c]; ďalej sa touto metódou oddeľovali alkaloidy chinínovníka, tabakové alkaloidy [206], kumarové alkaloidy, zmes morfinu, skopolamínu, sparteínu a strychnínu a iné látky [213a]. Z ostatných a mínov, ktoré sa oddeľovali chromatografiou na papieri, uvedieme aspoň cholínové látky, ďalej stanovenie adrenalínu vedľa noradrenalínu, oddeľovanie lokálnych anestetík [252], stanovenie histamínu v biologickom materiáli, stanovenie rôznych liečiv (najmä sulfonamidov [194, 256], Jaffé-pozitívnych látok [203] a mnoho iných).

Vitamíny Chromatografiou na papieri sa oddeľovali azda všetky vitamíny. Najväčší úspech sa však dosiahol [228, 248] pri oddeľovaní kyseliny askorbovej (otázka askorbigénu [227, 230]) a skupiny vitamínu B: tiamínu, riboflavínu, kyseliny pantoténovej, listovej [154], nikotínovej a najmä skupiny vitamínu B₁₂ [154, 259, 261], kde celý pokrok v poznaní účinného princípu proti pernicióznej anémii sa veľmi urýchlil spojením metódy chromatografie na papieri s mikrobiologickým kvantitatívnym testom. Pri použití mikróba *Escherichia coli* na bioautografickú detekciu možno odкрыť i jednu desattisícinu gama vitamínu B₁₂. O rozpúšťadlových sústavách tu nemožno všeobecne hovoriť, lebo sú pri jednotlivých vitamínoch značne odlišné; na detekciu sa využíva redukčná schopnosť, fluorescencia, bioautografia a i.

Antibiotiká [150]. Najviac prác bolo venovaných penicilínu, vyvíjanie ktorého sa dosiahne éterom nasýteným vodou alebo rôznymi tlmicmi pri teplote 4—5° C, pretože pri laboratórnej teplote by mohlo dôjsť k jeho rozkladu. Za použitia bioautografie možno oddeliť penicilíny G, F, dihydro-F, K a i. Z iných antibiotík sa chromatografovali streptomycín a u nás v poslednom čase najmä chloromycetín [211], čo súvisí s jeho uvedením na trh. V zahraničí býva obyčajne každý objav nového antibiotika spojený s použitím chromatografických metód. Pokiaľ ide o antibiotiká peptidického charakteru, chromatografia na papieri sa používa pri výskume štruktúry [246].

Anorganické látky [159, 225]. U nás máme na vysokom stupni polarografiu a analýzu pomocou komplexonov, čo azda vedie k tomu, že sa papierovej chromatografii týchto látok venovalo u nás málo pozornosti.

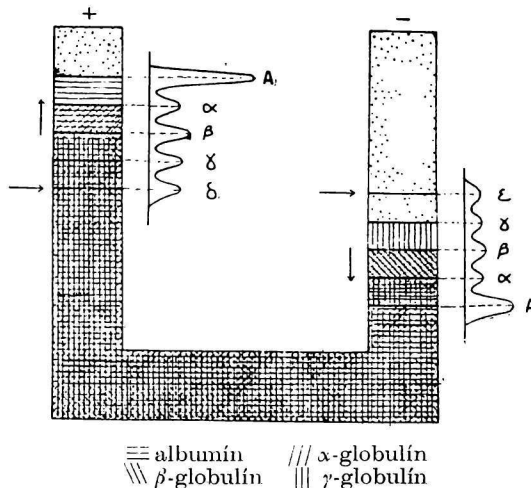
Chromatografiu na papieri možno však i na tomto úseku vhodne použiť ako rýchlu a citlivú metódu. Na vyvíjanie možno použiť organické rozpúšťadlá, avšak rozdeľovací dej, ku ktorému na papieri dochádza, zaiste nie je rozdelením medzi dve navzájom nemiešateľné rozpúšťadlá, ale ide predovšetkým o adsorpciu a významne sa môže uplatňovať i schopnosť papiera ako vymieňača iónov. Obyčajne sa deteguje špecifickými organickými alebo anorganickými činidlami.

Z veľmi častých aplikácií uvádzam stanovenie Pb, Cu, Bi, Cd, Hg alebo As, Sb, Sn, alebo Fe, Al, Cr, ďalej Ni, Mn, Co, Zn, alebo Ca, Sr, Ba, alebo Li, Na, K, ďalej rozličných aniónov atď.; papierová chromatografia týchto látok sa veľmi uplatnila pri analýze rôznych sliatin.

Okrem uvedených prác bolo chromatografii na papieri venovaných niekoľko monografií [148—152] a prehľadných referátov [158, 163, 165, 167, 180, 182—184, 189, 192, 199, 200, 207, 215, 217, 226, 231, 232, 247, 258, 263, 264].

C. Elektroforéza na papieri

O zaradovaní elektroforézy na papieri do skupiny chromatografických metód sú doteraz v literatúre spory. Záleží na tom, čo považujeme za chromatografiu; hoci by podľa definície H. Weila a T. J. Williamsa [40], uvedenej nzačiatka u nášho referátu, elektroforéza na papieri patrila k chromatografickým metódam, stavia sa ešte rad pracovníkov k tomuto bodu záporne. Jednako však takmer všetci autori najnovších monografií a prehľadných referátov zaradujú elektroforézu k týmto metódam. Dôvody, ktoré k tomu vedú, sú väčšinou výlučne praktické: rozhoduje tu najmä použitie papiera ako inertného nosiča a ďalej to, že s výnimkou vyvíjania je ostatná technika (nanášanie, detekcia, kvantita atď.) celkom obdobná chromatografii na papieri. Princíp metódy elektroforézy na papieri je rovnaký ako pri elektroforéze podľa Tiselia: zmesi látok sa oddelujú na základe svojej rôznej pohyblivosti v elektrickom



Obr. 31. Princíp voľnej elektroforézy krvného séra v U-rúrke.

Pri grafickom znázornení sa registruje prvá derivácia indexu lomu svetla. Plocha pod jednotlivými maximami je úmerná koncentrácii príslušnej látky (podľa de Waela [272]).

poli. Pri tejto klasickej *voľnej elektroforéze* [312] máme v rúrke tvaru U roztok látok, z ktorých napr. látka A je záporne nabitá, látka B je nenabitá a látka C je kladne nabitá. Tieto látky nech sú rozpustené v elektrolyte. Do U -rúrky zavedme elektrický prúd tak, aby v jednom ramene bola katóda a v druhom anóda. Záporne nabité čiastočky A potom putujú k anóde, kladne nabité čiastočky C poputujú ku katóde a látka B sa nebude v elektrickom poli pohybovať. Touto voľnou elektroforézou nemožno získať všetky tri zložky v čistej forme, ale môžeme sa tak výhodne presvedčiť o prítomných látkach v roztoku, ak sledujeme ich pohyb na základe indexu lomu; týmto spôsobom možno registrovať rozhranie putujúcich látok (obr. 31). Voľná elektroforéza sa veľmi výhodne využíva pri analýze vysokomolekulových látok, kým pre látky nízkomolekulové je vcelku málo výhodná. Pri hľadaní novej možnosti elektroforézy sa azda najpodstatnejšie uplatnila otázka finančná: prístroje pre voľnú elektroforézu sú veľmi drahé a keďže treba dnes elektroforézu robiť ako bežnú analytickú metódu vo všetkých nemocniciach a klinikách, hľadal sa spôsob, ako zjednodušiť a zlacniť aparátúru. Medzi prvými úspešnými autormi boli Wieland a Fischer [338].

V čom sa javí rozdiel v porovnaní s voľnou elektroforézou a aké má táto metóda výhody a nevýhody? Rozdiel je predovšetkým v tom, že elektroforetická migrácia v U -rúrke bola nahradená migráciou v pevnom médiu, konkrétne vo filtračnom papieri, ktorý je napojený príslušným tlmičom, a ďalej v tom, že kontinuálna optická registrácia priebehom pokusu je nahradená detekciou po skončenej migrácii, ktorá sa nijako nelíši od spôsobu detekcie pri chromatografii na papieri.

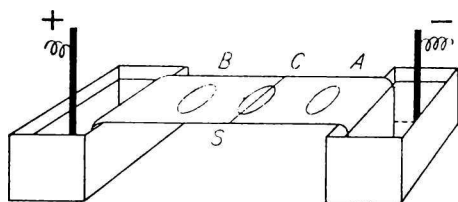
Z výhod elektroforézy na papieri v porovnaní s voľnou elektroforézou treba predovšetkým spomenúť možnosť kompletnej separácie všetkých látok; túto separáciu možno dosiahnuť vystrihnutím škvŕn alebo pásov s oddelenými látkami a ich elúciou, prípadne pre izoláciu väčšieho množstva látok možno použiť elektroforézu kontinuálnu, o ktorej sa zmienime neskoršie. S otázkou kompletnej separácie súvisí možnosť vykonania dvojrozmerovej elektroforézy na papieri, čo sa robí obdobným spôsobom ako pri dvojrozmerovej chromatografii na papieri. Niekedy je ešte výhodnejšia kombinácia papierovej elektroforézy a chromatografie: v jednom smere robíme papierovú elektroforézu a v druhom papierovú chromatografiu. Týmto spôsobom možno oddeliť látky, ktoré pre oddelenie voľnou elektroforézou vôbec neprichádzali do úvahy. Ďalšou výhodou je možnosť oddeľovať nízkomolekulové látky a dokonca možnosť oddeľovať anorganické ióny, čo bolo pri voľnej elektroforéze celkom vylúčené. Konečne poslednou a azda najväčšou výhodou je možnosť analýzy malého kvanta látok: toto množstvo sa obvykle pohybuje v množstvách rádovo 100 až 1000-krát menších, aké treba na voľnú elektroforézu.

Z nevýhod uvedieme niekedy nepríjemnú adsorpciu niektorých makromolekúl na filtračnom papieri, čo zapríčiňuje chvosty a zabraňuje dokonalému oddeleniu zmesi látok. Pokiaľ ide o presnosť kvantitatívneho stanovenia v porovnaní s normálnou voľnou elektroforézou, sám Tiselius [298] vyhlasuje, že je to doteraz sporná otázka.

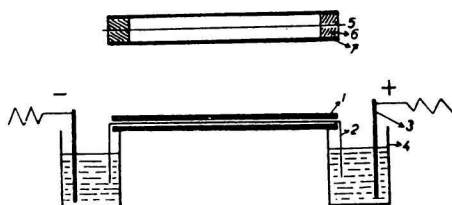
Technika a zariadenie

Prvou fázou elektroforézy na papieri bude opäť výber nosiča — *filtračného papiera*. Mohli by sme o ňom zhruba povedať to isté, čo sme uviedli o chromatografickom papieri, len s tým rozdielom, že pri elektroforéze na papieri máme väčšinou vyššie nároky. Na elektroforetický papier kladieme dve hlavné požiadavky: aby čo možno najmenej adsorboval [310] a aby mal pravidelný povrch, čo je podmienkou pre presné kvantitatívne stanovenie. Z papierov sa najlepšie osvedčuje Whatman 2, Whatman 1 a Schleicher-Schüll 2043 b.

Vzorku nanášame na suchý alebo mokrý papier. Na suchý normálne v prípade látok, ktoré sa suchom nenedaturujú; sú to najmä také látky, ktoré máme rozpustené v organickom rozpúšťadle nemiesateľnom s vodou. Po nanosení papier z obidvoch strán pretiahneme elektrolytom a počkáme, až sa obidve naimpregnované časti spoja, alebo možno štart postriekať tlmivcom z rozprašovača, ktorý používame na detekciu. Pri nanášaní za vlhka pretiahneme papier tlmivcom, nadbytok kvapaliny odsajeme medzi dvoma filtračnými papiermi a nanášame vzorku látky vo vodnom rozpúšťadle. V tomto prípade musí byť



Obr. 32a) Schematické znázornenie papierovej elektroforézy látok *A, B, C* nanesených na štart *S*. Celé toto zariadenie treba priklopiť skleneným zvonom, aby nastalo rušivé odparovanie tlmivca (podľa Haisa [285]).



Obr. 32b) Zariadenie pre elektroforézu na papieri.

Dolu: elektroforéza medzi dvoma sklenenými alebo pertinaxovými doskami.

1. dosky z plastickej látky alebo zo skla,
2. filtračný papier, 3. platínové elektródy,
4. nádoba s elektrolytom.

Hore: dosky 1 sú nahradené vlhkou komôrkou, ktorú tvoria dva obdĺžnikové rámčeky 6, medzi ktorými je umiestený filtračný papier 5. Rámčeky sú z obidvoch strán uzavreté dvoma sklenenými tabuľami 7. Nádoby na elektrolyt a elektródy sú také isté ako v predchádzajúcom prípade.

nanášaná vzorka dost koncentrovaná, aby sme nemuseli naniesť viac ako 20—40 μl ; maximálne možno tak naniesť asi 80 μl . Nanášanie za vlhka sa používa najmä pre látky bielkovinovej povahy. Oproti chromatografii na papieri je výhodnejšie nanášať pás namiesto škvrnky, lebo v tomto prípade býva dokonalejšia separácia.

Papier s nanesenou vzorkou umiestujeme do *aparatury*, kde je obvykle papier zavesený alebo napnutý v atmosfére nasýtenej vodnými parami, alebo je stlačený medzi dvoma doskami (obr. 32). Obidva druhy zariadenia majú svojich obhajcov i odporcov. Výhoda prvej metódy je v tom, že nedochádza k poruchám pohybu oddeľovaných látok na rozhraní elektrolytu a dosák a teda vzniknuté pásy zostávajú ostré. Nevýhodou je možnosť odparovania kvapaliny z papiera (lebo takmer nikdy nedosiahneme dokonalé utesnenie), čo má za následok vysychanie prúžka najmä na prostriedku papiera a nový prítok elektrolytu z elektrolytických nádob. Tento tok skresľuje pohyb pásu. Pri metódach, kde sa používa umiestenie prúžka medzi dve dosky, sú tieto poruchy odparovania eliminované, ale zasa môže dochádzať k povrchovým zjavom na rozhraní medzi elektrolytom a doskou. Ďalšou nevýhodou je možné zahrievanie papiera. Na elimináciu povrchových zjavov sa v prípade použitia sklenených dosiek natiera ich povrch parafínom alebo rôznymi olejmi, čím sa stane nezmáčavým, alebo možno namiesto sklenených dosiek použiť dosky z plastických látok.

Pokiaľ ide o *elektrody a elektródové priestory*, dnes sa pomerne najviac používajú elektródy platinové a okrem toho aj uhlíkové. Hladina elektrolytu musí byť v elektródových nádobkách rovnako vysoká, inak by dochádzalo k pretekaniu z jednej nádoby do druhej. Ďalej sa treba vystríhať toho, aby v priebehu elektroforézy nastala v elektródových nádobkách zmena pH. Najlepšie sa tomu zabráni mostíkovým zariadením. Ako zdroj napätia sa obvykle používa usmerňovač od 100 do 300 V. Inak možno použiť aj anódové batérie. Intenzita prúdu sa riadi použitým potenciálovým spádom, iónovou silou elektrolytu a vlastnosťami a plochou papiera; býva obyčajne niekoľko miliampérov. Na *pohyb* oddeľovaných látok má najväčší vplyv ich pohyblivosť, potenciálový spád a doba. Pohyblivosť látok, ktorú označujeme u , je za ideálnych podmienok vyjadrená výrazom:

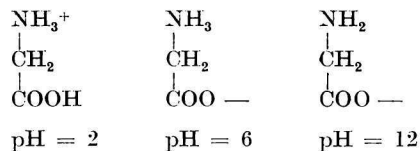
$$u = \frac{Q}{6\pi r \cdot \eta},$$

kde Q znamená náboj, η viskozitu a r je polomer molekuly. Dráha s , ktorú látka prebehne pri elektroforéze, je potom daná výrazom:

$$s = u \cdot (E/l) \cdot t,$$

kde E/l je potenciálový spád, t. j. potenciálový rozdiel vo voltoch na konci elektroferogramu dlhého l cm; t je doba trvania elektroforézy. Pohyblivosť

pri elektroforéze na papieri. vypočítaná z dráhy s , býva menšia ako pohyblivosť pri voľnej elektroforéze. Z vlastností oddeľovaných látok sa najviac uplatňuje ich *náboj*. Čím väčší je náboj, tým rýchlejšie sa častice pohybujú. Pri elektroforéze na papieri najčastejšie prichádza do úvahy oddeľovanie aminokyselín, peptidov a bielkovín, teda látok amfotérneho charakteru. Pri týchto amfotéroch možno náboj meniť zmenou koncentrácie vodíkových iónov. Vezmime si napr. najjednoduchšiu aminokyselinu, glykokol:



V kyslom prostredí disociuje iba amínová skupina a glykokol putuje ako kation. V alkalickej oblasti však bude disociovať karboxyl a glykokol putuje ako anión. Pri pH 6 sa budú disociovať obidve polárne skupiny, takže výsledný náboj bude nulový. Toto pH, keď molekula je prakticky elektroneutrálna, nazývame „izoelektrickým bodom“. Na elektroforéze sa to prejaví tak, že látka zostáva na štarte. Tento izoelektrický bod je dôležitou konštantou pre početné bielkoviny. Pri elektroforéze na papieri máme možnosť pomerne ľahko ho určiť: látku elektroforezujeme pri rôznom pH a vzdialenosť, kam látka doputovala, naniesieme na graf v závislosti od pH. Obyčajne získavame lineárnu závislosť a priamka pretína štart pri pH, ktoré je izoelektrickým bodom oddeľovanej látky.

Pri každom stanovení pohyblivosti látok treba brať do úvahy *prúdenie kvapalín*. Zistilo sa, že môže byť zapríčinené odparovaním alebo nerovnakou výškou hladiny v elektródových nádobkách; ďalej sa ešte môže uplatňovať elektroendoosmóza, zjav, pri ktorom elektricky neutrálna kvapalina putuje v elektrickom poli. Pri elektroforéze na papieri je totiž sama celulóza nabitá záporne a tak sa elektrolyt voči nej nabíja kladne a putuje ku katóde. Tento pohyb býva niekedy dosť výrazný a možno ho zisťovať elektroforézou nejakej nenabitej častice. Pre tento účel je vhodný dextran; možno použiť aj glukózu pri kyslom pH a kreatinín pri alkalickej pH. Škrvny týchto látok potom predstavujú vlastný štart, od ktorého treba počítať pohyblivosť.

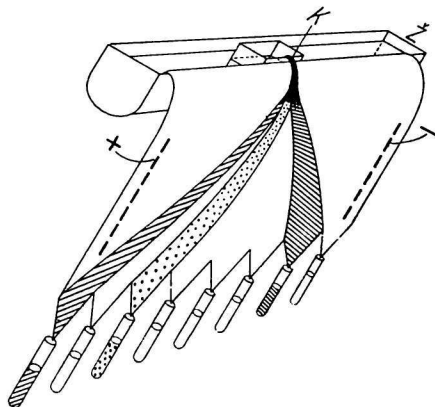
Elektrolyt volíme obyčajne taký, aby oddeľované látky boli v ňom dobre rozpustné a dobre disociované. Molarita tlmieča sa obvykle volí 0,025 až 0,1; čím je nižšia, tým väčšia býva pohyblivosť, ale tým ľahšie dochádza k poruchám spôsobeným iónmi samotnej vzorky. Pre oddeľovanie bielkovín sa najviac používa veronalový tlmieč o pH = 8,6.

Detekcia je celkom obdobná detekcii používanej pri chromatografii na papieri. Iba pre odkrývanie bielkovín bola vypracovaná nová metóda. Využíva

sa tu ich afinita k rozličným organickým farbivám, najčastejšie k brómfenolovej modrej. Vyfarbovanie sa deje tak, že bielkoviny najprv fixujeme na celulózové vlákno varom alebo lepšie ťažkými kovmi, obyčajne sublimátom, a potom celý prúžok papiera ofarbíme príslušným farbivom. Nato papier odfarbíme obvykle zriedeným roztokom kyseliny octovej, takže dostaneme žlté škvrny na bielom pozadí. Pre lepšiu viditeľnosť škvŕn možno elektroferogram vystaviť účinku pár amoniaku, čím žlté zafarbenie brómfenolovej modrej prechádza do modra.

Aj pri *kvantite* možno postupovať tak, ako sme o nej hovorili pri chromatografii na papieri. Najpoužívanjšou je elúcia farbiva jednotlivých prúžkov z papiera a fotometrické premeranie získaného roztoku, alebo fotometrické premeriavanie odfarbeného papiera, ktorý sa spriesvitní napr. parafínovým olejom, čo je rýchlejšie. Toto premeriavanie transparenencie, o ktorom sme sa zmienili v kapitole o chromatografii na papieri, možno zmechanizovať napr. použitím mechanickej časti polarografu: pohyb papiera sa v tomto prípade skoreluje s otáčaním bubna, kde je navinutý polarografický fotografický papier, takže dostávame krivku priamo na fotografickom papieri.

Úspechy elektroforézy na papieri ako analytickej metódy viedli rad autorov k prepracovaniu tejto metódy pre *preparáciu*. Z týchto metód uvádzame tri najdôležitejšie:

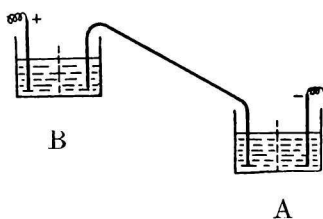


Obr. 33. Schematické znázornenie plynulého oddeľovania zmesi troch látok kombináciou toku elektrolytu v smere kolmom na smer elektrického prúdu. Ž — žliabok, K — papierový knôt, ktorým sa nasáva zmes oddeľovaných látok (podľa Haisa [285]).

1. Papier sa zavesí podobne ako pri dvojrozmerovej chromatografii horným koncom do žliabku s elektrolytom (obr. 33). V tomto žliabku alebo nad ním je oddelene umiestená nádobka s roztokom oddeľovanej látky a tá je spojená (papierovým knôtom) so stredom horného okraja filtračného papiera. Po okra-

joch papiera sú našíte platinové elektródy. Kvapalina s oddelovanými látkami putuje dolu po papieri a častice pri tom putujú podľa svojho náboja vejárovite na stranu. Papier má na dolnom okraji vystrihnuté zuby, pod ktoré sú podstavené nádoby, do ktorých sa zachytávajú jednotlivé oddelené frakcie. Podmienkou úspešného oddelenia je dôkladné utesnenie nádoby, v ktorej sa tento typ elektroforézy deje [274].

2. Druhým typom je kontinuitná elektroforéza, ktorú u nás nedávno navrhol Dvořák a spol. [276]. Jej princíp je zrejmý z obr. 34. Nádoby s elektrolytom



Obr. 34. Schematické znázornenie kontinuitnej elektroforézy podľa Dvořáka a spol. [276]. (Hais [285].)

sa umiestia do rôznej výšky. V nádobke *A*, ktorá je umiestená nižšie, je roztok látky, ktorú chceme oddeliť. V nádobke *B* je čistý elektrolyt. Papier je umiestený pod sklom, ktoré sa chladí vodným chladičom. Rôzna výška hladín spôsobuje prúdenie elektrolytu z nádoby *B* do nádoby *A*. Máme napr. oddeliť roztok látok kladne nabitých; v tomto prípade umiestime katódu do nádoby *B*. Pri danom experimentálnom usporiadaní sa vytvoria na papieri priečne pásy a do nádoby *B* môže putovať iba tá látka, ktorá má

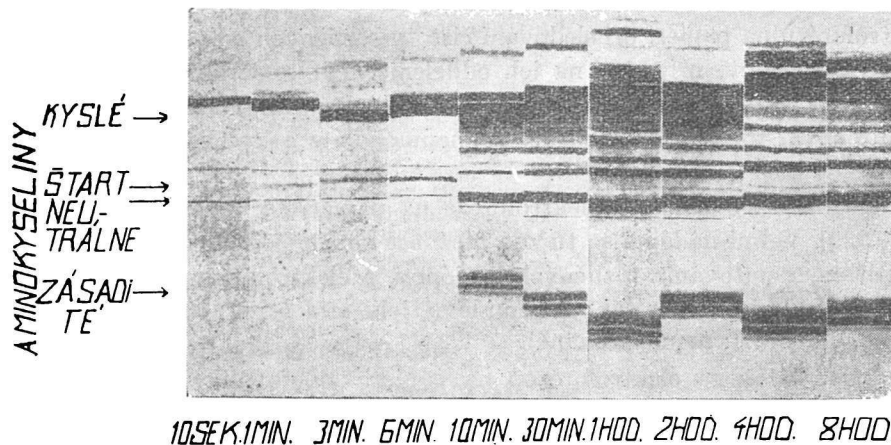
náboj taký veľký, že prekonáva prúdenie kvapaliny, ktoré ju strhuje naspäť. Ak nám táto látka preputovala z nádoby *A* do nádoby *B*, môžeme alebo zvýšiť napätie, alebo znížiť nádobku *B*, takže v nádobke *B* môžeme zachytávať aj látku s menším nábojom. Táto metóda, ako sa zdá, bude mať obrovský význam pre preparatívne oddelovanie látok. Zatiaľ nebola ešte celkom prepracovaná a bola publikovaná iba v predbežnom oznámení.

3. Posledným typom sú stĺpcové metódy [312], pri ktorých prúžok filtračného papiera nahradzujeme stĺpcom rozpráškovanej celulózy, stohmi filtračného papiera (chromatopile) alebo niekoľkými vrstvami hrubého filtračného papiera, čo je analogické chromatografii na stĺpcoch práškovitej celulózy.

Aplikácia

Aminokyseliny a peptidy Pri analýze aminokyselín dávame prednosť chromatografii na papieri; pri bohatšej zmesi aminokyselín môže však elektroforéza na papieri chromatografiu vhodne doplniť. Významne sa uplatňuje ako rýchla metóda na dôkaz prítomnosti kyslých, zásaditých alebo neutrálnych aminokyselín. Elektroforéza na papieri sa viac uplatňuje [292, 293, 330] pri oddelovaní peptidov (obr. 35).

Bielkoviny Tieto látky sa oddelujú elektroforeticky najčastejšie, pretože s výnimkou voľnej elektroforézy neexistuje pre ne nijaká iná natoľko vhodná



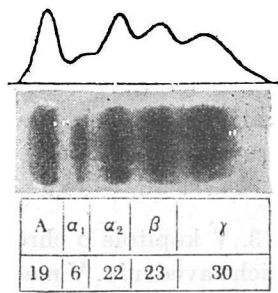
10SEK. 1MIN. 3MIN. 5MIN. 10MIN. 30MIN. 1HOD. 2HOD. 4HOD. 8HOD.

Obr. 35. Sledovanie syntézy bielkovín v bunkách kvasiniek po podaní acetátu so značkovacím karboxydom ^{14}C elektroforézou na papieri. Aminokyseliny a peptidy sa detegovali rádioautograficky (podľa Turbu a Essera [330]).

metóda. Najviac sa táto metóda rozšírila v lekárskej diagnostike, kde sa na patologický stav usudzuje podľa tzv. bielkovinového spektra, čo je kvantitatívne vyjadrený pomer albumínov k α , β a γ -globulínom. Ako elektrolyt sa takmer výlučne používa veronalový tlmáč o pH asi 8,6. Jednotlivé bielkovinové frakcie sa po skončenej elektroforéze vyfarbujú brómfenolovou modrou a kvantita in situ [300, 331] sa robí obvykle automatickou registráciou [320] (obr. 36), alebo sa robí po elúcii, keď sa v eluátoch stanovuje dusík kjeldahlizáciou, prípadne sa použije polarografia [288, 289].

Okrem uvedených bielkovín sa analyzovali lipoidné látky v sére [275, 278], bielkoviny v cerebrospinálnom likvore [323], rôzne enzýmy (pepsín [286], cytochróm C [321], amylázy [316, 335], trypsín [316, 335] a pankreatické proteolytické enzýmy trypsín, chymotrypsín a elastázy [318], proteohormóny (najmä *ACTH* [303, 305, 306], choriogonadotropín [269], hormóny predného laloku hypofýzy [307] a i. [297]) a napokon uroproteíny [302, 328].

Cukry Cukorné zásady a kyseliny možno elektroforeticky oddeliť od neutrálnych cukrov; pre neutrálne cukry sa využíva ich tvorba boritanových komplexov [270, 314], ktoré potom sú negatívne nabité. Pri oddelovaní cukrov však dávame prednosť metódam chromatografickým. Výhodnejšie je použiť



Obr. 36. Papierový elektroferogram séra nefrotika podľa Lohssa a spol. [302].

V normálnom sére sú albumíny (A) omnoho vyššie, kým globulíny, najmä α_2 , sú nižšie.

elektroforézu na papieri pri sledovaní čistoty rozličných polysacharidov a mukopolysacharidov, prípadne na ich oddelenie. Týmto látkam sa doteraz venovalo len veľmi málo prác: oddeľovali sa iba heparín, chondroitín, kyselina hyalurónová, rôzne polysacharidy z pneumokokov a kyselina alginová [322, [324].

Anorganické látky Elektroforéze na papieri sa venovalo viacej prác [301, 329]. Veľmi nádejná sa tu zdá možnosť použiť komplexony, ktoré môžu obrátiť smer putovania rozličných kationov, a elektroforézu možno teda využiť napr. na zisťovanie náboja komplexu, jeho stálosti pri rôznom pH a pod. (Macek, Přebil; nepublikované).

Z iných látok sa elektroforézou na papieri oddeľovali vitamíny (najviac prác sa tu venovalo vitamínu B_{12} [277, 287]), organické kyseliny [314] a zásady (málo prác sa zatiaľ venovalo štúdiu alkaloidov [213, 283, 336]), zložky nukleínových kyselín [309] a i.

Niekoľko referátov sa venovalo technike elektroforézy na papieri [271—273, 279—281, 284, 285, 290, 295, 296, 298, 299, 304, 308, 311—313, 318, 332, 333] a klinickému použitiu [282, 291, 294, 315, 317, 319, 320, 325—327, 334, 335, 337].

MUDr. I. M. Haisovi ďakujem za prečítanie a prediskutovanie celého referátu.

Súhrn

1. Autor podáva prehľad všetkých typov chromatografických metód a elektroforézy na papieri.

2. V kapitole o stĺpcovej chromatografii podrobnejšie rozoberá chromatografiu adsorpčnú, rozdeľovaciu a výmeny iónov; pri jednotlivých typoch sa stručne zmieňuje o teoretických základoch chromatografie, dôkladnejšie preberá časť metodickú a poukazuje na najdôležitejšie aplikácie.

3. V kapitole o chromatografii na papieri sa preberajú pokusy, ktoré viedli k ich zavedeniu. V metodickej časti sa prediskutovala otázka vhodného papiera pre chromatografiu, zariadenia, spôsobu vyvíjania, detekcie a kvalitatívneho i kvantitatívneho hodnotenia chromatogramu. Z aplikácií sa venovalo najviac miestu aminokyselinám, cukrom, organickým kyselinám a steroidom.

4. Záverom podáva autor prehľad o najdôležitejších technikách elektroforézy na papieri s niektorými príkladmi použitia.

LITERATÚRA*

1. Sborník *Chromatografie*, Praha 1952.
2. *Chromatographic Analysis*, Discussions of the Faraday Society, č. 7 (1949).
3. Asatiani V. S., *Uspechi chim.* 22, 291 (1953).
4. Beyer E., *Arch. Pharm.* 285, 129 (1952).
5. Kirk P. L., Duggan E. L., *Anal. Chem.* 24, 124 (1952).
6. Moore S., Stein W. H., *Ann. Rev. Biochem.* 21, 521 (1952).
7. Partridge M. W., *J. Pharm. Pharmacol.* 4, 217 (1952).
8. Samsonov G. B., *Priroda*, č. 6, 3 (1953).
9. Stein W. H., Moore S., *Sci. American* 184, 35 (1951).
10. Strain H. H., *Anal. Chem.* 22, 41 (1950).
11. Strain H. H., *Anal. Chem.* 23, 25 (1951).
12. Strain H. H., Murphy G. W., *Anal. Chem.* 24, 50 (1952).
13. Tiselius A., *Endeavour* 11, 5 (1952).
14. Williams T. I., *Discovery* 1953, 53.
15. Williams T. I., Weil H., *Arkiv kemi* 5, 283 (1953).
16. Cassidy H., *Adsorption and Chromatography*, New York 1951.
17. Lederer E., *Progrés Récents de la Chromatographie*, Paris 1949.
18. Strain H. H., *Chromatographic Adsorption Analysis*, New York 1945 (2. vyd.).
19. Williams T. I., *An Introduction to Chromatography*, London 1946.
20. Zechmeister L., Cholnoky L. v., *Die chromatographische Adsorptionsmethode*, Berlin 1938 (2. vyd.).
21. Zechmeister L., *Progress in Chromatography 1938–1947*, London 1950.
22. Cvet M. S., *Adsorpciionnyj chromatografičeskij analiz*, Moskva 1946.
23. Cvet M. S., *Trudy Varšavskogo obščestva jestestvospytat.*, Otd. biologii 14, 20 (1903); cit. Kostojanc a Kalmykov[29].
24. Brockmann H., Beyer E., *Angew. Chem.* 63, 133 (1951).
25. Brockmann H., Schodder H., *Ber.* 74, 73 (1941).
26. Brockmann H., Volpers F., *Chem. Ber.* 82, 95 (1949).
27. Drake B., *Nature* 160, 602 (1947).
28. Hanč O., *Chem. listy* 37, 258, 290 (1943); 38, 22 (1944).
29. Kostojanc C. S., Kalmykov K. F., *Biochimija* 16, 479 (1951).
30. Košťír J. V., *Čas. čes. lékárnictva* 20, 227, 246 (1940).
31. Košťír J. V., *Chemie* 3, 144, 163, 188, 197 (1947).
32. Macek K., *Čs. farmacie* 1, 657 (1952).
33. Reichstein T., Shoppee C. W., *Disc. Faraday Soc.* 7, 305 (1949).
34. Tiselius A., Hagdahl L., *Acta Chem. Scand.* 4, 394 (1950).
35. Trappe W., *Biochem. Z.* 305, 150 (1940).
36. Ulman M., *Die Pharmazie* 7, 787, 791 (1952).
37. Weil H., Williams T. I., *Nature* 166, 1000 (1950).
38. Weil H., Williams T. I., *Research* 6, 16 (1953).
39. Williams T. I., *Research* 1, 400 (1948).
40. Williams T. I., Weil H., *Nature* 176, 503 (1952).
41. Ylstra J., *Chem. Weekblad* 48, 1 (1952).
42. Zechmeister L., *Nature* 167, 405 (1951).
43. Zechmeister L., Rohdewald M., *Fortschr. Chem. org. Naturstoffe* 8, 341 (1951).
44. Boggs L. A. a spol., *Anal. Chem.* 24, 1148 (1952).
45. Boldingh J., *Recueil* 69, 247 (1950).
46. Bulen W. A. a spol., *Anal. Chem.* 24, 187 (1952).
47. Butt W. R. a spol., *Biochem. J.* 49, 434 (1951).
48. Crook E. M., Datta S. P., *Chem. Ind.* 1951, 718.
49. Dodgson K. J., *Biochem. J.* 46, XX iii (1950).
50. Drew F. D. a spol., *J. Amer. Chem. Soc.* 74, 1852 (1952).

* Priebehom tlače vyšli ešte ďalšie knihy: Brimley R. C., Barret F. C., *Practical Chromatography*, London 1953. Lederer E., Lederer M., *Chromatography, a Review of Principles and Applications*, Amsterdam 1953. Pollard F. H., McOmie J. F. W., *Chromatographic Methods of Inorganic Analysis*, London 1953. Račinskij V. V., Gapon T. B., *Chromatografija v biologii*, Moskva 1953.

51. Edman P., Acta Chem. Scand. 2, 592 (1948).
52. Eidsden S. R., Biochem. J. 40, 252 (1946).
53. Evans W. C., Partridge M. W., J. Pharm. Pharmacol. 4, 769 (1952).
54. Fairbairn D., Harpur R. P., Nature 166, 789 (1950).
55. Fajkoš F., Chem. listy 47, 630 (1953).
56. Fuks N. A., Uspechi chim. 17, 45 (1948).
57. Gilson, Chem. Ind. 1951, 185.
58. Gordon A. H. a spol., Biochem. J. 37, 79 (1943).
59. Gordon A. H. a spol., Biochem. J. 38, 65 (1944).
60. Hais I. M. a spol., Čas. čes. lékařnictva 58, 29 (1945).
61. Henry R., Thevenet M., Bull. Soc. Chim. Biol. 34, 839 (1952).
62. Holley A. D., Holley R. W., Anal. Chem. 24, 216 (1952).
63. Hough L. a spol., Nature 162, 448 (1948).
64. Hough L. a spol., J. Chem. Soc. 1949, 2511.
65. Howard G. A., Martin A. J. P., Biochem. J. 46, 532 (1950).
66. Chapon L., Bull. Soc. Chim. France 1952, 538.
67. Jensen R., Acta Chem. Scand. 6, 771 (1952).
68. Jones J. K. N., Stich S. R., Biochem. J. 53, 679 (1953).
69. Knessl O. a spol., Chem listy 45, 145 (1951).
70. Košťiř J. V., Chem. listy 42, 115 (1948).
71. Kretovič V. L. a spol., Doklady AN SSSR 80, 409 (1951).
72. Lens J., Evertzen A., Rec. trav. chim. 71, 43 (1952).
73. Lucas J., Orten J. M., J. Biol. Chem. 191, 287 (1951).
74. Marshall L. M. a spol., Anal. Chem. 24, 773 (1952).
75. Martin A. J. P., Ann. Rev. Biochemistry 19, 517 (1950).
76. Martin A. J. P., Porter R. R., Biochem. J. 49, 215 (1951).
77. Martin A. J. P. Syngge R. L. M., Biochem. J. 35, 91, 1358 (1941).
78. Martin A. J. P., Syngge R. L. M., Biochem. J. 37, 522 (1943).
79. Marvel C. S., Rands R. D., J. Amer. Chem. Soc. 72, 2642 (1950).
80. Mitchell H. K. a spol., J. Biol. Chem. 180, 1071 (1949).
81. Moore S., Stein W. H., J. Biol. Chem. 178, 53 (1949).
82. Nyc J. F. a spol., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 77, 466 (1951).
83. Phares E. F. a spol., Anal. Chem. 24, 660 (1952).
84. Sanger F., Biochem. J. 39, 507 (1945).
85. Sanger F., Biochem. J. 45, 563 (1949).
86. Schwimmer S., Nature 171, 442 (1953).
87. Smrž R., Chem. zvesti 7, 197 (1953).
88. Stein W. H., Moore S., J. Biol. Chem. 176, 337 (1948).
89. Syngge R. L. M., Biochem. J. 38, 285 (1944).
90. Syngge R. L. M., Analyst 71, 256 (1946).
91. Syngge R. L. M., Biochem. J. 43, 429 (1951).
92. Williams R. T., Syngge R. L. M., *Partition Chromatography*, Biochemical Society Symposia, No. 3, Cambridge 1950.
93. Williams T. I., Anal. Chem. Acta 2, 635 (1948).
94. Busch H. a spol., J. Biol. Chem. 196, 717 (1952).
95. Cannan R. K., Ann. N. Y. Acad. Sci. 47, 135 (1946).
96. Carsten M. E., J. Amer. Chem. Soc. 74, 5954 (1952).
97. Carsten M. E., Cannan R. K., J. Amer. Chem. Soc. 74, 5950 (1952).
98. Cohn W. E., Science 109, 377 (1949); J. Amer. Chem. Soc. 71, 2275 (1949); J. Amer. Chem. Soc. 72, 1471 (1950).
99. Conden R. a spol., Biochem. J. 42, 443 (1948).
100. Davies C. W., Research 3, 447 (1950).
101. Dickel G., Titzmann K., Angew. Chem. 63, 450 (1951).
102. Dixon H. B. F. a spol., Nature 168, 1044 (1951).
103. Duncan J. F., Nature 169, 22 (1952).
104. Fitch F. T., Russel D. S., Canad. J. Chem. 29, 363 (1951).
105. Gardell S., Acta Chem. Scand. 7, 207 (1953).
106. Hirs C. H. W. a spol., J. Biol. Chem. 195, 669 (1952).
107. Hirs C. H. W. a spol., J. Biol. Chem. 200, 493 (1953).
108. Huffman E. a spol., J. Amer. Chem. Soc. 72, 3323 (1950).

109. Huffman E. a spol., *J. Amer. Chem. Soc.* 73, 4474 (1951).
110. Hutchins H. H., Christian J. E., *J. Amer. Pharm. Assoc.* 42, 310 (1953).
111. Jindra A., *Čas. čes. lékárnictva* 5, 253 (1949).
112. Jindra A., *J. Pharm. Pharmacol.* 1, 87 (1949).
113. Jindra A., Motl O., *Čs. farmacie* 1, 632 (1952).
114. Jindra A., Pohorský J., *Čas. čes. lékárnictva* 63, 57 (1950).
115. Jindra A., Pohorský J., *J. Pharm. Pharmacol.* 2, 361 (1950); 344 (1951).
116. Jindra A., Rentz J., *Čs. farmacie* 1, 625 (1952).
117. Jindra A., Rentz J., *J. Pharm. Pharmacol.* 4, 645 (1952).
118. Khym J. X., Zill L. P., *J. Amer. Chem. Soc.* 73, 2399 (1951); 74, 2090 (1952).
119. Kressman T. R. E., *Manufact. Chemist* 23, 194 (1952).
120. Kunin R., *Anal. Chem.* 24, 64 (1952).
121. Kunin R., Myers R. J., *Ion Exchange Resins*, New York 1951.
122. Mikeš O., *Chemie* 7, 104 (1951).
123. Moore S., Stein W. H., *J. Biol. Chem.* 192, 663 (1951).
124. Motl O., *Čs. farmacie* 1, 630 (1952).
125. Nachod F. C., *Ion Exchange Theory and Application*, New York 1949.
126. Neilands J. B., Aksson A., *J. Biol. Chem.* 188, 307 (1951).
127. Osborn G. H., *Analyst* 78, 220 (1953).
128. Osborn G. H., *Analyst* 78, 221 (1953).
129. Paléus S., Neilands J. B., *Acta Chem. Scand.* 4, 1024 (1950).
130. Partridge S. M., *Disc. Faraday Soc.*, č. 7, 296 (1949).
131. Partridge S. M., *Biochem. J.* 44, 521 (1949); 45, 459 (1949).
132. Partridge S. M., *Analyst* 77, 955 (1953).
133. Partridge S. M., Brimley R. C., *Biochem. J.* 51, 628 (1952).
134. Partridge S. M., Westall R. G., *Biochem. J.* 44, 418 (1949).
135. Partridge S. M. a spol., *Biochem. J.* 46, 334 (1950).
136. Rasmussen H. a spol., *J. Pharm. Pharmacol.* 4, 566 (1952).
137. Řehoř J., *Matematicko-přírodov. rozhledy* 32, 135 (1953).
138. Sober H. A. a spol., *J. Amer. Chem. Soc.* 74, 2734 (1952).
139. Spedding F. H., *Disc. Faraday Soc.*, č. 7, 214 (1949).
140. Steele R., Celozzi E., *J. Biol. Chem.* 198, 237 (1952).
141. Šmíd J., *Chem. průmysl* 2, 141 (1952).
142. Šmíd J., *Chem. průmysl* 3, 348 (1953).
143. Šmíd J., Rádl V., *Chem. průmysl* 3, 179 (1953).
144. Tallan H. H., Stein W. H., *J. Biol. Chem.* 200, 506 (1953).
145. Tomko J., *Chem. zvesti* 6, 361 (1952).
146. Wall J. S., *Anal. Chem.* 25, 950 (1953).
147. Woolf L. I., *Nature* 171, 841 (1953).
148. Balston J. N. a spol.: *A Guide to Filter Paper and Cellulose Powder Chromatography*, London 1952.
149. Block R. J. a spol., *Paper Chromatography, a Laboratory Manual*, New York 1952.
150. Cramer F., *Papierchromatographie*, Weinheim 1953 (2. vyd.).
151. Hais I. M., Macek K. (red.), *Papírová chromatografie*, Praha 1954 (v tlači).
152. Lederer M., *Progrès récents de la chromatographie. 2. Chimie minérale*, Paris 1949.
153. Asselineau J., *Bull. Soc. Chim. France* 1952, 884.
154. Bánhidi Z. G., Ericson L. E., *Acta Chem. Scand.* 7, 713 (1953).
155. Bate-Smith F. C., Westall R. G., *Biochim. biophys. Acta* 4, 427 (1950).
156. Bayly R. J., Bourne E. J., *Nature* 171, 385 (1953).
157. Berg A. M., *Chromatographische Scheidung der Moederkoornalkaloiden een praktische Toepassing Daarvan* (dizertácia), Utrecht 1953.
158. Bösward J., Jindra A., *Čs. farmacie* 1, 667 (1952).
159. Bouissières G., Lederer M., *Bull. Soc. Chim. France* 1952, 904.
160. Boulanger P., Biserte G., *Bull. Soc. Chim. France* 1952, 830.
161. Boulanger P., Montreuil J., *Bull. Soc. Chim. France* 1952, 844.
162. Bryant F., Overell B. T., *Biochem. biophys. Acta* 10, 471 (1953).
163. Clegg D. L., *Anal. Chem.* 22, 48 (1950).
164. Conden R. a spol., *Biochem. J.* 38, 224 (1944).
165. Conden R., *Nature* 162, 359 (1948).
166. Cramer F., *Angew. Chem.* 62, 73 (1950).
167. Decker P., *Pharmazie* 8, 371, 477 (1953).

- 168 a) Dent C. E., *Biochem. Soc. Symposia*, č. 3, 34 (1950).
 168 b) Dedonder R., *Bull. Soc. Chim. France 1952*, 874.
 169. El Hawary M. F. S., Thompson R. H. S., *Biochem. J.* 53, 340 (1953).
 170. Fisher R. B. a spol., *Nature 161*, 764 (1948).
 171. Franc Z., Hais I. M., *Chem. listy* (v tlači).
 172. Fromageot C. a spol., *Biochim. biophys. Acta 6*, 283 (1950).
 173. Franklin A. E. a spol., *Nature 168*, 687 (1951).
 174. Fučík K., Procházka Ž., *Chem. listy 44*, 165 (1950).
 175. Giddey C., *Schweiz. med. Wochenschr.* 83, č. 14 (1953).
 176. Giri K. V., Rao N. A. N., *J. Indian Inst. Sci.* 34, 95 (1952).
 177. Giri K. V. Nigam V. N., *Naturwissenschaften 40*, 343 (1953).
 178. Giri K. V. a spol., *J. Indian Inst. Sci.* 34, 209 (1952).
 179. Giri K. V., *J. Indian Inst. Sci.* 35, 145 (1953).
 180. Gordon A. H., *Angew. Chem.* 61, 367 (1949).
 181. Grüne A., *Literaturzusammenstellung über Papierchromatographie I. II*, Schleicher-Schüll, Dassel 1950—1951.
 182. Hais I. M., *Chemie 4*, 145 (1948).
 183. Hais I. M., *Chem. listy 42*, 125 (1948).
 184. Hais I. M., *Čas. lékařů čes.* 83, 172 (1949).
 185. Hais I. M., *Chemie 6*, 222 (1950).
 186. Hais I. M., *Chemie 7*, 173 (1951).
 187. Hais I. M., *Chem listy 45*, 76 (1951).
 188. Hais I. M., *Čs. farmacie 1*, 681 (1952).
 189. Hais I. M., Rábek V., *Chem. listy 43*, 80 (1949); *Čas. čes. lékařů.* 63, 340 (1950).
 190. Hais I. M., Horešovský O., *Chem. listy* (v tlači).
 191. Hashimoto Y., Mori I., *Nature 170*, 1024 (1952).
 192. Iwainusky H., *Pharmazie 8*, 125 (1953).
 193. Isherwood F. A., Jermyn M. A., *Biochem. J.* 48, 515 (1951).
 194. Jakubec I., *Čs. farmacie 1*, 43 (1952).
 195. Jones T. S. G., *Disc. Faraday Soc.*, č. 7, 285 (1949).
 196. Jirgensons B., *Univ. Texas Publ.*, č. 5109, 56 (1951).
 197. Jutisz M., *Bull. Soc. Chim. France 1952*, 821.
 198. Keil B. a spol., *Chem listy 46*, 167, 457 (1952).
 199. Kirby-Berry H., Cain L., *Univ. Texas Publ.*, č. 5109, 71 (1951).
 200. Kirby-Berry H. a spol., *Univ. Texas Publ.*, č. 5109, 22 (1951).
 201. Konop R., *Papír a celuloza 7*, 118 (1952).
 202. Kopoldová J., *Čas. lékařů čes.* 89, 416 (1950).
 203. Košťál J. V., Rábek V., *Biochim. biophys. Acta 5*, 210 (1950).
 204. Košťál J. V., Slavík K., *Chem listy 44*, 17 (1950).
 205. Kritchevsky D., Kirk M. R., *Arch. Biochem. Biophys.* 35, 346 (1952).
 206. Kraft D., *Pharmazie 8*, 251 (1953).
 207. Lederer E., *Bull. Soc. Chim. France 1952*, 816.
 208. Liesegang R. E., *Naturwissenschaften 31*, 348 (1943).
 209. Lissitzky S., Michel R., *Bull. Soc. Chim. France 1952*, 891.
 210. Lüderitz O., Westphal O., *Z. Naturforsch.* 7b, 136 (1952).
 211. Macek K., *Chem. listy 47*, 467 (1953); *Chem. Technik 6*, 41 (1954).
 212. Macek K., Tadra M., *Chem. listy 46*, 450 (1952).
 213 a) Macek K., Trčka V., *Čs. farmacie 3*, 74 (1954).
 213 b) Macek K., Hamsík M., *Umění 2*, 58 (1954).
 213 c) Macek K., *Die Pharmazie 9* (v tlači).
 214. McFarren E. F., *Anal. Chem.* 23, 168 (1951).
 215. Martin A. J. P., *Endeavour 6*, 21 (1947).
 216. Martin A. J. P., *Biochem. Soc. Symposia*, č. 3, 4 (1950).
 217. Mikeš O., *Chemie 7*, 170 (1951).
 218. Munier R., *Bull. Soc. Chim. France 1952*, 852.
 219. Neher R., Wettstein A., *Helv. Chim. Acta 35*, 276 (1952).
 220. Nosek J. J., Krestýnová O., *Chemie 7*, 64 (1951).
 221. Oparin A. I., Bardinskaja M. S., *Doklady AN SSSR 89*, 531 (1953).
 222. Partridge S. M., *Nature 164*, 443 (1949).
 223. Partridge S. M., *Biochem. J.* 42, 238, 251 (1948).

224. Partridge S. M., *Biochem. Soc. Symposia* 3, 52 (1950).
225. Pollard F. H., McOmie J. F. W. *Endeavour* 10, 213 (1951).
226. Procházka Ž., *Chemie* 6, 201 (1950).
227. Procházka Ž., *Chemie* 6, 181 (1950).
228. Procházka Ž., *Čs. farmacie* 2, 17 (1953).
229. Procházka Ž., *Chem. listy* 47, 718 (1953).
230. Procházka Ž., Kořistek S., *Chem. listy* 45, 274, 415 (1951).
231. Rábek V., *Papírová chromatografie* (O. Hanč, *Chem. labor. příručka*, Praha 1951).
232. Račinskij V. V. *Uspechi chim.* 19, 445 (1950).
233. Račinskij V. V., Knjazjatova E. I., *Doklady AN SSSR* 85, 1119 (1952).
234. Račinskij V. V. a spol., *Biochimija* 17, 551 (1952).
235. Rockland L. B. a spol., *Science* 109, 539 (1949).
236. Rockland L. B. a spol., *Anal. Chem.* 23, 1142 (1951).
237. Rutter L., *Nature* 161, 435 (1948).
238. Sanger F., *Biochem. Soc. Symposia* 3, 21 (1950).
239. Sanger F., *Adv. Prot. Chem.* 7, 1 (1952).
240. Sanger F., Thompson E. O. P., *Biochem. J.* 53, 353, 366 (1953).
241. Savard K., *J. Biol. Chem.* 202, 457 (1953).
242. Shull G. M. a spol., *Arch. Biochem. Biophys.* 37, 186 (1952).
243. Schute J. B., *Pharm. Weekblad* 86, 201 (1951).
244. Schute J. B., *Mededelingen van de Vlaamse Chem. Ver.* 15, 1 (1953).
245. Spiteri J., Nunez G., 234, *C.R.* 2603 (1952); Koblík V., *Chem. listy* (v tlači).
246. Synge R. L. M., *Biochem. J.* 39, 363 (1945).
247. Synge R. L. M., *Chem. Ind.* 1950, 339.
248. Šamraj E. F. a spol., *Biochimija* 16, 604 (1951).
249. Školník R. Ja., *Doklady AN SSSR* 90, 847 (1953).
250. Šorm F., Keil B., *Chem. listy* 45, 278 (1951).
251. Šorm F., Šormová Z., *Chem. listy* 45, 215 (1951).
252. Vaček J. a spol., *Čs. farmacie* 2, 185 (1953).
253. Vavruch I., *Listy cukrov.* 66, 299 (1950).
254. Vavruch I., *Listy cukrov.* 67, 87, 211 (1951).
255. Virtanen A. J. a spol., *Acta. Chem. Scand.* 7, 38 (1953).
256. Wagner G., *Arch. Pharm.* 285, 409 (1952).
257. Wieland T., *Angew. Chem.* 60, 313 (1948).
258. Wieland T., *Angew. Chem.* 60, 386 (1950).
259. Winsten W. A., Eigen F., *J. Biol. Chem.* 177, 989 (1949); 181, 109 (1949); 184, 155 (1950).
260. Winteringham E. P. W. a spol., *Analyst* 77, 19 (1952).
261. Woodruff H. B., Foster J. C., *J. Biol. Chem.* 183, 569 (1950).
262. Weil H., Williams T. J., *Naturwissenschaften* 40, 1 (1953).
263. Ylstra J., *Chem. Weekblad* 49, 1 (1953).
264. Ylstra J., *Chem. Weekblad* 49, 316 (1953).
265. Zbudovská O., Hais I. M., *Chem. listy* 46, 307 (1952).
266. Zaffaroni A., Burton R. B., *J. Biol. Chem.* 193, 749 (1951).
267. Zimmermann G., *Z. anal. Chem.* 138, 21 (1953).
268. Zimmermann G., Kludas K. H., *Chem. Technik* 5, 203 (1953).
269. Butt W. R., Deriaz R. E., *Biochem. J.* 54, XXXV iii (1953).
270. Conden R., Stanier W. M., *Nature* 169, 783 (1952).
271. Cremer H. D., Tiselius A., *Biochem. Z.* 320, 273 (1950).
272. De Wael J., *Chem. Weekblad* 49, 229 (1953).
273. Durrum E. L., *J. Amer. Chem. Soc.* 72, 2943 (1950).
274. Durrum E. L., *J. Amer. Chem. Soc.* 73, 4875 (1951).
275. Durrum E. L. a spol., *Science* 116, 428 (1952).
276. Dvořák J. a spol., *Chem. listy* 47, 899 (1953).
277. Ericson L. E. a spol., *Acta Chem. Scand.* 6, 1130 (1952).
278. Fasoli A., *Acta Med. Scand.* 145, 233 (1953).
279. Filip J., *Čas. lékařů čes.* 92, 645 (1953).
280. Foster A. B., *Chem. Ind.* 1952, 1050.
281. Ganzin M. a spol., *Bull. Soc. Chim. Biol.* 34, 26 (1952).
282. Ganzin M., Macheboeuf M., *Bull. Soc. Chim. Biol.* 34, 32 (1952).

283. Goldbaum L. R., Kazyak L., J. Pharm. Exper. Ther. 106, 388 (1952).
 284. Gray G. W., Sci. American 185, 45 (1951).
 285. Hais I. M., Vesmír 32, 312 (1953).
 286. Heinrich W. D., Biochem. Z. 323, 469 (1953).
 287. Holdsworth E. S., Nature 171, 148 (1953).
 288. Homolka J., Chem. listy 46, 255 (1952); 47, 278 (1953).
 289. Homolka J., Čas. lékařů čes. 92, 633 (1953).
 290. Hradec J., Čas. lékařů čes. 91, 1062 (1952).
 291. Hradec J., Čas. lékařů čes. 92, 867 (1953).
 292. Kickhöfen B., Westphal O., Z. Naturforsch. 7b, 655 (1952).
 293. Kickhöfen B., Westphal O., Z. Naturforsch. 7b, 659 (1952).
 294. Kōiw E. a spol., Scand. J. Clin. Lab. Invest. 4, 47 (1952).
 295. Konop R., Papír a celulóza 7, 149 (1952).
 296. Kravčenko N. A. a spol., Biochimija 18, 34 (1953).
 297. Kunkel H. G. a spol., J. Biol. Chem. 200, 559 (1953).
 298. Kunkel H. G., Tiselius A., J. Gen. Physiol. 35, 89 (1951).
 299. Latner A. L., Biochem. J. 51, XX i (1952).
 300. Latner A. L. a spol., Biochem. J. 51, X a XXX i (1952).
 301. Lederer M., Nature 167, 864 (1951).
 302. Lohss F. a spol., Z. Naturforsch. 7b, 600, 605 (1952).
 303. Loomeyer F. J., Witter A., Acta Endocrinol. 12, 167 (1953).
 304. McDonald H. J., J. Chem. Education 29, 428 (1952).
 305. McDonald H. J., Marbach E. P., J. Amer. Chem. Soc. 74, 1619 (1952).
 306. McDonald H. J., Marbach E. P., J. Biochem. 40, 111 (1953).
 307. Macek K. a spol., Chem. listy 48, č. 4 (1954).
 308. Macheboeuf M. a spol., Bull. Soc. Chim. Biol. 35, 334, 346 (1953).
 309. Markham R., Smith J. D., Biochem. J. 52, 552, 558, 565 (1952).
 310. Merklen F. P., Masseyeff R., Compt. rend. 146, 1905 (1952).
 311. Michalec Č., Čas. lékařů čes. 92, 642 (1953).
 312. Michalec Č., Hais I. M., Chem. listy 47, 284 (1953).
 313. Michl H., Oester. Chem. Ztg. 53, 15 (1952).
 314. Michl H., Monatsh. 82, 489 (1951); 83, 737 (1952).
 315. Moneke C., Folia Haematol. 71, 616 (1953).
 316. Nikkilä E. a spol., Acta Chem. Scand. 6, 617 (1952).
 317. Noverraz M., Schweiz. Med. Wochenschr. 82, 880 (1952).
 318. Nowotny A., Acta physiol. Hung. 3, 469 (1952).
 319. Opplt J., Čas. lékařů čes. 92, 323 (1953).
 320. Opplt J. a spol., Čas. lékařů čes. 92, 624 (1953).
 321. Paléus S., Acta Chem. Scand. 6, 969 (1952).
 322. Pasternak C. A., Kent P. W., Research 5, 486 (1952).
 323. Peters H. J., Chem. Weekblad 49, 248 (1953).
 324. Rienits K. G., Biochem. J. 53, 79 (1953).
 325. Riva G., Martini V., Schweiz. Med. Wochenschr. 83, 73 (1953).
 326. Schneider G., Acta Chem. Scand. 5, 1020 (1951).
 327. Schneider G., Wunderly C., Schweiz. Med. Wochenschr. 82, 445 (1952).
 328. Slater R. J., Kunkel H. G., J. Lab. Clin. Med. 41, 619 (1953).
 329. Strain H. H., Sullivan J. C., Anal. Chem. 23, 816 (1951).
 330. Turba F., Esser H., Angew. Chem. 65, 256 (1953).
 331. Van Os G. A. J., Biochim. biophys. Acta 9, 111 (1952).
 332. Višnjakov A. P. a spol., Doklady AN SSSR 87, 1035 (1952).
 333. Voigt K. D., Schroeder W., Roentgen- u. Lab.-praxis 6, 97, 148, 176 (1953).
 334. von Holt C. a spol., Biochem. Z. 323, 345 (1952).
 335. Wallenfels K., Pechmann E. v., Angew. Chem. 63, 44 (1951).
 336. Weber R., Helv. Chim. Acta 34, 2031 (1951).
 337. Wiedermann D., Lékař. listy 7, 543 (1952).
 338. Wieland T. Fischer E., Naturwissenschaften 35, 29 (1948).

Č. 1–15 chromatografia všeobecná, 16–43 adsorpční, 44–93 rozdělovací, 94–147 výmeny iónů, 148–268 na papíři, 269–338 elektroforéza na papíři.