
Z Zakładu Chemii Fizjologicznej Akademii Medycznej w Lublinie
Kierownik: Prof. Dr Janina Opieńska-Blauth

Janina OPIEŃSKA - BLAUTH, Olga SAKŁAWSKA - SZYMONOWA,
Marek KAŃSKI

Chromatografia bibułowa niektórych kwasów organicznych

Анализ некоторых органических кислот методом хроматографии на фильтровальной бумаге

The partition paper chromatography of some organic acids

W s t ę p

W ramach szerzej zakrojonej pracy nad przemianą węglowodanową u *Escherichia coli* podjęliśmy temat metodycznego opracowania wykrywania i rozdzielania kwasów organicznych, a w szczególności tych, które odgrywają rolę w przemianach biologicznych. Wiele względów przemawiało za zastosowaniem do tego celu techniki chromatografii bibułowej.

Pomimo bardzo wielu prac z dziedziny chromatografii bibułowej, jakie ukazywały się w literaturze światowej w ciągu ostatnich kilku lat, jedynie nieliczne dotyczyły rozdzielania i wykrywania kwasów organicznych. W przeciwieństwie do rezultatów osiągniętych dla kwasów tłuszczowych przy użyciu chromatografii kolumnowej, chromatogramy bibułowe tych kwasów nie są na ogół zachęcające. Największą trudność przy rozdzielaniu homologów niższych kwasów tłuszczowych stanowiła ich lotność i zależność współczynnika podziału od stężenia kwasu. Istotę trudności stanowi tworzenie się asocjatów w rozpuszczalnikach organicznych oraz częściowa jonizacja roztworu.

Na tę zależność wartości R_F od stężenia badanych kwasów organicznych wskazywali już w swych pierwszych pracach Martin i Synge (10). Lugg i Overell (9) stosowali technikę chromatografii bibułowej dla rozdzielania dwuzasadowych kwasów organicznych. Fazą ruchomą w ich doświadczeniach był n-butanol, ale wprowadzili oni nasycając atmosferę kamery chromatograficznej parami kwasu mrówkowego

w celu cofnięcia dysocjacji wywoływanych kwasów. Autorzy ci wywoływali plamy badanych przez siebie kwasów za pomocą wskaźników: zieleni bromokrezolowej lub błękitu bromofenolowego. Nie podali oni, niestety, wartości R_F dla poszczególnych kwasów. Podobnie Lester Smith (8) w swoich doświadczeniach posługiwał się zielenią bromokrezolową dla wywoływania kwasów tłuszczowych na kolumnie, ale równocześnie używał jako fazy ruchomej chromatogramu, mieszaniny chloroformu z n-butanolem (95% chloroformu + 5% n-butanolu).

Bolding (1) rozdzielał estry etylowe wyższych kwasów tłuszczowych (stearynowego, palmitynowego, mirystynowego i laurynowego) na bibule nasyconej latexem. W jego doświadczeniach fazę ruchomą stanowił metanol.

Isherwood (7) zwraca uwagę na to, że cały szereg trudności związanych z chromatografią bibułą pochodzi od zanieczyszczeń bibuły śladami ciężkich metali. Od tych zanieczyszczeń można uwolnić się przez przemywanie bibuły 10 N kwasem solnym względnie 1% roztworem alkoholowym 8-oksychinoliny.

Fink i Fink (5) opisali metodykę chromatografii bibułowej kwasów tłuszczowych o długości łańcucha od C_1 do C_8 przy pomocy przeprowadzania tych kwasów najpierw w estry metylowe, a następnie w pochodne hydroksamowe. Jako wskaźnik (wywoływacz) stosowali roztwór chlorku żelazowego. Najlepsze wyniki osiągnęli przy zastosowaniu układu rozpuszczalników fenol — kwas izomasłowy.

Opisano również metody wykrywania i rozdzielania szeregu kwasów organicznych zawierających w swej budowie pewne charakterystyczne grupy, jak np.: aminokwasów, ketokwasów itp.

W naszej pracy wykrywaliśmy kwasy organiczne na podstawie ich oddziaływania, jako cechy charakterystycznej dla tej grupy związków chemicznych, oraz przeprowadziliśmy oznaczenia R_F dla dwudziestu kilku kwasów organicznych badanych oddzielnie i w mieszaninach.

Część doświadczalna

Nasza technika doświadczalna nie odbiegała w zasadzie od techniki chromatograficznej stosowanej przez Condena, Gordona i Martina (3), oraz Lugga i Overella (9). Dla kontroli w pierwszej fazie doświadczeń, nie nasycaliśmy atmosfery kamery parami kwasu mrówkowego. Fazę ruchomą zawsze stanowił fenol nasycony wodą, a fazę nieruchomą woda nasycona fenolem. Suszenie przeprowadzono w rozmaitych warunkach czasu i temperatury. W większości wy-

padków stosowaliśmy suszenie w suszarce w temp. 105°C, niekiedy zaś w temp. pokojowej w dobrze przewietrzanym miejscu w ciągu 24 godzin, lub łączyliśmy oba te zespoły. Wszystkie te odmiany metodyczne prowadzą do celu, ponieważ istotnym warunkiem jest całkowite usunięcie śladów fenolu z bibuły.

Wywoływanie plam kwasów odbywało się na drodze zanurzania wysuszonych pasków bibuły w roztworze odpowiedniego wskaźnika. W szeregu wstępnych doświadczeń wypróbowano następujące wskaźniki: wodne roztwory lakmusu, indykator uniwersalny Yamada'y, wodne roztwory czerwieni Kongo, wodne i alkoholowe roztwory błękitu bromotymolowego. Najlepsze jednak wyniki osiągnięto posługując się alkoholowym roztworem błękitu bromofenolowego i tego wskaźnika używano w przeważającej ilości doświadczeń.

Jako podpory dla fazy nieruchomej używano stale bibuły Whatmana Nr 1, ciętej w paski o wymiarach 47 x 10 cm. Bibuły nie oczyszczono od śladów ciężkich metali.

A p a r a t u r a :

1. Kamera chromatograficzna.

Jako kamery chromatograficznej używano stale termostatu z płaszczem wodnym, o wymiarach wewnętrznych 716 x 523 x 385 mm. Temperatura termostatu wahała się w granicach 21° do 23°C, jednakże wahania te obserwowano na przestrzeni kilku dni, a nie jednej doby i były one zależne od wahań temperatury pokojowej.

2. Rynienka (korytko).

Rynienkę sporządzono z rury szklanej o średnicy 19 mm przez zatopienie jej końców i wyszlifowanie wzdłuż długiej osi rury szczeliny o szerokości ok. 3 mm. Po umieszczeniu górnych brzegów pasków bibuły w rynience umocowywano je przy pomocy kilku wąskich i długich płytek szklanych, sporządzonych ze zwykłego szkła okiennego.

O d c z y n n i k i :

1. Fenol nasycony wodą.

Do doświadczeń używano fenolu chemicznie czystego, świeżo przedestylowanego. Fenol upłynniano w podwyższonej temperaturze i przelewano do rozdzielacza, w którym mieszano go z równą objętością wody. Po 24 godzinach rozdzielania się obu faz w temperaturze, odpowiadającej temperaturze normalnie panującej wewnątrz kamery chromatograficznej, tj. ok. 21° do 23°C, zbierano fazę fenolową, która gromadziła się w rozdzielaczu w dolnej warstwie. Fazą tą wypełniano rynienkę chromatograficzną.

2. Woda nasycona fenolem.

Fazę tę stanowiła warstwa górna w rozdzielaczu. Rozlewano ją w ilości ok. 100 ml. do kilku płytek Petriego i umieszczano je na dnie kamery chromatograficznej tak, aby zwisające paski bibuły nie zanurzały się w płytkach.

3. Kwas mrówkowy.

Używano 60% kwasu mrówkowego chemicznie czystego, który umieszczano w ilości ok. 50 ml w kilku płytkach Petriego na dnie kamery chromatograficznej.

4. 0,5% wodny roztwór lakmusu.

5. 0,04% alkoholowy roztwór błękitu bromofenolowego.

6. 0,02% wodny roztwór błękitu bromotymolowego.

7. 0,05% wodny roztwór czerwieni Kongo.

8. Indykator uniwersalny Yamada'y o składzie:

- a) Błękit tymolowy 5 mg,
- b) Czerwień metylowa 12 mg,
- c) Błękit bromotymolowy 60 mg,
- d) Fenolftaleina 100 mg,
- e) Alkohol 95% 100 ml.

Wszystkie badane przez nas kwasy organiczne stosowane były w postaci roztworów wodnych ok. 1% (o ile nie podano inaczej na odpowiednim miejscu). Do wkraplania badanych roztworów używano mikropipetki sporządzonej z tak wyciągniętej pitetki pasteurowskiej, by wypływające krople posiadały zawsze tę samą objętość, tj. 10 mikrolitrów.

Przy wkraplaniu ważne jest trzymanie mikropipetki zawsze pod tym samym kątem nachylenia. Po wkropleniu roztworu kwasu na linię wyjściową (ok. 5 cm od górnego brzegu paska bibuły) obrysowywano kontur powstałej plamki zwykłym ołówkiem.

• Po wkropleniu badanych roztworów umieszczano paski bibuły w kamerze chromatograficznej na 24 godziny dla nasycenia się bibuły parami fenolu i wody, z tym jednak, że nie zanurzano jeszcze górnych brzegów pasków w rynience zawierającej fazę fenolową.

Po okresie nasycania się bibuły parami rozpuszczalników zanurzano górne brzegi pasków bibuły na głębokość ok. 1 cm (licząc od brzegu szczeliny) w głąb rynienki chromatograficznej i przyciskano je lekko do brzegów rynienki przez zaklinowanie płytkami szklanymi. Z tą chwilą rozpoczynało się spływanie fazy ruchomej widoczne w postaci tzw. frontu cieczy przesuwającego się powoli wzdłuż pasków ku dołowi.

Spływanie fazy ruchomej w naszych warunkach doświadczalnych trwało normalnie (tzn. do chwili zbliżenia się frontu rozpuszczalnika na

odległość 3—5 cm od dolnego brzegu paska bibuły) ok. 20—24 godzin. Po wysuszeniu pasków bibuły (celem usunięcia śladów fenolu) wywoływano plamy odpowiadające położeniu odpowiednich kwasów organicznych przez przeciągnięcie paska bibuły przez roztwór wskaźnika, którym napełniano dużą płytkę Petriego (średnicy 90 mm). Ponieważ plamy w niektórych wypadkach były nietrwałe, przeto obrysowywano kontury plam na wilgotnej jeszcze bibule przy pomocy ołówka chemicznego. Następnie suszono powtórnie paski bibuły w prądzie gorącego powietrza wytwarzanego przez zwykłą suszarkę fryzjerską (tzw. Fön).

Ten sposób wywoływania (zanurzanie chromatogramów w roztworze wskaźnika) budził początkowo nasze zastrzeżenia, ponieważ mogłyby występować pewne przesunięcia się plam przy wyjmowaniu pasków bibuły z roztworu wskaźnika, ale była to metoda z wyboru, ponieważ nie dysponowaliśmy dostatecznie dobrym rozpylaczem, który dawałby jednolity strumień jednakowo drobnych kropelek wskaźnika. Stwierdziliśmy, że stosując zawsze ten sam sposób postępowania przy zanurzaniu pasków bibuły można praktycznie wyeliminować błąd, jaki może powstać w tych warunkach.

Badania przeprowadziliśmy na 26 kwasach organicznych o różnej budowie chemicznej, jak: lotne kwasy tłuszczowe, kwasy alifatyczne dwuzasadowe, oksykwasy, chlorowco-kwasy oraz kwasy cykliczne tak aromatyczne, jak i heterocykliczne. Kwasy te badano zarówno indywidualnie, jak i w mieszaninach.

Niżej podane tabele (1 do 27) podają zestawienie wartości liczbowych odnoszących się do wielkości i kształtu plamy, R_F poszczególnych kwasów oraz zestawienie charakterystyki natężenia plamy, trwałości plamy, barwy i natężenia plam fluorescencyjnych. Tabele zestawiono oddzielnie dla układu rozpuszczalników fenol-woda i fenol-woda-kwas mrówkowy. Oddzielnie również potraktowano wyniki otrzymane dla poszczególnych kwasów z mieszanin.

Wielkości „a” i „b” oznaczają odpowiednio długość osi poziomej i pionowej plamy. Przez „x” oznaczono długość odcinka od środka plamki, utworzonej przez wkroplenie roztworu kwasu, do środka plamy wywołanej. Przez „y” oznaczono długość odcinka od centrum wkroplonej plamki do odpowiedniego punktu na linii frontu osiągniętej przez rozpuszczalnik przy końcu spływania. R_F jest, w myśl definicji, stosunkiem $x : y$. Podanie danych ilościowych charakteryzujących wymiary wywołanych plam wydawało się dlatego ważne, że opisywane były w literaturze metody ilościowego oznaczania związków na podstawie wielkości i intensywności plamy.

Sprawdzenie trwałości plamy w zestawieniu z rodzajem użytego wskaźnika pozwoliło wyprowadzić wnioski co do wyboru najodpowiedniejszego, w danych warunkach doświadczalnych, wskaźnika. Wprowadzenie, jako dodatkowej próby, badania chromatogramów w świetle pozafioletkowym pozwoliło ustalić R_F dla niektórych kwasów w tych wypadkach, kiedy lokalizacja plam wywołanych przez wskaźnik była niepewna.

Tabele (28 i 29) podają dane odnoszące się do zagadnienia zależności R od stężenia ładanych kwasów oraz od rodzaju użytego wskaźnika.

Tabela 30 zawiera próbę ujęcia wyników z poprzednich tabel w interpretacji statystycznej. W kolumnie „A” podano ilość badań ogólną, w kolumnie „B” — ilość badań nieudanych, a w kolumnie „C” — ilość otrzymanych wyników mało prawdopodobnych, których z tego powodu nie umieszczono w kolumnie „A”. Kolumny „A”, „B” i „C” posiadają to samo znaczenie, co poprzednio wymienione, ale odnoszą się one do wyników otrzymanych dla kwasów badanych nie indywidualnie, lecz w mieszaninach. Wszystkie dane w tabeli 30 odnoszą się do doświadczeń przeprowadzonych w układzie fenol-woda-kwas mrówkowy.

Tabele 31—33 są próbą ujęcia zależności R_F od budowy chemicznej kwasu i próbą teoretycznego obliczenia R_F dla poszczególnych grup, wchodzących w skład badanych kwasów.

OBJAŚNIENIA DO TABEL (1 — 27)
(EXPLANATIONS TO THE TABLES (1 — 27))

Kolumna I — liczba porządkowa doświadczenia.

(Column I — No. of experiment).

Kolumna II — stężenie badanego kwasu w %.

(Column II — concentration of acid in per cent).

Kolumna III — nazwa wskaźnika.

(Column III — indicator).

Lith. alc. = 0,5% roztw. alkoholowy lakmusu.

(0,5% lithmus in 95% ethanol).

Lith. w. = 0,5% roztw. wodny lakmusu.

(0,5% lithmus in water).

B. th. b. = 0,02% roztw. wodny błękitu bromotymol.

(0,02% brom-thymol blue in water).

Yamada = indykator uniwersalny wg Yamada'y.

(Yamada's universal indicator).

Congo = 0,05% roztwór wodny czerwieni Kongo.
(0,05% Congo red in water).

B. ph. b. = 0,04% roztw. alkoholowy błękitu bromofenolowego.
(0,04% bromphenol blue in ethanol 95%).

Kolumna IV — natężenie barwy wywołanej plamy.

(Column IV — intensity of colour of the developed acid).

Kolumna V — trwałość wywołanej plamy.

(Column V — stability of developed spot).

st. = plama trwała (spot stable).

unst. = „ nietrwała (spot unstable).

Kolumna VI — natężenie i barwa plamy fluorescencyjnej.

(Column VI — intensity and colour of the spot in ultraviolet light).

p. = różowa (pink).

g. = zielona (green).

o. = pomarańczowa (orange).

b. = niebieska (blue).

v. = fioletowa (violet).

y. = żółta (yellow).

b. = brunatna (brown).

s. = cień — silna absorpcja (shadow — a strong absorption).

Kolumna „a“ — wymiar osi poziomej plamy w cm.

(Column „a“ — horizontal axis of the spot in cm).

Kolumna „b“ — wymiar osi pionowej plamy w cm.

(Column „b“ — length of the perpendicular axis of the spot in cm).

Kolumna „x“ — odległość przebyta przez kwas od miejsca wkroplenia do środka wywołanej plamy.

(Column „x“ — distance that is travelled by an acid on the paper).

Kolumna „y“ — odległość przebyta przez front rozpuszczalnika od linii wyjściowej do punktu końcowego.

(Column „y“ — distance that is travelled by the front of the solvent from the starting line).

Kolumna R_F — wg definicji (from definition).

Sat. — nasycony roztwór kwasu.
(saturated acid solution).

Tabl. 2.

Kwas ASKORBINOWY ch. cz.

(ASCORBIC Acid. c. p.)

Rozpuszczalność (Solubility)

Stała dysocjacji (Dissociation Constant): I. $7,94 \cdot 10^{-5}$ (24° C)II. $1,62 \cdot 10^{-12}$ (15° C)

I	II	III	IV	V	VI	a	b	x	y	R _F
Kwas badany indywidualnie (Acid alone)										
Układ: fenol-woda (System: phenol-water)										
1.	1%	B. ph. b.	—	unst.	± g.	1.2	3.0	34.0	7.2	0.21
2.	1%	Lith. w.	—	..	—	1.5	2.0	31.0	4.6	0.14
3.	1%	B. th. b.	—	..	+ g.	2.0	3.0	34.8	9.4	0.28
4.	1%	..	—	2.0	2.7	34.7	16.0	0.46
5.	1%	Lith. w.	—	—	..	—	—	—	—	—
6.	1%	B. th. b.	—	—	..	—	—	—	—	—
7.	1%	..	—	—	..	—	—	—	—	—
8.	1%	Lith. w.	—	—	..	—	—	—	—	—
9.	1%	..	—	—	..	—	—	—	—	—
Układ: fenol-woda-kwas mrówkowy (System: phenol-water-formic acid)										
1.	1%	B. ph. b.	++	st.	—	1.6	2.5	34.7	16.2	0.46
2.	1%	..	++	..	+ b.	2.3	2.4	35.1	15.5	0.41
3.	1%	..	++	..	+ b.	2.2	2.9	35.2	16.1	0.46
4.	1%	..	++	..	+ b.	2.0	2.6	35.6	16.4	0.46
5.	1%	..	++	..	+ b.	2.0	2.7	35.2	15.1	0.44
6.	1%	..	+	..	++ b.	1.7	2.5	35.3	18.3	0.52
7.	1%	..	++	..	++ b.	1.6	2.7	32.4	15.4	0.47
8.	1%	..	++	..	+ b.	2.0	2.6	37.0	18.2	0.49
9.	1%	..	++	..	+++ b.	1.9	2.4	35.0	17.1	0.49
10.	1%	..	++	..	—	1.8	2.3	35.5	16.9	0.48
11.	1%	..	++	..	+ b.	2.0	2.8	35.3	16.9	0.48
12.	1%	..	++	..	++ b.	2.0	2.9	32.9	14.1	0.43
13.	1%	..	++	..	—	2.4	2.3	32.8	14.9	0.45
14.	1%	..	+++	..	—	2.3	3.7	33.7	15.2	0.45
15.	1%	Lith. w.	+	..	+ b.	1.4	1.6	28.2	4.5	0.16
16.	1%	B. ph. b.	—	..	—	—	—	—	—	—
17.	1%	..	—	..	—	—	—	—	—	—
18.	1%	..	—	..	—	—	—	—	—	—
19.	1%	..	—	..	—	—	—	—	—	—
20.	1%	..	—	..	—	—	—	—	—	—
21.	1%	..	—	..	—	—	—	—	—	—
22.	1%	..	—	..	—	—	—	—	—	—
23.	1%	..	—	..	—	—	—	—	—	—
24.	1%	..	—	..	—	—	—	—	—	—
25.	1%	..	—	..	—	—	—	—	—	—
26.	1%	..	—	..	—	—	—	—	—	—
27.	1%	..	—	..	—	—	—	—	—	—
28.	1%	..	—	..	—	—	—	—	—	—
29.	1%	..	—	..	—	—	—	—	—	—
Kwas badany w mieszaninie (Values from a mixture of acids)										
Układ: fenol-woda-kwas mrówkowy (System: phenol-water-formic acid)										
1.	1%	B. ph. b.	++	st.	+ b.	1.9	2.6	37.3	17.5	0.47
2.	1%	..	++	..	++ b.	2.3	2.3	31.7	12.0	0.38
3.	1%	..	—	..	—	1.8	5.4	33.0	14.0	0.43
4.	1%	..	+	..	—	1.8	5.4	34.1	14.2	0.42

Tabl. 3.

Kwas ASPARAGINOWY ch. cz. (B. D. H. Laboratory Reagent. The British Drug Houses LTD.) (ASPARTIC Acid, c. p.)

Rozpuszczalność (Solubility): 0,61 w 20°C, 9,37 w 97°C.

Stała dysocjacji (Dissociation Constant): $1,35 \cdot 10^{-4}$ (25°C)

I	II	III	IV	V	VI	a	b	x	y	R _F
Kwas badany indywidualnie (Acid alone) Układ: fenol-woda (System: phenol-water).										
1.	2%	Lith. w. 0.2%	±	st.	± b.	0.6	0.7	33.8	7.4	0.21
2.	1%	Lith. w.	+	"	—	1.6	1.6	28.7	6.5	0.23
3.	2%	B. th. b.	—	unst.	—	1.7	2.2	34.0	7.6	0.22
4.	1%	Lith. w.	—	"	—	1.9	1.1	32.5	7.2	0.22
Układ: fenol-woda-kwas mrówkowy (System: phenol-water-formic acid)										
1.	1%	B. ph. b.	+	st.	± o.	2.0	2.0	35.8	12.8	0.36
2.	1%	"	+	"	+ o.	1.7	3.0	32.6	9.8	0.30
3.	1%	"	++	"	+ o.	1.9	2.4	36.8	15.3	0.41
4.	1%	"	+	"	± o.	1.9	2.2	32.2	11.2	0.34
5.	1%	"	+	"	+ y.	2.0	2.0	35.6	15.3	0.43
6.	1%	Yamada	—	unst.	--	2.0	2.6	31.2	10.2	0.32
7.	0.5%	"	—	"	—	1.4	1.6	30.8	10.6	0.33
8.	1%	B. ph. b.	+	st.	F+ o.	2.4	2.5	34.9	13.2	0.38
9.	1%	"	+	"	+ o.	2.1	3.0	35.8	13.5	0.38
10.	1%	"	+	"	+ o.	2.0	2.8	35.7	13.2	0.37
11.	1%	"	+	"	+ o.	1.8	2.6	32.9	10.9	0.33
12.	1%	Congo	+	—	—	—	—	—	—	—
13.	1%	Yamada	—	—	—	—	—	—	—	—
Kwas badany w mieszaninie (Values from a mixture of acids) Układ: fenol-woda-kwas mrówkowy (System: phenol-water-formic acid)										
1.	1%	Congo	—	unst.	—	1.5	1.5	35.6	11.0	0.30
2.	1%	"	—	"	—	1.4	1.3	35.0	11.1	0.31
3.	1%	B. ph. b.	+	st.	+ o.	3.0	3.2	37.7	14.3	0.38
4.	1%	"	+	"	± o.	1.9	2.8	31.6	9.2	0.29
5.	1%	"	+	"	+ o.	2.0	3.1	34.0	12.6	0.36
6.	1%	"	+	"	+ o.	1.9	2.2	32.8	10.1	0.31
7.	1%	"	+	"	+ o.	1.6	2.0	34.3	10.1	0.29
8.	1%	"	"	"	+ o.	2.1	2.8	41.5	20.4	0.49
9.	1%	"	+	"	± o.	2.3	2.5	32.7	9.4	0.28
10.	1%	"	—	unst.	—	1.9	2.3	32.9	10.2	0.31
11.	1%	Yamada	—	"	—	1.8	2.3	32.	10.9	0.34

Tabl. 5.

Kwas BURSZTYNOWY — (SUCCINIC Acid)

Rozpuszczalność (Solubility): 6,84 w 20° C, 60,37 w 75° C.

Stała dysocjacji (Dissociation Constant): I. $6,4 \cdot 10^{-5}$ (25° C)II. $3,3 \cdot 10^{-6}$ (25° C)

I	II	III	IV	V	VI	a	b	x	y	R _F
Kwas badany indywidualnie (Acid alone)										
Układ: fenol-woda (System: phenol-water)										
1.	1%	Lith. w.	+	st.	—	2.2	3.4	31.5	19.2	0.61
2.	1%	..	++	..	—	2.2	3.8	29.9	18.9	0.63
3.	1%	..	+	..	—	1.1	1.4	34.0	21.4	0.63
4.	1%	..	++	..	—	1.9	2.2	30.1	19.1	0.63
Układ: fenol-woda-kwas mrówkowy (System: phenol-water-formic acid)										
1.	5%	Yamada	—	unst.	—	2.1	4.1	29.5	20.1	0.68
2.	1%	"	—	"	—	2.1	2.8	29.4	20.1	0.68
3.	0.5%	"	—	"	—	1.9	2.9	30.8	21.2	0.69
4.	1%	Congo	—	"	—	2.2	2.3	34.0	22.8	0.67
5.	1%	B. ph. b.	++	st.	+o.	2.0	3.1	35.4	24.1	0.67
6.	1%	Yamada	—	unst.	—	2.2	2.9	34.4	23.7	0.68
7.	1%	Lith. w.	+—	st.	—	1.6	2.1	36.5	24.9	0.68
8.	1%	B. th. b.	—	unst.	—	3.0	3.2	33.8	23.0	0.68
9.	1%	B. ph. b.	+—	st.	+o.	2.7	3.5	33.0	22.4	0.67
10.	1%	Congo	—	—	—	—	—	—	—	—
Kwas badany w mieszaninie (Values from a mixture of aids)										
Układ: fenol-woda-kwas mrówkowy (System: phenol-water-formic acid)										
1.	1%	Yamada	—	unst.	—	1.4	1.6	30.7	16.1	0.52
2.	1%	..	—	"	—	1.2	1.5	32.9	16.2	0.52
3.	1%	Congo	—	"	—	1.9	2.3	36.5	24.0	0.65
4.	1%	..	—	"	—	2.0	2.2	36.7	24.7	0.66
5.	1%	..	—	"	—	2.0	2.1	35.0	24.0	0.66
6.	1%	..	—	"	—	2.1	2.2	25.2	23.8	0.68
7.	1%	B. ph. b.	++	st.	—o.	2.3	3.7	33.8	22.2	0.66
8.	1%	..	++	"	+o.	2.5	3.3	31.6	20.0	0.64
9.	1%	..	+++	"	+o.	2.3	4.6	41.5	30.5	0.73
10.	1%	..	—	"	F+o.	2.0	2.9	32.9	21.7	0.66
11.	1%	Yamada	—	unst.	—	1.6	1.8	32.7	21.7	0.66
12.	1%	..	—	"	—	1.5	3.1	32.0	19.9	0.61
13.	1%	..	—	"	—	1.6	2.7	32.1	20.4	0.64
14.	1%	..	—	"	—	2.0	3.7	32.2	21.4	0.66

Tabl. 6.

Kwas JEDNOCHLOROOCYTOWY ch. cz.
(MONOCHLORACETIC Acid, c. p.)
Rozpuszczalność (Solubility)- 614 w 30°C.
Stała dysocjacji (Dissociation Constant): $1,4 \cdot 10^{-3}$ (25°C)

I	II	III	VI	V	VI	a	b	x	y	R _F
Kwas badany indywidualnie (Acid alone) Układ: fenol — woda (System: phenol — water)										
1.	1%	B. th. b.		unst.	—	2.1	5.2	33.0	22.5	0.69
2.	1%	Lith.		"	—	1.3	1.4	27.9	22.8	0.81
3.	1%	B. th. b.		"	—	1.2	2.8	32.0	22.9	0.68
4.	1%	"		"	—	1.8	4.1	34.0	26.7	0.72
5.	2%	Lith.	—	—	—	—	—	—	—	—
6.	1%	B. th. b.	—	—	—	—	—	—	—	—
Układ: fenol—woda—kwas mrówkowy (System: phenol—water—formic acid)										
1.	1%	B. ph. b.		st.	—	2.1	3.6	35.9	28.7	0.80
2.	1%	"	+	"	—	1.8	2.0	33.5	27.3	0.82
3.	1%	"	—	—	—	—	—	—	—	—
4.	1%	"	—	—	—	—	—	—	—	—
5.	1%	"	—	—	—	—	—	—	—	—
6.	1%	"	—	—	—	—	—	—	—	—
7.	1%	Lith.	—	—	—	—	—	—	—	—
8.	1%	Yamada	—	—	—	—	—	—	—	—
Kwas badany w mieszaninie (Values from a mixture of acids) Układ: fenol—woda—kwas mrówkowy (System: phenol—water—formic acid)										
1.	1%	B. ph. p.		st.	—	1.6	8.1	30.9	15.4	0.50
2.	1%	"		"	—	1.5	2.7	34.1	20.5	0.60

Tabela 12.
Kwas GLUKURONOWY
(GLUCURONIC Acid)

I	II	III	IV	V	VI	a	b	x	y	R _F
Kwas badany indywidualnie (Acid alone) Układ: fenol-woda (System: phenol-water)										
1.	1%	Lith. w.	+	st.	++b.	1.2	1.4	32.7	5.7	0.17
2.	1%	„	+	„	++b.	2.0	1.8	30.7	4.5	0.15
3.	1%	„	+	„	+++b.	2.2	2.2	32.3	5.3	0.16
4.	1%	B. th. b.	—	unst.	—	1.6	2.4	34.9	6.4	0.18
5.	1%	Lith. w.	+	st.	+++b.	2.0	1.9	28.7	5.0	0.18
Układ: fenol-woda-kwas mrówkowy (System: phenol-water-formic acid)										
1.	1%	B. ph. b.	+	st.	—	2.0	3.3	35.1	7.9	0.22
2.	1%	Yamada	—	unst.	—	1.5	2.7	31.4	7.5	0.23
3.	1%	B. ph. b.	+	st.	—	2.1	2.2	36.5	8.3	0.23
4.	1%	„	+	„	F ± o.	2.7	2.8	34.9	9.4	0.27
5.	1%	„	+	„	± o.	2.2	2.5	34.0	7.7	0.22
6.	1%	„	+	„	—	2.2	2.8	34.0	7.7	0.21
7.	1%	„	++	„	+ o.	1.8	2.3	34.2	7.0	0.20
8.	1%	Lith. alc.	—	unst.	—	1.6	1.9	36.3	7.5	0.20
9.	1%	„	+	st.	—	2.1	2.2	36.5	8.3	0.23
10.	0.1%	Yamada	—	—	—	—	—	—	—	—
Kwas badany w mieszaninie (Values from a mixture of acids) Układ: fenol-woda-kwas mrówkowy (System: phenol-water-formic acid)										
1.	1%	Congo	—	unst.	—	1.6	1.6	35.4	6.3	0.18
2.	1%	Lith. alc.	—	„	—	1.5	1.5	36.4	7.5	0.20
3.	1%	B. ph. b.	+ —	st.	—	2.2	2.5	37.7	8.8	0.23
4.	1%	„	+	„	+ o.	2.4	2.6	35.4	8.1	0.23
5.	1%	„	+	„	+ o.	1.7	2.2	31.6	5.4	0.17
6.	1%	„	+	„	—	2.2	3.1	41.5	10.4	0.25
7.	1%	„	+	„	—	1.6	1.7	36.2	8.5	0.23
8.	1%	„	+	„	—	1.7	1.9	33.3	6.6	0.20
9.	1%	„	++	„	—	1.8	2.6	32.7	5.9	0.18
10.	1%	„	+	„	+ o.	1.6	2.2	34.3	5.9	0.17
11.	1%	„	+	„	—	—	—	—	—	—

Tabela 15.

Kwas MALONOWY ch. cz. (MALONIC Acid c. p.)

Rozpuszczalność (Solubility): 139,4 w 15° C.

Stała dysocjacji (Dissociation Constant): I. $1,40 \cdot 10^{-3}$ (25° C)II. $2,05 \cdot 10^{-6}$ (25° C)

I	II	III	IV	V	VI	a	b	x	y	R _F
Kwas badany indywidualnie (Acid alone)										
Układ: fenol - woda (System: phenol - water)										
1.	2%	Lith. w.	+	st.	—	2.3	4.0	31.6	16.8	0.53
2.	2%	" 0,2%	+	"	—	1.9	4.7	33.9	15.3	0.45
3.	2%	Lith. w.	+	"	—	1.6	3.3	32.6	14.8	0.46
4.	2%	"	++	"	—	2.3	4.7	30.7	15.6	0.50
5.	2%	"	++	"	—	2.7	4.8	30.8	15.8	0.51
6.	2%	B. th. b.	—	unst.	—	2.4	8.0	33.9	14.2	0.42
Układ: fenol - woda - kwas mrówkowy (System: phenol - water - formic acid)										
1.	1%	B. ph. b.		st.	—	2.4	2.4	32.8	17.8	0.54
2.	1%	"		"	—	2.6	3.5	34.8	19.5	0.56
3.	1%	"		"	—	2.4	2.5	35.5	19.1	0.53
4.	1%	Lith. w.		"	—	2.4	2.5	33.3	17.5	0.52
5.	1%	"		unst.	—	1.7	1.7	36.5	19.4	0.53
6.	1%	Yamada		"	—	2.1	2.4	29.7	16.4	0.56
7.	0,5%	"		"	—	1.5	1.8	30.6	16.3	0.53
8.	5%	"		"	—	1.9	5.3	29.6	16.2	0.56
9.	1%	"		"	—	2.3	2.5	34.4	18.6	0.54
10.	1%	B. ph. b.		st.	—	2.5	3.1	34.3	18.7	0.55
11.	1%	Congo		unst.	—	2.1	2.5	34.2	18.6	0.54
12.	1%	B. th. b.		"	—	2.9	3.2	34.1	18.1	0.54
13.	1%	B. ph. b.		st.	—	2.6	2.6	32.3	18.1	0.56
Kwas badany w mieszaninie (Values from a mixture of acids)										
Układ: fenol - woda - kwas mrówkowy (System: phenol - water - formic acid)										
1.	1%	B. ph. b.		st.	—	2.6	2.8	32.7	13.3	0.53
2.	1%	"		"	—	2.2	2.9	33.8	17.0	0.50
3.	1%	Yamada		unst.	—	1.1	1.1	30.6	12.6	0.41
4.	1%	Congo		"	—	1.6	2.0	36.8	19.2	0.52
5.	1%	"		"	—	1.6	2.2	36.7	19.2	0.52
6.	1%	B. ph. b.		st.	—	1.8	2.1	32.9	17.5	0.53
7.	1%	Lith. w.		unst.	—	1.3	1.7	33.0	17.0	0.50
8.	1%	B. ph. b.		st.	—	2.5	2.6	37.3	21.3	0.57
9.	1%	"		"	—	2.5	2.8	31.6	15.5	0.49
10.	1%	Yamada		unst.	—	1.4	1.9	32.4	17.5	0.54
11.	1%	"		"	—	1.8	1.8	32.6	12.5	0.38

Tabela 20.

Kwas PIKRYNOWY ch. cz.

(PICRIC Acid c. p.)

Rozpuszczalność (Solubility): 1,2 w 20°C, 7,2 w 100°C.

Stała dysocjacji (Dissociation Constant): $2 \cdot 10^{-1}$ (18°C)

I	II	III	IV	V	VI	a	b	x	y	R _F
Kwas badany indywidualnie (Acid alone) Układ: fenol-woda (System: phenol-water)										
1.	1%	B. th. b.	+	st.	+++ b.	1.8	4.7	34.6	16.8	0,48
2.	1%	„	+	„	++ b.	1.5	4.7	33.2	16.0	0.50
Układ: fenol-woda-kwas mrówkowy (System: phenol-water-formic acid)										
1.	1%	B. ph. b.	+++	st.	+++ b.	2,6	4,2	33,5	25,2	0,75
2.	1%	„	+++	„	+++ b.	1,8	3,2	35,5	27,4	0,77
3.	1%	„	+++	„	+++ b.	2,1	3,7	32,5	23,9	0,74
4.	1%	„	+++	„	+++ b.	1,8	3,8	34,0	24,8	0,73
5.	1%	„	+++	„	+++ b.	1,9	4,6	34,0	25,4	0,75
6.	1%	Yamada	+	„	++ b.	2,3	3,1	35,8	27,8	0,78
7.	1%	B. ph. b.	+++	„	+++ b.	2,6	4,4	35,1	26,5	0,75
8.	1%	Lith. w.	++	„	+++ b.	2,5	3,5	35,4	26,2	0,74
9.	1%	„	++	„	+++ b.	1,7	6,2	30,6	13,3	0,43
10.	1%	„	+++	„	+++ b.	1,9	6,0	28,5	15,0	0,52
11.	1%	B. ph. b.	+++	„	+++ b.	2,1	3,9	30,2	22,2	0,74
Kwas badany w mieszaninie (Values from a mixture of acids) Układ: fenol-woda-kwas mrówkowy (System: phenol-water-formic acid)										
1.	1%	B. ph. b.	+++	st.	—	2,0	3,2	32,7	22,7	0,70

Tabela 27.

WODOROTLENEK SODU
 Rozpuszczalność (Solubility): 107 w 20° C.
 Stała dysocjacji (Dissociation Constant): 89 (0,1 n).

I	II	III	IV	V	VI	a	b	x	y	R _F
Kwas badany indywidualnie (Acid alone) Układ: fenol - woda (System: phenol - water)										
1.	0,1 n	B. th. b.	++	unst.	—	1.1	3.8	31.8	15.2	0.47
2.	„	„	++	„	—	1.8	3.5	30.2	14.1	0.46
3.	„	„	++	„	—	1.3	4.6	31.5	14.6	0.46
4.	„	„	++	„	—	1.4	5.2	30.8	13.3	0.42
5.	„	„	++	„	—	1.5	4.1	35.0	15.9	0.43
6.	„	„	++	„	—	1.2	4.1	30.5	13.9	0.45

Dyskusja

W przeciwstawieniu do wielu prac z zakresu chromatografii bibułowej aminokwasów i węglowodanów opublikowano zaledwie kilka prac odnoszących się do badania kwasów organicznych przy zastosowaniu tej metody. Autorzy tych prac zetknęli się z wielu niepowodzeniami i trudnościami.

Nasze badania przeprowadziliśmy na 26 kwasach organicznych. Niestety, z powodu braku czystych preparatów nie można było dokonać oznaczeń na wielu interesujących nas kwasach organicznych, jakie odgrywają rolę w pośredniej przemianie materii.

Początkowo zastosowany układ fenol-woda nie dawał zadowalających wyników: otrzymane plamy były wydłużone („tailing“ wg określenia używanego w pracach anglosaskich), co stwarzało niekorzystne warunki przy rozdzielaniu mieszanin kwasów. Dopiero wprowadzenie do tego układu trzeciego składnika, kwasu mrówkowego, cofającego dysocjację innych kwasów organicznych, wpłynęło dodatnio na powstawanie bardziej regularnych kształtów plam. Podczas doświadczeń zachowywano ściśle kontrolowane warunki.

Zauważono, że zmiany temperatury w kamerze chromatograficznej w granicach 20° do 23°C wpływały jedynie na szybkość splywu fazy ruchomej, a nie na wartości R_F.

Przy stosowaniu używanych przez nas wskaźników stwierdzono, że duże znaczenie ma dokładne usuwanie fenolu i kwasu mrówkowego z chromatogramów, gdyż niedostateczne wysuszenie bibuły nie pozwala na prawidłowe wywołanie plam. Pomimo tego, że wysuszanie bibuły doprowadzono do całkowitego usunięcia woni fenolu, tło wywołanych chromatogramów, po ponownym wysuszeniu w prądzie gorącego powietrza, szybko przybierało barwę kwasową odpowiedniego wskaźnika. Jedyne wyjątek stanowił błękit bromofenolowy, przy użyciu którego plamy wywołanych kwasów nie zniknęły na skutek zmiany barwy tła.

W literaturze dotyczącej chromatografii bibułowej spotyka się zwykle metodę wywoływania polegającą na spryskiwaniu chromatogramów przy pomocy rozpylacza roztworem odpowiedniego odczynnika wywołującego. Ponieważ dostępne nam rozpylacze nie odpowiadały stawianym wymaganiom (wylimitowanie części metalowych, małe zużycie roztworu odczynnika wywołującego, uzyskanie zawiesiny jednolitych, drobnitkich kropelek, utrzymanie przez czas dłuższy jednakowego ciśnienia wewnątrz przyrządu rozpylającego itp.), zastosowano metodę wywoływania przez zanurzanie pasków bibuły w dużej płytce Petriego, zawierającej odczynnik wywołujący. Sądzimy, że przy zachowaniu pewnych ostrożności można zmniejszyć do minimum możliwość przesuwania się plam na bibule w czasie wywoływania.

Jak łatwo przewidzieć, rodzaj użytego wskaźnika nie ma żadnego wpływu na wielkość R_F badanego kwasu (patrz tabela Nr 29).

Stwierdzono, że zmiany stężeń badanych kwasów nie wpływają na zmiany wartości R_F tych kwasów w zakresie stężeń 0,5 do 5,0% (tabela Nr 28).

W wymienionych tabelach podano także wymiary osiowe wywołanych plam (kolumna „a” podaje w cm. wymiar plamy w osi równoległej do kierunku spływu rozpuszczalnika, kolumna „b” wymiar plamy w cm. w osi prostopadłej do kierunku spływu rozpuszczalnika). Z danych przytoczonych w tabeli Nr 28 wynika, że trudno jest wyprowadzić ogólną zależność między stężeniem kwasu a wielkością i kształtem jego plamy na chromatogramie, jakkolwiek wielkość plamy jest na ogół proporcjonalna do stężenia kwasu. Wydaje się, iż własności adsorbcyjne bibuły mogą odgrywać tu pewną rolę.

Wyniki naszych doświadczeń przeczą możliwości dokonywania oznaczeń ilościowych kwasów organicznych na podstawie wielkości i natężenia barwy plam. Przy tych samych stężeniach użytych kwasów w układzie fenol-woda plamy są na ogół większe niż w układzie fenol-woda-kwas

mrówkowy. Różnicę w wielkości i kształcie plam różnych kwasów o tych samych stężeniach możnaby w pewnych wypadkach wytłumaczyć mniejszą lub większą hydrofilnością poszczególnych kwasów.

Wyniki otrzymane przy porównywaniu natężenia plam wywołanych błękitem bromofenolowym wykazały, że natężenia plamy nie można rozpatrywać jako prostej funkcji stężenia kwasu i jego stałej dysocjacji. Zagadnienie to ilustruje tabela Nr 30, w której dla określenia natężenia barwy wywoływanych plam posługiwano się znakami: \pm , +, ++, +++. Liczby w odpowiednich kolumnach oznaczają ilość doświadczeń przypadających na dane natężenie plamy.

Prócz wywoływania kwasów przy pomocy wskaźników badano wywołane uprzednio chromatogramy w świetle pozajfioletowym. Jako źródło światła pozajfioletowego służyła lampa rtęciowa analityczna z filtrem Wooda. Próbę tę wprowadzono już po ukończeniu głównej części doświadczeń i z tego powodu, niestety, nie przeprowadzono badań na chromatogramach nie wywołanych wskaźnikami. Zestawienie wyników znajduje się w tabeli Nr 31, gdzie dla oznaczenia stopnia natężenia fluorescencji zachowano to samo znakowanie, jak w tabeli Nr 30. W niektórych wypadkach analiza fluorescencyjna pozwala na dokładniejsze rozpoznanie rozmiarów plamy i co za tym idzie — dokładniejsze oznaczenie R_F .

Wszystkie doświadczenia przeprowadzone przez nas na lotnych kwasach tłuszczowych (mrówkowy, octowy, propionowy) dały ujemne wyniki, to znaczy, że w opisanych warunkach doświadczalnych nie udało się otrzymać plam tych kwasów na chromatogramach.

Wobec tego próbowano chromatografii bibułowej soli sodowych tych kwasów, przy użyciu jako wskaźnika błękitu bromotymolowego, ale wywołane plamy posiadały zabarwienie niebieskie, a wartości R_F dla poszczególnych kwasów nie różniły się od siebie. Wkroplenie roztworu wodorotlenku sodowego i wywołanie jego chromatogramu potwierdziło przypuszczenie, że uprzednio uzyskane plamy pochodziły od wodorotlenku sodowego, powstałego wskutek hydrolizy soli sodowych lotnych kwasów tłuszczowych.

Podobnie negatywne wyniki chromatogramów dały próby z kwasem kamforowym, co przypisujemy lotności tego kwasu.

W przypadku halogenowych pochodnych kwasów tłuszczowych — kwasu monochlorooctowego, trójchlorooctowego i jodoctowego — nie udało się jednoznacznie oznaczyć ich wartości R_F .

Wyniki zawarte są w niżej zamieszczonej tabelce.

Układ: fenol - woda

Nazwa kwasu	Ilość doświadczeń		R _F w zakresie	
	dodatnich	ujemnych	od	do
Kwas monochlorooctowy . . .	7	0	0,68	0,82
Kwas trójchlorooctowy . . .	8	0	0,30	0,76
Kwas jodooctowy	5	0	0,70	0,81

Układ: fenol - woda - Kwas mrówkowy

Nazwa kwasu	Ilość doświadczeń		R _F w zakresie	
	dodatnich	ujemnych	od	do
Kwas monochlorooctowy . . .	2	0	0,50	0,60
Kwas trójchlorooctowy . . .	4	0	0,53	0,83
Kwas jodooctowy	1	0	0,59	

Nie udało się również w żadnym doświadczeniu uzyskać plam na chromatogramie kwasu moczowego, co uzasadnia się bardzo małą jego rozpuszczalnością w wodzie, oraz przynależnością do bardzo słabych kwasów.

W stosunku do wszystkich pozostałych badanych przez nas kwasów zastosowywano obliczenia statystyczne w oparciu o krzywą rozkładu Studenta. Do obliczeń odchyłeń standardowych i przedziału ufności (z 95% pewnością) wybierano te wyniki doświadczeń, których rozrzut nie przekraczał średniej wartości R_F. Wyniki niezgodne z przyjętą wyżej zasadą kwalifikowano jako doświadczenia nieudane. Za podstawę do obliczeń statystycznych przyjęto następujące definicje i symbole:

$$\text{Odchylenie wzorcowe} = S_x^2 = \frac{1}{n} \sum_j^n (x_j - \bar{x})^2$$

gdzie n = ostatnia największa wartość, jaką przyjmuje wskaźnik j.

\bar{x} = średnia arytmetyczna zmiennej x (R_F).

$$\text{Przedział ufności} = \mu / x - \frac{t_{P^S}}{\sqrt{n-1}} < \mu < x + \frac{t_{P^S}}{\sqrt{n-1}}$$

P = procentowość przyjęta dla oznaczeń padających poza przedział ufności (0,05)

$$t_p = \frac{\bar{x} - \mu}{S} \sqrt{n-1}$$

Pełne zestawienie wyników obliczeń statystycznych znajduje się w tabeli Nr 32, gdzie kolumna A = ilość wyników uznanych za prawidłowe.

(amount of accepted results).

D = ilość wyników uznanych za nieprawidłowe.

(amount of discrepant results).

N = ilość wyników negatywnych.

(amount of negative results).

S = pierwiastek kwadratowy odchylenia standardowego S^2 .

(square root of standard deviation).

Tabela Nr 33 zawiera porównanie wielkości przedziału ufności dla szeregu kwasów organicznych badanych indywidualnie z wielkością przedziału ufności dla kwasów badanych w mieszaninach.

Jak widać z tej tabeli istnieje wyraźny wpływ wzajemny kwasów w mieszaninach, co uzewnętrznia się w zmianie R_F poszczególnych ich przedstawicieli.

Badane kwasy organiczne można uszeregować według procentowości pozytywnych wyników przypadających na dany kwas:

100% — kwasy: cytrynowy, fumarowy, jabłkowy, malonowy, nikotynowy, pikrynowy.

90% — kwasy: bursztynowy, winowy i sulfosalicylowy.

80% — kwasy: asparaginowy, pyrogronowy i szczawiowy.

70% — kwas glukuronowy.

mniej niż 70% — kwasy: askorbinowy, p-aminobenzoesowy, gallusowy, mlekowy, migdałowy, sulfanilowy.

Przyjęcie wielkości R_F jako cechy charakteryzującej dany związek chemiczny nasuwa potrzebę rozstrzygnięcia zależności współczynnika podziału od budowy związku. Tabela Nr 34 stanowi próbę poszukiwania tej zależności.

Materiał doświadczalny naszej pracy jest zbyt szczupły i zawiera zbyt wiele luk w szeregach homologicznych kwasów, by można było na jego podstawie wyprowadzić daleko idące wnioski, ale jest wystarczający dla wykazania wpływu grup hydroksylowych, karboksylowych, aminowych oraz rodników na wartości R_F . Wydaje się, że przy zebraniu odpowiednio dużego materiału doświadczalnego można byłoby określać wartości R_F na podstawie teoretycznych przesłanek.

Dane zawarte w tabeli Nr 34 wykazują, że w miarę zwiększania się długości łańcucha w szeregu homologicznym kwasów organicznych, zwiększają się również wartości R_F .

Na podstawie porównywania wartości R_F poszczególnych prostych kwasów tłuszczowych, oksykwasów, aminokwasów, kwasów cyklicznych, w oparciu o materiały doświadczalne własne (1) oraz obce, oznaczono teoretyczną wartość R_F dla pierwszego atomu węgla w łańcuchu kwasów tłuszczowych. Wynosi ona $+ 1,23$. Obecność drugiego atomu węgla w łańcuchu alifatycznym zwiększa wartości R_F o $R_F + 0,20$, podczas gdy dla trzeciego i dalszych atomów węgla odpowiednie wartości R_F wynoszą $+ 0,10$.

Przyjmując wyżej podaną teoretyczną wartość R_F dla atomu węgla w łańcuchu można było oznaczyć R_F grup karboksylowych, hydroksylowych i aminowych. Wartości R_F grup karboksylowych zależą od tego, czy w danej cząsteczce kwasu występuje jedna czy więcej grup COOH. Największy wpływ na zmniejszanie się wartości R_F kwasu ma pierwsza grupa COOH: wpływ dalszych grup jest już mniejszy, jak to widać z tabeli.

Wpływ grupy hydroksylowej jest stosunkowo niewielki i wyraża się cyfrą $R_F = - 0,22$ dla każdej grupy OH wprowadzonej do budowy cząsteczki. Niemal ściśle to samo odnosi się do wpływu grupy aminowej.

W związkach cyklicznych obliczona przez nas teoretyczna wartość R_F dla pierścienia benzenowego wynosi $+ 1,42$. Wpływ grupy karboksylowej w związkach cyklicznych wyraża się stale tą samą liczbą niezależnie od jej położenia przy pierścieniu benzenowym. Grupa OH wywiera wpływ na R_F kwasu tylko wtedy, kiedy znajduje się w bezpośrednim związku z atomem węgla pierścienia benzenowego. Grupa hydroksylowa w łańcuchu bocznym kwasów cyklicznych nie wywiera żadnego wpływu na wartość R_F tego kwasu. To samo dotyczy grupy aminowej w pierścieniu bocznym.

Dość znaczne jest R_F grupy sulfonowej, jeżeli związana jest z atomami węgla pierścienia benzenowego. Natomiast mały wpływ na wartości R_F posiadają grupy NO_2 , jak to wynika z przykładu kwasu pikrynowego.

Od wyżej wymienionych reguł istnieją pewne odstępstwa. I tak np. trudno wytłumaczyć dlaczego według Consdena, Gordona i Martina R_F kwasu asparaginowego wynosi $0,19$.

Należy podkreślić, że przy obliczeniu teoretycznych wartości R_F uwzględnia się wszystkie atomy węgla zawarte w danej cząsteczce (łącznie z atomem C grupy COOH), nie uwzględnia się natomiast atomów wodoru zawartych w łańcuchach alifatycznych lub pierścieniach cyklicznych.

Tabela 28.

Wartość R_F w zależności od stężenia roztworów.
(Relation between R_F values and concentration of acids).

Stęż. w % Concen. in p. c.	Indykator (Indicator)	a	b	x	y	R_F
Kwas SZCZAWIOWY (OXALIC Acid)						
0,5%	Lithmus	1.9	3.3	34.1	11.5	0.34
1%	„	1.7	2.4	33.9	10.5	0.31
5%	„	1.9	4.3	34.1	10.5	0.31
5%	„	1.8	4.0	34.0	11.6	0.34
0,5%	„	1.9	3.1	35.6	12.3	0.34
1%	„	1.4	1.3	35.8	11.2	0.31
5%	„	2.0	5.6	35.8	10.6	0.30
Kwas JABŁKOWY (MALIC Acid)						
0,5%	Yamada's	1.7	2.3	32.5	14.2	0.43
1%	„	1.9	2.8	32.7	14.5	0.44
5%	„	2.2	3.0	32.7	14.1	0.44
Kwas MLEKOWY (LACTIC Acid)						
0,5%	Yamada's	1.2	1.8	37.2	29.9	0.80
1%	„	1.8	2.2	37.3	29.7	0.82
5%	„	3.9	4.9	37.3	30.1	0.81
1%	„	1.9	2.4	36.4	28.7	0.78
5%	„	2.1	3.6	36.4	28.7	0.78
5%	„	2.0	3.2	36.3	28.6	0.78
Kwas CYTRYNOWY (CITRIC Acid)						
0,5%	Yamada's	1.5	2.2	32.3	8.5	0.26
1%	„	2.0	2.7	32.1	8.2	0.25
5%	„	2.7	3.2	32.1	9.3	0.29

Tabela 29.Wartość R_F w zależności od rodzaju użytego indykatora.(Relation of R_F values and indicators used).

Stęż. w % Concen. in p. c.	Indykator (Indicator)	a	b	x	y	R_F
Kwas BURSZTYNOWY (SUCCINIC Acid)						
1%	Congo	2.2	2.3	34.0	22.8	0.67
1%	B. ph. b.	2.0	3.1	35.4	24.1	0.67
1%	Lithmus	1.6	2.1	36.5	24.9	0.68
1%	Yamada	2.2	2.9	34.4	23.7	0.68
1%	B. th. b.	3	3.2	33.8	23	0.68
Kwas MALONOWY (MALONIC Acid)						
1%	Congo	2.1	2.5	34.2	18.6	0.54
1%	B. ph. b.	2.4	2.5	35.5	19.1	0.53
1%	B. th. b.	2.9	3.2	34.1	18.1	0.54
1%	Yamada	2.3	2.5	34.4	18.6	0.54
1%	Lithmus	1.7	1.7	36.5	19.4	0.53
Kwas CYTRYNOWY (CITRIC Acid)						
1%	Congo	1.8	2.3	34.1	9.1	0.26
1%	B. ph. b.	2.2	3.2	35	8.5	0.24
1%	Lithmus	1.5	1.3	36.5	9.7	0.26
1%	Yamada	1.9	1.9	34.4	9.3	0.26
1%	B. th. b.	2.4	2.7	34.3	9.3	0.27
Kwas JABŁKOWY (MALIC Acid)						
1%	Congo	2	2.5	34.1	15.3	0.45
1%	B. pb. b.	2.4	3.0	35	15.3	0.45
1%	B. th. b.	2.3	3.0	34.6	14.7	0.44
1%	Yamada	2.5	3.1	34.4	15.1	0.44
1%	Lithmus	1.5	1.8	36.2	15.7	0.43

Tabela 30.**Ocena intensywności plamy.**

(Intensity of spots in connection to the kind of acid).

Kwas (Acid)	+++	++	+	±	*) pos/neg
Askorbinowy (Ascorbic)	1	14	2	1	18/23 = 0.78
p-Aminobenzoesowy (p Aminobenzoic)	—	—	3	—	3/18 = 0.17
Asparaginowy (Aspartic)	—	1	15	1	17/29 = 0.58
Bursztynowy (Succinic)	2	6	2	1	11/28 = 0.39
Cytrynowy (Citric)	3	5	7	—	15/25 = 0.60
Fumarowy (Fumaric)	6	5	2	—	13/32 = 0.40
Gallusowy (Tannic)	—	—	5	—	5/14 = 0.35
Glukuronowy (Glucuronic)	—	2	15	1	18/25 = 0.72
Jabłkowy (Malic)	—	5	3	1	9/25 = 0.36
Malonowy (Malonic)	3	8	5	—	16/30 = 0.53
Migdałowy (Mandelic)	—	4	7	6	17/24 = 0.78
Nikotynowy (Nicotinic)	—	—	20	—	20/24 = 0.83
Pikrynowy (Picric)	9	2	3	—	14/14 = 1.0
Pyrogronowy (Pyruvic)	—	—	8	2	10/22 = 0.45
Sulfanilowy (Sulfanilic)	—	1	7	1	9/18 = 0.50
Sulfosalicylowy (Sulfosalicylic) . . .	—	4	14	3	21/29 = 0.72
Szczawiowy (Oxalic)	2	3	10	6	21/32 = 0.65
Winowy (Tartaric)	—	14	8	—	22/32 = 0.69
Mlekowy (Lactic)	—	1	10	—	10/37 = 0.27

$$*) \text{ pos/neg} = \frac{\text{ilość wyników dodatnich}}{\text{ilość wyników ujemnych}} \quad \frac{(\text{number of positive results})}{(\text{number of negative results})}$$

U w a g a: wszystkie kwasy użyte były w stężeniu 1%. Jako wskaźnika używano błękitu bromofenolowego.

Remark: all acids were used in concentration of 1 per cent.
Indicator: bromophenol blue.

Tabela 31.
Fluorescencja badanych kwasów.
 (Fluorescence of examined acids).

Kwas (Acid)	+++	++	+	±	*) pos/neg
p-Aminobenzoesowy (p-Aminobenzoic)	—	—	5	3	8/18 = 0.44
Askorbinowy (Ascorbic)	—	4	15	1	20/23 = 0.87
Asparaginowy (Aspartic)	—	—	11	5	16/29 = 0.55
Bursztynowy (Succinic)	—	—	6	1	7/28 = 0.25
Cytrynowy (Citric)	—	1	5	6	15/25 = 0.60
Glukuronowy (Glucuronic)	2	2	7	4	15/25 = 0.60
Jabłkowy (Malic)	—	1	4	1	6/25 = 0.24
Fumarowy (Fumaric)	—	1	8	1	10/32 = 0.31
Gallusowy (Tannic)	—	—	3	1	4/14 = 0.29
Malonowy (Malonic)	—	5	5	1	11/30 = 0.36
Migdałowy (Mandelic)	—	4	6	1	11/24 = 0.45
Nikotynowy (Nicotinic)	—	—	9	2	11/24 = 0.45
Pikrynowy (Picric)	11	3	—	—	14/14 = 1.0
Pyrogronowy (Pyruvic)	—	—	5	3	8/22 = 0.36
Sulfanilowy (Sulfanilic)	—	1	5	6	12/18 = 0.66
Sulfosalicylowy (Sulfosalicylic)	—	4	13	2	19/29 = 0.65
Szczawiowy (Oxalic)	—	—	12	2	14/32 = 0.43
Salicylowy (Salicylic)	—	—	3	2	5/8 = 0.62
Mlekowy (Lactic)	—	—	3	1	4/37 = 0.10
Winowy (Tartaric)	—	—	11	2	13/32 = 0.40

$$*) \text{ pos/neg} = \frac{\text{ilość wyników dodatnich}}{\text{ilość wyników ujemnych}} \quad \frac{(\text{number of positive results})}{(\text{number of negative results})}$$

U w a g a: badania w świetle pozafioletowym przeprowadzono po uprzednim wywołaniu chromatogramów wskaźnikiem.

Remark: all acids were examined in the ultraviolet light after the spots of the acids has been revealed.

Tabela 32a.

Kwasy organiczne badane pojedynczo.
(Organic acid examined separately).

Kwas (Acid)	A	D	N	Średnia wart. R _F (Mean of R _F values)	S	Przedział ufności (Confidence Interval)
p-Aminobenzoesowy (p-Aminobenzoic)	10	5	—	0.868	0.0075	0.857—0.878
Askorbinowy (Ascorbic)	29	14	2	0.461	0.0227	0.447—0.475
Asparaginowy (Aspartic)	13	2	—	0.361	0.0378	0.341—0.381
Benzoesowy (Benzoic)	13	7	2	0.865	0.015	0.834—0.891
Cytrynowy (Citric)	13	—	—	0.263	0.0189	0.251—0.275
Fumarowy (Fumaric)	8	—	—	0.639	0.0117	0.629—0.649
Glukuronowy (Glucuronic)	11	2	—	0.217	0.002	0.216—0.217
Mlekowy (Lactic)	21	10	3	0.795	0.0165	0.780—0.809
Jabłkowy (Malic)	17	—	2	0.434	0.0203	0.423—0.445
Malonowy (Malonic)	13	—	—	0.542	0.0135	0.534—0.550
Migdałowy (Mandelic)	15	1	—	0.857	0.0166	0.847—0.856
Nikotynowy (Nicotinic)	11	—	—	0.894	0.0195	0.880—0.888
Szczawiowy*(Oxalic)	16	2	2	0.333	0.0024	0.332—0.334
Pikrynowy (Picric)	11	—	2	0.750	0.0149	0.738—0.762
Salicylowy (Salicylic)	7	5	—	—	—	—
Sulfosalicylowy (Sulfosalicylic)	19	1	2	0.257	0.0325	0.238—0.285
Galusowy (Tannic)	11	—	5	0.188	0.0157	0.170—0.205
Winowy (Tartaric)	14	1	3	0.210	0.0265	0.190—0.230
Pyrogronowy (Pyruvic)	11	2	—	0.348	0.0700	0.291—0.405

Tabela 32b.

Kwasy organiczne badane w mieszaninie.

(Organic acids examined in mixture).

Kwas (Acid)	A	D	N	Srednia wart. R _F (Mean of R _F values)	S	Przedział ufności Confidence Interval
p-Aminobenzoesowy (p-Aminobenzoic)	4	3	—	—	—	—
Askorbinowy (Ascorbic)	4	—	—	0.425	0.032	0.409—0.450
Asparaginowy (Aspartic)	11	—	—	0.333	0.0563	0.293—0.373
Benzoesowy (Benzoic)	2	—	—	—	—	—
Cytrynowy (Citric)	10	3	—	0.257	0.0357	0.221—0.293
Fumarowy (Fumaric)	13	1	—	0.632	0.0185	0.610—0.644
Glukuronowy (Glucuronic)	10	—	—	0.204	0.0276	0.184—0.224
Mlekowy (Lactic)	24	16	1	0.783	0.0210	0.782—0.812
Jabłkowy (Malic)	5	1	—	0.410	0.0107	0.374—0.441
Malonowy (Malonic)	11	—	2	0.522	0.0277	0.504—0.540
Migdałowy (Mandelic)	7	2	—	0.844	0.0300	0.802—0.885
Nikotynowy (Nicotinic)	9	1	—	0.872	0.0185	0.313—0.369
Pikrynowy (Picric)	1	—	—	—	—	—
Szczawiowy (Oxalic)	19	7	3	0.341	0.0321	0.313—0.369
Salicylowy (Salicylic)	3	—	—	—	—	—
Sulfosalicylowy (Sulfosalicylic)	6	1	—	0.226	0.0338	0.179—0.293
Galusowy (Tannic)	3	1	—	—	—	—
Winowy (Tartaric)	15	1	1	0.190	0.0372	0.167—0.213
Pyrogronowy (Pyruvic)	10	4	—	0.318	0.0463	0.175—0.381

Tabela 33.

Rozpiętość przedziału ufności.

(The amplitude of the confidence interval).

< 0,01	< 0,02	< 0,03	< 0,04	< 0,05	< 0,06	> 0,1
I. Dla kwasów badanych indywidualnie (for the acids examined separately).						
Glukuronowy (Glucuronic)	Bursztynowy (Succinic)	p-Aminobenzoesowy (p-Aminobenzoic)	Gallusowy (Tannic)	Winowy (Tartaric)	Benzoesowy (Benzoic)	Pyrogro- nowy (Pyruvic)
Pikrynowy (Picric)	Malonowy (Malonic)	Cytrynowy (Citric)		Sulfosalicylowy (Sulfosalicylic)		
Szczawiowy (Oxalic)	Migdałowy (Mandelic)	Fumarowy (Fumaric)		Asparaginowy (Aspartic)		
		Mlekowy (Lactic)				
		Nikotynowy (Nicotinic)				
		Sulfanilowy (Sulfanilic)				
		Askorbinowy (Ascorbic)				
		Jabłkowy (Malic)				
II. dla kwasów w mieszaninach (for the acids examined in mixtures).						
Askorbinowy (Ascorbic)		Bursztynowy (Succinic)	Fumarowy (Fumaric)	Glukuronowy (Glucuronic)	Asparaginowy (Aspartic)	Pyrogro- nowy (Pyruvic)
		Mlekowy (Lactic)		Winowy (Tartaric)	Cytrynowy (Citric)	Sulfosalicy- lowy (Sulfosa- licylic)
		Nikotynowy (Nicotinic)			Jabłkowy (Malic)	
					Malonowy (Malonic)	
					Migdałowy (Mandelic)	

Tabela 34.

1. ΔR_F (C) I = + 1,23 dla pierwszego atomu C w łańcuchu alifatycznym,
(for the first C-atom of aliphatic chain).
- ΔR_F (C) II = + 0,20 dla drugiego atomu C w łańcuchu alifatycznym,
(for the second C-atom of aliphatic chain).
- ΔR_F (C) III = + 0,10 dla następnych atomów C w łańcuchu alifatycznym,
(for the further C-atoms of aliphatic chain).
2. ΔR_F (COOH) I = + 0,55 dla pierwszej grupy COOH,
(for the first COOH-group).
- ΔR_F (COOH) II = - 0,45 dla drugiej grupy COOH,
(for the second COOH-group).
- ΔR_F (COOH) III = - 0,25 do - 0,30 dla dalszych grup COOH,
(for the further COOH-groups).
3. ΔR_F (OH) = - 0,22 w kwasach alifatycznych,
(in the aliphatic acids).
4. ΔR_F (NH₂) = - 0,27 w kwasach alifatycznych,
(in the aliphatic acids).
5. ΔR_F (pierścienia
benzenowego)
(benzen ring) = + 1,42.
6. ΔR_F (COOH) cykl. = - 0,55 ta sama wartość dla wszelkich położeń,
(the same value in all positions).
7. ΔR_F (OH) cykl. = - 0,22 tylko przy bezpośrednim związaniu z atomem węgla
pierścienia benzenu,
(if attached to any atom of carbon of the benzen
ring).
8. ΔR_F (OH) cykl. = \pm 0,00 jeżeli znajduje się w łańcuchu bocznym,
(if present in a side-chain).
9. ΔR_F (NO₂) cykl. = - 0,15 w przypadku kwasu pikrynowego,
(in the case of picric acid).
10. ΔR_F (SO₃H) cykl. = - 0,48 jeżeli jest przyłączona do pierścienia benzenowego,
(if attached to benzen ring).
11. ΔR_F (N lub NH
lub NH₂) cykl. = \pm 0,00 niezależnie od tego, czy występuje w pierścieniu,
czy w łańcuchu bocznym,
(irrespectively whether present in the ring or in the
side-chain).

Przykład 1:

Obliczenie teoretyczne R_F dla kwasu mlekowego.

Wzór kwasu mlekowego:



ze względu na obecność 3 atomów węgla otrzymujemy	1,23
	0,20
	0,10
	+ 1,53
ze względu na obecność grupy COOH	— 0,55
	0,98
ze względu na obecność grupy OH	— 0,22
a zatem teoretyczna wartość $R_F =$	+ 0,76
podczas gdy wartość znaleziona doświadczalnie wynosi	0,79.

Przykład 2:

Obliczenie teoretycznego R_F kwasu bursztynowego.

Wzór: $\text{COOH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH}$.

Ilość atomów węgla : 4.

Ilość grup karboksylowych : 2.

$$\begin{aligned} \text{Obliczenie: } 1,23 + 0,20 + 0,10 + 0,10 &= + 1,63 \\ &\quad - (0,55 + 0,45) = - 1,00 \end{aligned}$$

$$\text{teoretyczna wartość } R \text{ kw. bursztynowego} = 0,63$$

$$\text{doświadczalna „ „ „ „} = 0,67$$

Przykład 3:

Obliczenie teoretycznej wartości R kwasu nikotynowego.

Wzór: $\text{C}_5\text{N}-\text{COOH}$.

Ilość pierścieni benzenowych (ze względu na to, że atom azotu w pierścieniu nie odgrywa żadnej roli w obliczeniach, traktuje się pierścień pirydynowy jak benzenowy) : 1.

Ilość grup karboksylowych : 1.

Obliczenie: $1,42 + (-0,55) = 0,87$, podczas gdy wartość R_F kwasu nikotynowego obliczona doświadczalnie wynosi 0,89.

PIŚMIENNICTWO

1. Boldingh J. — *Experientia* 4, 270, 1948.
 2. Cavallini D., Frontali N. i Toschi G. — *Nature*, 163, 568, 1949.
 3. Consden R., Gordon A. H. i Martin A. J. P. — *Biochem. J.*, 38, 224, 1944.
 4. Elsdon S. R. — *Biochem. J.*, 40, 252, 1946.
 5. Fink K. i Fink R. M. — *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 70/4, 654–656. Utica, 1949.
 6. Isherwood F. A. — *Biochem. J.* 40, 688, 1946.
 7. Isherwood F. A. — *Nature*, 164, 1107, 1949.
 8. Lester Smith E. — *Biochem. J.*, 36, 1942.
 9. Lugg J. W. H. i Overell B. T. — *Nature*, 160, 87, 1947.
 10. Martin A. J. P. i Synge R. L.M. — *Biochem. J.*, 35, 1358, 1941.
 11. Williams R. T. i Synge R. L. M. — „Partition Chromatography“, *Biochemical Society Symposia No. 3*. Cambridge, 1949.
-

РЕЗЮМЕ

1. Описан метод разделения некоторых органических кислот методом распределительной хроматографии на фильтровальной бумаге. Найдено значение R_F для ряда отдельно исследованных чистых кислот, а также для тех же кислот, исследованных в смесях.
2. Исследования проводились в следующих экспериментальных условиях:
 - а) система растворителей:
 - в начальных опытах — фенол насыщенный водой как подвижная фаза
 - вода насыщенная фенолом как неподвижная фаза;
 - б) фильтровальная бумага Ватмана № 1 как „опора“ для неподвижной фазы;
 - в) концентрация растворов наносимых каплями на фильтровальную бумагу равнялась в большинстве опытов 1% (вес, объем), но в несколько специально приготовленных опытах она колебалась от 0,5 до 5,0%;
 - г) объем выпущенной из микропипеты капли постоянно равнялся 10 микрометрам. Растворы кислот наносились всегда в количестве одной капли;
 - д) время стечения подвижной фазы системы растворителей равнялось в температуре 20—23° С около 24 часам.
 - е) хроматограмму, после извлечения из камеры, сушили в температуре 110° С в течение 15 минут, или в комнатной температуре (20—23° С в течение 24 часов, или же применяли оба способа вместе;
 - ж) пользовались следующими индикаторами:
 - 0,4% спиртовым раствором бромфеноловой сини (в большинстве опытов),
 - 0,4% спиртовым раствором бромтимоновой сини;
 - 0,5% водным раствором лакмуса;
 - 0,5% водным раствором конгокрасный;
 - универсальным индикатором Ямада;
 - з) хроматограммы, после их проявления индикатором сушили в горячем воздухе (полученные пятна кислот были очерчены еще в сыром состоянии).
3. Исследовано следующие органические кислоты:
 - а) муравьиная, уксусная и пропионовая;

- б) однохлоруксусная, трихлоруксусная и подхлоруксусная;
- в) щавелевая, малоновая, янтарная, фумаровая, пировиноградная, (собственно пировиноградный натр), молочная, лимонная, яблочная, винная, аскорбиновая, глюкуроновая, аспарагиновая и мочева;
- г) бензойная, салициловая, сульфаниловая, сульфосалициловая, парааминбензойная, галлусовая, миндальная, никотиновая, и каморная.
4. В описанных экспериментальных условиях не удалось обнаружить на хроматограммах пятен летучих жирных кислот (муравьиной, уксусной и пропионовой), а также камфорной кислоты, вследствие летучести этих кислот).⁴
5. Не удалось установить окончательно значения R_F для ряда производных галогеновых уксусной кислоты из за значительно различных между собой результатов, колеблющихся от одного опыта до другого.
6. Некоторые кислоты были обнаружены как пятна на хроматограммах лишь в около 50% случаев. К этим кислотам принадлежат: бензойная, салициловая, парааминобензойная, галлусовая, аскорбиновая и молочная.
В опытах с мочевой кислотой никогда не обнаружено ее пятен на хроматограммах.
7. Параллельно проведенные исследования с кислотами: щавелевой, малоновой, молочной, лимонной в пределах концентрации от 0,5% до 5,0% показали, что значения R_F не зависят от концентрации (см. таб. № 29), хотя по мере того, как растет концентрация испытуемой кислоты, увеличивается также поле проявленного пятна. Нужно однако отметить, что величина (поле) пятна, и также интенсивность цвета пятна не являются по видимому простой функцией концентрации кислоты ни ее постоянной диссоциации.
В ряде случаев отмечено, что некоторые кислоты обладают постоянной тенденцией образовать большие пятна или пятна со значительной интенсивностью цвета.
Несомненно, здесь играет роль специфическая химическая структура молекулы.
8. Наиболее удовлетворительные результаты были получены при применении, для проявления пятен, бромфеноловой сини в качестве индикатора, так как, несмотря на несколько меньшую ее чувствительность по сравнению с бромтимоновой синью, проявленные бромфеноловой синью были устойчивы.

9. Не было замечено, чтобы проявление алкогольными растворами индикаторов влияло на изменение расположения пятен на хроматограммах.
10. Кроме индикаторов, для обозначения R_F применялся ультрафиолетовый свет (источником света была ртутная аналитическая лампа с фильтром Вуда).
11. Установлено, что R_F кислот, исследованных в разных смесях, в основном не отличалось от R_F тех же кислот, исследованных отдельно.
В 50% опытов не удалось отделить щавелевой кислоты от молочной.
12. Среднее значения R_F найдено статистически, принимая размещение изменчивости по кривой Студента и учитывая 95%—ный раздел доверия.
На основании стандартных отклонений можно разделить значения ΔR_F испытанных кислот по следующим группам:
 - а) $S > 0,01$ имеют кислоты:
парааминобензойная,
миндальная,
янтарная,
глюкуроновая.
 - б) $0,01 < S < 0,02$ имеют кислоты:
фумаровая,
малоновая,
молочная,
лимонная,
никотиновая,
галловая,
пикриновая,
бензойная.
 - в) $0,02 < S < 0,05$ имеют кислоты:
аскорбиновая,
яблочная,
аспарагиновая,
щавелевая,
винная,
сульфаниловая,
сульфасалициловая.
 - г) $S > 0,05$ найдено для салициловой кислоты.
13. Была сделана попытка найти числовую зависимость между значениями R_F и химической структурой родников и основных групп. Таким образом найдено приблизительно значения ΔR_F для ряда химических групп.

S U M M A R Y

1. The technique of the partition paper chromatography of some of the organic acids has been described.
2. The following organic acids were investigated:
formic, acetic, propionic,
monochloroacetic, trichloroacetic, iodoacetic,
oxalic, malonic, succinic, fumaric, pyruvic (sodium salt),
lactic, citric, malic, tartaric, ascorbic, uric, aspartic,
p-aminobenzoic, benzoic, salicylic, sulfanilic, sulfosalicylic,
nicotinic, mandelic, camphoric, picric and tannic acids.
A number of the experiments has been conducted on the chemically pure organic acids as well as on the mixtures of the same organic acids as their R_f values have been determined.
3. The experiments were performed under following conditions:
 - a) The following system of the solvents were used:
at the beginning of investigations — phenol — water
in the main part of investigations — phenol — water — formic acid.
 - b) Whatman's filter paper No. 1 as an inert support for the stationary phase of the solvent system.
 - c) The solutions of the acids had a concentration of 1 per cent (w/v) as a rule. In several experiments the concentrations of the solutions were 0,5—5,0 per cent.
 - d) The acids were used in an amount of 1 drop. A volumen of the delivered drop was always 10 microliters.
 - e) The chromatograms were developed for 24 hours at room temperature 20° — 23° C.
 - f) The developed chromatograms were dried for 15 min. in a thermostat at 105° C and at a room temperature for 24 hours or only by one of these ways.
 - g) Following indicators have been employed in order to detect positions of the acids:
0,04 per cent alcoholic solution of bromophenol blue,
(in main part of the experiments),
0,04 per cent alcoholic solution of bromthymol blue,
0,5 per cent aqueous solution of lithmus,

0,5 per cent aqueous solution of Congo red,

Yamada's universal indicator.

5. The efforts to detect some volatile organic acids (formic, acetic, propionic, and camphoric) under described experimental conditions did not succeed.
6. It has been stated that R_F values of halogen derivatives of acetic acid (monochloroacetic, trichloroacetic and iodoacetic) were irregular and varied greatly from experiment to experiment.
7. Spots of some acids such as p-aminobenzoic, benzoic, salicylic, lactic, ascorbic and tannic were revealed only in ca. 50 per cent of performed experiments. It was not possible to detect the spots of the uric acid (probably due to its insolubility in water).
8. The parallelly performed experiments on the solutions of the oxalic, lactic, citric, malonic acids in the concentration range of 0,5—5,0 per cent (w/v) indicated that R_F values are independent of concentration in this range. (See table Nr 28). It is clear that with the increase in the acid concentration there is also an increase in the spot surface. However, the spot size as well as its colour intensity do not seem to be a simple function either of the acid concentration or of its dissociation constant. In a number of experiments it has been observed that certain acids possess a stable tendency to form very large or intensively coloured spots. It is quite doubtless that this phenomenon is due to the specific chemical structure of the molecules.
9. The best results have been obtained with bromphenol blue as indicator: the spots on paper were more stable than with bromthymol blue, although the latter was found to be of higher sensibility.
10. The R_F values were not influenced by the use of alcoholic solutions of the indicators.
11. It was shown that R_F values of acids in the mixture did not differ from those of the same acids separately examined. In spite of efforts the separation of oxalic and lactic acid in the described experimental conditions proved to be unsuccessful.
12. Besides indicators the positions of the acids were detected in the ultraviolet light from fluorescent spots on the coloured (due to the indicator used) background.
13. The statistical methods have been employed to calculate the mean R_F values, the standard deviation and the range of the 95% confidence interval.

The values of the standard deviation (S) of the investigated organic acids may be divided into four classes.

- a) $S > 0,01$,
p-aminobenzoic, glucuronic, mandelic and succinic acid,
 - b) $0,01 < S < 0,02$,
benzoic, citric, fumaric, lactic, malonic, nicotinic, picric and tannic acid,
 - c) $0,02 < S < 0,05$,
ascorbic, aspartic, malic, oxalic, pyruvic, sulfanilic, sulfosalicylic and tartaric acid,
 - d) $S > 0,05$,
salicylic acid.
14. An attempt was made to calculate the theoretical R_F values of several chemical groups, such as CH_2 , OH , NH_2 , COOH etc., from a comparison of R_F values of a number of organic acids. The R_F values found have been expressed in terms of ΔR_F . ΔR_F — a difference in the R_F values between two acids that results from incorporation of a given group to one of them).
-

