

Z Zakładu Chemii Ogólnej Akademii Medycznej w Lublinie
Kierownik: zast. prof. dr Irena Krzeczowska

Irena KRZECZKOWSKA

**Badania nad zastosowaniem bibułowej
chromatografii rozdzielczej do wykrywania miedzi
w roztworach o małym stężeniu i w materiale
biologicznym**

**Исследования по применению распределительной
хроматографии на бумаге для определения меди
в растворах с малой концентрацией и в биологическом
материале**

**Investigations on the Application of Partition Paper
Chromatography for Detecting Copper in Solutions of Weak
Concentration and in Biological Material**

Badania chromatograficzne przeprowadzane nad związkami organicznymi miały znacznie większy zakres i rozwijały się szybciej niż nad związkami nieorganicznymi. Tłumaczy się to prawdopodobnie tym, że 1) substancje nieorganiczne zaadsorbowane z trudem dają się eluować, 2) na ruch kationów wpływa wiele czynników: pH, temperatura, rodzaj i stan bibuły, jakość anionu, substancje towarzyszące, układy rozpuszczalników, rodzaj kompleksu oraz 3) związki nieorganiczne dysocjują i ulegają hydrolizie. Począwszy od roku 1949 rozwój chromatografii rozdzielczej związków nieorganicznych posuwa się bardzo szybko i zajmują się nią Arden, Burstall, Davies, Linstead, Lederer, Omnie i inni. (1), (2), (5), (6).

Celem niniejszej pracy było opracowanie prostej metody zagęszczania chromatograficznego oraz zastosowania jej do wykrywania miedzi w roztworach silnie rozcieńczonych i w materiale biologicznym. Przeprowadzenie badań nad związkami miedzi jest uzasadnione zarówno ze względu na problem zatruc zawodowych, jak na dużą rolę miedzi w ustroju a także na zwiększony jej poziom przy niektórych chorobach (choroba Wilsona i inne).

I. METODY BADAŃ I MATERIAŁ

1. W toku badań stosowano różne techniki chromatografii rozdzielczej na bibule.

a) *Chromatografia zstępująca* robiona była w kamerze drewnianej oszklonej o wymiarach $70 \times 54 \times 35$ cm. Dzięki znacznym wymiarom kamery można było wykonać równocześnie kilka prób w tych samych warunkach.

Najlepsze wyniki otrzymywano wówczas, gdy bibułę z nakropioną substancją umieszczano w suchej rynience i pozostawiano przez kilka godzin w celu wysycenia parami rozpuszczalnika. Po dokładnym wysyceniu wypełniano rynienkę do $3/4$ odpowiednio dobranym rozpuszczalnikiem. Kamrę uszczelniano bardzo dokładnie.

Metodą tą badano: a) R_f b) intensywność i wielkość plam dla różnych stężeń badanej substancji, c) wpływ substancji towarzyszących, i d) przydatność różnych gatunków bibuły.

b) *Chromatografia zstępująca w cylindrze.*

Zamiast proponowanego przez W. Hermanowicza i wsp. (4) metalowego statywu używano szklanego cylindra. Na podstawie z dykty umieszczonej na pałeczce szklanej umocowanej w korku cylindra stawiano naczynko przedzielone na połowę dopasowaną szklaną płytką. Paski bibuły wsuwano między szkiełka przedmiotowe i umieszczano w naczynku z rozpuszczalnikiem. Całą aparaturę ustawiano na płycie szklanej i przykrywano cylindrem lub kloszem okrytym czarnym papierem ze względu na światłoczułość związków miedzi. Aparatura ta pozwala na przeprowadzenie dwóch prób równocześnie (ryc. 1).

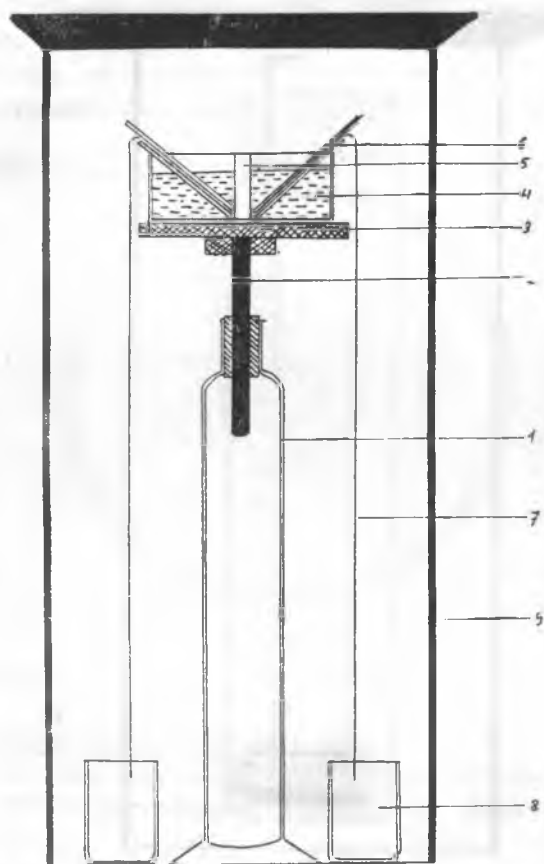
c) *Chromatografia wstępująca.*

Cylinder z bibuły zanurzano jednym końcem w płytce Petri'ego wg techniki Wiliamsa i Kirby'ego (1948), (9). Bibułę o wymiarach 28×25 cm zwijano w rurkę, zeszywając brzegi, zamiast ogólnie przyjętego zwyczaju łączenia ich spinaczami. Unika się w ten sposób zanieczyszczenia bibuły rdzą, a stykając brzegi, zamiast nakładania ich na siebie, zmniejsza się wpływ brzegów na rozwijanie chromatogramu. Tak przygotowane urządzenie nakrywano cylindrem lub kloszem okrytym czarnym papierem. Metodą tą badano R_f oraz rozdzielano mieszaninę: miedź, ołów, bizmut i arsen.

Omawiana technika daje przeważnie dobre wyniki i pozwala na równoczesne nakropienie pojedynczych kationów i ich mieszaniny, umożliwia więc porównanie wyników w jednakowych warunkach, a to jest rzeczą niezmiernie ważną przy wyjątkowej wrażliwości

metody chromatograficznej na różne czynniki (np. różnica w stanie nasycenia kamery itp.).

W ten sam sposób przeprowadzano badania metodą chromatografii dwukierunkowej.

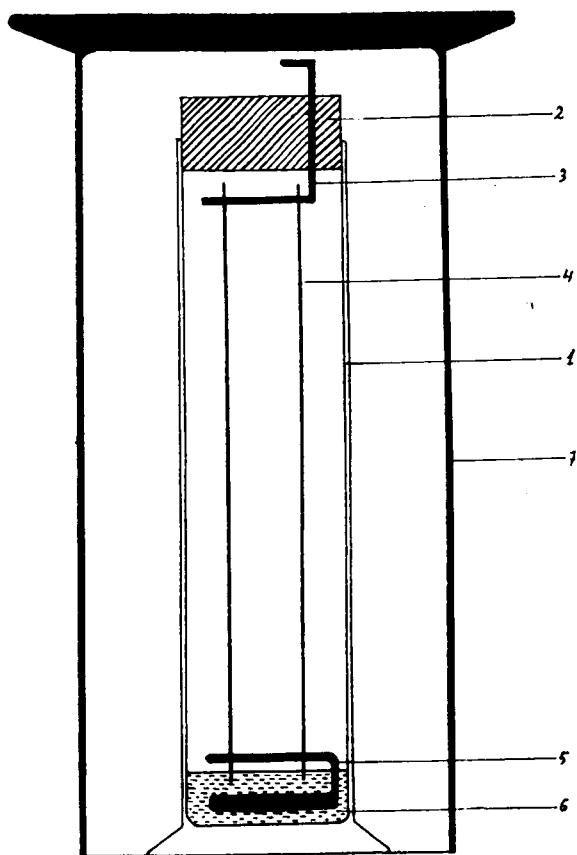


Ryc. 1. Chromatografia rozdzielcza zstępująca: 1. cylinder szklany. 2. pałeczka szklana. 3. podstawka drewniana. 4. naczynko z rozpuszczalnikiem. 5. płytka szklana. 6. szkiełka przedmiotowe. 7. paski bibuły. 8. naczynka z rozpuszczalnikiem. 9. cylinder.

d) *Chromatografia wstępująca w cylindrze miarowym.*

W cylindrach miarowych pół- i jedno-litrowych, w korku umieszczano drut, na którym zawieszano paski bibuły, oddzielone od siebie kawałeczkami pociętej rurki lub szklanymi paciorkami. Zwis-

jące końce bibuły Hermanowicz łączy kapilarką. W naszej pracy łączono je podkówką zrobioną z pałeczki szklanej, której grubszy koniec utrzymywał bibułę w miernym naprężeniu, a tym samym uniemożliwiał falowanie się pasków bibuły oraz stykanie się ich (ryc. 2).



Ryc. 2. Chromatografia rozdzielcza wstępująca wg Hermanowicza.
1. cylinder miarowy. 2. korek. 3. drut. 4. paski bibuły. 5. podkówka szklana.
6. rozpuszczalnik. 7. cylinder.

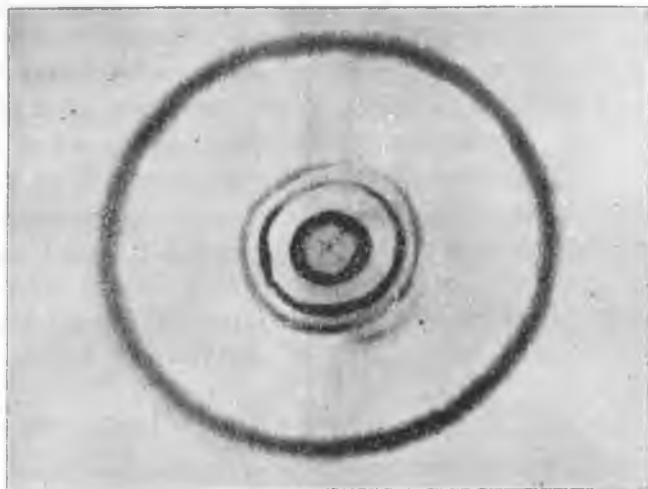
Hermanowicz przeprowadzał 5 prób równocześnie. W pracy niniejszej zakładano tylko cztery paski.

e) Metoda krążkowa w płytkach Petri'ego wg Ruttera (1948, 1949).

Metoda krążkowa Ruttera polega na wycięciu w krążku bibuły wąziutkiego paseczka, obcięciu go do odpowiedniej długości

i zanurzeniu do małego naczynka wagowego lub obciętej płaskodennej próbki umocowanej parafiną w samym środku płytki Petri'ego. Technika ta bardzo często nie daje prawidłowego chromatogramu (promień rozchodzących się kół nie jest równy).

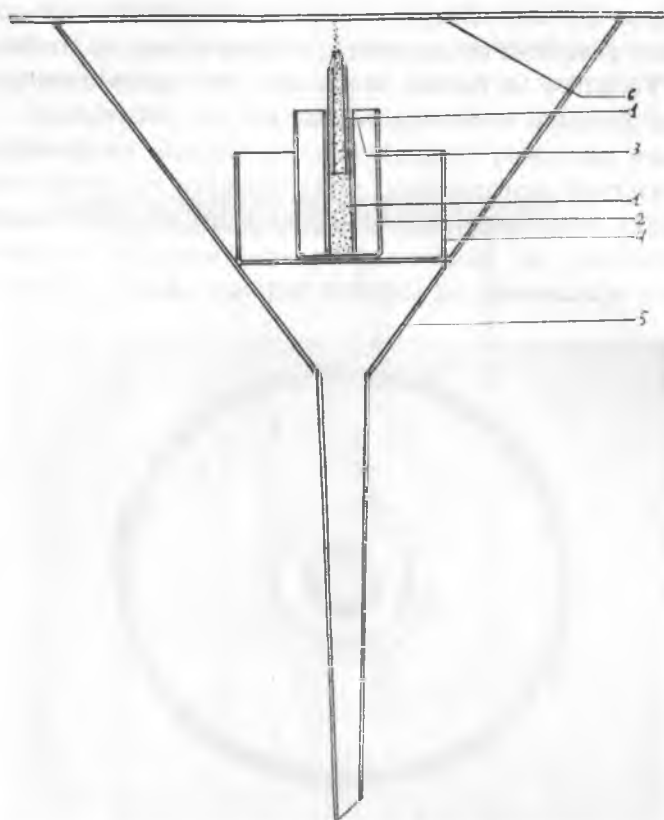
W pracy niniejszej posługiwano się całymi krążkami bibuły, w środek których wprowadzano nitkę bawełny lub cienki paseczek bibuły. Kółka chromatogramu miały idealnie równy promień oraz równą szerokość, co pozwalało na obserwowanie intensywności zabarwienia w zależności od stężenia badanej substancji. (ryc. 3).



Ryc. 3. Chromatogram uzyskany metodą krążkową.

Do dodatknych stron omawianej metody należą: 1) zużywanie bardzo małych ilości rozpuszczalników, 2) szybkość przeprowadzanych prób, oraz 3) możność wyzyskania sączków ilościowych zamiast bibuły Whatmana.

f) *Metodę krążkową R. Schwerdtfegera* (8) zmodyfikowano używając zamiast dwóch współśrodkowych rurek, jednej, obsadzonej w korku, którą umieszczano w szklanym naczynku ustawionym w eksikatorze lub w dużym lejku, na umocowanym wewnątrz oparafinowanym korku. (ryc. 4). Metoda ta jest bardziej kłopotliwa niż poprzednia, wymaga bardzo umiejętnego wypełniania rurki watą oraz odpowiedniego ustawienia aparatu (wata musi lekko dotykać do bibuły). Metodą tą rozdzielano mieszaninę związków miedzi i ołowiu.



Ryc. 4. Metoda krążkowa p/g Schwerdtfegera R.

g) Metoda krążkowa.

Zmodyfikowana metoda Zimmermanna G. i Nehringa K. (10). Krążek bibuły umieszcza się w eksikatorze tuż pod pokrywą. Koniec paseczka bibuły, wprowadzonego do środka krążka, zanurza się w rozpuszczalniku nalany na szkiełko zegarkowe ustawione na zlewce o odpowiedniej wysokości znajdującej się wewnątrz eksikatora.

Metoda dogodna, chromatogramy uzyskane są bardzo prawidłowe, dzięki odpowiedniemu położeniu bibuły przytrzymywanej przez ciężką przykrywą eksikatora. W czasie badań najczęściej stosowano tę metodę.

2. Metody własne zagęszczania roztworów silnie rozcieńczonych, oraz materiału biologicznego.

a) Metoda zagęszczania na trójkącie.

Trójkąt z paskiem u wierzchołka służył do zagęszczania substancji nakropłonej w odległości 2 cm od podstawy. Paseczek bibuły znajdujący się przy wierzchołku trójkąta wsuwno między dwie szklane pałeczki połączone na obu końcach półcentymetrowymi kawałkami węża gumowego.

Pałeczki umieszczano w małym, szklanym akwarium w ten sposób, żeby podstawa trójkąta zanurzyła się na głębokość 1cm w rozpuszczalniku umieszczonym na dnie akwarium.

Przy odpowiednio dobranym układzie rozpuszczalnika, badana substancja była przesunięta na wąski paseczek bibuły u wierzchołka trójkąta i w ten sposób znacznie się zagęszczała.

b) Metoda własna zagęszczania na stożku z bibuły.

Sporządzano stożek z bibuły przedłużony u wierzchołka wąskim paseczkiem bibuły. Substancję nakraplano w odległości 2 cm od podstawy stożka. Stożek ustawiano na płytce Petri'ego napełnionej rozpuszczalnikiem. Całe urządzenie przykrywano lejkiem (o większych od stożka wymiarach).

3. Wywoływacze i wywoływanie.

Używano następujących wywoływaczy: 1) amoniaku gazowego, 2) siarkowodoru gazowego, 3) alizaryny (5% roztworu alkoholowego), i 4) ditizonu oraz amoniaku. (Ditizon wprowadzony przez Fishera i Leopoldi'ego — 1940).

Sporządzono wzorcowy roztwór 20 mg % w oczyszczonym chloroformie, z tego roztworu przygotowywano do badań roztwory o stężeniach od 1% do 3 mg%.

Chromatogramy wywoływano:

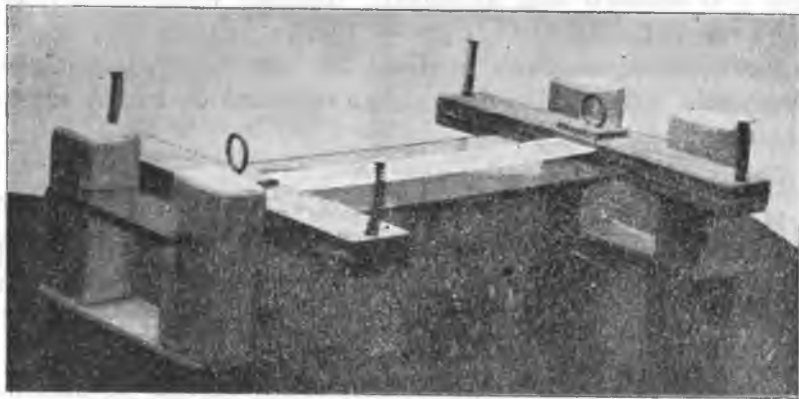
- a) przez zanurzenie pasków bibuły w roztworze odpowiedniego wywoływacza. Metoda nie należy do najlepszych, wskazane jest przestrzeganie jednakowego sposobu zanurzania i wyjmowania pasków, wykonanie musi być szybkie i sprawne, paski należy suszyć w pozycji poziomej.
- b) przez rozpylenie ciekłego wywoływacza. Metodę tę stosowano przy wywoływaniu ditizonem i alizaryną. Przy stosowaniu tego sposobu należy używać rozpylacza szklanego, a nie metalowego

zawierającego miedź. Rozpylając należy chromatogram zraszać a nie moczyć, płyn nie powinien spływać.

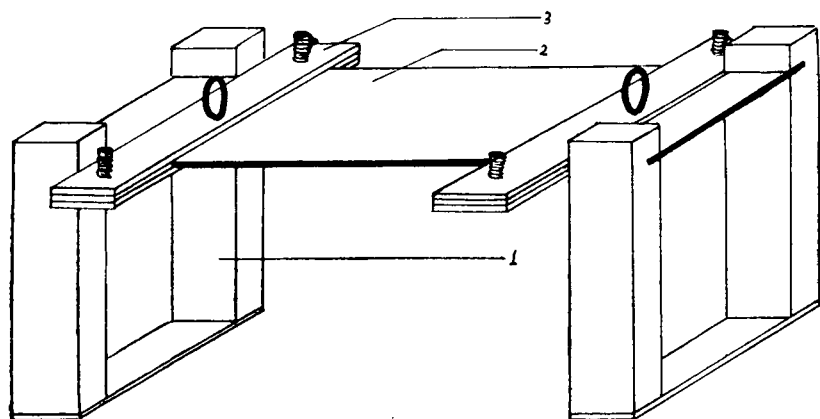
- c) gazowym siarkowodorem, oraz alkalizowanie gazowym amoniakiem. Wywoływano mokre lub suche chromatogramy poddając działaniu gazowego siarkowodoru. W celu równomiernego doprowadzenia siarkowodoru, łączono aparat Kippa rurką gumową z lejkiem, pod którym umieszczano chromatogram. Wywoływanie przeprowadzano również w eksikatorze z tubusem wkładając bibułę tuż pod przykrywą i doprowadzając siarkowodór przez rurkę osadzoną w korku umieszczonym w tubusie. W eksikatorze również wysycano chromatogramy amoniakiem gazowym.

4. Suszenie chromatogramów:

- a) suszenie w suszarce nadawało się przy wywoływaniu alizaryną, która wymaga dokładnego usunięcia rozpuszczalnika.
- b) suszenie suszarką fryzjerską (Foen) było stosowane przy próbach z materiałem biologicznym, gdzie konieczność stężenia wymaga ciągłego i długotrwałego wkraplania. Takie przyspieszone suszenie powoduje często pękanie bibuły.
- c) suszenie w temp. pokojowej, na wolnym powietrzu, dawało najlepsze rezultaty, zwłaszcza jeżeli suszono chromatogramy w pozycji poziomej. Chcąc zapobiec stykaniu się mokrego chromatogramu ze szkłem i umożliwić suszenie w pozycji poziomej skonstruowano specjalny aparat do suszenia chromatogramów. (ryc. 5 i 6).



Ryc. 5. Nowy aparat do suszenia chromatogramów (wykonał Czarnecki Janusz).



Ryc. 6. Nowy aparat do suszenia chromatogramów. 1. podstawka drewniana
2. płytka szklana. 3. ruchome uchwyty.

5. Bibuła chromatograficzna.

- a) Bibułę Whatman Nr 1. używano do chromatografii zstępującej, wstępującej oraz krążkowej przeprowadzanej w eksikatorze.
- b) Do chromatografii krążkowej przeprowadzanej w płytkach Petri'ego używano sączków ilościowych Mundtall Nr OB i Nr OK. Kółka chromatogramów uzyskane na tych gatunkach bibuły są bardzo prawidłowe, ich szerokość i intensywność barwy na całej powierzchni jednakowa.
- c) Bibuła Whatman Nr 31 doskonale nadaje się do metody stożkowej.
- d) Bibuła ilościowa szwedzka Mundtall N. 00 nie nadawała się do naszych celów.
- e) Bibuła Schleicher — Schüll N. 589 z „niebieskim paskiem”, posiada zanieczyszczenia i wodne znaki dzięki czemu chromatogramy są zniekształcone (eliptyczne). Rozpuszczalnik rozchodzi się szybciej w kierunku zgodnym ze znakami wodnymi, aniżeli w kierunku prostopadłym do nich. Rf kółek uzyskanych na tej bibule obliczano w miejscu o największym promieniu, oraz miejscu o najmniejszym promieniu, średnią z tych dwóch pomiarów przyjmowano za Rf. W ten sposób obliczane Rf na ogół zgadzało się z wartością Rf obliczoną na innych gatunkach bibuły — przy zachowaniu innych warunków zgodnych.
- f) Bibuła Schleicher — Schüll N 597 nadawała się do badań.

- g) Spływ na bibule Schleicher — Schüll N 604 jest zbyt szybki — bibuła rzadka i wiotka.
- h) Bibuła Schleicher — Schüll N 590, kółka chromatogramów były zbyt szerokie w porównaniu z kółkami uzyskanymi na innych bibułach — co nie pozwalało na wyciągnięcie z intensywności zabarwienia, wniosków dotyczących ilościowej zawartości miedzi.
- i) Bibuła krajowa nie nadawała się. Uzyskane kółko chromatogramu było jak gdyby cieniowane, poszczególne sektory posiadały różną intensywność barwy. Barwne koło było zbyt szerokie, rozlane, kontury mało ostre.

6. Rozpuszczalniki.

Używano przeważnie układów:

n-butanol — kwas octowy — woda

- | | | | | | |
|----|-------------------------------|---|-----|---|------|
| a) | 5 | : | 1 | : | 4 |
| b) | 4 | : | 1 | : | 1 |
| c) | 4 | : | 1 | : | 5 |
| d) | 4 | : | 1 | : | 4 |
| e) | 4 | : | 1 | : | 3 |
| f) | n-butanol — kwas solny — woda | | | | |
| | 4 | : | 1 | : | 5 |
| | 5 | : | 1 | : | 4 |
| g) | kolidyna — kwas azotowy 0,4 n | | | | |
| | 1 | : | 1 | | |
| h) | pirydyna — kwas azotowy 0,5 n | | | | |
| | 1 | : | 1 | | |
| i) | aceton — kwas solny — woda | | | | |
| | 97 | : | 1,5 | : | 1,5 |
| | 85 | : | 3,3 | : | 11,7 |

II. BADANIA WŁASNE I OMÓWIENIE WYNIKÓW.

1. Zakres stężeń roztworów używanych do badań.

Do badań używano roztworów o stężeniach od $10^{-4}\%$ do $10^0\%$ chlorku miedziowego p. a. — nakraplając krople w różnych ilościach mikrolitrów.

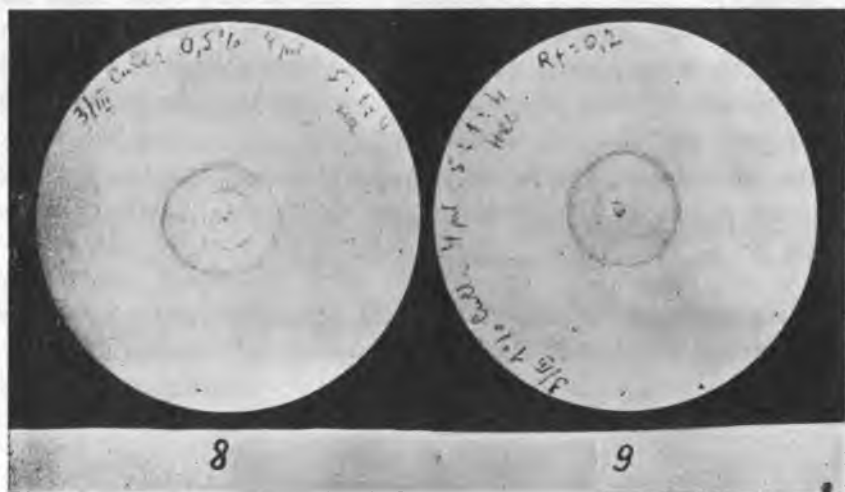
Plamki o zawartości 0,5 gamma miedzi dawały tylko lekki ślad barwy brązowej, szybko znikający. Przy ilości miedzi 50 gamma i więcej, uzyskane plamki miały większą powierzchnię od powierzchni kropli nakropionej. Przy ilości ok. 94 gamma plamy chromatogramu rozlewały się i zniekształcały.

Na ogół plamy uzyskiwane przez wywoływanie gazowym siarkowodorem są bardzo trwałe, bledną, ale nie znikają, nawet po dwóch latach.

W celu ustalenia orientacyjnej oceny ilościowej, sporządzano wzorce z roztworów o znanym stężeniu. Stopniowa zmiana natężenia barwy kropli lub kółka odpowiadały wzrostowi stężenia (Ryc. 7, 8, 9, 10 i 11).

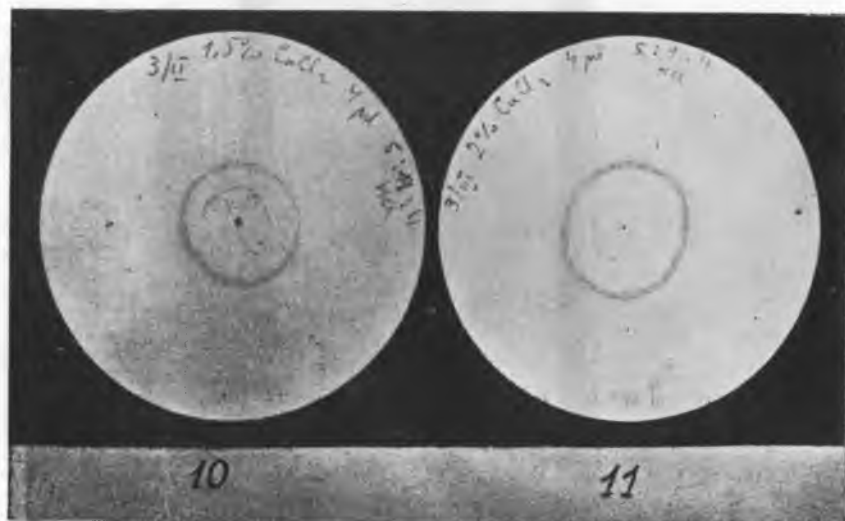


Ryc. 7. Chromatogram uzyskany metodą zstępującą. Roztwory chlorku miedziowego 0,1‰, 0,25‰, 0,5‰, 1‰.



Ryc. 8. Chromatogram uzyskany metodą krążkową. Roztwór chlorku miedziowego 0,5%.

Ryc. 9. Chromatogram uzyskany metodą krążkową. Roztwór chlorku miedziowego 1%.



Ryc. 10. Chromatogram uzyskany metodą krążkową. Roztwór chlorku miedziowego 1,5%.

Ryc. 11. Chromatogram uzyskany metodą krążkową. Roztwór chlorku miedziowego 2%.

2. Oznaczenie współczynnika R_f .

Pojęcie współczynnika podziału wprowadzili *Consden R., Martin A. J. P.* i inni (1948). Bezpośrednie oznaczenie tego współczynnika jest trudne i uproszczono je wprowadzając R_f .

$$R_f = \frac{\text{przesunięcie kropli badanego związku}}{\text{przesunięcie czoła rozpuszczalnika}}$$

Na wartość R_f w dużym stopniu wpływały między innymi:

- wielkość kamery i wypływający stąd stan jej wysycenia parami rozpuszczalnika. (Tabela I i II, ryc. 12, 13, 14).
- układ rozpuszczalników. (Tabela III, ryc. 15, 16, 17).
- jakość bibuły, (omówiono przy materiałach). (Ryc. 18, 19, 20).
- wpływ temperatury. (Tabela IV i V).
- wpływ pH. (Tabela VI i VII, ryc. 21, 22).

Temperatura, jak się okazało, w zakresie kilku stopni, nie wpływa na wartość R_f , większe zmiany wpływają na szybkość spływu rozpuszczalnika i powodują gorszy rozdział. Przy temperaturach wysokich np. 50° C i wyżej, szybkość parowania rozpuszczalnika wpływa niekorzystnie na jakość chromatogramu i możliwość obliczenia R_f . W niskich temperaturach otrzymuje się chromatogramy węższe o intensywniejszym zabarwieniu i ostrych konturach. Nawet przy większych stężeniach (ok. 94 gamma) w niskich temperaturach plamy i krążki nie rozlewają się.

Tabela I

Zależność wartości R_f od wielkości kamery przy układzie: n-butanol — kwas solny — woda w stosunku 5 : 1 : 4

metoda	chromatografia rozdzielcza zstępująca		chromatografia rozdzielcza wstępująca		chromatografia rozdzielcza krążkowa	
kamera	kamera duża oszklona	cylinder miarowy	cylinder miarowy	rura z bibuły w płytce Petri'ego	w płytkach Petri'ego	w eksikatorze
R_f	w granicach 0,27—0,33	w granicach 0,19—0,23	w granicach 0,15—0,20	w granicach 0,24—0,32	w granicach 0,18—0,38	w granicach 0,32—0,38

Tabela II

Zależność Rf od wielkości kamery, temp. od 14°C — 22°C

L.p.	Układ rozpuszczalnika	Temp.	Ilość na- kropł. sub- stancji w mfkro- litrach	Stęż. w %	Czas spły- wu	Rf	Uwagi
	n-butanol—kw. solny—woda				nie od- noto- wano		
1.	5 : 1 : 4	14°C	4	0.2		0,21	Płytki Petriego Nr 1
2.	5 : 1 : 4	14°C	4	0.25	1h —	0,18	
3.	5 : 1 : 4	14°C	4	0.1	1h 10'	0,22	
4.	5 : 1 : 4	14°C	4	0.05	1h 05'	0,21	
5.	5 : 1 : 4	14°C	4	1.0	1h 28'	0,24	
6.	5 : 1 : 4	14°C	2	0.5	— 50'	0,26	
7.	5 : 1 : 4	18°C	2	10,0	2h 35'	0,34	Płytki Petriego Nr 2
8.	5 : 1 : 4	18°C	2	10,0	1h 50'	0,34	
9.	5 : 1 : 4	18°C	2	2,0	1h 45'	0,35	
10.	5 : 1 : 4	18°C	2	2,0	1h 20'	0,35	
11.	5 : 1 : 4	18°C	2	2,0	1h 15'	0,35	
12.	5 : 1 : 4	18°C	2	0,5	2h 55'	0,35	
13.	5 : 1 : 4	22°C	2	0,5	2h —	0,38	
14.	5 : 1 : 4	20°C	2	0,5	— 50'	0,37	
15.	5 : 1 : 4	20°C	2	0,5	— 50'	0,36	

Tabela III

Układy rozpuszczalników

L.p.	Układ rozpuszczalnika	Uwagi
1.	n-butanol—kw. octowy—woda 4 : 1 : 5	nie nadaje się do rozdzielania Cu, Pb, Hg
2.	n-butanol—kw. octowy—woda 4 : 1 : 1	dobry rozdział Cu, Pb, Bi i Hg
3.	n-butanol—kw. octowy—woda 4 : 1 : 4	Hg i Bi rozdział dobry Cu i Pb łączą się
4.	n-butanol—kw. octowy—woda 4 : 2,5 : 2,5	przy plamach tworzą się ogony Rf trudne do oznaczenia
5.	n-butanol — kwas solny — woda 4 : 1 : 4	większe Rf i lepsze chroma- togramy niż przy układzie z kw. octowym

L.p.	Układ rozpuszczalnika	Uwagi
6.	n-butanol—kwas solny—woda 4 : 1 : 5	większe Rf i lepsze chromatogramy niż przy układzie z kw. octowym
7.	aceton — kwas solny — woda 87 : 3,3 : 11,7	nie nadawał się do pracy
8.	kolidyna — kwas azotowy 0,4n 1 : 1	nadaje się do metody stożkowej rozdzielono Cu i Pb
9.	pirydyna—kwas azotowy 0,5n 1 : 1	nadaje się bardzo dobrze do metody stożkowej rozdzielono Cu i Pb oraz Fe i Cu

Tabela IV

Zależność wartości Rf od temperatury. Badania przeprowadzone w płytce Petri'ego N 2. Temp. od 12°C — 35°C.

L p.	Układ rozpuszczalnika	Temp.	Ilość n-kropl. substancji w mikrolitrach	Stęż. w %	Czas spływu	Rf
	n-butanol—kwas solny—woda					
1.	4 : 1 : 5	12° C	2	0,5	1h 02'	0,28
2.	4 : 1 : 5	12° C	2	0,5	1h 02'	0,28
3.	4 : 1 : 5	13° C	3	1,0	— 50'	0,27
4.	4 : 1 : 5	14° C	2	10,0	— 47'	0,29
5.	4 : 1 : 5	14° C	2	10,0	1h —	0,30
6.	4 : 1 : 5	14° C	2	10,0	1h 05'	0,32
7.	4 : 1 : 5	20° C	3	1,0	1h —	0,32
8.	4 : 1 : 5	20° C	2	2,0	2h —	0,31
9.	4 : 1 : 5	20° C	2	2,0	1h —	0,33
10.	4 : 1 : 5	23° C	2	2,0	— 35'	0,31
11.	4 : 1 : 5	33° C	2	1,0	2h —	0,34
12.	4 : 1 : 5	35° C	1	1,0	1h —	0,34
13.	4 : 1 : 5	35° C	1	1,0	1h —	0,36
14.	4 : 1 : 5	35° C	3	11,5	1h 15'	0,43

Tabela V. Zależność wartości R_f od układu rozpuszczalników i temperatury

L.p.	Układ rozpuszczalnika	Temp.	Ilość na- kropl. sub- stancji w mikro- litrach	Stęż. w %	Czas spły- wu	R_f
kolidyna — 0,4N kw. azotowy						
1.	1 : 1	—7° C	4	10,0	1h —	0,91
2.	1 : 1	—7° C	4	10,0	2h —	0,99
3.	1 : 1	19° C	4	1,0	2h 50'	0,88
aceton—kwas solny—woda						
4.	85 : 3,3 : 11,7	12° C	3	1,5	— 40'	0,70
5.	85 : 3,3 : 11,7	22° C	2	10,0	— 40'	0,87
6.	85 : 3,3 : 11,7	50° C	3	1,0	— 35'	0,79
n-butanol—kwas solny,—woda						
7.	5 : 1 : 4	—7° C	3	1,0	1h 50'	0,34
8.	5 : 1 : 4	14° C	2	0,5	2h —	0,29
9.	5 : 1 : 4	22° C	2	0,5	2h —	0,37
10.	5 : 1 : 4	50° C	3	1,0	1h 25'	0,43
n-butanol—kw. octowy—woda						
11.	5 : 1 : 4	—7° C	3	1,0	1h 50'	0,24
12.	5 : 1 : 4	50° C	3	1,0	1h 35'	0,33

Tabela VI. Wpływ temperatury oraz pH na wartość R_f .

L.p.	Układ rozpuszczalnika	Temp.	Ilość na- kropl. sub- stancji w mikro- litrach	Stęż. w %	Czas spły- wu	R_f
n-butanol—kwas solny—woda						
1.	5 : 1 : 4	50° C	3	1,0	1h 25'	0,43
2.	5 : 1 : 4	28° C	2	2,0	1h 45'	0,38
3.	5 : 1 : 4	22° C	2	0,5	2h —	0,37
4.	5 : 1 : 4	20° C	2	0,5	— 50'	0,37
5.	5 : 1 : 4	20° C	2	0,5	— 56'	0,36
6.	5 : 1 : 4	18° C	2	2,0	1h 20'	0,33
7.	5 : 1 : 4	—7° C	3	1,0	1h 40'	0,24
n-butanol—kw. octowy—woda						
8.	5 : 1 : 4	50° C	3	1,0		0,37
9.	5 : 1 : 4	50° C	3	1,0	1h 35'	0,35
10.	5 : 1 : 4	—7° C	3	1,0	1h 50'	0,24

Tabela VII

Zależność wartości R_f od układu rozpuszczalnika i pH. Badania przeprowadzone w płytce N 1

L. p.	Układ rozpuszczalników	Temp.	Ilość na- kropl. sub- stancji w mikro- litrach	Stęż. w %	R_f
	n-butanol — kwas oct. — woda				
1.	4 : 1 : 5	20° C	2	1,5	0,16
2.	4 : 1 : 5	20° C	2	1,5	0,17
3.	4 : 1 : 5	20° C	2	0,5	0,22
	n-butanol — kwas sol. — woda				
4.	4 : 1 : 5	20° C	3	1,0	0,32
5.	4 : 1 : 5	20° C	3	1,0	0,30
6.	4 : 1 : 5	20° C	3	1,0	0,27
7.	4 : 1 : 5	20° C	5	1,0	0,32
8.	4 : 1 : 5	20° C	6	1,0	0,29
9.	4 : 1 : 5	20° C	9	1,0	0,29
10.	4 : 1 : 5	20° C	10	1,0	0,27

f) Wpływ substancji towarzyszących.

Oznaczano R_f pojedynczych pierwiastków (miedź, rtęć, ołów, arsen) oraz w mieszaninach. (Ryc. 23).

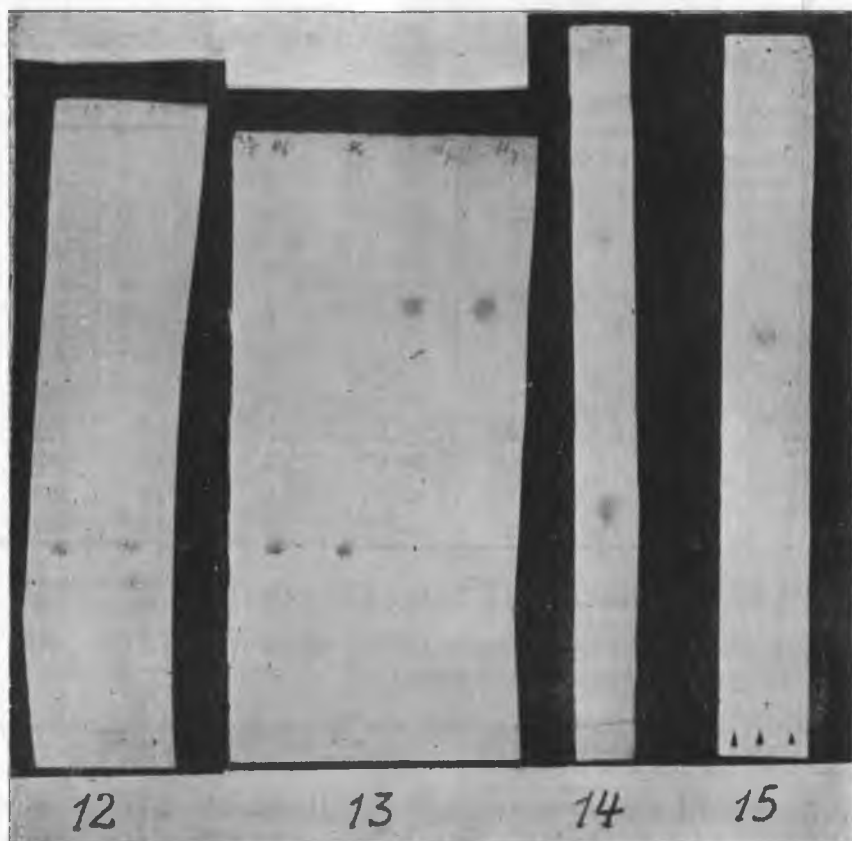
Miedź wywoływano w środowisku kwaśnym, przeważnie gazowym siarkowodorem. Ditizonem wywoływano przy pH ok. 4,5.

Badano R_f miedzi w mieszaninach: miedź-ołów; miedź-rtęć; miedź-ołów-rtęć; miedź-żelazo; miedź-ołów-żelazo. Otrzymano dla R_f wartość wyższą aniżeli w przypadku badania R_f dla samej miedzi. Duże ilości chlorku sodu powodowały zniekształcenie plam i kółek.

3. *Wywoływacze używane w pracy i sposób wywoływania* (Tabela VIII).

4. *Metoda zagęszczania substancji silnie rozcieńczonych na trójkącie.*

Opisaną metodą uzyskiwano zagęszczenia: zwiększając odpowiednio trójkąt, wydłużając paseczek bibuły znajdującej się u jego wierzchołka, zwężając ten paseczek itp.

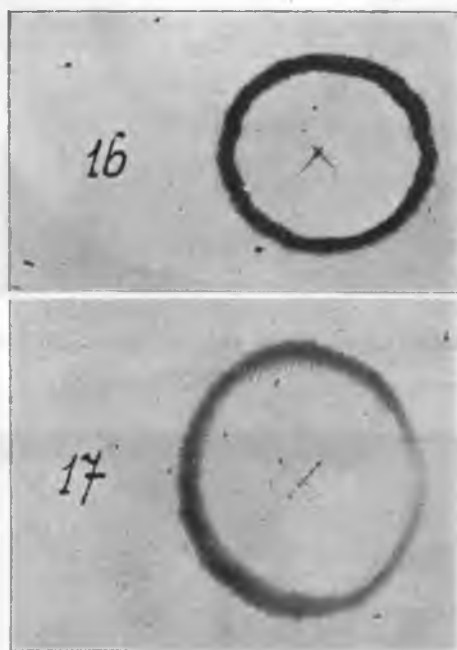


Ryc. 12. Chromatogram uzyskany metodą zstępującą. Kamera $70 \times 54 \times 35$ cm.
Miedź wywołana siarkowodorem.

Ryc. 13. Chromatogram uzyskany metodą zstępującą. Kamera $70 \times 54 \times 35$ cm.
Ołów i rtęć wywołane siarkowodorem.

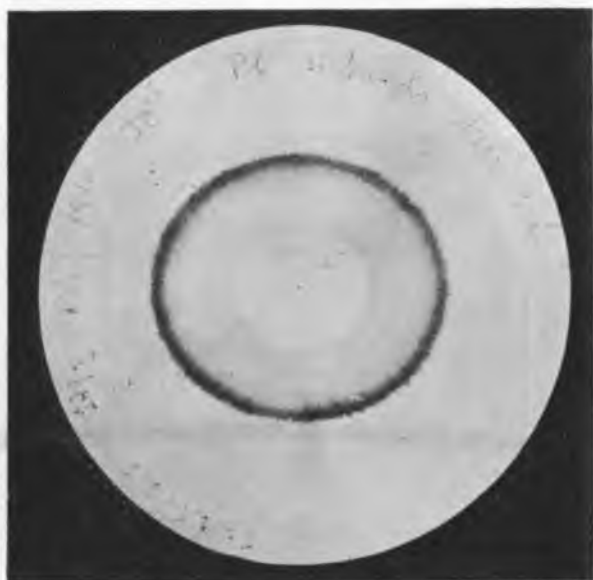
Ryc. 14. Chromatogram uzyskany metodą zstępującą w cylindrze. Miedź
wywołana siarkowodorem.

Ryc. 15. Chromatogram uzyskany metodą wstępującą w cylindrze.
Rozpuszczalnik aceton : kw. solny : woda w stosunku $86 : 3,3 : 11,7$.
Bibula Whatman N 1.

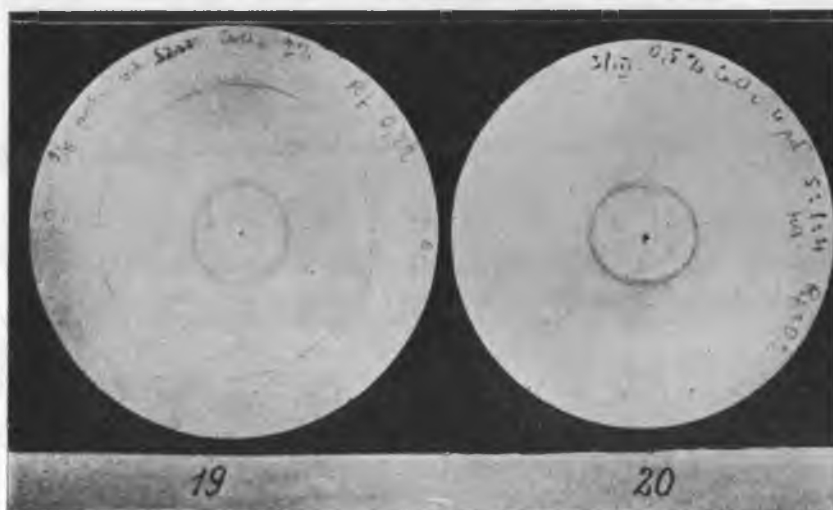


Ryc. 16. Chromatogram na bibule Whatman N 1.
układ rozp. n-butanol : kwas octowy : woda w stosunku 4 : 1 : 1.

Ryc. 17. Chromatogram na bibule Whatman N 1.
układ rozp. n-butanol : kwas octowy : woda w stosunku 4 : 1 : 1.

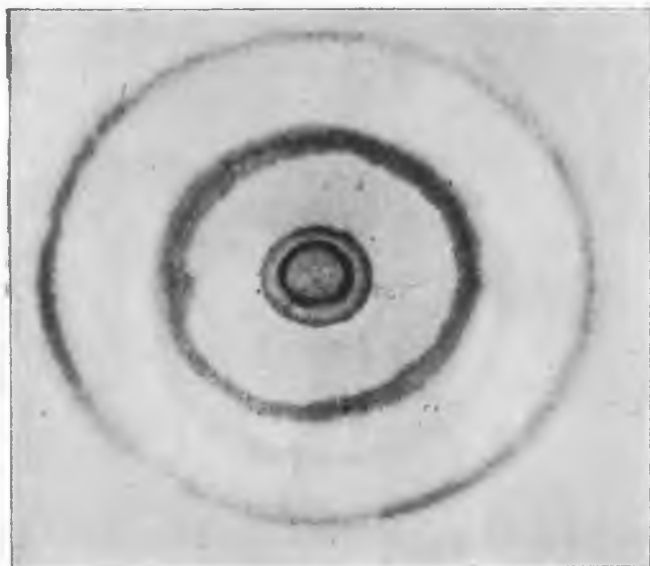


Ryc. 18. Chromatogram na bibule Schleicher — Schüll 589 wywołany siarkowodorem.

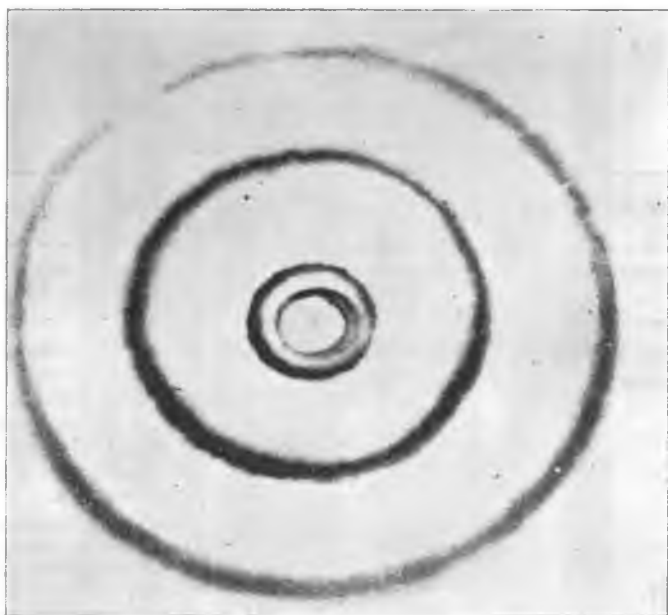


Ryc. 19. Chromatogram na bibule szwedzkiej Mundstall OB wywołany ditizenem.

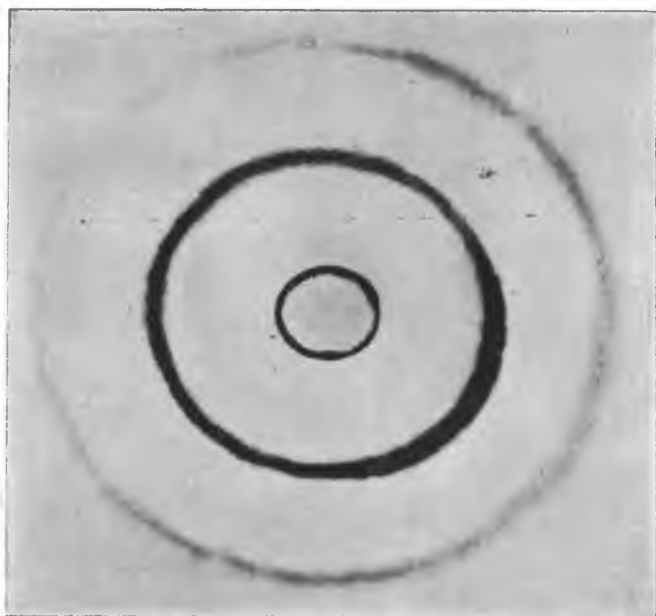
Ryc. 20. Chromatogram na bibule Schleicher — Schüll 597 wywołany siarkowodorem.



Ryc. 21. Chromatogram uzyskany przy ukł. rozpuszczalnika
n-butanol : kwas octowy : woda w stosunku 4 : 1 : 1.



Ryc. 22. Chromatogram uzyskany przy ukł. rozpuszczalnika
n-butanol : kw. solny : woda w stosunku 4 : 1 : 1.



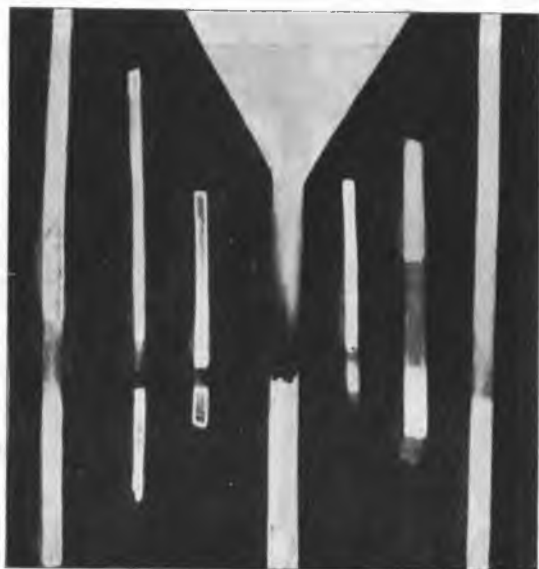
Ryc. 23. Chromatogram mieszaniny kationów: Pb, Bi, As, Hg (As jasno żółty niewidoczny na zdjęciu).

Tabela VIII
Wywoływacze i sposób wywoływania.

L. p.	Wywoływacz	barwa	Sposób wywoływania
1.	amoniak	szafirowa	mokry chromatogram trzymano w gazowym amoniaku
2.	siarkowodór gazowy	brązowo-czerw.	a) mokry chromatogram poddawano działaniu gazowego siarkowodoru, b) mokry chromatogram poddawano działaniu gazowego amoniaku, a następnie siarkowodoru, c) suszono chromatogram, zraszano roztworem amoniaku i wywoływano siarkowodorem, d) suchy chromatogram poddawano działaniu gazowego amoniaku i siarkowodoru

L. p.	Wywoływacz	barwa	Sposób wywoływania
3.	alizaryna	różowa	po wysuszeniu i dokładnym usunięciu rozpuszczalnika zraszano 1% roztworem alkoholowym alizaryny
4.	ditizon	czerw.-brąz. barwa zmienna w zależności od stężenia ditizonu	suchy chromatogram zrasza no ditizonem a następnie rozpylano amoniak

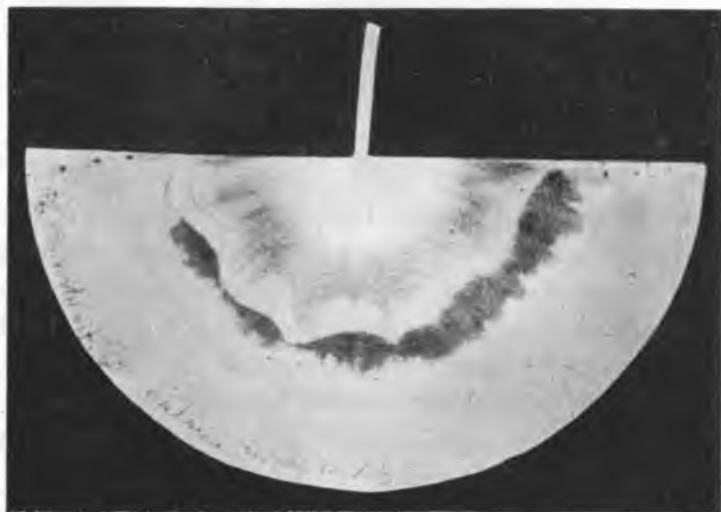
Zagęszczenie można uzyskać przez dobranie układu rozpuszczalników dającego wartość R_f taką, by badana substancja mogła się przesunąć na paseczek bibuły znajdujący się przy wierzchołku. Ryc. 24 przedstawia trójkąt i szereg paseczków z innych trójkątów. Zebrana na paseczku badana substancja jest widoczna w formie ciemnej plamki. Chcąc zgromadzić substancję na możliwie małej przestrzeni przepuszczano rozpuszczalnik kilkakrotnie przed wywołaniem, a po uprzednim wysuszeniu.



Ryc. 24. Metoda zagęszczania na trójkącie. Trójkąt z zagęszczoną substancją
Paski z zagęszczoną miedzią.

5. *Metoda zagęszczania substancji silnie rozcieńczonych na stożku.*
Technika wykonania.

Stożek przygotowuje się przez wycięcie z bibuły półkola z wąskim długim paseczkiem odchodzącym od środka półkola. (Ryc. 25).



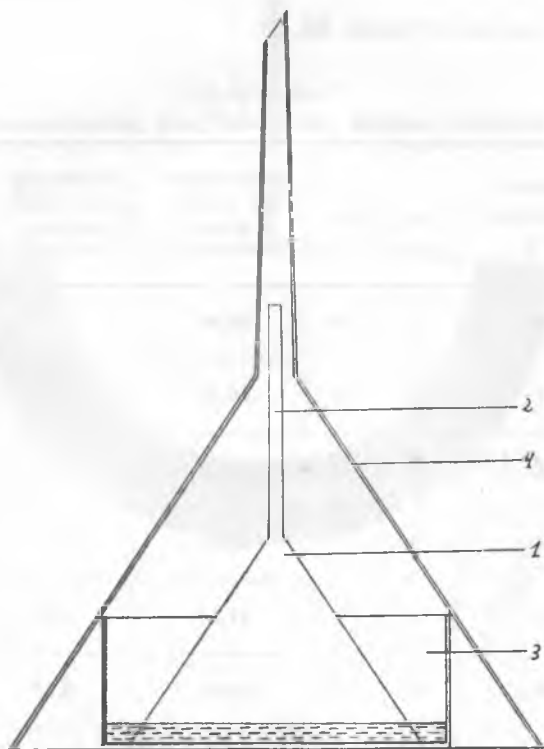
Ryc. 25. Metoda stożkowa Stożek rozwinięty.



Ryc. 26. Miedź zagęszczona metodą stożkową.

Półkole zeszywa się w ten sposób, żeby utworzył się stożek z wąskim i długim paseczkiem przy wierzchołku. (Ryc. 26).

Stożek wstawia się do płytki Petri'ego, w której znajduje się rozpuszczalnik i nakrywa lejką w ten sposób, żeby paseczek znajdował się w rurce lejka. (Ryc. 27).



Ryc. 27. Aparat do metody stożkowej.

Należy dobrać taki układ rozpuszczalnika, żeby substancja badana została przesunięta aż na wąski paseczek bibuły.

W celu wykrywania miedzi używano układów: kolidyna — kwas azotowy 0,4 n w stosunku 1 : 1 oraz pirydyna — kwas azotowy 0,5 n w stosunku 1 : 1.

Zagęszczenie substancji osiąga się przez: a) kilkakrotne nakrapianie po uprzednim wysuszeniu, b) zwiększenie powierzchni stożka, a więc równoczesne zwiększenie powierzchni nakropionej, c) zwężenie paseczka bibuły znajdującego się przy wierzchołku.

Wielkość zagęszczenia regulujemy stosując jeden ze sposobów: a, b, lub c, ewentualnie równocześnie dwa lub wszystkie trzy sposoby. Wielkość powierzchni nakropionej można obliczyć stosując wzór:

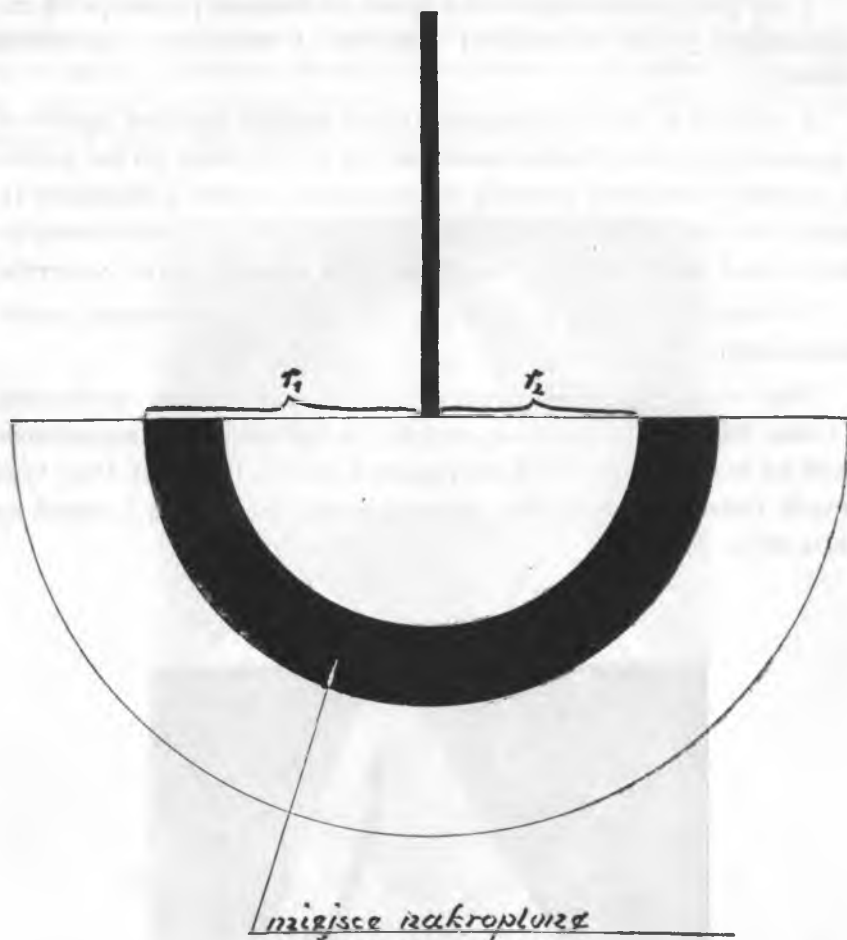
$$S = \frac{\pi r_1^2 - \pi r_2^2}{2}$$

Wyniki podano w tabeli IX.

Tabela IX
Zagęszczenia uzyskane metodą „stożkową“ przy jednorazowym nakropieniu.

Lp.	Stężenie subst. nakr. w %	r ₁	r ₂	Powierzchnia nakropiona w cm ²	Powierzchnia subst. zagęszcz. w cm ²	Zagęszczenie
1.	0,01	8	6	43,96	2,1	20,9
2.	0,01	10	8	56,52	2,1	26,9
3.	0,01	10	9	29,83	1,25	23,9
4.	0,01	9	7	50,24	1,0	50,2
5.	0,02	8	7	47,10	1,5	31,4
6.	0,001	8	6	43,96	0,25	175,8
7.	0,001	8	6	43,96	0,6	73,3
8.	0,001	8	7	47,10	2,4	19,1
9.	0,001	10	8	56,52	2,5	22,6
10.	0,001	9	6,7	56,70	1,5	37,8

W celu umiejscowienia badanej substancji na jak najmniejszej przestrzeni należy kilka razy przepuścić przez stożek rozpuszczalnik po uprzednim wysuszeniu, a przed wywołaniem. Metodą tą uzyskano zagęszczenie ok. 200-krotne.



Ryc. 28. Metoda stożkowa. Miejsce nakropienia.

Nieźmiernie ważną rzeczą jest odpowiednie sporządzenie stożka oraz baczna obserwacja czoła poruszającego się rozpuszczalnika, który nie powinien dochodzić do końca paseczka.

6. *Zastosowanie metody stożkowej do wykrywania miedzi w materiale biologicznym.*

1 sposób: 40 ml moczu odparowywano do suchości na łaźni piaskowej, a następnie spalano w piecu muflowym w temp. 500° — 600° C. Po spaleniu rozpuszczano w 3 ml 3n kwasu azotowego i dopełniano wodą redetylowaną do 100 ml.

Z tak przygotowanego moczu brano do badania próbki po 15 ml, zagęszczając je do minimalnej objętości i wkraplano na stożek z bibuły.

2 sposób: Mocz przygotowywano ogólnie znanym sposobem w aparacie Kiejdala. Zastosowanie użytej przeze mnie po raz pierwszy metody stożkowej pozwala na eluowanie miedzi i ilościowe jej oznaczenie innymi metodami analitycznymi, oraz na porównanie intensywności zabarwienia z zabarwieniem sporządzonych wzorców.

W niniejszej pracy zajmowano się tylko wykrywaniem miedzi (jakościowo).

Przy użyciu układów: pirydyna : 0,5 n kwas azotowy w stosunku 1 : 1 oraz kolidyna : 0,4 n kwas azotowy w stosunku 1 : 1, zagęszczono miedź na małym paseczku u wierzchołka stożka. (Ryc. 29). Przy tych samych układach oddzielono również miedź od ołowiu i miedź od żelaza (Ryc. 30).



Ryc. 29. Miedź zagęszczona na końcu paseczka. Układ kolidyna : 0,4 n kwas azotowy, (1 : 1).

Stosując wyżej podane metody przygotowania materiału biologicznego do analizy oraz używając roztworu kwasu tróchlorooctowego w celu uwolnienia miedzi z kompleksu wykrywano przy użyciu metody stożkowej ślady miedzi w moczu, krwi i mleku kobiet karmiących. (Ryc. 31). Badania ilościowe w toku.

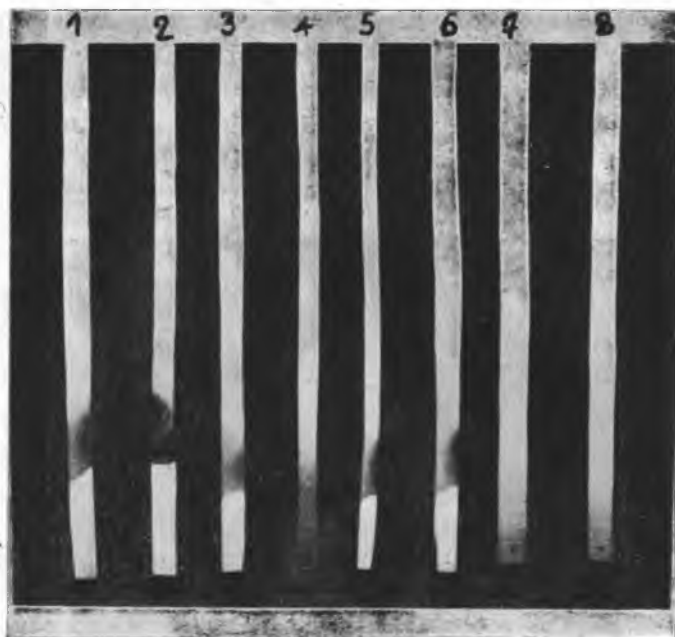


Ryc. 30. Rozdzielenie śladów miedzi od ołowiu. Miedź na pasku, ołów na stożku.

III. WNIOSKI

W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono że:

- 1) plamy i koła chromatogramów mają najostrzejsze zarysy w zakresie 0,5 gamma do 50 gamma miedzi w nakropionej kropli.
- 2) na wartość R_f mają wpływ takie czynniki jak: stan wysycenia kamery parami rozpuszczalnika (wielkość i stopień uszczelnienia kamery), jakość użytego układu rozpuszczalnika, rodzaj bibuły użytej do badań, jej czystość, gęstość i jednolitość, pH, temperatura, substancje towarzyszące.



Ryc. 31. Paski bibuły z wykrytą miedzią w materiale biologicznym 1, 2 — miedź z rozcieńczonego roztworu chlorku miedziowego; 3, 4 — miedź w mleku kobiet karmiących; 5, 6 — miedź w moczu chorego na chorobę Wilsona; 7, 8 — miedź we krwi.

- 3) układ rozpuszczalnika ma wpływ nie tylko na wartość R_f ale i na jakość chromatogramu (ostrość konturów, plam i kółek oraz na dobry rozdział).
- 4) do chromatografii rozdzielczej zstępującej i wstępującej najlepiej nadaje się bibuła Whatman Nr 1.
- 5) do chromatografii rozdzielczej krążkowej prócz Whatmana N 1 nadaje się bibuła szwedzka Mundtall OB i OK.
- 6) do metody zagęszczania „stożkowej” należy używać bibuły Whatman N 31.
- 7) do przeprowadzonych badań nadawały się układy rozpuszczalników:

n-butanol : kwas octowy : woda w stosunku 4 : 1 : 1

n-butanol : kwas solny : woda w stosunku 5 : 1 : 4 i 4 : 1 : 5

- 8) używając metody „stożkowej” uzyskano dobre zagęszczenie roztworów miedzi przy użyciu układu rozpuszczalników:
 pirydyna : 0,5 n kwas azotowy w stosunku 1 : 1.
 kolidyna : 0,4 n kwas azotowy w stosunku 1 : 1.
- 9) dodatek kwasu wpływa na tworzenie się prawidłowych kółek i plam o ostrych konturach.
- 10) znaczne podwyższenie temperatury ujemnie wpływa na ostrość konturów plam i na jakość rozdziału poszczególnych kationów (granice zacierają się), zmiany temperatur w małych zakresach nie wywierają dostrzegalnego wpływu na Rf.
- 11) często skład badanej mieszaniny ma wpływ na układ plam i kółek chromatogramu.
- 12) podwyższenie pH — ma korzystny wpływ na wielkość Rf.
- 13) najkorzystniejszym sposobem suszenia chromatogramów jest suszenie na wolnym powietrzu w temp. pokojowej, przy czym chromatogram powinien być zawieszony w ułożeniu poziomym.
- 14) dobre wyniki daje wywoływanie wywoływaczami gazowymi. Przy rozpylaniu wywoływacz ciekły musi dawać mgiełkę, żeby chromatogram był zroszony, ale nie zamoknięty, płyn nie może spływać, rozpylacz powinien być szklany.
- 15) wprowadzono metodę zagęszczania roztworów silnie rozcieńczonych na trójkącie z paseczkiem bibuły u wierzchołka.
- 16) wprowadzono „stożkową” metodę chromatograficznego zagęszczania pozwalającą osiągnąć zagęszczenie ok. 200-krotne, a nawet wyższe. ;
- 17) zastosowano stożkową metodę zagęszczania chromatograficznego do zagęszczania materiału biologicznego — wykrywając obecność miedzi w moczu, krwi i mleku kobiet karmiących.
- 18) fakt umiejscowienia miedzi na małej przestrzeni paseczka bibuły pozwala na: a) łatwe jej eluowanie oraz oznaczenie innymi metodami analitycznymi (kolorymetrycznie, polarograficznie itp.), b) zastosowanie metody stożkowej do badań ilościowych, c) oddzielenie miedzi od towarzyszących pierwiastków, d) jakościowe wykrycie miedzi nawet przy bardzo małych stężeniach.

PIŚMIENNICTWO

1. Arden T. V.: *Nature* (1948) 162, 691, 2. Burstall F. H. i współpr.: *Nature* (1948), 162, 961, *Nature* (1949), 163, 64, *J. Chem. Soc* 195, 516, *Discuss. Faraday Soc.* (1949), 7, 179, *J. Chem. Soc.* (1952), 1497, *Analyst* (1951), 76, 396, *Anal. Chem.* (1952), 24, 1522. 3. Fischer R. B. Persons D. S. Morrison G. A.: *Nature* (1948) 164, 764, (1948) 162, 180. 4. Hermanowicz W. i Obuchowska T.: *Przem. Chem.* VI (1950) 649, 5. Lederer Michael: *Nature* Nr (1948), 162, 776, (1949), 163, 598, *Science* (1949) 110, 115, (1950) 112, 504, *Anal. Chim. Acta* (1949) 3, 476, (1952) 7, 458. 6. Pollard F. H. i współpr.: *Endeavour* (1951) 10, 213, *Nature* (1949) 163, 292, *J. Chem. Soc.* (1951) 466, 470, *Discuss. Faraday Soc.* (1949) 7, 183—338, *J. Chem. Soc.* (1951) 771, *J. Chem. Soc.* (1951) 1863, *Biochem J.* (1951) XXXI 49, 7. Rutter L.: *Nature* (1948) 161, 435. 8. Schwerdtfeger E.: *Naturwissenschaften.* (1953) 40, 201, 9. Williams R. T. i Kirby H.: *Sciences* (1948) 107, 481. 10. Zimmermann G. Nehring K.: *Angew. Chem.* (1951) 63, 556.

Р Е З Ю М Е

1. В первой части своей работы автором производятся методические исследования по определению меди при помощи различных методов распределительной хроматографии на бумаге.

Были использованы разные: аппаратура, бумага, системы растворителей, индикаторы, а также исследования велись при разных рН и при различных температурах.

2. Во второй части работы автор описывает примененный для определения меди в растворах сильно разбавленных и в биологическом материале собственный „конусный“ (бумага свернута в виде конуса) метод хроматографического загущения.

При помощи этого метода растворы загущались около 200 раз.

3. Применение конусного метода загущения дает возможность легко элюировать вещества для определения при помощи иных методов.

4. Возможность локализации вещества на маленьком пространстве полоски бумаги позволяет применять конусный метод и для количественных определений.

SUMMARY

The first part of the paper reports on the author's methodological investigations on detecting copper by means of various techniques of partition paper chromatography. Differences concerned machinery, paper, combinations of solvents and developers; also different hydrogen ion concentrations and temperatures were used.

The second part of the paper concerns the use of the author's own, „conical” method of chromatographic concentration. By means of this method solutions were concentrated up to 200 times.

The use of the conical method of concentration permits of an easy elution of the substance with the purpose of its further determination by means of other methods.

The fact that the substance can be placed on a small section of the paper strip makes it possible to use the conical method for quantitative investigations.