



**URZĄD
PATENTOWY
PRL**

Patent dodatkowy
do patentu nr ———

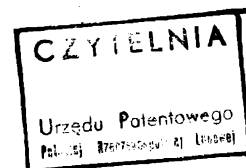
Int. Cl.³ G01N 31/08
G01N 21/78

Zgłoszono: 80 04 28 (P. 223839)

Pierwszeństwo ———

Zgłoszenie ogłoszono: 81 10 30

Opis patentowy opublikowano: 1985 11 30



Twórcy wynalazku: Barbara Iwanicka, Zbigniew Makles, Zdzisław Filipowicz,
Mieczysław Sokołowski

Uprawniony z patentu: Wojskowy Instytut Chemii i Radiometrii,
Warszawa (Polska)

Sposób polowy analizy skażeń środowiska nieorganicznymi i organicznymi substancjami trującymi

Przedmiotem wynalazku jest sposób polowy analizy skażeń środowiska nieorganicznymi i organicznymi substancjami trującymi. Substancjami trującymi mogą być toksyczne środki przemysłowe w rodzaju pestycydów, petrochemikalii, kationów metali, alkaloidów, bojowych środków trujących. Badanymi materiałami mogą być: gleba, woda, powietrze, artykuły żywnościowe, odzież, ścieki przemysłowe, płyny ustrojowe.

Stosowany dotychczas sposób analizy substancji trujących w warunkach polowych jest oparty na konwencjonalnej technice analizy systematycznej, w której analizowane składniki zostają wykryte po przeprowadzeniu szeregu reakcji specyficznych dla poszczególnych indywiduów. Taki sposób postępowania jest pracochłonny, wymaga dużej ilości materiału próbki, stosowania wielu operacji analitycznych i odczynników.

Identyfikacja konwencjonalna techniką chromatografii cienkowarstwowej jest również nieprzydatna. Podstawą tej metody analitycznej jest wyznaczanie wartości R_F , które wymaga zachowania stałych własności fizykochemicznych fazy stacjonarnej i ruchomej oraz zachowania stałej temperatury otoczenia w czasie wykonywania analizy, a zachowanie takich wymogów jest niemożliwe w warunkach polowych.

Sposób według wynalazku polega na tym, że uzyskane z materiałów próbki drogą ekstrakcji roztwory wieloskładnikowe nanosi się każdy na oddzielną płytkę do chromatografii cienkowarstwowej w kilka punktów startowych na każdej płytce i rozwija chromatogramy wzdłuż oddzielnych torów fazami ruchomymi dostosowanymi do rodzaju grupy skażenia, po czym na jednej i tej samej rozwiniętej płytce przeprowadza się reakcje charakterystyczne na oddzielnych torach dla wszystkich możliwych składników grupy skażenia i identyfikuje poszczególne indywidua w kolejnych opryskach na podstawie różnicy w ich reaktywnościach z zadanymi odczynnikami i porównaniu wytworzonych barwnych plam z barwnymi wzorcami.

Istota sposobu polega na rozwinięciu chromatogramu jednego wieloskładnikowego ekstraktu z badanej próbki na jednej płytce chromatograficznej jedną fazą ruchomą i zidentyfikowaniu poszczególnych indywiduów na drodze reakcji charakterystycznych dla tych indywiduów na tej

samej płytce. Rozwijanie chromatogramu ma na celu rozdzielanie poszczególnych składników tak, aby tworzyły oddzielne skupiska na płytce wzdłuż drogi migracji fazy ruchomej. Uzyskuje się również oddzielenie różnych domieszek zawartych w próbce, które nie oddzielone wprowadzałyby zakłócenia przy identyfikacji poszukiwanych związków.

Jako fazę ruchomą stosuje się rozpuszczalnik dostosowany do rodzaju badanego skażenia. Tak więc w przypadku próbki zawierającej toksyczne kationy stosuje się na przykład chloroform, a przy badaniu materiału na skażenie bojowymi środkami trującymi stosuje się na przykład mieszaninę czterochlorku węgla z acetonem.

Identyfikację poszczególnych indywiduów uzyskuje się przez wykonanie kilku charakterystycznych reakcji chemicznych dla badanej grupy związków. Uwidocznienie i rozróżnienie produktów reakcji następuje na podstawie różnic w zabarwieniu wytworzonych plam. Te same lub różne odczynniki stosuje się w różnych sekwencjach zależnie od ich reaktywności z poszczególnymi składnikami badanej mieszaniny. Kolejność stosowanych odczynników odpowiada dozowaniu kilku odczynników do przeprowadzenia jednej reakcji barwnej, bądź powoduje powstawanie produktów w kilku kolejnych reakcjach, co przejawia się zmianą barw lub zanikaniem plam zabarwionych. Różnice w reaktywności rozpoznaje się przede wszystkim z różnicy w zabarwieniu plam, a także z różnicy szybkości ich powstawania. Ale również podstawą rozróżnienia poszczególnych indywiduów jest miejsce powstawania charakterystycznie zabarwionych plam oraz także ich kształt na płytce chromatograficznej.

Do wykonania analizy sposobem według wynalazku służy połowy zestaw analityczny, który zawiera niezbędne ilości potrzebnych rozpuszczalników, odczynników oraz szkło i sprzęt pomocniczy do sporządzania ekstraktów. Materiały chromatograficzne zawarte w zestawie analitycznym stanowią: gotowe płytki chromatograficzne, porcjowane odczynniki, komory chromatograficzne małej objętości, mikropipetki, mikrostrzykawki. Zestaw analityczny można kompletować z przeznaczeniem do analiz jednej grupy substancji trujących lub kilku grup związków. Można również kompletować zestaw analityczny do badania określonego rodzaju próbek na przykład wody, artykułu żywnościowego lub ścieku.

Zaletę sposobu według wynalazku stanowi możliwość wykrycia w jednej analizie — lub stwierdzenia nieobecności — związków tworzących określoną grupę w liczbie od kilku do kilkunastu indywiduów.

Sposób eliminuje przy tym wady charakterystyczne dla klasycznych metod analizy w roztworach. Na przykład wpływ rodzaju ekstrahenta na przebieg reakcji detekcyjnej oraz maskowanie produktów tych reakcji przez zanieczyszczenia wyekstrahowane z próbki. Uzyskuje się także korzyści bardzo istotne w pracy w warunkach polowych, ponieważ operuje się niewielkimi ilościami badanego materiału, zużywa niewiele i w niewielkich ilościach odczynników. Ponadto sposób wykonania analizy jest łatwy, trwa krótko i nie wymaga zaplecza laboratoryjnego.

Sposób według wynalazku przedstawiono w przykładach wykonania.

Przykład I. Wykrywanie alkaloidów w próbce oranżady.

200 cm³ oranżady doprowadza się do pH > 10 dozując kroplami 0,5 M roztwór Na₂CO₃ i sprawdzając odczyn papierkiem uniwersalnym, po czym ekstrahuje trzykrotnie chloroformem stosując każdorazowo po 5 cm³ rozpuszczalnika. Ekstrakt zatęża się przez odparowanie do objętości 0,1–0,2 cm³. Na gotową płytkę chromatograficzną pokrytą żelalem krzemionkowym na podłożu z folii nanosi się w 2 punkty startowe po 20 mm³ zatężonego ekstraktu.

Płytkę rozwija się fazą ruchomą aceton-etanol 1 : 4, w której rozpuszcza się uprzednio sól — azotan amonowy w takiej ilości, aby stężenie soli wynosiło 0,25 mg/cm³ roztworu. Wystarczy rozwinięcie płytki na drodze 7 cm.

Płytkę wyjmuje się z komory i rozcina na dwa osobne chromatogramy.

Pierwszy chromatogram spryskuje się 20% roztworem p-dwumetyloaminobenzaldehydu w stężonym kwasie siarkowym. W dolnej części chromatogramu pojawiają się plamy: pomarańczowa nad startem, wyżej żółto-pomarańczowa, nad nią czerwono-pomarańczowa i nad nimi czerwona. Obrysowuje się ołówkiem kontury plamek i ogrzewa chromatografem w 110°C. Plama czerwona przechodzi w oliwkową wskazując na obecność kodeiny. Plama czerwono-pomarańczowa zmienia się również w oliwkową wskazując na obecność morfiny. Plama żółto-pomarańczowa staje się zielona wskazując na narceinę. Pomarańczowa plama nad punktem startowym zmienia się na żółtą

wskazując na brucynę. Nad plamką brucyny pojawia się pomarańczowa plama wskazująca na obecność strychniny.

Ten sam chromatogram spryskuje się 1%-owym roztworem siarczanu cerowego w kwasie siarkowym. W górnej części chromatogramu pojawia się fioletowo-brunatna plama wskazująca na apomorfinę. Plama narceiny pozostaje zielona, plama strychniny staje się czerwono-pomarańczowa, a plama brucyny pomarańczowo-żółta. Po ogrzaniu chromatogramu w 110°C fioletowo-brunatna plama apomorfiny i zielona narceiny pozostają niezmienione, natomiast plamy strychniny i brucyny stają się żółte.

Następny, odłożony dotąd chromatogram spryskuje się 1% roztworem wodnym kwasu pikrynowego i porównuje z pierwszym chromatogramem. Na wysokości odpowiadającej plamie apomorfiny pojawia się zielona plama potwierdzająca obecność tego alkaloidu. Następnie drugi chromatogram spryskuje się odczynnikiem Marquisa (1% aldehydu mrówkowego w stężonym kwasie siarkowym). Plama apomorfiny przybiera barwę fioletową, również na wysokościach odpowiadających kodeinie i morfinie pojawiają się plamy fioletowe, a na wysokości odpowiadającej brucynie pojawia się plama czerwona. Chromatogram ogrzewa się w 110°C. Plama apomorfiny pozostaje nadal fioletowa, plama kodeiny zabarwia się na granatowo, a plama morfiny na szaro. Na wysokości odpowiadającej narceinie pojawia się plama koloru szarego, a na wysokości odpowiadającej strychninie plama koloru amarantowego. Plama brucyny pozostaje nadal czerwona.

W próbce wykryto: apomorfinę, kodeinę, morfinę, narceinę, strychninę i brucynę.

Przykład II. Wykrywanie środków toksycznych w próbce gleby.

Próbkę gleby (ok. 20 g) ekstrahuje się na lejku Schotta chloroformem do uzyskania 3 cm³ wycieku. Ekstrakt zateża się do objętości 0,1–0,2 cm³ i nanosi na gotową płytkę chromatograficzną z żelem krzemionkowym na podłożu z folii po 20 mm³ tego ekstraktu w 2 punkty startowe. Płytkę umieszcza się w naczyniu wysyconym parami metanolu (np. w słoiku wyścielonym zwilżoną metanolem bibułką) i przetrzymuje 2,5 min, po czym natychmiast przenosi się płytkę do komory chromatograficznej i rozwija mieszaninę czterochlorek węgla - metanol 2:1 na dystansie 7 cm.

Rozwiniętą płytkę rozcina się na dwa chromatogramy. Pierwszy chromatogram spryskuje się 5% roztworem tioketonu Michlera w benzenie. Tło płytki przybiera barwę brunatną. W górnej części chromatogramu pojawia się stożkowa plama barwy wiśniowej wskazująca na obecność czteroetylołowiu. W dolnej części chromatogramu pojawia się owalna plama barwy zielonej wskazująca na obecność aminopieliku. Chromatogram ogrzewa się w 110°C, przy czym tło płytki staje się beżowe. Nad konturem plamy czteroetylołowiu pojawia się granatowa plama przechodząca w jasnoniebieską, wskazując na obecność enolofosu. Nad konturem plam aminopieliku pojawia się również granatowa plama przechodząca w białą, która wskazuje na obecność metasystoxu R.

Drugi chromatogram spryskuje się nasyconym roztworem wodnym AgNO₃ i ogrzewa w 110°C. Porównuje się obydwie chromatogramy. Na drugim chromatogramie pojawienie się brunatnej plamy odpowiadającej kształtem i położeniem plamie czteroetylołowiu potwierdza jego obecność w próbce. Pod plamą czteroetylołowiu pojawia się okrągła czerwona plama wskazująca na obecność fenylotiomocznika.

W glebie wykryto: enolofos, czteroetylołów, fenylotiomocznik, metasystox R, aminopielik.

Przykład III. Wykrywanie bojowych środków trujących w próbce tkaniny mundurowej.

Próbkę tkaniny mundurowej o powierzchni około 100 cm² rozdrabnia się nożyczkami i wkłada pincetą do lejka Schotta. Na próbkę w lejku Schotta nanosi się porcjami mieszaninę ekstrakcyjną metanol-heksan-chloroform (1:1:1) z takim wyliczeniem, aby po wyciśnięciu próbki korkiem otrzymać około 5 cm³ ekstraktu. Ekstrakt zateża się strumieniem powietrza do objętości około 0,2 cm³. Na płytkę chromatograficzną pokrytą żelem krzemionkowym nanosi się w trzy punkty startowe po 20 mm³ zateżonego ekstraktu. Chromatogram rozwija się w komorze Sandwich w mieszaninie czterochlorek węgla: aceton 4:1. Rozwinięty chromatogram rozcina się na trzy paski, wzdłuż drogi migracji, otrzymując trzy tory, każdy zawierający jeden punkt startowy. Jeden z torów spryskuje się odczynnikiem anizydynowym, a następnie roztworem K₂CO₃. Uwidoczniają się plamki zabarwione na kolor — od pomarańczowego do brązowego. Plamka na wysokości około 0,25 drogi migracji świadczy o obecności w badanej próbce estru izopropylowego kwasu metylofluorofosfonowego. Plamka na wysokości około 0,40 drogi migracji świadczy o obecności estru pinakolinowego kwasu metylofluorofosfonowego.

Następny tor płytki rozcina się w poprzek na wysokości połowy drogi migracji. Górną część toru spryskuje się roztworem kompleksu ketonu Michlera z chlorkiem rtęci. Pojawienie się wiśniowo zabarwionej plamy jest dowodem obecności siarczku 2,2-dwuchlorodwuetylowego.

Dolną część tego toru spryskuje się roztworem tioketonu Michlera. Powstanie zielonej plamki w pobliżu punktu startu zmieniającej kolor na pomarańczowy z karminowym środkiem po następnym oprysku kwasem siarkowym dowodzi obecności w próbce 2-chlorowinyłodwuchloroarsyny. Powstanie zielonej plamki lub smugi w środkowej strefie tej części toru, której kolor pod wpływem oprysku kwasem siarkowym zmienia się na szary, jest dowodem obecności w próbce dwufenyloaminochloroarsyny. Ostatni trzeci tor płytki przecina się także w poprzek na wysokości połowy drogi migracji.

Górną część toru opryskuje się roztworem m-dwunitrobenzenu i tlenku benzofurazanu, a następnie wodorotlenkiem potasu. Powstanie wiśniowej plamki świadczy o obecności chloroacetofenonu. Powstanie powyżej niej plamki fioletowej dowodzi obecności 2-chlorobenzylidenomalnonitrylu. Dolną część tego toru opryskuje się odczynnikami Marquisa. Powstanie turkusowej plamki nad punktem startowym świadczy o obecności w tkaninie estru 3-chinuklidynowego kwasu benzilowego.

W próbce wykryto: ester izopropylowy kwasu metylofluorofosfonowego, ester pinakolinowy kwasu metylofluorofosfonowego, siarczki 2,2'-dwuchlorodwuetylowy, 2-chlorowinyłodwuchloroarsynę, dwufenyloaminochloroarsynę, chloroacetofenon, 2-chlorobenzylidenomalnonitryl i ester 3-chinuklidynowy kwasu benzilowego.

Przykład IV. Wykrywanie bojowych środków trujących w próbce wody.

Próbkę wody o objętości około $0,5 \text{ dm}^3$ ekstrahuje się przy pomocy 8 cm^3 chloroformu przez 5 minut. Po rozdzieleniu się warstw oddziela się warstwę chloroformową, osusza bezwodnym siarczanem sodu i zatęża do objętości około $0,2 \text{ cm}^3$. Na płytkę chromatograficzną pokrytą żelem krzemionkowym nanosi się w trzy punkty startowe po 20 mm^3 zatężonego ekstraktu. Chromatogram rozwija się na dystansie 15 cm w pełnoszklanej komorze nasyconej parami fazy ruchomej. Fazą ruchomą jest mieszanina toluen: benzen 9:1.

Chromatogram po rozwinięciu rozcina się na trzy części wzdłuż drogi migracji, każdy zawierający jeden punkt startowy. Każdy z tych trzech torów rozcina się następnie w poprzek na połowie wysokości drogi migracji.

Jedną z dolnych części torów spryskuje się buforowym roztworem cholinoesterazy o aktywności 20 j.a./cm^3 , a następnie odczynnikami mieszanym zawierającym 125 mg jodku butyrylotiocholiny i 3 mg hydrolu Michlera w 25 cm^3 roztworu, zgodnie ze zgłoszeniem patentowym nr P—202 204. Powstanie niebieskiej plamki w pobliżu punktu startowego dowodzi obecności estru dwuizopropiloaminoetantiolowego kwasu etoksymetylofosfonowego. Niebieska plamka w środkowej strefie tej części płytki świadczy o obecności estru izopropylowego kwasu metylofluorofosfonowego. Plamka barwy niebieskiej w górnej strefie tej części płytki wskazuje na obecność estru pinakolinowego kwasu fluorometylofosfonowego.

Drugą z dolnych części torów spryskuje się odczynnikami Dragendorffa. Powstanie pomarańczowej plamy w pobliżu punktu startowego dowodzi obecności estru 3-chinuklidynowego kwasu benzilowego w badanej próbce wody.

Trzecią z dolnych części torów spryskuje się roztworem dwufenyloitiokarbazonu. Powstanie żółtej plamki w pobliżu punktu startu, której kolor po opryskiwaniu kwasem siarkowym zmienia się na niebieski, dowodzi obecności 2-chlorowinyłodwuchloroarsyny. Obecności dwufenyloaminochloroarsyny dowodzi powstanie żółtej plamki lub smugi w środkowej strefie tej części płytki, której kolor zmienia się na czerwony po oprysku kwasem siarkowym.

Jedną z górnych części torów opryskuje się roztworem mieszanym jodoplatynianu sodowego ze skrobią. O obecności w badanej wodzie siarczku 2,2'-dwuchlorodwuetylowego w środkowej strefie tej części toru świadczy pojawienie się fioletowej plamy. Drugą z górnych części torów opryskuje się roztworem m-dwunitrobenzenu i wodorotlenku potasu. Powstanie wiśniowej plamy pośrodku tej części toru dowodzi obecności 2-chloroacetofenonu.

Trzecią z górnych części torów opryskuje się roztworem nitroprusydku sodu i wodorotlenku sodu. Powstanie czerwonej plamy świadczy o obecności 2-chlorobenzylidenomalnonitrylu.

W próbce wykryto: ester dwuizopropiloaminoetantiolowy kwasu etoksymetylofosfonowego, ester izopropylowy kwasu metylofluorofosfonowego, ester pinakolinowy kwasu fluorometylofos-

fonowego, ester 3-chinuklidynowy kwasu benzylowego, 2-chlorowinyloarsynę, siarczek 2,2'-dwuchlorodwuetylowy, 2-chloroacetofenon i 2-chlorobenzylidenomalononitryl.

Przykład V. Wykrywanie toksycznych kationów w próbce ścieków.

Próbkę ścieku około 200 cm³ doprowadza się przy pomocy wodorotlenku sodowego do pH 10, dodaje winianu sodowo-potasowego i roztwór dwuetylodwutiokarbaminianu sodowego. Po wymieszaniu i odczekaniu 5 minut ekstrahuje się próbkę trzykrotnie porcjami po 5 cm³ chloroformu. Ekstrakty łączy się i odparowuje do objętości około 0,2 cm³. Do pozostałej po ekstrakcji w środowisku zasadowym próbki dodaje się kompleksonu III (EDTA), zakwasza próbkę przy pomocy kwasu octowego do pH 5 i po 5 minutach trzykrotnie ekstrahuje porcjami po 5 cm³ chloroformu.

Ekstrakty ze środowiska kwaśnego łączy się i odparowuje do objętości około 0,2 cm³. Obydwa zatężone ekstrakty — ze środowiska alkalicznego i kwaśnego — nanosi się na przygotowaną płytkę chromatograficzną pokrytą żel krzemionkowym w dwa punkty startowe. Chromatogram rozwija się benzenem w komorze typu Sandwich. Rozwinięty chromatogram rozcina się wzdłuż drogi migracji na dwa tory. Tor, na którym rozwijany był ekstrakt ze środowiska alkalicznego opryskuje się roztworem ditizonu w chloroformie. Pojawienie się w górnej części toru plamy różowej dowodzi obecności cynku, a plamy pomarańczowej obecności rtęci. W środkowej części toru powstanie różowej plamki świadczy o obecności ołowiu, szarej — talu i pomarańczowej kadmu.

Następnie tor ten opryskuje się roztworem jodku potasu i kwaśnego roztworu tioacetamidu. Po każdym oprysku plamki zmieniają zabarwienie zgodnie z poniższą tabelą, co utwierdza o obecności poszczególnych kationów.

Tor alkaliczny			
ditizon	KJ	tioacetamid	kation
różowy	karminowy	karminowy	Zn 2 ⁺
pomarańczowy	pomarańczowy	czarny	Hg 2 ⁺
różowy	różowy	brązowy	Pb 2 ⁺
szary	zielony	żółty	Tl 1 ⁺
pomarańczowy	pomarańczowy	pomarańczowy	Cd 2 ⁺

Tor, na którym rozwijany był ekstrakt ze środowiska kwaśnego opryskuje się roztworem ditizonu w chloroformie. Pojawienie się w górnej części toru plamy o zabarwieniu żółtym wskazuje na obecność selenu. W środkowej części toru powstanie plamy o zabarwieniu żółtym dowodzi obecności antymonu, pod nią o zabarwieniu także żółtym — obecności arsenu. W dole toru plama o zabarwieniu niebieskim świadczy o obecności chromu.

Następnie tor ten opryskuje się mieszanym roztworem KJO₃ i skrobi, a później roztworem tioacetamidu. Po każdym oprysku plamy zmieniają zabarwienie zgodnie z poniższą tabelą, co dowodzi obecności poszczególnych kationów.

Tor kwaśny			
ditizon	KJO ₃ + skrobia	tioacetamid	kation
żółty	żółty	zielony	Se 4 ⁺
żółty	czarny	żółty	Sb 3 ⁺
żółty	czarny	zielony	As 3 ⁺
niebieski	niebieski	niebieski	Cr 6 ⁺

W próbce wykryto: Zn, Hg, Tl, Cd, Se, Sb, As, Cr.

Zastrzeżenie patentowe

Sposób polowy analizy skażeń środowiska truciznami nieorganicznymi i organicznymi, polegający na wyodrębnianiu mieszaniny badanych związków chemicznych z materiału próbki za pomocą ekstrakcji, rozdzieleniu mieszaniny i zidentyfikowaniu jej składników, **znamienny tym**, że

uzyskane drogą ekstrakcji roztwory wieloskładnikowe nanosi się każdy na oddzielną płytkę do chromatografii cienkowarstwowej w kilka punktów startowych na każdej płytce i rozwija chromatogramy wzdłuż oddzielnych torów fazami ruchomymi dostosowanymi do rodzaju grupy skażenia, po czym na jednej i tej samej rozwiniętej płytce przeprowadza się reakcje charakterystyczne na oddzielnych torach wszystkich możliwych składników grupy skażenia i identyfikuje poszczególne indywidua w kolejnych opryskach na podstawie różnicy w ich reaktywnościach z zadanymi odczynnikami i porównania wytworzonych barwnych plam z barwnym wzorcem.