

CHROM. 9201

IDENTIFICATION DE MÉTAUX TOXIQUES APRÈS EXTRACTION ET CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHES MINCES DE LEURS DITHIZONATES

APPLICATIONS TOXICOLOGIQUES

PH. BAUDOT, J. L. MONAL et M. H. LIVERTOUX

Laboratoire de Toxicologie, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Nancy, B.P. 403, 54001 Nancy Cedex (France)

et

R. TRUHAUT

Laboratoire de Toxicologie et d'Hygiène Industrielle, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Paris, 4, avenue de l'Observatoire, 75270 Paris Cedex 06 (France)

Reçu le 16 mars 1976

SUMMARY

Identification of toxic metals after extraction and thin-layer chromatography of their dithizonates. Toxicological applications

The technique consists in employing successively an extraction method using the dithizone-carbon tetrachloride system, at 4 different pH values, then thin-layer chromatography on silica gel, to identify and separate Ag, Cd, Co, Cu, Hg, Ni, Pb, and Zn in the form of their dithizonates. Sensitivity is of the order of 10^{-7} g ion/l. This method is directly applicable in hydrology; after destruction of organic matter in the case of biological samples (blood, urine, excrement). We have applied it in toxicological analysis together with other methods for the detection of copper, lead, mercury and zinc in cases of poisoning.

INTRODUCTION

La chromatographie sur couches minces des éléments métalliques est maintenant bien connue, mais sa sensibilité est insuffisante en hydrologie, en biologie et en toxicologie lorsque la concentration des ions à détecter est faible. Par contre, l'extraction par solvants des complexes formés par les ions avec des molécules organiques telles que la dithizone¹⁻⁶ puis l'identification du chélate extrait — par étude de sa stabilité^{3,4,7} ou sa chromatographie⁸⁻¹⁵ — permet de repousser plus loin le seuil de sensibilité de l'analyse de certains éléments déjà toxiques à l'étaut de traces pour l'homme. Leur dosage peut être réalisé par volumétrie directe lors de l'extraction avec une solution titrée de complexant³⁻⁶ par colorimétrie du chélate extrait^{1,2,6,7,16}, par dosage

spécifique du métal complexé —absorption atomique¹⁷, polarographie⁹, comptage pour les ions radioactifs¹⁸.

Nous exposons une méthode couplant l'extraction d'ions métalliques par la dithizone et la chromatographie sur couches minces des dithizonates. Des études analytiques ont déjà porté en partie sur de tels moyens^{15,19}; mais nous avons recherché les conditions optimales de sensibilité pour obtenir une identification rapide et une évaluation avec des moyens visuels d'un certain nombre d'ions intéressant l'hydrologie et la toxicologie —n'ignorant pas que des analyses plus sophistiquées offrent une meilleure sensibilité— la spectrométrie d'absorption atomique et la polarographie impulsionale si l'on prend l'exemple du plomb^{20,21}.

EXPÉRIMENTATION

Principe

Les ions en solution aqueuse (après minéralisation d'échantillons d'origine biologique) sont extraits par une solution de dithizone dans le tétrachlorure de carbone. Tewari et Bhatt¹⁹, dans leur recherche toxicologique du cuivre, préconisent une extraction à deux pH différents et la chromatographie avec deux systèmes de solvants pour résoudre un mélange témoin de dithizonates extraits à partir de solution environ $10^{-2} M$. Pour obtenir aussi une bonne séparation mais une sensibilité bien plus élevée applicable à l'identification des principaux métaux toxiques, nous opérons comme suit: extraction à quatre valeurs de pH successivement, puis chromatographie unique, sur plaques lavées, des dithizonates avec comparaison visuelle des taches colorées avec des témoins (Tableau I).

Matériel et réactifs

Plaques de chromatographie: Gel de silice 60, plaques finies pour chromatographie sur couches minces, épaisseur 0.25 mm, Merck (Darmstadt, G.F.R.).

Éluants: chlorure de méthylène-méthanol (9:1 v/v), benzène.

Réactifs: dithizone (pr. anal. Merck) dans le tétrachlorure de carbone (pr. anal. pour dosages par le dithizone, Merck), solution A à 100 mg/l; solution B à 10 mg/l. Solution tampon et complexante pour la recherche du plomb: KCN = 7 g; $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ = 1.5 g; $(\text{NH}_4)_2\text{HC}_6\text{H}_5\text{O}_7$ = 75 g (pr. anal.); NH_3 (min. 25% suprapur) 200 cm³; HCl (min. 30% suprapur) q.s. pH 10.5; eau bidistillée q.s. 1000 cm³.

Solutions témoins: chlorure de cadmium, cobalt, cuivre(II), mercure(II), nickel et zinc, nitrate de plomb, $10^{-5} M$ dans l'eau bidistillée (à partir de titrisol Merck pour la préparation de solutions étalons).

Tous les autres réactifs purs pour analyses ou suprapurs si disponibles.

Impuretés métalliques sur les plaques. L'emploi direct des plaques donne lieu à la formation de traînées colorées avec la dithizone et d'autres complexants^{22,23}. Pour évaluer ces impuretés, nous grattons la surface d'une plaque vierge et recueillons 1 g de gel de silice, le gel est agité avec 50 cm³ de 1 M HNO_3 et la phase aqueuse décantée est extraite complètement par une solution titrée de dithizone aux quatre pH. On décèle ainsi Cu^{2+} et Zn^{2+} à la concentration respective de 25 et 100 $\mu\text{g/g}$ de gel.

Il est donc indispensable de nettoyer les plaques avant usage puisque les extraits à chromatographier peuvent contenir de la dithizone non complexée et que

certains dithizonates assez peu stables (plomb, cadmium) libèrent de la dithizone en cours de chromatographie.

Pour le lavage du gel de silice, nous formons un large dépôt de solution A de dithizone (environ 1.5 cm³) sur toute la largeur de la plaque à 0.5 cm du bord inférieur, puis éludons en chromatographie ascendante avec le système chlorure de méthylène-méthanol (9:1). La dithizone migre en une bande verte précédée d'une bande très rouge de dithizonates des impuretés. Le lavage qui demande 0.5 h à la température ambiante est répété quatre fois (il est utile d'avoir un stock de plaques ainsi lavées d'avance).

Technique opératoire

Précautions. Tout le matériel utilisé pour la manipulation (ampoule à décanter, tubes à hémostase pour recueillir les fractions de dithizone, micropipettes pour électrophorèse, etc.) est soigneusement rincé à l'eau bidistillée et les traces d'ions métalliques éventuellement présents sont éliminées par quelques cm³ de solution A de dithizone.

Extraction. 20 cm³ de solution aqueuse ou de minéralisat (toujours en milieu sulfurique⁵) sont ajustés à pH 0.5 (par NH₃) et extraits jusqu'à épuisement par fractions successive de 0.5 cm³ de solution B de dithizone. Ces extraits sont réunis. La phase aqueuse est amenée ensuite à pH 3 (par NH₃) et on recommence de même; puis, la solution aqueuse est divisée en deux parties égales: l'une ajustée à pH 5 (par NH₃), l'autre à pH 10 (solution tampon et complexante), sont traitées comme ci-dessus.

Chromatographie. On dépose au maximum 50 µl de chaque extrait à 1 cm du bord inférieur d'une plaque, lavée selon notre technique, et on élue avec du benzène sur une hauteur de 6 cm, en chromatographie ascendante (20-30 min). On compare à l'œil les taches avec celles de témoins extraits et chromatographiés dans les mêmes conditions.

Temps de manipulation. Après la minéralisation d'une urine qui demande environ 0.5 h, la technique est réalisable en 1 h (tout dépend du liquide à minéraliser et du nombre d'ions à extraire, en fait!).

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Le Tableau I donne l'ordre d'extraction des dithizonates ainsi que leur couleur, puis le *R_F* et les couleurs des taches après chromatographie. On notera que la coloration des extraits peut déjà guider utilement dans l'identification des ions s'ils sont peu nombreux (cas pratique d'analyses toxicologiques). L'ordre d'extraction a été déterminé avec un mode opératoire spécial: après extraction d'un mélange d'ions par des fractions successives de 0.5 cm³ de solution B de dithizone, on chromatographie chacune de ces fractions (sans les mélanger).

Les dithizonates de mercure et d'argent sont extraits en milieu très acide (pH 0.5-0.9) mais déjà avec quelques traces de cuivre. Le taux d'extraction du cuivre croît très vite avec le pH; ce phénomène déjà signalé par Irving *et al.*²⁴ a été étudié par Fabre *et al.*⁵ qui donne les courbes d'extraction de ces dithizonates —en phase chloroformique ou tétrachlorure de carbone— en fonction du pH.

De ces deux solvants nous avons choisi le tétrachlorure de carbone selon les tendances récentes⁶: bien que moins sélectif de chaque métal en fonction du pH, il

TABLEAU I

PRINCIPALES CARACTÉRISTIQUES DES DITHIZONATES EXTRAITS, PUIS CHROMATOGRAPHIÉS SUR GEL DE SILICE LAVÉ

Éluant, benzène; hauteur du front de solvant, 6-7 cm; migration, 20-30 min; séchage à l'air, quelques minutes; aucun révélateur; spots visibles à l'œil nu.

pH et groupes d' extraction	Ordre d' extraction, coloration du dithionate extrait	R _F moyen des dithionates (± 0.02)	Couleur des spots chromatographiés et visibilité
0.5	I Mercure, orangé	0.64	orangé ⁺⁺⁺⁺ , très stable
	Argent, jaune d'or avec traces de cuivre	0 0.57	jaune, pas de migration violacé ⁺
3	II Cuivre, rouge violacé	0.57	violacé ⁺⁺
	Bismuth, orangé	0.57	violacé ⁺
5	III 1. Zinc, rose cerise (mélangé au plomb, rose et au cadmium, rose) avec des traces de cobalt violet	0.61 0.11	rose foncé ⁺⁺⁺⁺⁺ , très stable
	2. Cobalt, violet	0.35	violet ⁺⁺⁺
	3. Nickel, difficile à extraire	0.53	brunâtre ⁺⁺
10	IV Plomb, rose		instable; décomposition du dithionate en deux spots: dithizone et dehydroadithizone

donne un meilleur rendement d'extraction et la chromatographie permet de retrouver la sélectivité désirable. Enfin, les solutions de dithizone dans tétrachlorure de carbone sont plus stables que dans chloroforme.

Dans notre méthode l'identification des trois dithionates de mercure, d'argent et de cuivre en mélange n'est pas gênée puisqu'ils sont séparés très nettement par chromatographie. Quant au dosage du mercure par titrimétrie grâce à la dithizone (au lieu de la di- β -naphthylthiocarbazone rare sur le marché) nous avons vérifié que même avec de grosses quantités de cuivre, le dosage est possible en masquant ce métal avec EDTA comme le préconise Fabre *et al.*⁵ dans sa méthode à la di- β -naphthylthiocarbazone. Comme nous avons remarqué que le bismuth n'est extrait que difficilement à partir de pH 2.80; sa présence ne peut donc interférer dans le dosage du mercure en milieu plus acide.

Le cuivre est totalement extrait à pH 3 (sous forme de dithionate primaire) en même temps que le bismuth. Malgré tous nos essais nous n'avons pas réussi à séparer par chromatographie ces deux dithionates qui ont toujours le même R_F quelque soit l'éluant que nous avons utilisé [benzène, CCl₄-CHCl₃ (100:40 v/v), CS₂-CH₂Cl₂ (35:35), C₆H₆-CH₂Cl₂ (50:10), CCl₄-C₆H₅NO₂ (80:5), benzène-dichloro-1,2 éthane (80:8), CCl₄-CHCl₃-cyclohexane (65:25:20)]. Cette interférence des R_F ne perturbe pas l'identification du cuivre puisque celui-ci est déjà visible à pH 0.5; par contre le bismuth ne peut être détecté en présence de cuivre.

Si l'on pratiquait d'emblée l'extraction à pH 5, le cuivre formerait un dithionate secondaire brun-vert à ce pH; son R_F de 0.50 le ferait interférer avec le nickel. Il faut donc bien effectuer l'extraction à pH 3 selon notre méthode.

De même, mercure et cobalt forment des dithizonates secondaires à pH plus élevé et sans avantage par rapport aux primaires.

La dithizone elle-même forme un spot bleu (R_F 0.30-0.32) et quelquefois un spot jaune (R_F 0.53) dû vraisemblablement à la déhydrotithizone²². Ce dernier spot voisine celui brun du nickel et le spot violacé du cuivre mais ne gêne pas leur détection.

Le cas du plomb est particulier, il est partiellement extractible à pH 5 avec Zn, Cd, Co et Ni, et sélectivement extrait à pH 10 en milieu complexant ce qui permet son dosage volumétrique. La chromatographie de cet extrait donne deux spots aux R_F de la dithizone et de la déhydrotithizone indiquant l'instabilité du dithizone et sa décomposition. Tewari et Bhatt¹⁹ obtiennent un spot rose mais pour des concentrations 1000 fois plus élevées; ils donnent aussi des R_F inversés par rapport à nos valeurs pour le nickel et le cobalt extraits, il est vrai, à pH 6-8 (formation de dithizonates secondaires?).

La répétition de nos chromatographies montre quelque variation dans les valeurs des R_F qui imposent l'emploi systématique de témoins sur la même plaque.

L'extraction de solutions aqueuses contenant un seul ion, par une solution titrée de dithizone, permet en comparant avec une solution titrée du métal de donner un seuil de détection visuelle limite de 10^{-7} ion g/l pour Co^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} , Ni^{2+} et Zn^{2+} , et de $2 \cdot 10^{-7}$ pour Ag^+ , Bi^{3+} , Cd^{2+} et Pb^{2+} .

20 cm³ d'une solution sulfurique contenant par exemple $1.25 \cdot 10^{-7}$ ion g/l de Co^{2+} , Ni^{2+} et Zn^{2+} et $2 \cdot 10^{-7}$ de Cd^{2+} est extraite puis chromatographiée selon la méthode proposée; l'épuisement total demande environ 6 cm³ de solution B de dithizone et les spots chromatographiés sont identifiés sur plaque par des dépôts de 40 μl d'extrait; cela indique donc pour ce mélange un seuil de sensibilité de $1.25 \cdot 10^{-7}$ ion g/l pour chaque ion (sauf pour $\text{Cd}^{2+} 2 \cdot 10^{-7}$). Nous avons obtenu des résultats semblables sur des urines "chargées" qu'il faut minéraliser au préalable.

TABLEAU II

EXEMPLE D'ANALYSES TOXICOLOGIQUES: COMPARAISON AVEC D'AUTRES MÉTHODES

Ion métallique	Origine des échantillons		Méthode à la dithizone		Autres méthodes de dosage***
			Identification CCM*	Dosages**	
Mercure	WE 02.11.74	urines sang	+	80 $\mu\text{g/l}$ (a) 600 $\mu\text{g/l}$ (a)	
	Enfant DY 16.09.75	selles	+++ -	60 $\mu\text{g/10g}$ (a)	
Plomb	MOC 22.10.73	urines sang		2 300 $\mu\text{g/l}$ (b) 2 800 $\mu\text{g/l}$ (b)	2 200 $\mu\text{g/l}$ (PI ara) 2 600 $\mu\text{g/l}$ (PI ara)
Zinc	VIG 18.05.73	urines sang	++++	3 250 $\mu\text{g/l}$ (b) 12 700 $\mu\text{g/l}$ (b)	3 000 $\mu\text{g/l}$ (A.A.) 12 000 $\mu\text{g/l}$ (A.A.)
Cuivre	OUM 04.07.75	selles liquides	++ -	3 000 $\mu\text{g/l}$ (b)	

* + = Intensité des spots chromatographiés.

** (a) Le mercure est dosé par la technique de Fabre *et al.*⁵ mais en utilisant de la dithizone au lieu de di- β -naphthylthiocarbazone. (b) Dosage volumétrique lors de l'extraction par la dithizone titrée.

*** A.A. = Absorption atomique; PI ara = polarographie impulsionale avec redissolution anodique.

Nous n'avons testé l'extraction de l'argent que sur des mélanges d'ions en solution aqueuse. La technique de minéralisation apportant des ions chlorures, par le chlorhydrate d'hydroxylamine, risquerait de précipiter AgCl .

Le Tableau II donne quelques résultats d'analyses toxicologiques de métaux dans différents prélevements. Notre méthode donne rapidement (2 h) une identification indispensable pour le toxicologue et une orientation sur la quantité du toxique dosé par ailleurs.

CONCLUSION

La méthode exposée permet d'identifier rapidement Ag, Cd, Co, Hg, Ni, Pb et Zn. Dans le cas d'un mélange Bi-Cu, le cuivre est toujours identifiable mais le bismuth ne l'est pas.

La sensibilité de cette méthode en fait un outil intéressant pour la recherche de ces ions en hydrologie et en toxicologie si l'on prend la précaution de laver le gel de silice de ses impuretés avant d'effectuer la chromatographie. Sa spécificité permet une identification certaine des toxiques (hormis le bismuth).

Bien entendu, des méthodes plus élaborées atteignent une précision de dosage plus grande après l'identification préalable indispensable.

Si malheureusement l'arsenic n'est pas extractible par la dithizone, l'application de la méthode à l'étain, l'or et le thallium est en cours d'essai.

RÉSUMÉ

La technique consiste à employer successivement une méthode d'extraction par le système dithizone-tétrachlorure de carbone, à quatre pH différents, puis la chromatographie sur couches minces de gel de silice, pour identifier et séparer Ag, Cd, Co, Cu, Hg, Ni, Pb et Zn sous forme de dithizonates. La sensibilité est de l'ordre de 10^{-7} ion g/l. Cette méthode est applicable directement en hydrologie, après minéralisation dans le cas d'échantillons biologiques (sang, urine, selles, etc.). Nous l'avons appliquée à l'analyse toxicologique parallèlement à d'autres méthodes pour la recherche du cuivre, du mercure, du plomb et du zinc lors d'intoxications.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 G. Iwantscheff, *Das Dithizon und seine Anwendung in der Mikro und Spurenanalyse*, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr., 1958.
- 2 E. N. Sandell, *Colorimetric Determination of Traces of Metals*, Interscience, New York, 3me Éd., 1959.
- 3 P. Mesnard, *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 82 (1944) 90.
- 4 F. Lupant-André, *J. Pharm. Belg.*, (1952) 14.
- 5 R. Fabre, R. Thuhaut et C. Boudène, *Ann. Biol. Clin.*, 16 (1958) 286.
- 6 G. Charlot, *Chimie Analytique Quantitative*, Tomes I et II, Masson, Paris, 6me Éd., 1974.
- 7 H. Friedeberg, *Anal. Chem.*, 27 (1955) 305.
- 8 O. Erämetsä, *C.A.*, 40 (1946) 4620.
- 9 F. Carritt, *Anal. Chem.*, 25 (1953) 1927.
- 10 G. Venturello, *Anal. Chim. Acta*, 10 (1954) 335.
- 11 H. Nagai et T. Deguchi, *Nippon Kagaku Zasshi*, 84 (1963) 499.
- 12 M. Hranisavljevic-Jakovljevic, I. Pejkovic-Tadic et K. Jakovljevic, in G. B. Marini-Bettolo, *Thin-Layer Chromatography*, Elsevier, Amsterdam, 1964, pp. 221-224.

- 13 M. Hranisavljevic-Jakovljevic, I. Pejkovic-Tadic et J. Miljkovic-Stojanovic, *Mikrochim. Ichnoanal. Acta*, (1965) 141.
- 14 E. Stahl, *Thin-Layer Chromatography*, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 2me Éd., 1969, pp. 844-845.
- 15 T. Duthiewicz, A. Podoski et S. Komsta, *C.A.*, 80 (1974) 12770h.
- 16 E. Benman, *Amer. J. Clin. Pathol.*, 36 (1961) 549.
- 17 M. Pinta et coll., *Spectrométrie d'Absorption Atomique*, Tome II, Masson, Paris, 1971, pp. 540-564.
- 18 A. Elek, *J. Radioanal. Chem.*, 16 (1973) 165.
- 19 S. N. Tewari et N. Bhatt, *Chromatographia*, 5 (1972) 624.
- 20 X. Herbeauval, J. L. Maso, Ph. Baudot, M. F. Hutin et D. Burnel, *Pathol. Biol.*, 23 (1975) 379.
- 21 Ph. Baudot, R. J. Royet, D. Burnel et J. A. Martin, *Ann. Méd. Nancy*, sous presse.
- 22 T. Takeuchi et Y. Tsunoda, *Nippon Kagaku Zasshi*, 88 (1967) 176.
- 23 Y. Nishimoto et S. Toyoshima, *Yakugaku Zasshi (J. Pharm. Soc. Jap.)*, 85 (1965) 317; 85 (1965) 322.
- 24 H. Irving, G. Andrew et E. J. Risdon, *J. Amer. Chem. Soc.*, 1 (1949) 541.