

## PRÍSPEVOK KU KVANTITATÍVNEMU VYHODNOCOVANIU PAPIEROVÝCH CHROMATOGRAMOV

A. R. NEURATH, F. FRIČ

Oddelenie rastlinnej biológie Biologického ústavu Slovenskej akadémie vied v Bratislave

Ako je známe, kvantitatívne stanovenie látok po ich oddelení papierovou chromatografiou možno uskutočniť:

- a) po elúcii,
- b) in situ.

Metódy in situ zahrňujú stanovenia podľa plochy škvŕn, meranie absorpcie svetla stredom škvŕny a meranie absorpcie svetla celou škvŕnou, pri ktorom sa uplatnia obidva faktory charakterizujúce chromatografickú škvŕnu — plocha a farebná intenzita. Posledným spôsobom možno dosiahnuť presnejšie výsledky než pri predchádzajúcich dvoch spôsoboch [1].

Nevýhoda uvedených spôsobov, ktoré sú založené na meraní v prechádzajúcom svetle, spočíva v tom, že sa pri nich uplatňuje nerovnomernosť štruktúry papiera. Preto niektorí autori [2, 3] vyhodnocujú papierové chromatogramy v odrazenom svetle. K metódam, ktoré sú založené na meraní odrazeného svetla, možno počítať aj fotometrické vyhodnotenie škvŕn na negatívoch získaných ofotografovaním chromatogramov [4, 5, 9]. Tento spôsob sme použili aj pri stanovení mikroelementov v rastlinnom materiáli a v pôde [6, 7], pričom sme pri fotografovaní chromatografických škvŕn používali farebné, prípadne interferenčné filtre a zaviedli sme postup, ktorým možno v značnej miere znížiť chyby spôsobené kolísaním niektorých faktorov spojených so zavedením fotografického procesu do postupu kvantitatívneho vyhodnocovania papierových chromatogramov (zmeny v osvetlení, uzáver fotografického prístroja nereprodukuje úplne presne expozičnú dobu, gradácia negatívneho materiálu, zmeny teploty pri vyvolávaní, doba vyvolávania). V tejto práci chceme podrobnejšie rozobrať princíp, výhody a odôvodnenosť tohto postupu.

### Metodická časť

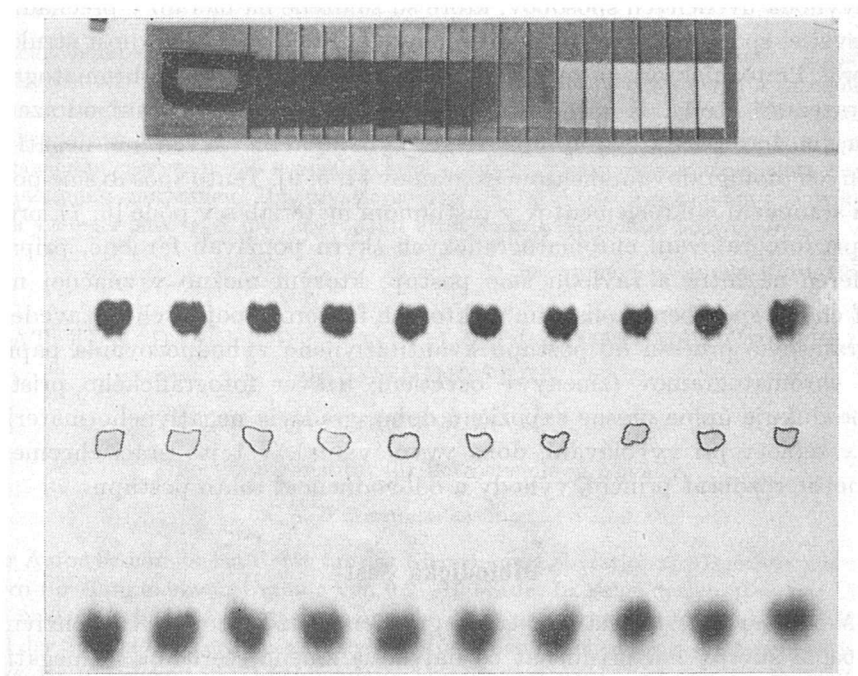
1. *Negatívny materiál* má mať tvrdú gradáciu (každej zmene v intenzívnosti zafarbenia škvŕny má prislúchať čo najväčšia zmena sčernenia na negatíve), má byť jemnozrný a pre všeobecné použitie (fotografovanie škvŕn rôznej farby) citlivý v celej oblasti viditeľného svetla.

2. *Farebné (interferenčné) filtre* sa volia na základe absorpčných kriviek príslušných škvŕn analogicky ako v spektrofotometrii (kolorimetrii). Ich použitie umožňuje jednak posunúť hranicu možnosti kvantitatívneho vyhodnocovania k nižším množstvám látok oddeľovaných papierovou chromato-

grafiou (získa sa oveľa kontrastnejší negatív ako bez použitia filtra, preto možno vyhodnocovať i veľmi slabo intenzívne škvrny), jednak kvantitatívne vyhodnocovať škvrny detegované farebným činidlom [6, 7].

3. *Spôsob vyhodnocovania ofotografovaných chromatogramov — metóda prevodového faktora.* Ofotografované škvrny sa vyhodnocujú mikrofotometricky obvyklým spôsobom [5]. Aby sa vylúčil vplyv faktorov spojených s fotografickým procesom (pozri vyššie) na získané výsledky, vydolí sa číselná hodnota plochy, získaná po planimetrovaní [5], prevodovým faktorom, ktorého hodnota sa určí týmto postupom:

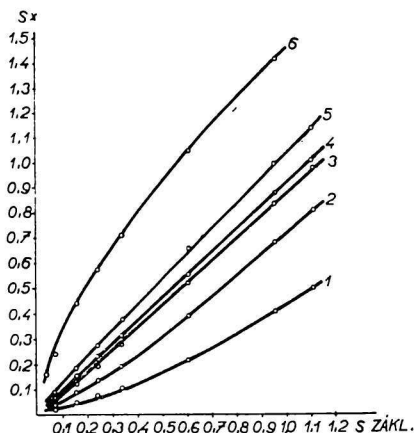
Spolu s chromatogramom sa vždy fotografuje šedý klin (obr. 1). Sčernenie jednotlivých políčok šedého klinu na každom negatíve sa zmeria na mikrofotometri. Jedna zo snímok sa vyberie ako základná. Prevodový faktor sa



Obr. 1. Šedý klin a škvrny Ni (10—28  $\mu\text{g}$ ), Co (5—14  $\mu\text{g}$ ) a Cu (10—28  $\mu\text{g}$ ).

potom určuje graficky takto: na os úsečiek sa nanášajú sčernenia jednotlivých políčok šedého klinu na základnej snímke a na os poradníc hodnoty sčernenia tých istých políčok na danej snímke. Zostrojí sa závislosť *sčernenie danej*

snímky — sčernenie základnej snímky. Závislosť je vždy lineárna.\* Smernica získanej priamky udáva hodnotu prevodového faktora (obr. 2).



Obr. 2. Závislosť sčernenia od sčernenia základnej snímky.

*Krivka 1:* osvetlenie  $2 \times 100$  W (z 1,5 m), vyvolávané 5 min. *Krivka 2:* osvetlenie  $2 \times 100$  W (z 1,0 m), vyvolávané  $2 \frac{1}{2}$  min. *Krivka 3:* osvetlenie ako pri krivke 2, vyvolávané 5 min. *Krivka 4:* osvetlenie ako pri krivke 2, vyvolávané 10 min. *Krivka 5:* osvetlenie  $2 \times 200$  W (z 1,2 m), vyvolávané 5 min. *Krivka 6:* osvetlenie  $2 \times 200$  W (z 1,0 m), vyvolávané 5 min.

Vo všetkých prípadoch expozičná bola 2 sek. a teplota pri vyvolávaní  $21^\circ\text{C}$ .

Fotografovali sme škvrnu Co ( $7 \mu\text{g}$ ) detegovanú kyselinou rubeanovodíkovou (0,25 % roztok v etanole), pričom sme použili farebný filter BG-12 (Jena). Menili sme osvetlenie, expozičnú dobu, teplotu vývojky a dobu vyvolávania, aby sme mohli zistiť, do akej miery možno vylúčiť vplyv uvedených faktorov na získané výsledky pri použití vyššie opísanej metódy prevodového faktora. Fotografovali sme prístrojom Exakta-Varex II (clona 8, expozičná doba 2—5 sek., vzdialenosť fotografického prístroja od objektu 1,2 m).

Na osvetlenie sa použili dve 100 W žiarovky, pričom napätie sa stabilizovalo stabilizátorom napätia ČKD typ ST 150. Pri sledovaní vplyvu zmien osvetlenia sa použili aj dve 200 W žiarovky bez stabilizátora.

Používali sme kinofilm Agfa-Isopan-F 17/10 DIN. (Film Agfa-Isopan-FF 10/10 DIN, ktorý sme pôvodne chceli použiť, nemali sme k dispozícii.)

Vyvolávali sme vo vývojke Agfa 22 [8] (metol 0,8 g, siričitan sodný bezvodý 40 g, bromid draselný 5 g, hydrochinón 8 g, potaš bezvodá 50 g ad 1000 ml) pri teplotách

\* V tejto práci sme jednotlivé faktory spojené s fotografickým procesom menili v oveľa širšom rozsahu, ako sa môžu meniť pri kvantitatívnom vyhodnocovaní chromatogramov, aby sme dokumentovali použiteľnosť tejto metódy názornými číslami. Vyskytli sa nám preto i preexponované alebo podexponované a nedovyvolané negatívy, pri ktorých táto závislosť nie je lineárna. Pri týchto sa korekcia urobila tak, že sa osobitne každá hodnota získaná mikrofotometrickým premeriavaním chromatografickej škvrny prepočítala na základe získaného grafu a z týchto hodnôt sa určila korigovaná hodnota plochy obvyklým spôsobom planimetrickým.

16—24 °C po dobu 2½ až 10 minút. Ustalovač: 200 g tiosíranu sodného kryšt., 20 g meta-siričitanu draselného, 1 g komplexonu II ad 1000 ml.

Negatívy sa premeriavali na rýchlofotometri Zeiss (štrbina 2 mm, 20 násobné zväčšenie, posun po 0,1 mm). Pri meraní sa používala stupnica S — sčernenie.

Ako základná snímka pre metódu prevodového faktora sa brala snímka exponovaná 3 sek., vyvolávaná 5 minút pri 18 °C, osvetlenie  $2 \times 100$  W z kolmej vzdialenosti 1 m.

Výsledky sú zhrnuté v tab. 1 až 5. V prvom riadku je uvedený faktor, ktorý sa v priebehu fotografického procesu menil, v druhom riadku sú hodnoty plôch po planimetrovaní, v treťom riadku hodnoty plôch korigované metódou prevodového faktora.

Ako vyplýva z tab. 1 až 4, možno metódou prevodového faktora znížiť vplyv činiteľov, ktoré sú spojené so zavedením fotografického procesu do priebehu kvantitatívneho vyhodnocovania papierových chromatogramov.

Tabuľka 1

Premenná: expozičná doba  
Vyvolávané 5 minút pri 16 °C, osvetlenie  $2 \times 100$  W zo vzdialenosti 1 m

Exp. (sek.)	2	3	4	5
Plocha (cm <sup>2</sup> )	5,65	7,11	7,66	8,16
P <sub>korig</sub> (cm <sup>2</sup> )	7,10	7,34	7,13	7,24

Tabuľka 2

Premenná: teplota pri vyvolávaní  
Exp. 2 sek., vyvolávané 5 minút, osvetlenie  $2 \times 100$  W zo vzdialenosti 1 m

Teplota (°C)	16	18	20	22	24
Plocha (cm <sup>2</sup> )	5,65	6,06	6,53	6,62	6,65
P <sub>korig</sub> (cm <sup>2</sup> )	7,10	7,28	7,30	7,12	7,10

Tabuľka 3

Premenná: doba vyvolávania  
Exp. 2 sek., teplota pri vyvolávaní 21 °C, osvetlenie  $2 \times 100$  W

Doba vyvolávania (min.)	2,5	5,0	6,5	8,5	10,0
Plocha (cm <sup>2</sup> )	5,93	6,01	6,19	6,56	6,71
P <sub>korig</sub> (cm <sup>2</sup> )	7,22	7,16	7,15	7,36	7,41

Tabuľka 4

Premenná: osvetlenie  
Exp. 2 sek., vyvolávané 5 minút pri 21 °C

Osvetlenie	Plocha (cm <sup>2</sup> )	P <sub>korig</sub> (cm <sup>2</sup> )
2 × 100 W z 1,5 m	3,72	7,31
2 × 100 W z 1,5 m, 100 W z 2 m	4,04	7,50
2 × 100 W z 1,2 m	5,59	7,39
2 × 100 W z 1,2 m, 100 W z 2 m	5,69	7,15
2 × 100 W z 1,0 m	6,46	7,19
2 × 200 W z 1,2 m	7,26	7,24
2 × 200 W z 1,2 m, 100 W z 2 m	7,27	7,06
2 × 200 W z 1,0 m	8,11	7,54

Skutočnosť, že touto metódou možno zvýšiť reprodukovateľnosť výsledkov, dokazuje tab. 5. V prvom riadku sú hodnoty plôch pred korekciou a v druhom riadku po korekcii. Hodnoty sa získali z mikrofotometrického premerania ôsmich negatívov, z ktorých všetky

Tabuľka 5

P (cm <sup>2</sup> )	6,30	6,29	7,01	6,90	7,16	7,18	6,02	6,46
P <sub>korig</sub>	7,10	7,09	7,31	7,07	7,24	7,27	7,16	7,26
	priemer		smerodajná odchýlka			detto v %		
P (cm <sup>2</sup> )	6,67		0,252			3,80		
P <sub>korig</sub>	7,19		0,077			1,07		

boli exponované 2 sek., vyvolávané 5 minút pri 21 °C, pričom na osvetlenie sa použili dve 100 W žiarovky zo vzdialenosti 1,0 m (každý negatív sa vyvolal osobitne).

Smerodajnú odchýlku bolo teda možné pomocou metódy prevodového faktora znížiť z 3,80 % na 1,07 % (vyjadrené v percentách vzhľadom na aritmetický priemer).

### Záver

Kvantitatívne vyhodnocovanie papierových chromatogramov fotometrickým premeriavaním škvŕn na negatívoch získaných ofotografovaním chromatogramov má tieto výhody:

1. Neuplatňuje sa nerovnomerná štruktúra papiera.
2. Možno fotografovať škvŕny s nestálym zafarbením (fotografovanie vždy v rovnakom okamihu po detegovaní chromatogramu).
3. Možno vyhodnocovať difúzne, nepravidelné škvŕny [1].
4. Možno vyhodnocovať škvŕny vyvolané farebným detekčným činidlom (použitie interferenčných filtrov).

5. Možno získať trvalý dokument o vykonanej analýze.

Použitie farebných (interferenčných) filtrov umožňuje zvýšiť citlivosť metódy.

Korekcia pomocou prevodového faktora umožňuje zvýšiť reprodukovateľnosť výsledkov a obmedziť vplyv ťažko kontrolovateľných zmien faktorov, ktoré sú spojené s fotografickým procesom. Použitie prevodového faktora má význam tam, kde sa robí kvantitatívne vyhodnocovanie papierových chromatogramov na základe vopred zostrojenej kalibračnej krivky.

*Ďakujeme inž. J. S u c h é m u z Chemického ústavu SAV v Bratislave za cenné rady.*

### Súhrn

V práci sa opisuje metóda kvantitatívneho vyhodnocovania papierových chromatogramov pomocou mikrofotometrického premeriavania negatívov získaných ofotografovaním chromatogramov za použitia farebných (interferenčných) filtrov. Uvádza sa metóda, pomocou ktorej je možné zvýšiť reprodukovateľnosť výsledkov a vylúčiť vplyv zmien faktorov, ktoré sú spojené s fotografickým procesom.

### ЗАМЕТКА К КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКЕ БУМАЖНЫХ ХРОМАТОГРАММ

А. Р. НЕЙРАТ, Ф. ФРИЧ

Отдел растительной биологии Биохимического института Словацкой Академии Наук в Bratislave

#### Выводы

В работе описывается метод количественной оценки бумажных хроматограмм при помощи микрометрического промера негативов, полученных после сфотографирования хроматограмм с применением цветных (интерференционных) фильтров. Приводится метод, при помощи которого можно повысить воспроизводимость результатов и исключить влияние изменений факторов, связанных с фотографическим процессом.

Поступило в редакцию 21. 10. 1958 г.

### BEITRAG ZUR QUANTITATIVEN AUSWERTUNG VON PAPIER-CHROMATOGRAMMEN

A. R. NEURATH, F. FRIČ

Abteilung für Pflanzenphysiologie des Biologischen Instituts an der Slowakischen Akademie der Wissenschaften in Bratislava

#### Zusammenfassung

Eine Methode für quantitative Auswertung von Papierchromatogrammen mittels mikrophotometrischer Durchmesserung von Negativen, die durch Photographieren von Chromatogrammen bei Anwendung von Farb- (Interferenz-) filtern gewonnen wurden,

wird beschrieben. Es wird eine Methode angegeben mit Hilfe deren es ermöglicht wird, die Reproduzierbarkeit von Ergebnissen zu verbessern und den Einfluss der Änderungen von Faktoren die mit dem photographischen Prozess verbunden sind, auszuschliessen.

In die Redaktion eingelangt den 21. 10. 1958

#### LITERATÚRA

1. M y k o l a j e w y e z R., Anal. Chem. 29, 1300 (1957). — 2. F e l l e g i J., S l á m a L., Chem. zvesti 10, 314 (1956). — 3. V a e c k S. V., Nature 172, 213 (1953). — 4. G u s t a f s s o n C., S u n d m a n J., L i n d h T., Finnish Paper and Timber J. B 33, 1 (1951). — 5. K e i l B., Chem. listy 48, 725 (1954). — 6. N e u r a t h A. R., Referát na konferencii o mikroelementoch u rastlín a živočíchov, Bratislava, 26.—27. júna 1958. — 7. N e u r a t h A. R., F r i č F., Biológia (v tlači). — 8. Agfa Recepte. Filmfabrik Agfa-Wolfen, 1952. — 9. M a r k o v i č O., R e x o v á L., Chem. zvesti 11, 192 (1957).

Došlo do redakcie 21. 10. 1958

*Adresa autorov:*

*Inž. Alexander Róbert Neura th, inž. Fridrich Fri č, Bratislava, Dúbravská cesta 12, Oddelenie rastlinnej biológie Biologického ústavu SAV.*