

czania pozwoliło nie tylko osiągnąć zagęszczenie 200-krotne i wyższe, na bardzo małej powierzchni paseczka bibuły, ale także umożliwiło przeprowadzenie ilościowego oznaczania miedzi w roztworach bardzo rozcieńczonych i materiale biologicznym (mocz, mleko). Dzięki użyciu tej metody oddzielono również miedź od żelaza.

METODY BADAŃ I MATERIAŁ.

Do zagęszczania roztworów rozcieńczonych i materiału biologicznego posługiwano się metodą opracowaną przez I. Krzeczowską (1956). Sporządzano stożek z bibuły Whatman N 31 albo N 41 przedłużony u wierzchołka wąskim paseczkiem bibuły. Substancję nakraplano w odległości $1\frac{1}{2}$ —2 cm od podstawy stożka. Stożek ustawiano na płytce Petriego napełnionej rozpuszczalnikiem, nakrywano odpowiedniej wielkości lejką i uszczelniano. Chcąc zgromadzić substancję na możliwie małej powierzchni przepuszczano rozpuszczalnik kilkakrotnie przed wywołaniem, a po uprzednim wysuszeniu promieniami podczerwonymi, lub suszarką fryzjerską (Foen).

Roztwory rozcieńczone sporządzano z chlorku miedziowego p. a (firmy Merck) w następujących stężeniach: 4,48 — 2,24 — 1,12 — 0,56 — 0,28 — 0,14 — 0,07 oraz 0,035 gamma w ml. Materiał biologiczny (mocz osobników chorych i zdrowych oraz mleko kobiet karmiących) przygotowywano do badań przez rozpuszczenie, otrzymanego po spaleniu, osadu w 3 ml 3 n kwasu azotowego i rozcieńczenie wodą redestylowaną do 100 ml. Do chromatografowania używano układu rozpuszczalników: pirydyna — kwas azotowy 0,5 n w stosunku 1 : 1. Do wywołania miedzi służył dwuetylodwutiokarbaminian sodu (firmy „BDH” Anglia).

Ilościowe oznaczanie miedzi wykonywano przy pomocy fotokolorymetru Pulfricha używając filtru N 8 (470 m μ).

BADANIA WŁASNE I OMÓWIENIE WYNIKÓW

1. Zastosowanie metody stożkowej do ilościowego oznaczania miedzi w roztworach silnie rozcieńczonych.

Badania, przeprowadzone na roztworach chlorku miedziowego o stężeniach: 4,48 — 2,24 — 1,12 — 0,56 — 0,28 — 0,14 — 0,07 i 0,035 gamma w ml miały na celu sprawdzenie dokładności metody stożkowej przy oznaczeniach ilościowych. Przy kolejnych próbach zmniejszono stężenie dwukrotnie (kolumna 2, tabeli I), równocześnie powiększając tylż raz ilość nakraplanego roztworu (kolumna 3, tabeli I), a zatem, przy dokładnej metodzie, wynik ilościowy oznaczeń Cu w gamma winien być przy każdej próbie taki sam i wynosić 4,48 gamma Cu (kolumna 4, tabeli I). Wielkość tę uzyskujemy przez pomnożenie zawartości miedzi w jednym mililitrze (kolumna 2) przez ilość nakropionych mililitrów (kolumna 3). W próbach od 1 do 3 użyto roztworów chlorku miedzi o dość dużym stężeniu, w tym celu, aby otrzymana ogólna zawartość miedzi w gamma mogła być oznaczona, przy pomocy fotokolorymetru Pulfricha, również bez zastosowania zagęszczenia.

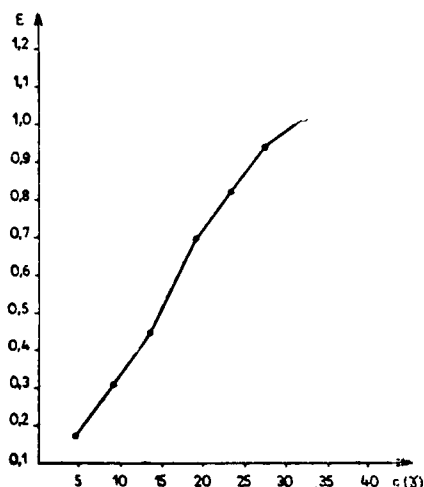
Równoczesne oznaczanie miedzi, bez zagęszczenia i po chromatograficznym zagęszczeniu, pozwalało na sprawdzenie czy użycie metody chromatograficznego zagęszczania nie powoduje strat ilościowych badanego materiału (kolumna 5 i 6, tabeli I).

Oznaczanie ilościowe miedzi przeprowadzano fotokolorymetrem Pulfricha firmy Carl Zeiss Jena przy użyciu kiuwetek o grubości warstwy przepuszczającej 1 cm. Do pomiaru użyto filtra N 8 (470 m μ). Z szeregu przebadanych odczynników dających barwne reakcje z jonami miedzi wybrano dwuetylodwutiokarbaminian sodu firmy „BDH”, przygotowując roztwór 0,05%. Do sporządzenia roztworów wzorcowych miedzi używano chlorku miedziowego p. a. firmy „Merck”. Zawartość miedzi w roztworze wzorcowym sprawdzano jednometrycznie. W toku pracy stale używano wody redestylowanej.

Technika wykonania pomiaru.

Do kiuwetki 1 nalewano 4 ml roztworu wzorcowego, a następnie wkraplano 1 ml 0,05% roztworu wodnego dwuetylodwutiokarbaminianu sodu.

Do kiuwetki 2 (odnośnik) nalewano 4 ml wody redestylowanej i wkraplano 1 ml 0,05% dwuetylodwutiokarbaminianu sodu. Odczytana ekstynkcja oraz stężenia wzorców posłużyły do wykreślenia krzywej kalibracji (ryc. 1).



Ryc. 1.

Wyniki otrzymanych oznaczeń zebrano w tabeli I. Stwierdzają one, że zagęszczanie roztworu metodą stożkową nie powoduje strat ilościowych oznaczanej substancji (kolumna 4 i 5). Średnie z 4—6 oznaczeń albo pokrywają się z teoretycznymi wyliczeniami, albo odchylenie jest minimalne, nie przekracza 0,1 gamma na 25 ml (Tabela I).

Tabela I

L.p.	Ilość gamma miedzi zawarta w 25 ml roztworu	Ilość ml nakroplonych	Wyliczona ilość gamma miedzi w roztworze nakroplonym (iloczyn kolumny 2 i 3)	Średnia (z 3-4 pomiarów) ilość gamma Cu oznaczona fotokolorymetrem Pulfricha w roztworze:	
				bez użycia metody zagęszceniowej	po użyciu metody stożkowej chromatograficznego zagęszczenia
1	2	3	4	5	6
1	4,48	1	4,48	4,38	4,38
2	2,24	2	4,48	4,48	4,48
3	1,12	4	4,48	4,48	4,48
4	0,56	8	4,48	—	4,38
5	0,28	16	4,48	—	4,48
6	0,14	32	4,48	—	4,48
7	0,07	64	4,48	—	4,48
8	0,035	128	4,48	—	4,48

Metodą stożkową można zagęszczać roztwory o znacznie mniejszych stężeniach, należy jednak wówczas nakraplać większe ilości badanego materiału. Używając wyżej podanej metody można wykryć nawet ślady poszukiwanej substancji, wymaga to oczywiście więcej czasu na nakraplanie i suszenie stożka z bibuły.

2. Zastosowanie metody stożkowej do ilościowego oznaczania miedzi w materiale biologicznym.

a) w m o c z u.

Mocz do badania przygotowywano dwoma sposobami.

Oznaczenia miedzi w materiale doświadczalnym wykonywano zachowując warunki takie, jak przy kalibracji.

1 sposób: 40 ml moczu odparowywano do suchości na łaźni płaskowej, a następnie spalano w piecu muflowym w temp. 500—550° C. Pozostałość po spalaniu rozpuszczano w 3 ml 3 n kwasu azotowego i dopełniano wodą redestylowaną do 100 ml.

2 sposób: Mocz przygotowywano ogólnie znanym sposobem w aparacie Kjeldahla: a) przy użyciu kwasu siarkowego, b) przy użyciu mieszaniny kwasu azotowego, siarkowego i nadchlorowego.

Sposób pierwszy lepiej nadawał się do naszych badań.

Roztwór otrzymany sposobem pierwszym nakraplano na stożek susząc promienikami podczerwonymi lub suszarką fryzjerską (foen), a następnie chromatografując przy użyciu jako rozpuszczalnika układu: pirydyna — kwas azotowy 0,5 n w stosunku 1 : 1. W celu całkowitego przesunięcia miedzi na paseczek bibuły znajdujący się przy wierzchołku stożka, prze-

puszczano przez stożek rozpuszczalnik dwu, a nawet trzykrotnie. Po wysuszeniu eluowano miedź 0,05% dwuetylodwutiokarbaminianem sodu i oznaczano ilościowo w fotometrze Pulfricha (Tabela II). Z każdego moczu wykonywano 4—6 oznaczeń ilości gamma miedzi w 25 ml, a następnie obliczano średnią ilość (kolumna 2, Tabela II). Znając ilość gamma miedzi w 25 ml, obliczono zawartość gamma miedzi w średniej dobowej moczu. Za średnią dobową moczu przyjęto ilość 1500 lub 2000 ml (3).

Ilość gamma miedzi w 25 ml moczu patologicznego w różnych jednostkach chorobowych wahała się średnio w granicach od 12,07 do 32,86 gamma, co daje po przeliczeniu w moczu dobowym: — 1) w 1500 ml od 924,2 do 1971,6 gamma 2) w 2000 ml od 965,6 do 2628,8 gamma. Najwyższa zawartość miedzi była w moczu chorego na chorobę Wilsona (zwyrodnienie soczewkowo-wątrobowe). Zawartość miedzi zmniejszała się w czasie leczenia.

Tabela II

L.p.	Średnia (z 4—6 oznaczeń) ilość gamma Cu w 25 ml	Ilości miedzi obliczone w gamma w średniej dobowej moczu 1500 ml — 2000 ml		U w a g i
		3	4	
1	21,03—32,86	1263,6—1971,6	1682,4—2628,8	<i>Degeneratio progresiva hepato lenticularis</i> (próby pobierano w różnych okresach leczenia)
2	14,87	892,2	1189,6	<i>casus pro diagnosi</i>
3	13,41	804,6	1072,8	<i>Lymphadenosis leucaemica.</i>
4	12,64	758,4	1011,2	<i>Lymphadenosis leucaemica.</i>
5	12,29	737,4	983,2	<i>Myelosis leucaemica</i>
6	12,07	924,2	965,6	<i>Myelosis leucaemica</i>
7	11,68	700,8	934,4	mocz osobnika zdrowego
8	9,59	575,4	767,2	mocz osobnika zdrowego
9	6,89	413,4	551,2	mocz osobnika zdrowego

W moczu osobników zdrowych ilość gamma miedzi w 25 ml wahała się od 6,89 do 11,68 gamma tj. od 413,4 do 700,8 w 1500 ml oraz od 551,2 do 934,4 w 2000 ml (Tabela II).

Wyniki dalszych badań zostaną podane w następnej pracy.

b) oznaczanie Cu w mleku kobiet karmiących.

Mleko pobrane jednorazowo od 13 kobiet karmiących w 3—5 dniu po porodzie, przygotowywano do badania przez odparowanie do suchości na łaźni piaskowej, a następnie przez spalenie w piecu muflowym w temp. 500°—550°C. Po spaleniu rozpuszczano pozostałość w 3 ml kwasu azotowego 3 n i rozcieńczano wodą redestylowaną do 100 ml.

Miedź oznaczano przy pomocy fotokolorymetru Pulfricha po uprzednim zagęszczeniu metodą stożkową, wykonując 2—3 oznaczenia z jednej próby obliczając średnią (kolumna 3 Tabeli III).

Tabela III

L.p.		Średnia (z 2—3 oznaczeń) ilość gamma miedzi w 25 ml mleka pobieranego w okre- sie 3—5 dni po porodzie	U w a g i
1	2	3	4
1	H. J.	20,98	Mleko pobierane jednorazowo
2	Ł. J.	20,10	
3	B. B.	20,10	
4	R. M.	19,66	
5	S. K.	19,22	
6	O. L.	18,56	
7	O. G.	17,73	
8	S. P.	16,84	
9	G. M.	15,07	
10	W. Z.	14,52	
11	W. A.	14,20	
12	S. M.	12,80	
13	K. M.	12,69	

Wyniki oznaczeń zestawione w tabeli III wykazują, że różnice w zawartości gamma Cu w mleku kobiet karmiących w tym samym czasie po porodzie (3—5 dni) wahają się u różnych osobników w granicach od 12,69 do 20,98 gamma w 25 ml.

Dotychczasowe nasze badania nie upoważniają nas do dokładnego omówienia uzyskanych wyników, zwraca jednak uwagę różna wartość mleka w odniesieniu do różnej zawartości w nim miedzi (dalsze badania w toku).

Otrzymane wyniki wskazują, że metoda stożkowa zagęszczania roztworów o bardzo małym stężeniu może być użyta do badań klinicznych. Nadaje się ona zwłaszcza wówczas gdy: a) stężenie badanej substancji jest za małe, by mogło być oznaczone bezpośrednio metodą fotometryczną, oraz b) gdy do całkowitego rozpuszczenia uzyskanego, po spaleniu, osadu należy użyć więcej wody redestylowanej, niż pozwala na to objętość kiuwety, w której dokonuje się pomiaru.

Uzyskane wyniki przeprowadzonych badań upoważniają nas do przedstawienia następujących wniosków:

1. Metoda stożkowa chromatograficznego zagęszczania nadaje się do jakościowego i ilościowego oznaczania miedzi w roztworach o dużym rozcieńczeniu. W wyniku naszych badań można było bowiem oznaczyć ilościowo 35 gamma miedzi w jednym litrze rozcieńczonego roztworu chlorku miedziowego (Tabela I).

2. Metoda stożkowa może mieć zastosowanie do zagęszczania materiału biologicznego (mocz, mleko), szczególnie w tych wypadkach, gdy po spaleniu otrzymuje się osady słabiej rozpuszczalne. Najmniejsze ilości miedzi, które uzyskano w badaniach materiału biologicznego wynoszą: w moczu 6,89 gamma w 25 ml, w mleku kobiet karmiących 12,69 gamma w 25 ml; największe uzyskane ilości: 32,86 gamma w 25 ml w przypadku moczu oraz 20,98 gamma w 25 ml w mleku kobiet karmiących w okresie 3—5 dni po porodzie (Tabela II i III).

3. Chromatograficzne zagęszczanie nie powoduje ilościowych strat badanego materiału.

4. Chromatograficzne zagęszczanie nadaje się zwłaszcza tam, gdzie znajdują się substancje towarzyszące, które przy odpowiednio dobranym układzie rozpuszczalników, można oddzielić od substancji badanej.

5. Metoda stożkowa nadaje się do ilościowego oznaczania pierwiastków śladowych.

6. Należy przypuszczać, że metoda stożkowa chromatograficznego zagęszczania może znaleźć zastosowanie do badań klinicznych.

7. Dokładność uzyskanych wyników ilościowych oznaczeń miedzi w roztworach o znanym stężeniu wykazała, że używane przez nas środki ostrożności przy stosowanych metodach były wystarczające.

P I S M I E N N I C T W O

1. Krzeczowska I.: Ann. UMCS Sec. D. Vol. XI. 1956, str. 199—232.
2. Praca zbiorowa „Chromatografia” Państw. Wyd. Nauk. W-wa 1957, str. 364.
3. Orłowski W.: Nauka o chorobach wewnętrznych. T. IV. Narząd moczowy. Wyd. P.Z.W.L. 1948, str. 37.

Р Е З Ю М Е

Авторами определялось количество меди в сильно разведенных растворах и биологическом материале (моча, молоко) при применении для сгущения исследуемого материала конуса из бумаги с узким пояском у вершины (метод сгущания разработанный И. Крзечковской — 1956).

Полученные на основании произведенных исследований результаты позволяют сделать следующие выводы:

1. Конусный метод хроматографического сгущания пригоден для качественного и количественного определения меди в сильно разведенных растворах. И так, в результате исследований, произведенных авторами, удалось определить количественно 35 гамма меди в 1 литре разведенного раствора хлорида меди (Таблица I).

2. Конусный метод можно применять и для сгущания биологического материала (моча, молоко), в особенности в тех случаях, когда после сжигания получаются труднорастворимые осадки. Наименьшие количества меди, полученные при исследованиях биологического материала составляют: в моче 6,89 гамма в 25 мл., в молоке кормящих женщин в 3 — 5 дней после родов 12,69 гамма в 25 мл. Полученные наибольшие количества меди: в моче 32,86 гамма в 25 мл и в молоке кормящих женщин 20,98 гамма в 25 мл. (Таблица II и III).

3. Хроматографическое сгущание не вызывает количественных потерь исследуемого материала.

Хроматографическое сгущание выгодно особенно там, где имеются сопутствующие вещества, которые при помощи соответственно подобранной системы растворителей можно отделить от исследуемого вещества.

4. Конусный метод пригоден для количественного определения следов элементов.

5. Следует предполагать, что конусный метод хроматографического сгущания может найти применение и в клинических исследованиях.

SUMMARY

The copper content was determined quantitatively in strongly diluted solutions and in biological material (urine, milk); the examined material was condensed in a paper cone with a narrow strip of paper at its top (method given by I. Krzeczowska, 1956).

The results thus obtained allow to arrive at the following conclusions.

1. The cone method of chromatographic condensation can be used both for quantitative and qualitative determination of copper in strongly diluted solutions. Using this method the authors were able to carry out quantitative determination of 35 gamma of copper in 1 litre of copper chloride solution (Table I).

2. The cone method can be used for condensing biological material (urine, milk), especially in those cases when the sediment obtained after combustion proves less soluble. The smallest amount of copper found in biological material was 6.89 gamma in 25 ml of urine, and 12.69 gamma in 25 ml of milk of lactating women, 3 to 5 days after delivery. The greatest amount of copper thus obtained was 32.86 gamma in 25 ml of urine, and 20.98 gamma in 25 ml of milk of lactating women (Tables II and III).

3. Chromatographic condensation does not produce any quantitative losses of the investigated material.

4. Chromatographic condensation is especially useful in cases where some accompanying substances are present; these can be separated from the investigated substance by a proper choice of solvents.

5. The cone method is adapted for quantitative determination of trace elements.

6. The supposition is expressed that the cone method of chromatographic condensation might be used for clinical tests.

