

## Stanovenie cukrov chromatografiou na papieri\*

F. RENDOŠ

*Chemický ústav Slovenskej akadémie vied, Bratislava*

Sledoval sa vplyv niektorých postupov na presnosť priameho fotometrického stanovenia cukrov (glukóza, manóza a xylóza) na papierových chromatogramoch.

Nanášanie roztokov na papier je presnejšie a rýchlejšie pomocou upravenej dielkovej mikropipety než pomocou špeciálnej chromatografickej mechanickej pipety (Chropa).

Je výhodné časť detekčného činidla (kyselinu ftalovú) pridať priamo do vyvíjacej sústavy.

Nanášanie roztokov na štart v čiarach, ktorých dĺžka je úmerná koncentrácii cukru, a fotometrické vyhodnotenie v smere kolmom na smer oddeľovania dávajú pre veľký rozsah koncentrácií lineárnu závislosť medzi plochou fotometrickej krivky a množstvom cukru.

Chromatografia na papieri dovoľuje nielen rýchle kvalitatívne stanovenie cukrov, ale napríklad pri použití vhodného fotometra dáva i kvantitatívne výsledky s vyhovujúcou presnosťou. Celková presnosť je však ovplyvnená všetkými časťami pracovného postupu — od prípravy a nanášania roztokov až po spôsob vyhodnocovania chromatogramov.

V práci sa opisujú niektoré spôsoby nanášania roztokov, detekcie a fotometrického vyhodnocovania, ktoré sa osvedčili v našom laboratóriu.

### Experimentálna časť a diskusia

#### *Nanášanie*

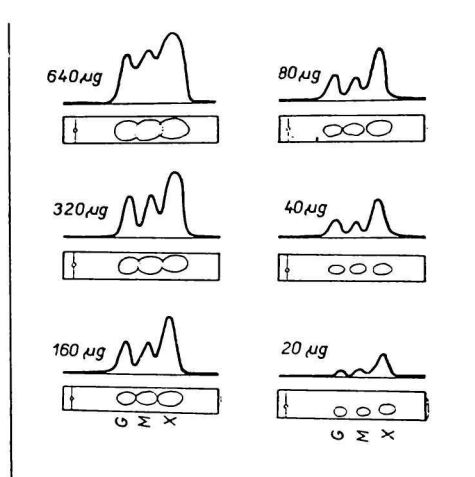
Základnou podmienkou pre kvantitatívne stanovenie látok chromatografiou na papieri je nanosenie presného množstva skúmanej látky na chromatografický papier. Na tento účel slúžia rozličné mikropipety a mikrobyrety s mikrometricou skrutkou. Mikrobyreta Chropa podľa našich skúseností sa neosvedčila, pretože chromatografický papier vysaje určité množstvo látky z kapiláry mikrobyrety. Táto chyba sa zväčšuje pri viacnásobnom nanášaní vzorky. Ak nanášanie trvá dlhší čas a ak sa na urýchlenie odparovania používa teplý vzduch, nastáva postupné otepľovanie mikrobyrety. Oteplením sa zväčší objem skúmaného roztoku, ktorý vytečie z mikrobyrety. Pri mikroanalýze tieto nedostatky môžu byť zdrojom značných chýb. Lepšie sa nám osvedčila hematologická pipeta o obsahu 0,1 ml, so stupnicou 100 dielkov, upravená tým spôsobom, že koniec pipety sa pretiahne a ohne tak, aby pri nanášaní vzorky mohla byť držaná vo vodorovnej, prípadne málo naklonenej polohe, čím sa zamedzí rýchlemu vytekaniu

\* Prednesené na Seminári o kvantitatívnych metódach v chromatografii na papieri v Bratislave 25. apríla 1963.

roztoku z mikropipety. Hrot mikropipety je potrebné zabrúsiť, aby pri nanášaní vzorky na čiaru ostré hrany netrhali vlákienka chromatografického papiera. Pomocou takto upravenej mikropipety možno značne zvýšiť presnosť nanášania i veľmi malých množstiev skúmanej látky.

### Detekcia

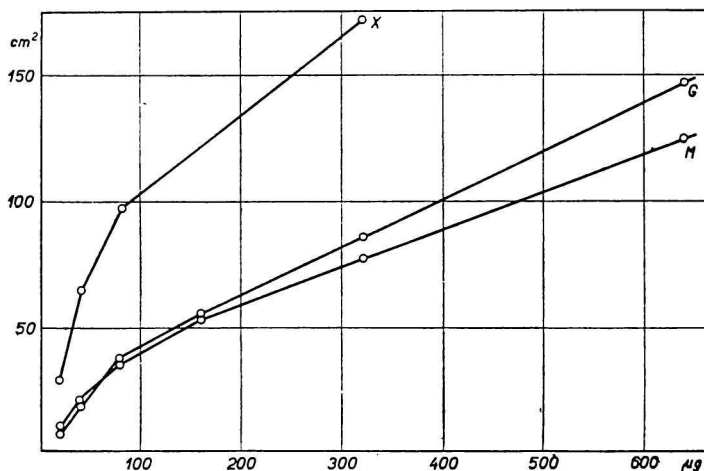
Pre kvantitatívne vyhodnocovanie papierových chromatogramov cukrov fotometricky dobre sa osvedčil spôsob preťahovania chromatogramov cez detekčné činidlo anilínftalát, a to tým spôsobom, že kyselina ftalová sa pridáva priamo do vyvíjacej sústavy (1,66 g sa rozpustí v 100 ml vyvíjacej sústavy *n*-butanol—kyselina octová—voda 4 : 1 : 5), po vysušení sa chromatogram pretiahne cez éterický roztok anilínu (0,93 g anilínu na 100 ml éteru) a zahrieva sa pri teplote 100 °C po dobu 5 minút. Neodporúča sa však viacnásobné vyvíjanie, pretože tým sa kyselina ftalová nepravidelne koncentruje na chromatograme a ovplyvňuje oddeľovanie cukrov.



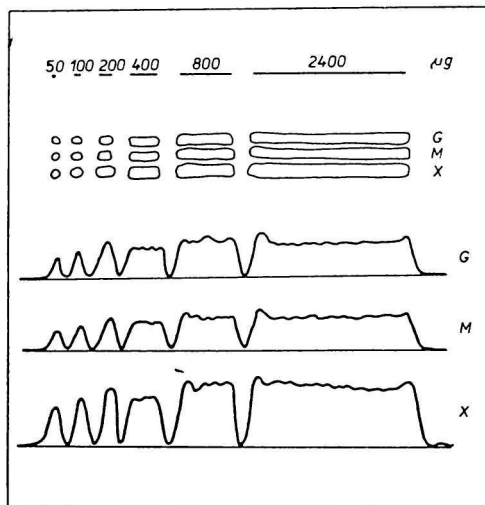
Obr. 1. Chromatogramy  
a im zodpovedajúce krivky svetlosti.  
G = D-glukóza; M = D-manóza;  
X = D-xylóza.

### Vyhodnocovanie

Na priamom fotometrickom vyhodnocovaní chromatogramov sa veľkosť a intenzita sfarbenia škvŕn zaznamenáva pomocou registračného fotometra, pričom sa získajú krivky svetlosti. Rovná časť krivky svetlosti vyjadruje svetlosť pozadia a jednotlivé vlny svetlosť škvŕn. Veľkosť vln, resp. výška maxima vlny je úmerná veľkosti a intenzite sfarbenia škvŕn a táto je úmerná množstvu nanesej skúmanej látky [1]. Tento vzťah je lineárny len pre určité množstvo nanesej vzorky a závisí od spôsobu nanášania. Na obr. 1 sú znázornené chromatogramy, na ktoré sú bodovo nanesené: D-glukóza, D-manóza a D-xylóza v množstvách 20, 40, 80, 160, 320 a 640 µg. Na obr. 1 sú aj zodpovedajúce krivky svetlosti získané meraním v odrazenom svetle. Na obr. 2 sú kalibračné krivky uvedených chromatogramov. Krivky svetlosti sa vyhodnocovali meraním plochy svetlosti planimetricky. Kalibračné krivky sa pri vyšších koncentráciách stáčajú k osi *x*, čo je najzjavnejšie pri D-xylóze. Na obr. 3 je znázornený chromatogram, na ktorý sú nanesené: D-glukóza, D-manóza a D-xylóza v množstvách 50, 100, 200, 400, 800 a 2400 µg,

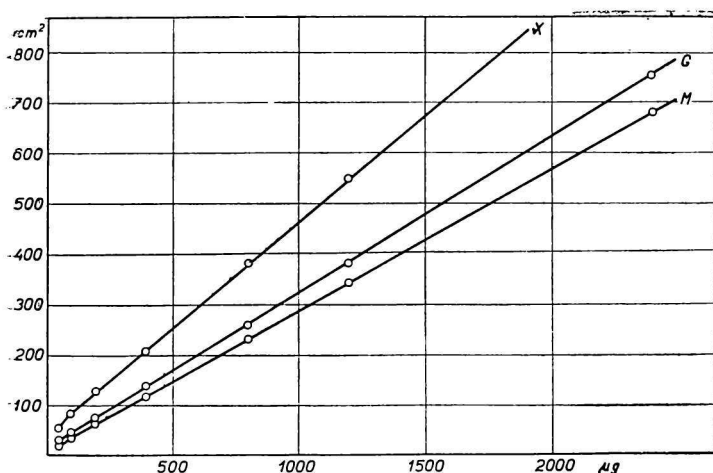


Obr. 2. Kalibračné krivky chromatogramov z obr. 1.

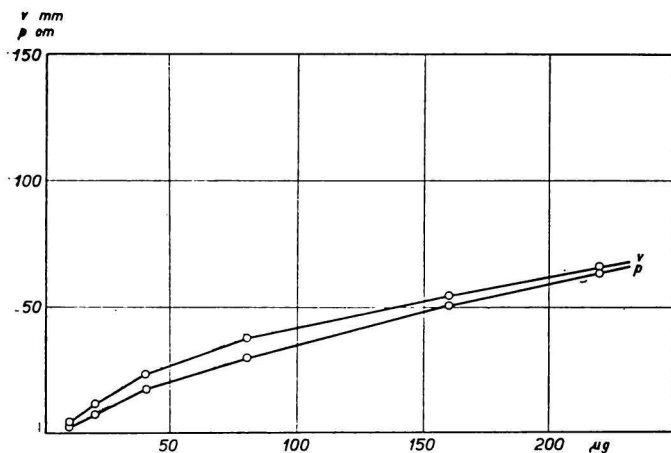


Obr. 3. Chromatogram D-glukózy, D-manózy a D-xylózy. Vzorky nanosené na čiary a zodpovedajúce krivky svetlosti.

a to tým spôsobom, že 50  $\mu\text{g}$  je nanosené bodovo, 100  $\mu\text{g}$  na čiaru 1 cm dlhú, 200  $\mu\text{g}$  na čiaru 2 cm dlhú atď. a 2400  $\mu\text{g}$  na čiaru 24 cm dlhú. Tým sa dosiahne, že plošná koncentrácia látky na chromatograme je v každom prípade rovnaká. Po detekcii sa chromatogram postrihá priečne na pásy a vyhodnotí sa registračným fotometrom. Krivky svetlosti sú znázornené na obr. 3, zodpovedajúce kalibračné krivky na obr. 4. Vzťah medzi množstvom látky a plochou svetlosti je v tomto prípade lineárny pre celú oblasť koncentrácií. Na základe týchto poznatkov sa pre kvantitatívne vyhodnocovanie papiero-



Obr. 4. Kalibračné krivky chromatogramu z obr. 3.

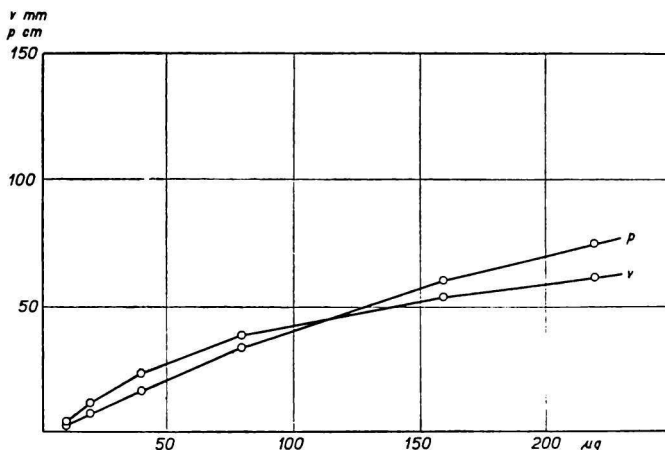


Obr. 5. Kalibračná krivka D-glukózy.

$v$  = vyhodnotením meraním výšky maxima vlny (mm);  $p$  = vyhodnotením meraním plochy svetlosti ( $\text{cm}^2$ ).

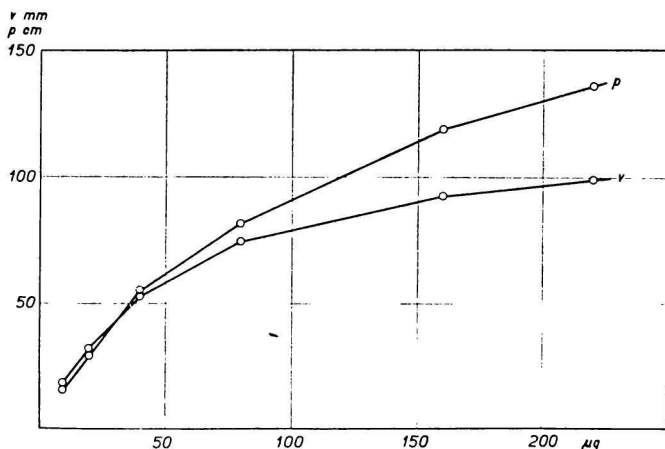
vých chromatogramov odporúča nanášať väčšie množstvá látky (ak je to potrebné) nie bodovo, ale na čiary.

Krivky svetlosti sa vyhodnocujú meraním výšky maxima vlny alebo meraním plochy svetlosti, t. j. plochy, ktorú uzatvára vlna prislúchajúca určitej škvrne so svetlosťou pozadia. Na obr. 5, 6 a 7 sú kalibračné krivky D-glukózy, D-manózy a D-xylózy, ktoré sú zhotovené meraním výšky maxima vlny, označené  $v$ , a meraním plochy svetlosti, označené  $p$ . Kalibračné krivky získané meraním plochy svetlosti sú menej zakrivené, čo je pre presnosť odčítania výhodnejšie.



Obr. 6. Kalibračná krivka D-manózy.

$v$  = vyhodnotené meraním výšky maxima vlny (mm);  $p$  = vyhodnotené meraním plochy svetlosti ( $\text{cm}^2$ ).



Obr. 7. Kalibračná krivka D-xylózy.

$v$  = vyhodnotené meraním výšky maxima vlny (mm);  $p$  = vyhodnotené meraním plochy svetlosti ( $\text{cm}^2$ ).

### Posúdenie presnosti

Pre posúdenie presnosti kvantitatívneho stanovenia látok pomocou chromatografie na papieri fotometrickou metódou je možné vypočítať koeficient korelácie, ktorý je najdôležitejší ukazovateľ vzťahu medzi premennými veličinami. V našom prípade ide o korelačný vzťah medzi množstvom cukrov

nanesených na chromatografický papier a plochou svetlosti, resp. výškou maxima krivky svetlosti. Koeficient korelácie sa vypočítal na základe štatistických metód analýzy [2] pri vzostupných množstvách D-glukózy. Krivky svetlosti D-glukózy sú vyhodnotené meraním plochy svetlosti a meraním výšky maxima krivky svetlosti.

Koeficient korelácie vypočítaný z hodnôt, ktoré sa získali meraním plochy svetlosti, je:

$$r = 0,994.$$

Ak meriame výšku maxima vlny, koeficient korelácie je:

$$r = 0,988.$$

Koeficient korelácie dokazuje, že medzi množstvom nanesej vzorky a plochou krivky svetlosti, resp. výškou maxima krivky svetlosti je úzka súvislosť.

Papierové chromatogramy sa vyhodnocovali v odrazenom svetle registračným fotometrom, ktorý bol zhotovený vo Vývojových dielňach Chemických ústavov SAV.

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ САХАРОВ ХРОМАТОГРАФИЕЙ НА БУМАГЕ

Ф. Рендош

Химический институт Словацкой академии наук, Братислава

Описываются различные варианты работы, которые влияют на точность количественного определения сахаров, разделенных хроматографией на бумаге.

Для нанесения образцов лучше, чем механическую микробюретку Хропа, применять калиброванные микропипетки с видоизмененным отверстием для выливания.

По сравнению с обычно применяемым методом проявления хроматограмм посыпанием, лучшим оказалось прибавлять фталевую кислоту в проявительную смесь и после высушивания протянуть хроматограммы через раствор анилина в эфире.

Зависимость между намеренными величинами является линейной только в небольшом интервале концентраций. Однако если более концентрированные растворы сахаров наносить в виде длинных линий вместо точек и хроматограммы регистрировать перпендикулярно по отношению к делениям, то зависимость между плоскостью фотометрической кривой и нанесенным количеством является линейной в широком интервале концентраций.

Между количеством нанесенного вещества и плоскостью фотометрической кривой, а также ее максимальной высотой, существует прямое соотношение. Коэффициент пропорциональности является близким единице.

*Preložila T. Dillingarová*

## BESTIMMUNG DER ZUCKER DURCH PAPIERCHROMATOGRAPHIE

F. Rendoš

Chemisches Institut der Slowakischen Akademie der Wissenschaften,  
Bratislava

In der vorliegenden Arbeit werden verschiedene Modifikationen beschrieben, die die Genauigkeit der quantitativen Auswertung der durch Papierchromatographie getrennten Zucker beeinflussen.

Für das Auftragen der Proben ist es besser, graduierte Mikropipetten mit einer modifizierten Ausflussöffnung zu verwenden als die mechanische Mikrobürette Chropa.

Gegenüber dem laufend angewandten Verfahren der Sichtbarmachung der Chromatogramme durch Bestäubung hat es sich besser bewährt, dem Entwicklungsgemisch Phthalsäure hinzuzufügen und erst nach der Trocknung des Chromatogramms dieses durch eine Lösung von Anilin in Äther hindurchzuziehen.

Die Abhängigkeit zwischen den gemessenen photometrischen Werten ist eine lineare, allerdings nur in einem geringen Konzentrationsbereich. Falls man jedoch konzentriertere Lösungen der Zucker in längeren Linien anstatt punktförmig aufträgt und die Chromatogramme senkrecht zur Richtung der Trennung registriert, dann ist die Abhängigkeit zwischen der Fläche der photometrischen Kurve und der aufgetragenen Menge in einem breiten Konzentrationsbereich linear.

Zwischen der Menge des aufgetragenen Stoffs und der Fläche der photometrischen Kurve, bzw. deren maximaler Höhe besteht eine direkte Korrelation. Der Korrelationskoeffizient liegt nahe bei eins.

*Preložil K. Ullrich*

## LITERATÚRA

1. Fellegi J., *Štúdium úlohy hemicelulózy v technológii buničiny*, 43. Kandidátska dizertačná práca, Bratislava 1956.
2. Batuner L. M., Pozin M. E., *Matematické metódy v chémii*, 324. Slovenské vydavateľstvo technickej literatúry, Bratislava 1956.

Do redakcie došlo 17. 5. 1963  
V revidovanej podobe 9. 9. 1963.

*Adresa autora:*

*Inž. František Rendoš, C. Sc., Chemický ústav SAV, Bratislava, Dúbravská cesta.*