
Z Katedry Chemii Ogólnej Wydziału Lekarskiego Akademii Medycznej w Lublinie
Kierownik: doc dr Irena Krzeczowska

Irena KRZECZKOWSKA

**Nowa metoda „krążkowa” chromatograficznego zagęszczania
i jej zastosowanie**

**Новый „радиальный” метод хроматографического загущения
и его применение**

**A New „Disk” Method of Chromatographic Condensation
and Its Application**

Lacourt (1952) zajmując się rozdzielaniem kationów, osiągała nieznaczne zagęszczenie roztworów przez zwięzanie i zaostrzanie pasków bibuły (3). Krzeczowska (1954), zagęszczając silnie rozcieńczone roztwory soli miedziowych oraz materiał biologiczny (mleko, mocz, krew) na trójkącie i stożku z bibuły z wążutkim paseczkiem bibuły przy wierchołku, uzyskiwała zagęszczenie 200—500-krotne (2). Lewandowski (1959) natomiast podał nowy sposób koncentrowania elektrolitów na bibule jonitowanej, przy którego pomocy uzyskiwał zagęszczenie tysiąckrotne. Metoda Lewandowskiego ograniczała się tylko do substancji jonowych i wymagała przygotowania bibuły jonitowanej (4, 5, 7). Należało więc opracować nową metodę chromatograficznego zagęszczania, która a) mogłaby być również zastosowana do zagęszczania i nieelektrolitów, b) pozwoliłaby na osiągnięcie jeszcze wyższych zagęszczeń, oraz c) usunęłaby wpływ brzegów, dający się niejednokrotnie zauważyć w metodach koncentrowania substancji na trójkącie i na stożku.

MATERIAŁY I METODA BADAŃ

1. Metodę własną chromatograficznego zagęszczania na krążku z bibuły opisano poniżej w części doświadczalnej.
2. Bibuła: do przeprowadzenia doświadczeń używano bibuły Whatman N 3 i N 1 (do ilościowych bezpośrednich oznaczeń).

3. Nakraplanie: wykonywano specjalną mikropipetką o pojemność 0,025 ml, albo melanżerem. Ze względu na bardzo małe stężenie badanych roztworów i konieczność nakraplania ich w dużych ilościach, suszono chromatogramy, w czasie nakraplania, suszarką fryzjerską (foen).

4. Rozpuszczalniki: używano następujących układów rozpuszczalników:

- a) n-butanol-kwas solny stęż.-woda, w stosunkach 4:1:1, 4:1:5 i 5:1:4.
- b) kolidyna-kwas azotowy 0,4 N, w stosunku 1:1.
- c) pirydyna-kwas azotowy 0,5 N, w stosunku 1:1.
- d) aceton-kwas solny stęż.-woda, w stosunku 97:1,5:1,5 oraz 85:3,3:11,7 (wg Hermanowicza (1)).

5. Wywoływacze: do wykrywania miedzi przy badaniach jakościowych używano gazowego siarkowodoru. Do ilościowych oznaczeń miedzi zastosowano dwuetylodwutiokarbaminian sodowy (firmy „BDH”, Anglia), przygotowując roztwory o stężeniu 0,5‰ i 0,05‰.

6. Roztwory wzorcowe miedzi: do sporządzania wzorcowych roztworów miedzi używano:

a) przekrystalizowanego chlorku miedziowego p.a. firmy Merck (zawartość miedzi w roztworze wyjściowym sprawdzono jodometrycznie). Badano roztwory zawierające 8,95—4,48—2,24—1,12—0,56—0,28—0,14—0,07—0,035—0,0175—0,0088 μg Cu w 1 ml oraz 7,92—3,96—1,98—0,99—0,495—0,248—0,124—0,062—0,031 μg Cu w 1 ml. Wyżej podane stężenia otrzymywano przez stałe dwukrotne rozcieńczenie wodą podwójnie destylowaną.

b) $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, rozpuszczając 0,786 g substancji w wodzie podwójnie destylowanej i rozcieńczając do 1 litra. Z tego roztworu przygotowano standardy do oznaczeń ilościowych.

7. Inne odczynniki: cytrynian amonowy sporządzano rozpuszczając 50 g subst. stałej w 100 ml amoniaku 25‰.

Czterochlorek węgla i wszystkie używane rozpuszczalniki świeżo destylowano.

Do wszystkich doświadczeń używano wody podwójnie destylowanej.

8. Materiał biologiczny do badań przygotowano spalając go na sucho. Naprzykład 10 ml dobowego moczu odparowywano do suchości na łaźni wodnej, a następnie spalano w piecu muflowym w temp. ok. 500°C. Pozostałość po spalaniu rozpuszczano w 3 ml 3 N HNO_3 i raz jeszcze odparowywano do suchości, a następnie rozpuszczano w 100 ml wody podwójnie destylowanej. Do spalania brano również mniejsze ilości moczu (5 i 3 ml). Roztwór uzyskany przez rozpuszczenie spalanej substancji zagęszczano metodą krążkową.

W ten sam sposób przygotowano do badania krew, grzyby i pomidory.

BADANIA WŁASNE

Metoda własna zagęszczania na krążku z bibuły

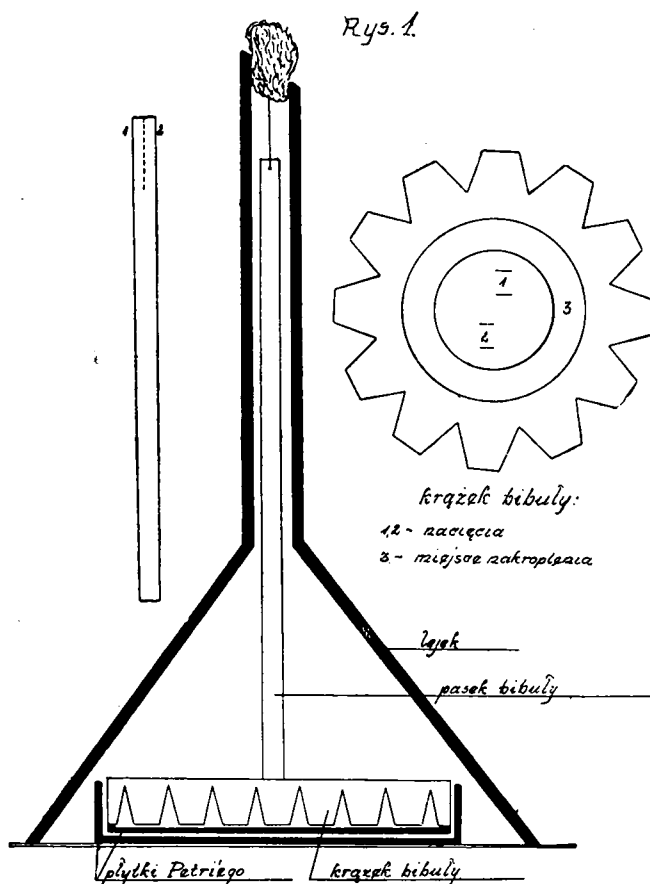
Wycinano krążek z bibuły Whatman N 3 lub N 1, w środku którego wprawiano długi, wąski paseczek z bibuły. Paseczek przymocowywano do krążka w ten sposób, że po przecięciu go podłużnie na dwie części (na 1 $\frac{1}{2}$ cm dł.) wsuwano uzyskane końce w nacięcia przygotowane na krążku. Nacięcia robiono z dwóch stron prostopadłej średnicy, trzy u góry z lewej strony (trygonometryczna druga ćwiartka) oraz trzy u dołu

z prawej strony — czwarta ćwiartka. Końce przycinano przy powierzchni krążka.

Na obwodzie krążka wycinano ząbki w kształcie trójkątów lub prostokątów. Wysokość ząbków powinna być równa wysokości płytki Petri'ego tak, aby po wsunięciu między ścianki płytek, końce ząbków dostawały do dna zewnętrznej płytki.

Substancję nakraplano na sporządzony krążek w odległości 1,5—2,5 cm od obwodu (nie licząc ząbków).

Krażkiem z naniesioną substancją przykrywano płytkę Petri'ego i wstawiano ją do górnej, większej, w taki sposób, aby dno mniejszej stało na dnie większej płytki. W wolną między bokami płytek, przestrzeń, wsuwano ząbki bibuły, pilnie bacząc żeby wszystkie dostawały do dna.



Ryc. 1. Krążek przygotowany do nakropienia oraz aparat do chromatograficznego zagęszczania metodą „krążkowa”

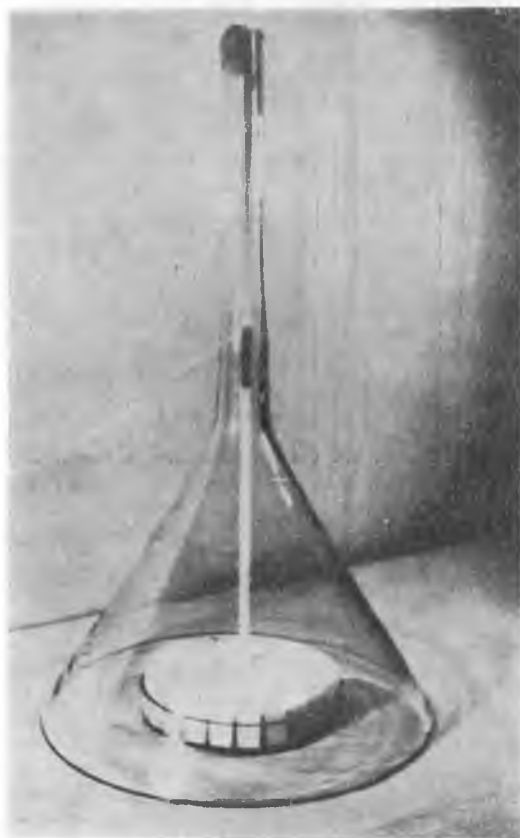
A disk of paper prepared for dropping and the apparatus for chromatographic condensation by the „disk” method.

Do tak przygotowanego aparatu wprowadzano pipetą rozpuszczalnik między ścianki płytek, tj. tam gdzie zostały umieszczone ząbki krążka. Całą przestrzeń między ściankami wypełniono rozpuszczalnikiem.

Do paseczka bibuły, odchodzącego od środka krążka, przyczepiono nitkę i całe urządzenie przykrywano lejkiem w taki sposób, aby paseczek przybrał pozycję pionową. Nitkę podtrzymującą paseczek umocowywano w nóżce lejka zamkniętego tamponem z waty.

Aparat ustawiano na płycie szklanej a brzegi lejka oparafinowywano (ryc. 1).

Na ryc. 1 pokazano: 1) krążek z zaznaczonym miejscem nakroplenia, widoczne są również nacięcia, w które należy wsunąć rozcięte paseczki bibuły, 2) zestawiony aparat do chromatograficznego zagęszczania.



Ryc. 2. Aparat do zagęszczania chromatograficznego. Na pasku bibuły wewnątrz aparatu widoczna miedź

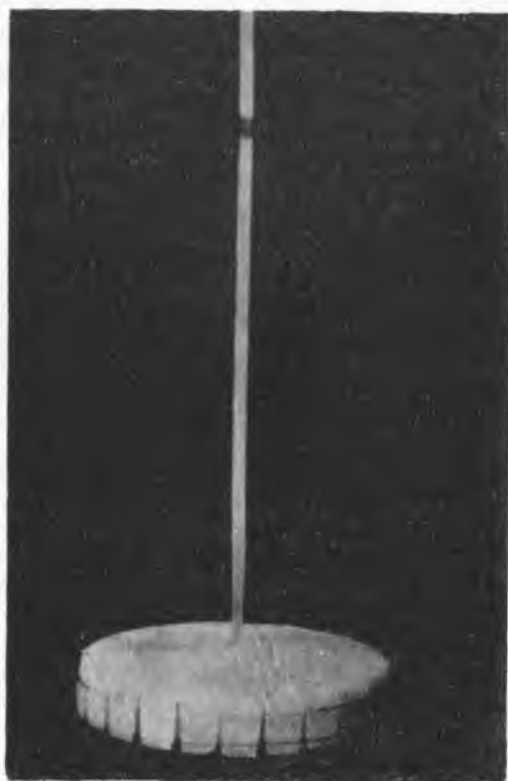
The apparatus for chromatographic condensation. Copper detected on a strip of paper is visible inside the apparatus.

I. Zagęszczanie metodą krążkową roztworów miedzi o bardzo małym stężeniu

Zagęszczano roztwory o zawartości od 0,0088 do 8,95 μg Cu w 1 ml.

W celu zgromadzenia na paseczku bibuły, ilości miedzi wystarczającej do wykrycia nanoszono od 1 do kilkuset ml roztworu, zależnie od stężenia. Rozpuszczalnik przepuszczano dwukrotnie.

Na ryc. 2 przedstawiono aparaturę do zagęszczania roztworów silnie rozcieńczonych w chwili ukończonego chromatografowania. Ciemna plamka, widoczna na paseczku, przedstawia miedź zagęszczoną, dającą się zaobserwować nawet bez wywołania, dzięki swojej niebieskiej barwie. Po wywołaniu siarkowodorem płamy stają się ciemnobrazowe.



Ryc. 3. Pasek bibuły z wykrytą miedzią. Stężenie nakropionego roztworu: 0,0088 μg w 1 ml

A strip of paper with detected copper. The concentration of solution used for dropping is 0.0088 μg per 1 ml.

Okazało się, że opisana metoda pozwala na wykrywanie substancji o każdym dowolnym stężeniu. Przy roztworach bardziej rozcieńczonych

należy nakraplać większe objętości, doprowadzając w ten sposób do granicy wykrywalności. Na ryc. 3 widoczny jest pasek bibuły z zebraną miedzią; do chromatografowania użyto roztworu o stężeniu: $0,0088 \mu\text{g Cu}^{2+}$ w 1 ml.

II. Rozdzielanie kationów z mieszanin o bardzo małym stężeniu

Posługując się wyżej opisaną metodą dokonano równocześnie zagęszczenia i rozdzielenia miedzi i kobaltu (ryc. 4) oraz miedzi, kobaltu i żelaza przy użyciu rozpuszczalnika o składzie: n-butanol-aceton-kwas solny stężony-woda, w stosunku 4:3:2:1 wg Lewandowskiego (4). Oddzielono również miedź od kobaltu i miedź od ołowiu, używając rozpuszczalnika: pirydyna-kwas azotowy 0,5 N w stosunku 1:1; w dwóch ostatnich przypadkach kobalt i ołów pozostały na krążku, a miedź zagęściła się na pasku. W ten sposób, odpowiednio dobierając układy rozpuszczalników, można oczyścić badany roztwór poprzez usuwanie niektórych z towarzyszących substancji.



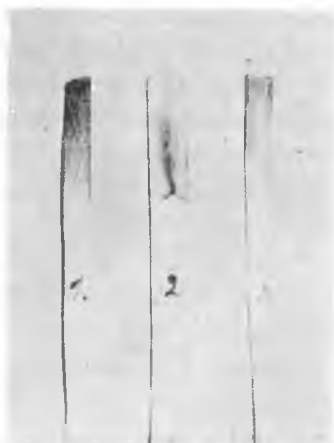
Ryc. 4. Pasek bibuły z zagęszczonymi i rozdzielonymi kationami: miedzi i kobaltu
A strip of paper with condensed and separated copper and cobalt cations.

III. Zastosowanie metody chromatograficznego zagęszczania do wykrywania miedzi w materiale biologicznym

Stosując metodę krążkową chromatograficznego zagęszczania, wykryto miedź w grzybach (1), moczu (2), pomidorach (3) (ryc. 5 paseczki 1, 2 i 3) oraz w pełnej krwi (ryc. 6).

IV. Ilościowe oznaczanie miedzi w roztworach silnie rozcieńczonych po uprzednim chromatograficznym zagęszczeniu

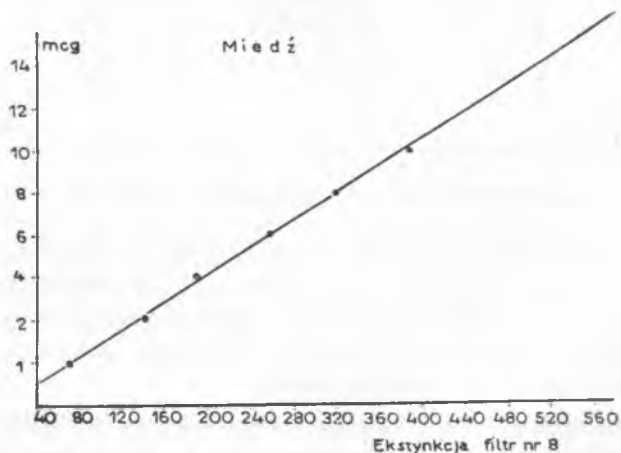
Nagromadzenie na małej powierzchni paska bibuły ilości substancji wystarczającej do jej wykrycia pozwala na: 1) oznaczenie jej metodą ilościową bezpośrednią oraz 2) łatwe wyeluowanie badanej substancji i oznaczenie innymi analitycznymi metodami (np. fotometryczną, polarygraficzną i kolorymetryczną).



Ryc. 5. Na paskach bibuły widoczna miedź wykryta w materiale biologicznym (grzyby, mocz, pomidory)
Copper detected in biological material (mushrooms, urine, tomatoes) is visible on strips of paper.



Ryc. 6. Na pasku bibuły wykryta miedź w pełnej krwi
Copper detected in the whole blood is visible on a paper strip.



Ryc. 7. Krzywa kalibracji fotometru Pulfricha (filtr N 8/470 μg). Naczynka o przekroju 2 cm
The calibration curve of the Pulfrich photometer (filter No. 8/470 μg). Vessels 2 cm in diameter.

W naszej pracy oznaczenia ilościowego miedzi dokonano przy pomocy fotometru Pulfricha (firmy C. Zeiss. Jena), posługując się filtrem N 8 (470 μg) i naczynkami o przekroju 2 cm. Ekstrakcję przeprowadzano czterochlorkiem węgla. Krzywą kalibracji podano na ryc. 7.

Do oznaczeń używano roztworu o stężeniu 8,96 μg Cu^{2+} w 1 ml oraz roztworów uzyskanych przez kolejne rozcieńczanie 2, 4, 8 i 16-krotne, biorąc po 1, 2, 4, 8 i 16 ml i rozcieńczając przed nakropieniem 10-krotnie. Tak sporządzone roztwory nakraplano na krążek i po odpowiednim zagęszczeniu metodą krążkową a) oznaczano miedź metodą bezpośrednią, uzyskując wyniki o błędzie $\pm 5\%$, b) oznaczano przy pomocy fotometru Pulfricha miedź w wyeluowanym roztworze, uzyskując odchylenia od ilości wyliczonych w granicach od $-0,01$ do $+0,14$ μg . Wyniki zestawione w tab. 1.

Tab. 1. Oznaczanie miedzi w roztworach silnie rozcieńczonych w μg

Lp.	Ilość miedzi w μg zawarta w 1 ml roztw. wzorców. chloru miedziow.	Ilość ml roztw. wzięta do sporząd. roztworu badanego	Ilość ml nakropiona na krążek po 10-krotnym rozcieńczeniu	Wyliczona ilość miedzi w μg nakropiona na krążek	Średnia (z 4—8 pomiarów) ilość miedzi w μg oznaczona fotometr. Pulfricha
1	8,96	1	10	8,96	9,1
2	4,48	2	20	8,96	9,05
3	2,24	4	40	8,96	8,90
4	1,12	8	80	8,96	8,95
5	0,56	16	160	8,96	8,90
średnia				8,96	8,98
odchylenie					+0,02

OMÓWIENIE WYNIKÓW BADAŃ I WNIOSKI

Metoda zagęszczania, taka jak odparowywanie, nie zawsze daje się zastosować. Przygotowywanie materiału do chromatografowania na bibule jonitowanej (4) ma ograniczony zakres zastosowania, nadaje się bowiem tylko dla substancji jonowych, natomiast metody zagęszczania na bibule można użyć i do nieelektrolitów.

Metody zagęszczania na trójkącie i stożku z bibuły (2) dawały zagęszczenie 200—500-krotne, ale niejednokrotnie występował w nich wpływ brzegów, który zupełnie jest usunięty w metodzie krążkowej. Zaznaczyć należy, że metoda krążkowa jest dogodniejsza od stożkowej również i z tego względu, że w niej wielkość powierzchni, na której się nakrapla,

jest dwukrotnie większa niż w metodzie stożkowej, dzięki czemu można łatwiej wprowadzić duże ilości badanego roztworu.

Dogodnością metody krążkowej jest również możliwość równoczesnego zagęszczania i rozdzielania substancji z mieszanin. Przy odpowiednio dobranym układzie rozpuszczalników substancja badana daje się oddzielić od innych towarzyszących. Na przykład: używając układu: pirydyna-kwas azotowy 0,5 N, w stosunku 1 : 1, wykryto miedź, równocześnie oddzielając ją od kobaltu, ołowiu i żelaza.

Metoda krążkowa pozwala na tak dużą koncentrację badanych substancji, że można nią wykryć nawet ślady poszukiwanych kationów.

Stosując metodę krążkową przekonano się, że należy pamiętać o starannym sporządzeniu krążka: a) paseczek bibuły powinien być wprawiony dokładnie w środek krążka, b) nacięcia na krążku muszą mieć szerokość ściśle odpowiadającą szerokości rozciętych końców paseczka, aby ten ostatni był dobrze oprawiony w krążek, c) ząbki wycięte na obwodzie krążka muszą mieć jednakową powierzchnię i wysokość, aby dotykały do dna płytki i równomiernie doprowadzały rozpuszczalnik, d) korzystne jest regulowanie szerokości paseczka w zależności od stężenia badanego roztworu.

W czasie badań zagęszczanie miedzi zwiększano przez 1) powiększenie powierzchni nanoszenia, 2) nakraplanie kilku-, a nawet kilkadziesiątkrotne, po uprzednim każdorazowym wysuszeniu „foenem”, 3) przez odpowiednie zważanie paseczka odchodzącego od środka krążka w zależności od rozcieńczenia badanego roztworu. Postępując w ten sposób, zagęszczano nawet najbardziej rozcieńczone roztwory i doprowadzano stężenie badanej substancji do granicy wykrywalności.

Używane do chromatografowania układy rozpuszczalników dobierano tak, aby uzyskane R_f badanej substancji było dostatecznie wysokie, tj. aby badana substancja zdołała się przesunąć na paseczek bibuły, odchodzący od środka krążka; wówczas substancje towarzyszące o mniejszych R_f pozostają na krążku. W ten sposób badaną substancję nie tylko zagęszczano, ale również oczyszczano i oddzielano od innych.

Rozpuszczalnik w czasie zagęszczania przepuszczano dwu- lub trzykrotnie (po uprzednim wysuszeniu), a zagęszczając w ten sposób badaną substancję na małej powierzchni, stwarzano dogodne warunki do ilościowych oznaczeń. Ważną rolę odgrywało dobre wysycanie kamery parami rozpuszczalnika, które osiągnęto przez dokładne uszczelnienie parafiną brzegów lejka.

Metodę krążkową zastosowano do zagęszczania miedzi w roztworach silnie rozcieńczonych oraz w materiale biologicznym; uzyskiwano każde żądane zagęszczenie, nakraplając na krążek tym większe objętości, im roztwór był bardziej rozcieńczony. W ten sposób wykryto miedź w roztworze o stężeniu 0,0088 μg w 1 ml.

WNIOSKI

1. Wprowadzono metodę chromatograficznego zagęszczania na krążku z paskiem bibuły umocowanym w środku krążka i użyto jej do stężenia roztworów silnie rozcieńczonych.

2. Użyta po raz pierwszy metodę krążkową zastosowano do wykrywania miedzi w materiale biologicznym: moczu, krwi, grzybach i pomidorach.

3. Zebranie substancji badanej na małej powierzchni paska bibuły pozwala na:

- a) jakościowe wykrywanie badanej substancji nawet w roztworach o bardzo małym stężeniu (wykrywano Cu^{2+} w roztworach zawierających 0,0175 μg i 0,0088 μg w 1 ml).
- b) zastosowanie metody krążkowej do badań ilościowych, zarówno przy użyciu bezpośredniej metody ilościowego oznaczania, jak i innych metod analitycznych (fotometrycznej, polarograficznej, kolorymetrycznej).

4. Przy roztworach o bardzo małym stężeniu nanoszono na krążek takie objętości, aby ogólna zawartość badanej substancji leżała w granicach wykrywalności.

5. Stwierdzono, że chromatograficzne zagęszczanie nie powoduje ilościowych strat w badanym materiale (średnie odchylenie + 0,02 μg).

6. Metoda krążkowa nadaje się, przy odpowiednio dobranych rozpuszczalnikach do równoczesnego zagęszczania i rozdzielania substancji z mieszanin oraz do oczyszczenia od substancji towarzyszących o niewielkim R_f .

7. Wycięte na obwodzie krążka ząbki, zależnie od nadanego im kształtu, mogą zwalniać przepływ rozpuszczalnika, co wpływa dodatnio na rozdział substancji.

8. W celu uzyskania dobrego rozdziału i wyraźnych plam o ostrych zarysach, należy rozpuszczalnik przepuszczać dwu- lub trzykrotnie.

9. Użycie metody krążkowej chromatograficznego zagęszczania jest korzystne zwłaszcza wówczas, gdy po spaleniu „na sucho” materiału biologicznego, otrzymuje się osad słabiej rozpuszczalny.

10. Należy przypuszczać, że metoda chromatograficznego zagęszczania na krążku może znaleźć zastosowanie do badań klinicznych.

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

1. Hermanowicz W. i Obuchowska T.: Przem. Chem. **11**, 649—661, 1950; 2. Krzeczowska I.: Ann. Univ. M. Curie-Skłodowska, Sec. D. **11**, 199—232, 1956; 3. Lacourt: Bull. de la Soc. Chim. de France **9—10**, 908—910, 1952; 4. Lewandowski A.: Chem. Anal. **4**, 545—550, 1959; 5. Lewandowski A. i Ignasiak J.: Roczniki Chem. **30**, 559—567, 1956; 6. Praca zbiorowa „Chromatografia”. Państw. Wyd. Nauk. W-wa 1957, 364; 7. Witkowski H.: Roczniki Chem. **30**, 549—557, 1956.

R E Z Y U M E

Автором разработан новый метод хроматографического загущания на ободке бумаги с узким пояском, закрепленным посередине ободка.

Аппарат для загущания иллюстрирует рис. 1.

Примененный метод давал загущение 1000-кратное, а даже и выше.

Выявлялись элементы в растворах с концентрацией от 4 до 0,0088 $\mu\text{г}$ в 1 мл.

Метод хроматографического загущения, ввиду на возможность скопления исследуемой субстанции на очень маленькой поверхности пояaska бумаги, позволяет на:

1. легкое элюирование выявленной субстанции и определение ее:
 - а) при помощи разных инструментальных аналитических методов,
 - б) методом непосредственного анализа,
2. одновременное загущение и разделение субстанции в смесях с низкой концентрацией;
3. выявление и обозначение следов элементов в биологическом материале.

O B Ъ Я С Н Е Н И Я К Р И С У Н К А М

Рис. 1. Ободок, приготовленный для нанесения субстанции, а также аппарат для хроматографического загущания „радиальным” методом.

Рис. 2. Аппарат для хроматографического загущания. На пояске бумаги внутри аппарата видна медь.

Рис. 3. Поясок бумаги с выявленной медью. Концентрация нанесенного раствора 0,0088 $\mu\text{г}$ в 1 мл.

Рис. 4. Поясок бумаги с загущенными и разделенными катионами меди и кобальта.

Рис. 5. На поясках бумаги видна медь, выявленная в биологическом материале (грибы, моча, помидоры).

Рис. 6. На пояске бумаги выявленная медь в цельной крови.

Рис. 7. Кривая калибрации фотометра Пульфриха (фильтр № 8, 470 $\mu\text{г}$). Кюветки диаметром в 2 см.

Таб. 1. Определяние меди в растворах сильно разбавленных в $\mu\text{г}$.

SUMMARY

A new method of chromatographic condensation on a paper disk, with a narrow strip of paper fastened to the centre of the disk, has been devised. The apparatus for condensation is shown in Fig. 1.

By this new method, thousandfold condensation, or higher, can be obtained, and it is possible to detect elements in solutions of concentration ranging from 4 to 0.0088 μg per 1 ml.

Since the method of chromatographic condensation on a paper disk enables us to accumulate a given substance on a very small area of paper strip, it is possible:

1. to elute easily the detected substance and to determine it by various analytical methods or direct determination,
2. to condense the substance as a whole or to separate the substance in slightly concentrated mixtures, and
3. to detect and determine trace elements in biological material.