

Řešit s plným úspěchem mnohé úkoly, s nimiž se běžně setkáváme v potravinářské analytice, může jen metoda vysoce selektivní a citlivá, které lze použít k analytickému stanovení co největšího počtu různých látek. Jsem přesvědčen, že tyto přísné podmínky splňuje *rozdělovací chromatografie na papíře*, jejíž velkou předností je dále velká jednoduchost a rychlost, s níž můžeme provést nejsložitější analytická stanovení.

Uvedených předností chromatografické metody se používá v potravinářské analytice v rostoucí míře a dnes je použití chromatografie v tomto úseku analýsy již tak rozsáhlé, že pouhý výčet jednotlivých aplikací přesahuje rámec mého sdělení. Omezím se proto jen na tři skupiny látek, které mají podle mého názoru základní důležitost a s jejichž stanovením papírovou chromatografií mám osobní zkušenosti.

1. Cukry

Pracovní postup

Při provádění chromatografické analýsy vystačíme s obvyklým jednorozměrným postupem. Jako *chromatografický papír* se nejlépe osvědčují neprané papíry *Whatman No. 1, Schleicher & Schüll No. 597* nebo *602-hart* a v některých případech též *Whatman No. 4 a Schleicher & Schüll No. 595*. Z početných rozpouštědel, jichž bylo použito pro dělení cukrů, se podle mých zkušeností nejlépe hodí tyto směsi: n-butanol-kyselina octová-voda, n-butanol-pyridin-voda a n-butanol-pyridin-voda-benzen. Z četných *detekčních činidel* jsou nejnázve dostupná a dávají velmi uspokojivé výsledky tato činidla: anilinkyselina šťavelová (na všechny cukry), amoniakální roztok dusičnanu stříbrného (na redukující cukry) a alkoholický roztok α -naftolu s přídavkem kyseliny orthofosforečné (na fruktosu nebo všechny disacharidy či trisacharidy, jejichž hydrolysou se uvolňuje fruktosa). Vyvolání příslušné barevné reakce na papíře dosáhneme s výjimkou druhého detekčního činidla záhřevem chromatogramu na 90° po dobu 5—15 min. Detekci provádíme jemným postříkem z rozprašovače [1, 2].

Analyzovaný roztok nanášíme na papír mikropipetou a jeho objem volíme nejlépe 5—30 μ l. Nanesenou kapku roztoku na papíře vysušíme nejlépe vysoušecí žárovkou a je-li koncentrace cukru v analyzovaném roztoku příliš nízká, lze ji zvýšit tím, že na stejná místa papíru nanese analyzovaný roztok vícekrát (až 5-krát) tak, že po každém nakápnutí roztoku papír vysušíme. *Identifikaci* jednotlivých cukrů provádíme směsnými chromatogramy. Stanovení stopových množství cukrů na chromatogramu mnohdy usnadňuje jeho studium v dopadajícím ultrafialovém světle, kdy se setkáváme s luminiscenčními zjevy [3].

Převážná většina cukrů vykazuje poměrně nízká R_f , která se u jednotlivých cukrů od sebe mnohdy liší jen velmi málo. Je proto velmi prospěšné provádět dlouhodobou chromatografii. Postupujeme při ní nejlépe tak, že použijeme obvyklého jednorozměrného sestupného uspořádání, ale k analýze užijeme papíru, který na konci volně visícím dolů vystřiháme tak, aby tvořil pravidelné zoubky, vzdálené od sebe zhruba 0,5 cm. Chromatografickou analýsu pak provádíme 48 hod. nebo i déle, při čemž zoubky na konci papíru

* Přednesené na Sjazde chemikov v Banskej Štiavnici v júlí 1954.

zajišťují stejnoměrné odkapávání rozpouštědla, což se uplatňuje stejně jako zvětšení délky chromatografického papíru.

Chceme-li se na chromatogramu rychle nebo předběžně orientovat, postačí mnohdy jako vodítko barva skvrny [1, 2] nebo skutečnost, že rychlost, s níž se pohybují jednotlivé cukry na papíře, je dána touto řadou, uspořádanou v pořadí rostoucích hodnot R_f : trisacharidy, disacharidy, aldohexosy, ketohexosy, pentosy [1, 2]. Ke stejnému účelu lze též mnohdy použít postupně různých shora uvedených detekčních činidel.

Semikvantitativní stanovení jednotlivých cukrů lze obvykle provést bez obtíží porovnáním intenzity zabarvení a velikosti příslušné skvrny cukru na chromatogramu se známými množstvími (modelovou stupnicí) stejného cukru, analyzovanými za týchž podmínek. Při tom je důležité, aby byly vždy vzájemně porovnávány jen stejné cukry [4, 5]. Chceme-li provést přesnou *kvantitativní analýzu*, je nutné porovnávat jednotlivé skvrny na papíře fotometricky nebo provést stanovení po extrakci chromatogramu vodou vhodnými analytickými postupy.

Úprava vzorků k analýze

Úspěšné provedení chromatografické analýsy cukrů v potravinářských produktech mnohdy předpokládá vhodnou předběžnou úpravu analyzovaného vzorku. Jde především o odstranění těchto nežádoucích látek: látek ve vodě nerozpustných, solí, látek koloidní povahy a látek příliš barevných. Odstranění *látek ve vodě nerozpustných* lze zpravidla dosáhnout filtrací nebo odstředováním. Odstranění *solí* lze dosáhnout odsolovačem nebo lépe pomalým proléváním vodného roztoku analyzovaného vzorku sloupcem vhodného měniče kationtů, pracujícího ve vodíkovém cyklu, čímž získáme eluát obsahující vedle cukrů, které procházejí sloupcem měniče kationtů prakticky beze změny, příslušné kyseliny, vzniklé výměnou kationtů solí za vodík. Tento eluát pak prolejeme sloupcem vhodného měniče aniontů, čímž odstraníme nežádoucí kyseliny, a cukry opět projdou beze změny. Takto získaný eluát pak zpravidla neobsahuje při volbě vhodných měničů iontů a dostatečně pomalém prolévání množství solí, které by podstatně ztěžovalo provádění chromatografické analýsy. Po prolití našeho roztoku sloupcem měniče kationtů jsou cukry přítomny v kyselém prostředí, což může vést k jejich destrukci (na př. inverte sacharosy), ale pracujeme-li při teplotě místnosti a zbavíme-li eluát kyselin v krátké době prolitím sloupcem měniče aniontů, není podle mých zkušeností zpravidla třeba k této okolnosti přihlížet. Většinou stačí odstranit soli v analyzovaném roztoku jen v větší části, a lze proto s výhodou použít při použití ionexového postupu jednodušších vsádkových operací. Velmi dobře se mi osvědčily jako měniče kationtů ionexové pryskyřice československé výroby, a to *Staionity FK 8, F 8 extra a F4m extra*.

Odstranění nežádoucích látek *koloidní povahy* bývá zpravidla obtížné. Částečné odstranění koloidů, v potravinářských vzorcích vesměs převážně hydrofilní povahy, lze alespoň v některých případech dosáhnout dehydratací methanolem nebo ethanolem, nebo přidáním vhodných adsorbens (na př. karborafin či norit), která pak odstraníme z roztoku filtrací. Při obou těchto postupech je nutné předem zjistit modelovými pokusy, zda při nich současně nedochází k nežádoucím úbytku cukrů, příp. je nutné na tuto ztrátu zavádět korekci. K odstranění koloidů dochází též mnohdy v pozoruhodné míře působením měničů iontů, které zde působí jako velmi účinná adsorbens, takže při odstraňování solí současně také odstraňujeme z upravovaného roztoku koloidy. Stejným způsobem odstraňují mnohdy měniče iontů také *nežádoucí barviva*, která často tvoří na chromatogramu barevné pásy a znesnadňují provádění detekce. Účinnější zde bývají různá adsorbens, ale při jejich použití je nutná stejná opatrnost jako při odstraňování koloidů.

Pracovní postup

Používáme zpravidla jednorozměrného postupu a pracnějšího dvojrozměrného, který lze provádět na též papíře jen s jedním vzorkem, užíváme jen při dělení tak složitých směsí, že je dělení pouze v jednom směru neuspokojivé. Jako *chromatografický papír* se nejlépe osvědčují opět neprané papíry *Whatman No. 1, Schleicher & Schüll 602-hart a 597*. Z početných *rozpuštědel* používaných k dělení aminokyselin se mi nejlépe osvědčila opět směs n-butanol-kyselina octová-voda a dále nasycený roztok vody ve fenolu, zvláště při dělení kyseliny asparagové, glutamové a jejich amidů. Při použití fenolu jako rozpuštědla je vhodné provádět analýsu v amoniakálním prostředí, které usnadňuje dělení. Použijeme-li dvojrozměrného postupu, je výhodné použít jako rozpuštědla v prvním směru směsi n-butanol-kyselina octová-voda a ve druhém směru fenolu.

Detekci provádíme buď postříkáním 0,1% roztokem ninhydrinu v n-butanolu nasyceném vodou, nebo tak, že ninhydrin přímo přidáváme do rozpuštědla. První z těchto postupů je většinou úspěšnější [1, 2, 3].

O nanášení analysovaných vzorků na papír, o vyvolávání barevné reakce záhřevem a o detekci luminiscence platí totéž, co bylo uvedeno u cukrů. Chromatografickou analýsu aminokyselin provádíme zpravidla (podle povahy papíru) asi 12 až 24 hodin. V některých případech, zvláště při dělení basických a kyselých aminokyselin, lze s výhodou použít také dlouhodobé chromatografie a o úpravě papíru platí totéž, co bylo uvedeno u cukrů [6, 7].

Podle mých zkušeností je R_f aminokyselin často více závislé na teplotě, přítomnosti ostatních složek v analysovaném roztoku a na míře nasycení chromatografického válce parami rozpuštědla než v případě cukrů.

Identifikace jednotlivých aminokyselin je rovněž obvykle obtížnější než u cukrů a často vyžaduje alespoň částečné zapracování. Při provádění identifikace směsnými chromatogramy je většinou nezbytně nutné, aby měl uměle připravený roztok složení co nejvíce odpovídající studovanému roztoku. Vzhledem k tomu, že je většinou velmi obtížné splnit tuto podmínku, pokládám za nejvhodnější provádět identifikaci jednotlivých aminokyselin na chromatogramu tak, že přidáme do analysovaného roztoku jednotlivé známé aminokyseliny a zjišťujeme, která ze skvrn se po tomto přidávku zvětšila. Podrobná identifikace většího počtu aminokyselin na chromatogramu je zdoluhavá a pracná a lze ji při provádění většího počtu analýs stejného druhu podstatně usnadnit takto:

Pracujeme vždy za co nejshodnějších podmínek a pořídíme si na průhledném papíře schéma alespoň přibližného rozmístění jednotlivých kyselin s uvedením barvy jednotlivých skvrn a jejich průměrné velikosti a můžeme se pak rychle orientovat po přiložení tohoto nákresu na chromatogram. Barva skvrn jednotlivých aminokyselin při detekci ninhydridem je další důležitou pomůckou při jejich identifikaci, ale při vlastních pokusech jsem se několikrát přesvědčil, že nebývá vždy spolehlivá, neboť ji mohou měnit zcela zásadně některé složky analysovaného roztoku.

Semikvantitativní stanovení aminokyselin lze provádět stejně jako u cukrů [3, 6]. Také u aminokyselin lze vzájemně porovnávat jen skvrny stejných kyselin. U aminokyselin platí zpravidla přesněji než u cukrů, že je intenzita zabarvení příslušné skvrny na chromatogramu přímo úměrná její koncentraci a metoda fotometrická dává zde proto spolehlivější výsledky. Rovněž poznatek, že je vztah mezi velikostí barevné skvrny a koncentrací příslušné látky logaritmický, platí zde obvykle spolehlivěji než u cukrů. Přesnou *kvantitativní analýsu* aminokyselin provádíme nejlépe kolorimetricky, někdy lze též použít polarografie nebo postupů biochemických.

Zde platí většinou stejné zásady, o nichž se zmiňuji shora. Se základními rozdíly se však setkáváme ve srovnání s cukry ve všech případech, kdy použijeme k úpravě analysovaného roztoku měničů iontů.

Proléváme-li roztok obsahující aminokyseliny sloupcem měniče kationtů, dochází k jejich adsorpci, jejíž rozsah závisí podle povahy měniče a aminokyseliny především také na pH roztoku. Toho často využíváme k oddělení aminokyselin z analysovaného roztoku, neboť při vhodně volených podmínkách lze při pomalém prolévání katexovou kolonou adsorbovat na katex převážnou většinu všech aminokyselin. Do jaké míry byly přítomné kyseliny z roztoku adsorbovány, je vždy třeba se přesvědčit modelovým pokusem. Z vlastní zkušenosti však vím, že lze mnohdy při používání shora jmenovaných měničů kationtů, při volbě správných rozměrů ionexové kolony a při dostatečně pomalém prolévání roztoku sloupcem ionexu tuto korekci zanedbat. Na sloupci adsorbované aminokyseliny uvolňujeme nejlépe tak, že kolonu pomalu proléváme amoniakem zředěným vodou 1:1 až 1:3 a eluáty shromažďujeme. Takto získané amoniakální roztoky opatrně odpaříme na vodní lázni, nejlépe do sucha, a získaný odparek, který často obsahuje prakticky čisté aminokyseliny v krystalické formě, vyjme vhodným množstvím vody a podrobíme chromatografické analýze. Tímto postupem lze nejen zbavit analysovaný roztok nežádoucích složek, ale lze také analysované aminokyseliny zkoncentrovat do té míry, že pak můžeme bez obtíží provést jejich stanovení i ve vzorcích, kde je jich přítomno jen velmi málo [3, 8].

Až dosud jsme předpokládali, že aminokyseliny přicházejí v daném roztoku *volně*. Velkých úspěchů však bylo také dosaženo při studiích papírovou chromatografií takových aminokyselin, které tvoří složku (stavební kameny) nejrůznějších bílkovin nebo peptidů. K tomu účelu postačí hydrolyzovat vhodným postupem příslušnou látku a provést pak stanovení jednotlivých aminokyselin. Nejčastěji používáme hydrolysy kyselá nebo enzymatické (nejlépe trypsinem). Také v tomto úseku lze papírovou chromatografií dosáhnout jedinečných výsledků [9].

3. Bezdušikáté organické kyseliny

Pracovní postup

Pracujeme výhradně jednosměrným sestupným postupem. Jako *chromatografického papíru* používáme výhradně papír *Whatman No. 1*, který je nutné před prováděním analýzy pečlivě proprat, nejlépe zředěným vodným roztokem ethanolu a pak vysušit. Papír během sušení i po něm nesmí přijít do styku s parami kyselin (zvláště mravenčí nebo octové) nebo amoniaku. Stanovení bezdušikátých organických kyselin lze rozdělit do dvou skupin: Stanovení nízkých mastných kyselin (nejvýše s 8 atomy uhlíku) a stanovení některých ostatních bezdušikátých kyselin. Při stanovení nízkých mastných kyselin se jako *rozpuštědlo* nejlépe osvědčily směsi: ethanol-amoniak, aceton-voda-amoniak a n-butanol-voda-amoniak. Změnou poměru těchto jednotlivých rozpuštědel lze měnit v širokém rozmezí R_f mastných kyselin. Pro ostatní bezdušikáté kyseliny se osvědčily jako rozpuštědla tyto směsi: fenol-voda s přísadkou kyseliny mravenčí, chloroform-ethanol s přísadkou kyseliny mravenčí a ether-kyselina octová-voda. K *detekci* bezdušikátých organických kyselin slouží vhodné acidobasické indikátory, a to k detekci nízkých mastných kyselin nejlépe roztok bromfenolové modře ve zředěném vodném roztoku kyseliny citrónové a k detekci ostatních bezdušikátých kyselin nejlépe roztok bromfenolové modře v ethanolu, zalkalisovaný hydroxydem sodným. Místo bromfenolové modře lze také

použití bromkresolové zeleně. Detekci provádíme postříkem z rozprašovače a barevné skvrny (žluté nebo modré) jsou na chromatogramu ihned patrný; zahřívání není třeba. Tyto skvrny jsou ještě mnohem méně stálé než u aminokyselin, proto je třeba ihned je obkreslit tužkou a vyhodnotit. O způsobu nanášení vzorků, době analýsy a použití ultrafialového světla k detekci platí totéž, co bylo shora uvedeno.

R_f u bezdusíkatých organických kyselin bývá mnohdy těžko reprodukovatelné, je značně závislé na podmínkách analýsy a na složení analysovaného roztoku. Tyto okolnosti činí velké potíže při identifikaci jednotlivých kyselin, o níž platí v ještě větší míře vše, co jsem uvedl u aminokyselin. Víím z vlastní zkušenosti, že tyto obtíže jsou tak veliké, že provádění chromatografické analýsy bezdusíkatých organických kyselin nelze většinou provádět s nadějí na úspěch bez jistých zkušeností [10].

Provádění *semikvantitativní* analýsy bezdusíkatých organických kyselin obvyklým porovnáváním velikosti a zabarvení jednotlivých skvrn se standardy bývá zpravidla velmi obtížné. Obvyklé vztahy mezi koncentrací a velikostí, resp. intenzitou zabarvení dané skvrny zde prakticky neplatí. Jsme proto při použití tohoto postupu odkázáni jen na velmi hrubé odhady, ale i tyto vyžadují zkušenosti. *Kvantitativní analýsu* lze však naproti tomu po rozstříhání chromatogramu a převedení kyselin do roztoku provádět vhodným chemickým postupem zpravidla snáze než u cukrů a aminokyselin.

Úprava vzorků k analýze

Platí stejné zásady jako u předchozího. Nejvýhodnější je opět použití měničů iontů. Prolijeme-li analysovaný roztok H-katexem, převedeme příslušné soli jednotlivých bezdusíkatých kyselin na volné kyseliny, které adsorbujeme na měnič aniontů, uvolníme opět amoniakem zředěným vodou jako amonné soli, eluát odpaříme do sucha, vyjmeme malým množstvím vody a podrobíme chromatografické analýze. Tento postup se velmi dobře osvědčuje a umožňuje zkoncentrovat jednotlivé kyseliny do té míry, že je lze s úspěchem chromatografovat i tehdy, přicházejí-li v původním vzorku prakticky jen ve stopách [8, 10, 11].

Závěr

Z početných aplikací bylo podrobněji pojednáno jen o chromatografické analýze *cukrů, aminokyselin a bezdusíkatých organických kyselin*. Stanovení většího počtu těchto látek vedle sebe obvyklými postupy je zpravidla velmi obtížné a v některých případech řešitelné jen použitím chromatografie.

V práci jsou shrnuty autorovy několikaleté praktické zkušenosti s chromatografickou analýsou uvedených látek a jsou zdůrazněny především takové všeobecné poznatky, jichž lze bezprostředně využít při použití chromatografie v potravinářské analytice. Je též stručně pojednáno o všeobecné úpravě vzorků pro chromatografickou analýsu, zvláště pak o použití měničů iontů.

LITERATURA

1. Vavruch I., *Použití polarografie a chromatografie v potravinářském průmyslu*, Prům. potravin 3, 140 (1952).
2. Vavruch I., *Chromatografická studie cukrů a aminokyselin v řepných semenech a v řepách*, Listy cukrovar. 68, 29 (1952).
3. Vavruch I., *Chromatografická studie řepných semen a cukrovky I.*, Cukry a aminokyseliny, Chem. listy 46, 453 (1952).

4. Vavruch I., *Stanovení rafinosy v surových cukrech rozdělovací chromatografií na papíře*, Listy cukrovar. 67, 87 (1951).
5. Vavruch I., *Stanovení rafinosy v melasách rozdělovací chromatografií na papíře*, Listy cukrovar. 67, 211 (1951).
6. Vavruch I., *Stanovení aminokyselin v melasách a melasových výpalcích rozdělovací chromatografií na papíře*, Listy cukrovar. 67, 151 (1951).
7. Vavruch I., *Chromatografická studie cukrovarnických meziproductů*, Aminokyseliny, Sborník věd. prací potr. průmyslu, Stát. nakl. techn. literatury, Praha 1953, str. 111.
8. Vavruch I., *Chromatografická studie včelího medu*, Chem. listy 46, 116 (1952).
9. Vavruch I., *Chromatografická studie aminokyselin řepné bílkoviny*, Sugar 47, 18 (1952).
10. Vavruch I., *Chromatografická studie řepných semen a cukrovky II.*, Bezdušikaté organické kyseliny, Chem. listy 48, 442 (1954).
11. Vavruch I., *Chromatografie v cukrovarnické analytice*, Sborník I. celostát. prac. konference analytických chemiků, nákladem ČSAV, Praha 1953, str. 354.