

ANNALES  
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA  
LUBLIN — POLONIA

VOL. XVI, 27

SECTIO D

1961

---

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

Irena KRZECZKOWSKA  
i Teresa WIDOMSKA-CZEKAJSKA

**Badania nad zastosowaniem rozdzielczej chromatografii bibułowej do wykrywania kobaltu w roztworach o małym stężeniu**

**Исследования над применением разделительной хроматографии на бумаге для определения кобальта в растворах малой концентрации**

**Investigations on the Application of Partition Chromatography for Detection of Cobalt in Weak Solutions**

Rozdzielcza chromatografia bibułowa została zastosowana do analizy związków nieorganicznych w r. 1948 przez Ardena, Burstalla i wsp. (1). W następnych latach stała się już ogólną metodą analityczną, prostą, o szerokim zasięgu. Lederer i Linstead (8, 9) zajmują się wykrywaniem i rozdzielaniem kationów wchodzących w skład tych samych grup analitycznych. Natomiast Pollard i wsp. (14—18) większy nacisk kładą na rozdzielanie dowolnych mieszanin kationów i anionów. Lewandowski stosuje chromatografię bibułową do analizy jakościowej kationów (11).

Oznaczanie pierwiastków śladowych jest skomplikowane z powodu ich niskiego stężenia w materiale biologicznym oraz równoczesnego występowania kilku kationów. Chromatografia bibułowa, dzięki swej silnej własności rozdzielczej przy odpowiednim doborze solwentów, pozwala na oddzielenie poszczególnych pierwiastków. Dodatkową trudność stanowi uzyskanie reakcji barwnych, ponieważ, mimo wielkiej czułości stosowanych obecnie wywoływaczy, stężenie tych pierwiastków w materiale biologicznym jest przeważnie tak małe, że nie sięga granicy wykrywalności. W ostatnim dwudziestoleciu szczególne zainteresowanie, obok żelaza i miedzi, budzi kobalt. Stwierdzenie, że jego brak w glebie (Martson cyt. wg Tempki) powoduje choroby zwierząt domowych, objawiające się niedokrwistością i wyniszczeniem organizmu, prowadzącym do zgonu, a ustępujące po dodaniu do paszy kobaltu, zapoczątkowało szereg prac badawczych (2, 4, 19, 24, 25). Ukazały się również liczne prace na temat wpływu kobaltu na układ krwiotwórczy człowieka i wyników leczenia niektórych niedokrwistości solami kobaltu (3, 7, 12).

Schmidt i wsp. stwierdzili hamujący wpływ kobaltu na wirusa grypy (21). Pital i wsp. (13) badali wpływ kobaltu na *Salmonella pullorum*. Saltzman (20) opracował metodę mikro-oznaczania kobaltu w materiale biologicznym na drodze ekstrakcji jego soli nitrozonafitolanu. Otrzymany w ten sposób kobalt, uwolniony od innych metali, oznaczał przy użyciu soli nitrozo R. Thiers i wsp. (23). Przed oznaczeniem kobaltu oddzielali go od innych metali śladowych, używając do tego celu żywicy anionowymiennej. Wysocki, Smockiewiczowa i Mizgalski (22, 28) opracowali metodę spektrograficznego oznaczania kobaltu i miedzi we krwi, po uprzednim chromatograficznym oddzieleniu go od innych metali.

Celem niniejszej pracy jest sprawdzenie przydatności niektórych metod chromatografii bibułowej do oznaczania kobaltu w roztworach o małym stężeniu, a szczególnie metod chromatograficznego zagęszczania zastosowanych przez Krzeczowską (5, 6) przy oznaczaniu miedzi.

### METODY BADAŃ I MATERIAŁY

1. Do wykrywania kobaltu metodą bibułowej analizy chromatograficznej używano różnych technik: a) Chromatografii wstępującej, wykonywanej w akwariach lub cylindrach szklanych. b) Chromatografii wstępującej wg Williamsa i Kirby (1948) (26). W metodzie tej bibułę zwiniętą w kształcie walca umieszczano w rozpuszczalniku wypełniającym płytke Petriego i nakrywano szklanym kloszem, dobrze uszczelniając. c) Chromatografii krążkowej w płytkach Petriego. Do płytki Petriego wstawiano naczynko wagowe z rozpuszczalnikiem i nakrywano dwoma kwadratowymi szybkami, z których dolna posiadała w środku otwór o średnicy 0,5 cm. Bibułę z nakropłą substancją umieszczano między szybkami w ten sposób, że paseczek bibuły, doprowadzającej solvent, przechodził przez otwór w dolnej szybce i zanurzony był w rozpuszczalniku. Przy badaniach, w których zależało na utrzymaniu identycznych warunków, szereg płytek ustawiano jedna na drugiej i „stos” przykrywano kloszem szklanym, dokładnie uszczelniając aparat. d) Zmodyfikowanej metody krążkowej Zimmermanna G. i Nehringa K. (25). Krążek bibuły umieszczano w eksykatorze tuż pod pokrywą. Koniec paseczka bibuły wprowadzonego do środka krążka, zanurzano w rozpuszczalniku znajdującym się na szkiełku zegarkowym umieszczonym w zlewce o odpowiednio dobrej wysokości. e) Metod chromatograficznego zagęszczania na trójkącie, stożku i krążku wg Krzeczowskiej (dokładny opis w pracach 5, 6).

2. Bibuła chromatograficzna. Po przebadaniu bibuły Whatman N. 1, 2, 3, Schleicher-Schüll 597 oraz Mundtall N. OB, O i 3 stale używano bibuły Whatman N. 3 i N. 1.

3. Układy rozpuszczalników. Stosowano układy solventów: a) n-butanol-kwas solny-woda w stosunku obj. (4:1:1), (4:1:2), (4:1:5). b) aceton-kwas octowy-woda (87:8:5). c) pirydyna-kwas azotowy 0,5 n (1:1). d) kolidyna-kwas azotowy 0,4 n (1:1). e) n-butanol-kwas octowy-woda (4:1:1). f) n-butanol-aceton-kwas solny-woda (4:3:2:1). g) aceton-kwas solny-woda (87:8:5). h) aceton-kwas solny-woda (84:11:5). Przy sporządzaniu rozpuszczalników używano wody redestylowanej.

4. Wywoływacze i sposób wywoływania. Jako wywoływacze używano następujących odczynników: a)  $\alpha$ -nitrozo- $\beta$ -naftol 0,5% (g/obj.) w 50% kwasie octowym, b) kwas rubeanowodorowy 0,1% w 95% alkoholu etylowym. Wywoływano dwoma metodami: suchy chromatogram nasycano parami amoniaku i spryskiwano odczynnikiem albo bezpośrednio przed użyciem dodawano do wywoływacza stężony amoniak w stosunku 10:1, c) dwuetylodwutiokarbaminian sodu, ogólnie używany

roztwór wodny (można wywoływać zarówno przez rozpylenie, jak i przez zanurzenie), d) siarkocyjanek potasu, nasycony roztwór wodny, mieszamy bezpośrednio przed użyciem z równą objętością acetonu, e) ditizon w czterechchlorku węgla (roztwory od 0,001 do 0,005 $\frac{0}{0}$ ), f) siarkowodór gazowy w środowisku alkalicznym lub roztwór wodny siarczku amonu, i g)  $K_4[Fe(CN)_6]$ . Chromatogramy wywoływano przez rozpylenie szklanym rozpylaczem.

5. Suszenie. W czasie nakraplania suszono chromatogramy promienikami podczerwonymi, a po wywołaniu — na powietrzu w temperaturze pokojowej. Nie używano suszarki fryzjerskiej ponieważ po jej użyciu wykrywano na bibule ślady zanieczyszczeń żelazem (w formie kropeczek).

6. Odczynniki. Używano odczynników chemicznie czystych i wody redestylowanej.

#### BADANIA WŁASNE

##### 1. Zakres stężeń roztworów używanych do badań.

Do badań używano roztworów o stężeniu od 0,001 do 1 $\frac{0}{0}$  w ilościach odpowiadających 0,08 $\gamma$  do 80 $\gamma$ . Przy metodzie krążkowej stosowano stężenie dwukrotnie większe niż przy wstępującej.

##### 2. Oznaczanie współczynnika $R_F$ .

Współczynnik  $R_F$  dla kobaltu waha się, przy metodzie wstępującej w granicach od 0,13 do 0,38 (średnie z 5-7 pomiarów), przy metodzie krążkowej od 0,27 do 0,77; wartość jego jest zależna od różnych zmiennych czynników: a) wielkości kamery, b) jakości bibuły, c) stężenia substancji badanej, d) układu rozpuszczalnika, e) ilości kwasu dodanego do rozpuszczalnika, f) temperatury, g) substancji towarzyszących. Pewien wpływ wywiera również czas spływu.

##### 3. Badanie wpływu czynników zmiennych na wartość $R_F$

a) Badania przeprowadzono w trzech eksykatorach o różnej wielkości. Na ryc. 1, 2, 3 widoczny jest wpływ wielkości kamery, a co z tym idzie, stopnia jej wysycenia parami rozpuszczalnika ( $R_F = 0,26; 0,30; 0,40$ ).



Ryc. 1. Chromatogram uzyskany w kamerze I (eksykator duży)

Ryc. 2. Chromatogram uzyskany w kamerze II (eksykator średni)

Ryc. 3. Chromatogram uzyskany w kamerze III (eksykator mały)

Chromatogram obtained in camera I (large exsiccator)

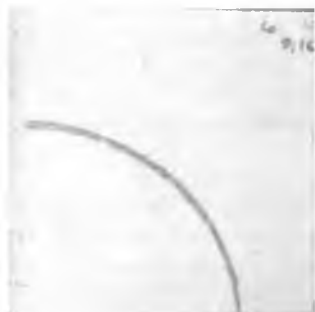
Chromatogram obtained in camera II (medium-sized exsiccator)

Chromatogram obtained in camera III (small exsiccator)

b) Zależność  $R_F$  od gatunku bibuły. Spis przebadanych gatunków bibuły podano w Metodach i materiałach. Wyniki przedstawiono w tabeli 1; na ryc. 4, 5, 6 widoczna jest różnica w wielkościach  $R_F$  oraz w ukształtowaniu plam (kólek).

Tab. 1. Zależność wartości  $R_F$  od gatunku bibuły; rozpuszczalnik: aceton-kwas solny (stęż.) — woda (84:11:5), metoda krążkowa  
Dependence of  $R_F$  values on the kind of filter paper; solvent system: acetone-hydrochloric acid (concentrated) — water (84:11:5). Disc method

Lp.	Rodzaj bibuły	$R_F$	Uwagi
1	Whatman N. 1	0,77	Plamy kobaltu dobrze ukształtowane o ostrych konturach, intensywne, krążki wąskie. Rozpuszczalnik rozchodzi się równo
2	Whatman N. 3	0,78	Plamy zwarte, kształtne. Przy tej samej ilości substancji mniej intensywne niż przy N. 1 Ślady zanieczyszczeń żelazem nie większe niż w N. 1
3	Whatman N. 4	0,78	Jak wyżej, ale kontury plam mniej ostre
4	Schleicher-Schüll N. 597	0,70	Kontury plam mniej ostre, brak zanieczyszczeń
5	Mundtall N. 0	0,74	Plamy i paski o nierównej szerokości i intensywności
6	Mundtall N. OB	0,77	Plamy i kółka niezbyt równe, zanieczyszczenia żelazem
7	Mundtall N. 3	0,80	Plamy i kółka dość równe, bibuła zanieczyszczona żelazem

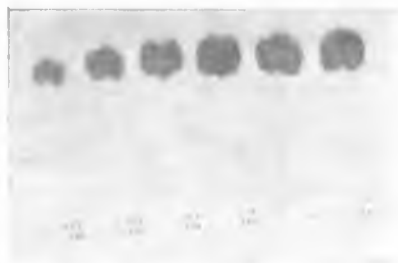


Ryc. 4. Kobalt na bibule Whatman N. 1  
Cobalt on Whatman No 1 paper

Ryc. 5. Kobalt na bibule Whatman N. 4  
Cobalt on Whatman No 4 paper

Ryc. 6. Kobalt na bibule Schleicher-Schüll N. 597  
Cobalt on Schleicher-Schüll No. 597 paper

c) Badania nad wpływem stężenia substancji nakraplanej na wartość  $R_F$ . Substancję nakraplano w ilościach: 10 $\gamma$ , 20 $\gamma$ , 30 $\gamma$ , 40 $\gamma$ , 50 $\gamma$  oraz 80 $\gamma$ . Tabela 2 zawiera uzyskane wyniki, a ryc. 7 przedstawia jeden z uzyskanych chromatogramów.



Ryc. 7. Wpływ stężenia badanej substancji na  $R_F$  (ilość kobaltu: 10 $\gamma$ , 20 $\gamma$ , 30 $\gamma$ , 40 $\gamma$ , 50 $\gamma$ , 80 $\gamma$ )  
Influence of the concentration of the studied substance on  $R_F$   
(quantities of cobalt: 10 $\gamma$ , 20 $\gamma$ , 30 $\gamma$ , 40 $\gamma$ , 50 $\gamma$ , 80 $\gamma$ )

Tab. 2. Wpływ stężenia nakropionej substancji na wartość  $R_F$ ;  
bibuła Whatman N. 1  
Influence of concentration of the studied substance on  $R_F$  values. Whatman No. 1

Lp.	Układ rozpuszczalnika	pH	temp.	Ilość subst. w $\gamma$	$R_F$	Ilość subst. w $\gamma$	$R_F$
1	aceton-kw. solny-woda 84 : 11 : 5	1	18°C	0,16	0,36	10	0,38
				0,24	0,36	20	0,38
				0,49	0,36	30	0,38
				0,81	0,37	40	0,39
				1,63	0,37	50	0,40
				2,47	0,38	80	0,40
				5,00	0,38	—	—

Wartości  $R_F$  są liczbami średnimi z 5—8 pomiarów.

d) Zależność wartości  $R_F$  od układu rozpuszczalników. Przebadano szereg (spis podano w Metodach i materiałach) rozpuszczalników, wyniki podano w tabeli 3.

e) Wpływ ilości kwasu zawartego w rozpuszczalniku na wartość  $R_F$ . W rozpuszczalniku o składzie: aceton-kw. solny stęż.-woda w stosunku 87:8:5 zmieniono ilość kwasu do 11 cz., a następnie do 20 cz. (87:11:5) i (87:20:5), zwiększenie ilości kwasu powodowało zwiększenie  $R_F$  ( $R_F = 0,33$ ; 0,38 i 0,6) patrz tabela 4.

f) Wpływ temperatury na wartość  $R_F$ . Przeprowadzono badania nad

Tab. 3. Wpływ układu rozpuszczalnika na wielkość  $R_F$ ; temp. 18°C.  
Bibuła Whatman N. 1

Influence of solvent system on  $R_F$  values. Temperature 18°C, Whatman No. 1 paper

Lp.	Układ rozpuszczalnika	Czas spływu w godz.	Metoda	Ilość subst. w $\gamma$	$R_F$
1	n-butanol-kwas solny-woda 4:1:1	18 6	wstęp. krążkowa	2,4 5,0	0,29 0,43
2	n-butanol-kwas solny-woda 4:1:2	25 8	wstęp. krążkowa	2,4 5,0	0,22 0,44
3	n-butanol-kwas solny-woda 4:1:5	6 6	wstęp. krążkowa	2,4 5,0	0,13 0,27
4	n-butanol-kw. octowy-woda 4:1:1	22 14	wstęp. krążkowa	2,4 5,0	0,13 ogon 0,29
5	n-butanol-aceton-kw. solny-woda 4:3:2:1	16 12	wstęp. krążkowa	2,4 5,0	0,33 0,42
6	aceton-kw. solny-woda 87:8:5	6 6	wstęp. krążkowa	2,4 5,0	0,33 0,60
7	aceton-kw. solny-woda 84:11:5	6 6	wstęp. krążkowa	2,4 5,0	0,38 0,77

Średnie z siedmiu pomiarów.

Tab. 4. Wpływ ilości kwasu w rozpuszczalniku na wartość  $R_F$   
Influence of acid content in solvent system on  $R_F$  values

Lp.	Układ rozpuszczalnika	Metoda	Temp.	Ilość subst. w $\gamma$	Czas spływu w godz.	$R_F$
1	aceton-kwas solny-woda 87:8:5	wstęp. krążkowa	18° 18°	2,4 5,0	6 6	0,33 0,60
2	aceton-kwas solny-woda 87:11:5	wstęp. krążkowa	18° 18°	2,4 5,0	6 6	0,38 0,78
3	aceton-kwas solny-woda 87:20:5	wstęp. krążkowa	18° 18°	2,4 5,0	6 6	0,86 0,64

wpływem temperatury na wartość  $R_F$  jonów: kobaltu, miedzi i żelaza zarówno nakraplanych pojedynczo, jak w mieszaninie. Tabela 5 przedstawia zebrane wyniki. Rozwijanie chromatogramu znajdującego się na ryc. 8 przeprowadzano w temperaturze 6°C, na ryc. 9 w 18°C, a na ryc. 10 w 40°C. Chromatogramy przedstawiają rozdzielone kationy:  $Co^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ .

Tab. 5. Zależność wartości  $R_F$  od temperatury  
Dependence of  $R_F$  values on temperature

Lp.	Substancja nakropiona	Temp.	Czas spływu w godz.	$R_F$	Uwagi
1	Chlorek kobaltowy $\text{CoCl}_2$	6°	8	0,73	Plamy (kółka) mają równy promień, jednakową szerokość i intensywność
2	$\text{CuCl}_2$	6°	8	0,83	Jak wyżej
3	$\text{FeCl}_2$	6°	8	0,89	Jak wyżej
4	mieszanina: $\text{CoCl}_2$ $\text{CuCl}_2$ $\text{FeCl}_2$	6°	8	0,78 0,85 0,94	Rozdział bardzo dobry
5	$\text{CoCl}_2$	18°	6	0,78	
6	$\text{CuCl}_2$	18°	6	0,85	
7	$\text{FeCl}_2$	18°	6	0,93	
8	$\text{CoCl}_2$ $\text{CuCl}_2$ $\text{FeCl}_2$	18°	6	0,80 0,84 0,91	Rozdział dobry. Mniejsze różnice we współczynnikach $R_F$
9	$\text{CoCl}_2$	40°	5	0,90	Kółko (plama) szerokie. Bibuła kruszeje.
10	$\text{CuCl}_2$	40°	5	0,95	Jak wyżej
11	$\text{FeCl}_2$	40°	5	1,00	Jak wyżej
12	$\text{CoCl}_2$ $\text{CuCl}_2$ $\text{FeCl}_2$	40°	5	0,90 0,96 1,00	Poszczególne kółka zlewają się.

Bibuła Whatman N. 3; Rozpuszczalnik: aceton-kw.solny-woda (84:11:5).  
Metoda krążkowa na „stosie”. Nakrapiano 5,0  $\gamma$  substancji (roztwór 1%).

g) Badanie wpływu substancji towarzyszących na wartość  $R_F$ . Oznaczano wartość samego kobaltu oraz po dodaniu 5% roztworów:  $\text{NaCl}$ ,  $\text{BaCl}_2$ ,  $\text{CuCl}_2$ ,  $\text{FeCl}_2$  i inn. w stosunku 1:1. Zaobserwowano zniekształcenie plam przy dodaniu nawet stosunkowo niewielkich ilości  $\text{NaCl}$ . Większe ilości  $\text{NaCl}$  i  $\text{BaCl}_2$  powodują zmniejszenie wartości  $R_F$  (wartość  $R_F$  dla samego kobaltu = 0,76, po dodaniu  $\text{NaCl}$   $R_F$  = 0,71).



Ryc. 8. Rozdział kobaltu, miedzi i żelaza w temperaturze 6°C  
 Ryc. 9. Rozdział kobaltu, miedzi i żelaza w temperaturze 10°C  
 Ryc. 10. Rozdział kobaltu, miedzi i żelaza w temperaturze 40°C  
 Partition of cobalt, copper and iron at 6°C  
 Partition of cobalt, copper and iron at 18°C  
 Partition of cobalt, copper and iron at 40°C

#### 4. Badanie przydatności wywoływaczy

Uwagi dotyczące przydatności wywoływaczy, podanych w Metodach i materiałach umieszczono w tabeli 6.

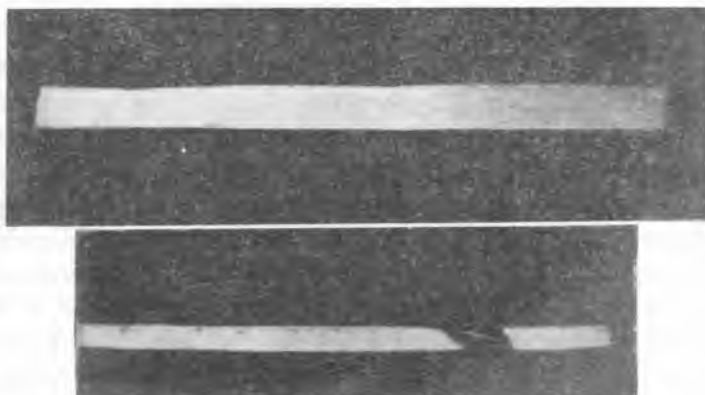
Tab. 6. Badanie przydatności różnych wywoływaczy dla kationu Co<sup>2+</sup>  
 Usefulness of various substances for detecting the Co<sup>2+</sup> cation

Nazwa wywoływacza	Czułość w $\gamma$	Barwa powstającego związku	Rozpuszczalnik wywoływacza	Wzór powstającego związku
$\alpha$ -nitrozo- $\beta$ -naftol	0,08	czerwona	kw. octowy aceton alkohol	$\text{Co}(\text{C}_{10}\text{H}_6\text{ONO})_3$
kw. rubeanowodorowy	0,8	rdzawa	alkohol aceton	$\text{Co}(\text{C}_2\text{H}_2\text{N}_2\text{S}_2)$
siarkowódor w środ. alkalicznym	0,05	czarno-brązowa	woda	$\text{CoS}$
siarczek amonu	0,05	czarno-brązowa	woda	$\text{CoS}$
dwuetylodwutiokarbaminian sodu, NaDDTK	0,16	zielona	woda aceton chloroform	$\text{Co}[(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{NCS}_2\text{S}]_2$
Ditizon	0,02	fioletkowa	amoniak benzen chloroform $\text{CCl}_4$	$\text{Co}\left(\text{SC} \begin{matrix} \text{NNHC}_6\text{H}_5 \\ \text{NNC}_6\text{H}_5 \end{matrix} \right)_2$
$\text{K}_4(\text{Fe}(\text{CN})_6)$	8	czerwono-fioletkowa	woda	$\text{Co}_2[\text{Fe}(\text{CN})_6]$
rodanek potasu	1,6	niebieska nietrwała	woda	$\text{Co}(\text{CNS})_2$



5. Wykrywanie kobaltu w roztworach o bardzo małym stężeniu

Do zagęszczania używano metod opracowanych przez Krzeczowską, a opisanych dokładnie w pracach (5, 6). Największe zagęszczenie uzyskano przy użyciu metody „krążkowej”. Ilość wprowadzanej na krążek substancji jest zależna od jej stężenia; im bardziej rozcieńczony jest



Ryc. 11. Kobalt wykryty na paseczku bibuły przy użyciu metody chromatograficznego zagęszczania wg Krzeczowskiej  
Cobalt detected in paper strip with the use of the method of chromatographic concentration according to Krzeczowska



Ryc. 12. Rozdział kobaltu, miedzi i żelaza metodą chromatografii wstępującej  
Partition of cobalt, copper and iron by the method of ascending chromatography



Ryc. 13. Kobalt, miedź i żelazo wykryte w roztworze silnie rozcieńczonym metodą zagęszczania wg Krzeczowskiej  
Cobalt, copper and iron detected in strongly diluted solution by the method of concentration according to Krzeczowska

roztwór, tym większe jego ilości należy wprowadzić, aby osiągnąć granicę wykrywalności (patrz czułość wywoływaczy — tabela 6). Metoda krążkowa pozwala na tak duże zagęszczenie pierwiastków, że można nią wykryć nawet ich ślady, oczywiście jeśli się posiada wystarczającą ilość materiału. Na ryc. 11 widzimy kobalt zebrany na paseczku bibuły, roztwór zawierał 0,009  $\mu\text{g}$  kobaltu w ml, nakropiono 100 ml, wywołano kwasem rubeanowodorowym.

#### 6. Rozdzielenie jonów kobaltu, miedzi i żelaza

Widoczne na ryc. 8, 9 i 12 chromatogramy ilustrują rozdział jonów kobaltu, miedzi i żelaza na bibule Whatman N. 3, przy rozpuszczalniku: aceton-kwas solny (steż.)-woda (84:11:5) oraz kwasie rubeanowodorowym z amoniakiem jako wywoływaczem. Ryc. 13. przedstawia rozdzielone metodą zagęszczeniową kationy kobaltu, miedzi i żelaza przy użyciu wyżej podanego rozpuszczalnika i wywoływacza. Niewidoczna na rycinie różnica barw poszczególnych kationów pozwala na ich wykrycie. Używając układów pirydyna — kwas azotowy 0,5 n albo kolidyna — kwas azotowy 0,4 n, można pozostawić żelazo na krążku, kobalt i miedź przesuną się na paseczek. Miedź wykrywamy siarkowodorem w środowisku kwaśnym, a kobalt w zasadowym.

#### OMÓWIENIE WYNIKÓW I WNIOSKI

Budząca ogólne zainteresowanie rola kobaltu w organizmie skłoniła nas do podjęcia badań metodycznych w celu przygotowania prostej metody do wykrywania go w materiale biologicznym. Występowanie kobaltu w śladowych ilościach skierowało poszukiwania na drogę badania prostych metod zagęszczania. W metodzie zagęszczania wg Krzeczowskiej (5, 6) używano roztworów zawierających od 0,0018  $\mu\text{g}$  w ml do 0,009  $\mu\text{g}$  kobaltu w ml.

Przy metodach chromatografii wstępującej i krążkowej najkorzystniejsze stężenia leżały w granicach od 0,08 $\gamma$  do 80 $\gamma$ , przy czym przy chromatografii krążkowej należało nakraplać ilości dwukrotnie większe, niż przy wstępującej (przeważnie przy metodzie wstępującej nakraplano ilości odpowiadające 2,40 $\gamma$ , przy krążkowej ok. 5 $\gamma$  kobaltu w ml.).

Uzyskiwane wartości współczynników  $R_F$  były wyższe przy metodzie krążkowej (w granicach od 0,27 do 0,77), niż przy wstępującej, (0,13 do 0,38). Jako wartość współczynnika  $R_F$  przyjmowano stosunek drogi substancji do drogi rozpuszczalnika, drogę substancji mierzono od linii startu do środka plamy, drogę rozpuszczalnika od poziomu rozpuszczalnika do jego czoła.

Ponieważ na wartość  $R_F$  ma duży wpływ zarówno wysycenie kamery, jak i bibuły, w toku pracy zwracano baczną uwagę na dokładne

uszczelnianie kamer, a przed rozpoczęciem rozwijania chromatogramu, trzymano bibułę, w ciągu paru godzin, w parach rozpuszczalnika.

W przeprowadzonych badaniach przeważnie używano bibuły Whatman N. 3, która ma tę przewagę nad używanym również przez nas N. 1, że wpływ brzegów oraz pewne niejednorodności bibuły nie wpływają na jakość plam. Natomiast przy bibule Whatman N. 1, a zwłaszcza N. 4 nawet niewielkie zakłócenia w wędrówce rozpuszczalnika (nierówność dna płytki, krzywe ustawienie bibuły), powodują zmiany  $R_F$  oraz zacieranie się ostrych konturów plam. Bibuła Schleicher-Schüll N. 597 również nadaje się do badań, a zaletą jej jest brak zanieczyszczeń żelazem.

Dominujący wpływ na wartość  $R_F$  oraz ukształtowanie plam posiada rozpuszczalnik. Najlepiej kształtują się plamy uzyskane przy rozpuszczalniku, w którego skład wchodzi kwas solny; rozpuszczalniki z kwasem octowym dają plamy zniekształcone (ogony), korzystniej wychodzą chromatogramy krążkowe. Zwiększenie ilości kwasu powoduje zwiększenie się wartości  $R_F$ . Ilość dodanego kwasu nie może jednak przekraczać  $1/5$  objętości rozpuszczalnika, ponieważ wówczas bibuła kruszeje i łamie się. Bibuła kruszeje również w wyższych temperaturach.

Temperatura wpływa na wartość  $R_F$  i na jakość plam.  $R_F$  zwiększa się w zakresach temperatur od  $6^\circ$  do  $40^\circ$ , ale jakość plam w niższych temperaturach jest lepsza, plamy i krążki są znacznie węższe i ostrzejsze w zarysach. Rozdział chromatograficzny kobaltu, miedzi i żelaza bardzo dobrze zachodzi w niskich temperaturach, uzyskuje się większe różnice w  $R_F$  poszczególnych kationów (ryc. 8 i 9). Na chromatogramach rozwijających się w temperaturze  $40^\circ\text{C}$  (ryc. 10) pozycje pierwiastków można ustalić wyłącznie na podstawie różnicy w zabarwieniu.

Plamy o różnym zabarwieniu otrzymuje się w zależności od użytego wywoływacza. Wywołując chromatogramy kobaltomem, otrzymujemy dla kobaltu plamę czerwoną, dla miedzi żółtopomarańczową, dla żelaza brązowoszarą. Pod wpływem kwasu rubeanowodorowego kobalt daje plamę ciepłordzawą, miedź zielonoszarą, żelazo szarobrązową. Z  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$  kobalt zabarwia się na szarofioletowo, miedź na czerwono-brązowo, żelazo daje piękną, intensywną barwę błękitną. Różnica w zabarwieniach poszczególnych kationów pozwala na ich wykrycie nawet przy gorszym rozdziale. Czułość wywoływaczy (ilość substancji dająca z wywoływaczem, na rozwiniętym chromatogramie jeszcze widoczną plamę) służących do wykrywania kationów jest przeważnie duża.

Przy użyciu własnej („krążkowej”) metody zagęszczeniowej rozdzielono kobalt, miedź i żelazo w roztworach silnie rozcieńczonych. Nakrapianie trwa tym dłużej, im większe objętości rozcieńczonego roztworu wprowadzamy na krążek. Metoda ta nie nadaje się do oznaczania w materiale, którego posiadamy ograniczone ilości, ponieważ zawartość ozna-

czanego pierwiastka w posiadanej próbce może nie znajdować się w granicach wykrywalności. Najlepiej do rozdzielania nadawały się układy rozpuszczalników:

n-butanol-aceton-kwas solny (stęż.)-woda (4:3:2:1)

aceton-kwas solny (stęż.)-woda (87:9:5)

aceton-kwas solny (stęż.)-woda (84:11:5).

Obecność nawet niewielkich ilości NaCl wpływa niekorzystnie na kształtowanie się plam, stąd wypływa konieczność usuwania substancji towarzyszących przed wykonywaniem oznaczeń, co zostanie uwzględnione w pracy, przy wykrywaniu kobaltu w materiale biologicznym.

#### WNIOSKI

1) Plamy barwne kobaltu z wywoływaczami najkorzystniej kształtują się w granicach stężeń 0,08% do 80% badanej substancji.

2) Wysycanie bibuły parami rozpuszczalnika (przed rozwijaniem chromatogramu) oraz dokładne uszczelnianie kamery wpływa dodatnio na ukształtowanie się plam.

3) Najlepszą bibułą chromatograficzną okazała się Whatman N. 3 i 1.

4) Dobre ukształtowanie plam i najkorzystniejszy rozdział kationów kobaltu, miedzi i żelaza uzyskano przy użyciu rozpuszczalników: a) n-butanol-aceton-kwas solny (stęż.)-woda (4:3:2:1), b) aceton-kwas solny (stęż.)-woda (87:8:5), c) aceton-kwas solny (stęż.)-woda (84:11:5).

5) Korzystne ukształtowanie plam i dobry rozdział kationów uzyskano w temperaturze 6°C.

6) Obecność niektórych substancji towarzyszących, zwłaszcza NaCl, powoduje zniekształcenie plam.

7) Najkorzystniejsze w użyciu okazały się wywoływacze: kobalt, kwas rubeanowodorowy,  $K_4[Fe(CN)_6]$  oraz  $H_2S$  (gaz).

8) W roztworach silnie rozcieńczonych można wykryć kobalt przy użyciu metody zagęszczania na krążku.

9) Metoda zagęszczania na krążku może służyć do rozdzielania kobaltu, miedzi i żelaza w roztworach silnie rozcieńczonych.

---

#### PIŚMIENNICTWO

1. Arden T. V., Burstall F. H., Davies G. R., Lewis J. A. i Linstead R. P.: A New Method for the Separation, Detection and Estimation of Inorganic Compound. *Nature* 162, 691—692, 1948.
2. Craft R. C.: The Effects of Cobalt, Liver Extract and Vitamin B<sub>12</sub> on the Anemia Induced by Hypophysectomy in Adult Female Rats. *Blood* 7, 863—873, 1952.

3. Gielecka M.: Wyniki leczenia niedokrwistości chlorkiem kobaltu. Pol. Tyg. Lek. 11, 294—298, 1956.
4. Korst D. R. i Bethell F. H.: Erythrocyte Radioiron Uptake in the Rat and Effects of Cobalt. J. Lab. Clin. Med. 52, 356—363, 1958.
5. Krzeczowska I.: Badania nad zastosowaniem bibułowej chromatografii rozdzielczej do wykrywania miedzi w roztworach o małym stężeniu i w materiale biologicznym. Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska Sec. D, 11, 199—232, 1956.
6. Krzeczowska I.: Nowa metoda „krążkowa” chromatograficznego zagęszczenia i jej zastosowanie. Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska Sec. D, 14, 87—98, 1959.
7. Kuźmińska D.: Leczenie niedokrwistości chlorkiem kobaltu. Pol. Tyg. Lek. 13, 1384—1388, 1958.
8. Lederer M.: Paper Chromatography of the Noble Metals. Nature 162, 776—777, 1948.
9. Lederer M.: Separation of Chloride Group Anions by Partition Chromatography on Paper. Science 110, 115, 1949.
10. Lederer M.: Inorganic Paper Chromatography. Nature 163, 598—599, 1949.
11. Lewandowski A.: Chromatografia rozdzielcza w analizie jakościowej związków nieorganicznych. Wiad. Chem. 8, 7—23, 1954.
12. Lipińska H.: Wpływ soli kobaltu na układ krwiotwórczy człowieka. Pol. Arch. Med. Wewn. 26, 1337—1348, 1956.
13. Pital A., Stafseth H. J. i Lucas E. H.: Observations on the Cobalt Enhancement of Penicillin Activity against *Salmonella pullorum*. Science 117, 459—460, 1953.
14. Pollard F. H., McOmie J. F. W., Elbeih I. I. M.: Inorganic Paper Chromatography and Detection of Cations by Fluorescence. Nature 163, 292, 1949.
15. Pollard F. H., McOmie J. F. W. i Elbeih I. I. M.: Analysis of Inorganic Compounds by Paper Chromatography. Part I. Movement of Cations with Complex-Forming Solvent Mixtures. J. Chem. Soc. 466—470, 1951.
16. Pollard F. H., McOmie J. F. W. i Elbeih I. I. M.: Part II. Analysis of Cations and Anions. J. Chem. Soc. 470—477, 1951.
17. Pollard F. H., McOmie J. F. W. i Stevens H. M.: Part III. A Scheme for Qualitative Analysis of Unknown Mixture of Cations. J. Chem. Soc. 771—774, 1951.
18. Pollard F. H., McOmie J. F. W. i Stevens H. M.: Part IV. An Extended Scheme for the Qualitative Analysis of an Unknown Mixture of Cations. J. Chem. Soc. 1863—1865, 1951.
19. Rothery P., Bell J. M. i Spinks J. W. T.: Cobalt and Vitamin B<sub>12</sub> in Sheep I. Distribution of Radiocobalt in Tissues and Ingesta. Journal of Nutrition 49, 173—181, 1953.
20. Saltzman B. E.: Microdetermination of Cobalt in Biological Material. Anal. Chem. 27, 1725—1731, 1955.
21. Schmidt J. R. A. i Rasmussen A. F.: Inhibitory Effect of Cobaltous Ions on Multiplication of Influenza Virus. Proc. Soc. Exp. Biol. 81, 244—246, 1952.
22. Smoczkiwiczowa A. i Mizgalski W.: Separation and Determination of Millimicrogram Amounts of Cobalt and Microgram Amounts of Copper in Biological Material. Nature 182, 53—54, 1958.

23. Thiers R. E., Williams J. F. i Yoe J. H.: Separation and Determination of Millimicrogram Amounts of Cobalt. *Anal. Chem.* **27**, 1725—1731, 1955.
24. Volk B. W., Lazarus S. S. i Goldner M. G.: Alpha Cell Damage and Blood Sugar Changes in Rabbits after Administration of Cobalt. *Proc. Soc. Exp. Biol.* **82**, 406—411, 1953.
25. Weissbecker L.: Die Bedeutung des Kobalts für den Eisenstoffwechsel. *Arzneimittel-Forschung* **2**, 171—173, 1952.
26. Williams R. J. i Kirby H.: Paper Chromatography Using Capillary Ascent. *Science* **107**, 481—483, 1948.
27. Wolff H.: Kobaltwirkung auf die Hämatopoese. *Klin. Wochenschrift* **28**, 279—280, 1950.
28. Wysocki K., Smoczkiwiczowa A., Mizgalski W. i Kabza R.: Zawartość kobaltu we krwi w przewlekłej niedokrwistości pokrwotocznej. *Pol. Tyg. Lek.* **15**, 1689—1691, 1960.
29. Zimmerman G. i Nehring K.: Ring Paper Chromatography by the Drop Method. *Angew. Chem.* **63**, 556, 1951.

### РЕЗЮМЕ

Проведено ряд экспериментов, целью которых было установление условий для хорошего фармирования пятен кобальта на хроматограммах, а также исследовано влияние различных изменяющихся факторов на величину коэффициента  $R_f$  (величина камеры, качество бумаги, концентрация исследуемого вещества, температура, наличие сопутствующих веществ). Кроме того было исследовано ряд систем растворителей и проявителей.

Для обнаружения кобальта в сильно разведенных растворах применялся метод хроматографического сгущения по Кшечковской.

Вышеупомянутый метод был применен для разделения ионов кобальта, меди и железа в сильно разведенных растворах.

- Рис. 1. Хроматограмма, полученная в камере I (большой эксикатор).
- Рис. 2. Хроматограмма, получена в камере II (средний эксикатор).
- Рис. 3. Хроматограмма, полученная в камере III (малый эксикатор).
- Рис. 4. Кобальт на бумаге Whatman № 1.
- Рис. 5. Кобальт на бумаге Whatman № 4.
- Рис. 6. Кобальт на бумаге Schleicher-Schüll № 597.
- Рис. 7. Влияние концентрации исследуемого вещества на  $R_f$  (количество кобальта: 10 гамма, 20 гамма, 30 гамма, 40 гамма, 50 гамма, 80 гамма).
- Рис. 8. Разделение кобальта, меди и железа при температуре 6°C.
- Рис. 9. Разделение кобальта, меди и железа при температуре 18°C.
- Рис. 10. Разделение кобальта, меди и железа при температуре 40°C.
- Рис. 11. Кобальт, обнаруженный на полоске бумаги при применении метода хроматографического сгущения по Кшечковской.
- Рис. 12. Разделение кобальта, меди и железа методом восходящей хроматографии.
- Рис. 13. Кобальт, медь и железо, обнаруженные в сильно разведенном растворе при помощи метода хроматографического сгущения по Кшечковской.

## SUMMARY

A number of experiments were carried out in order to determine the conditions favouring the formation of cobalt spots in chromatograms. The authors studied also the influence of some variable factors on the value of the  $R_F$  coefficient (size of camera, kind of filter paper, concentration of investigated substance, temperature, presence of accompanying substances).

Several solvent systems and detecting substances were tested.

The method of chromatographic concentration according to Krzeczowska was used for detecting cobalt in strongly diluted solutions. The same method was also used for partitioning the cobalt, copper and iron ions in strongly diluted solutions.

