JAN WOŹNIAK, ANDRZEJ TOKARZ, WIESŁAWA MIŚKIEWICZ

TERMOJONOWY DETEKTOR W CHROMATOGRAFICZNYCH BADANIACH NITROZOAMIN

Z Samodzielnej Pracowni Unikalnych Metod Analitycznych Instytutu Biofarmacji
Akademii Medycznej w Warszawie
Kierownik: dr hab. *J. Woźniak*
oraz z Zakładu Bromatologii Instytutu Biofarmacji
Akademii Medycznej w Warszawie
Kierownik: doc. dr hab. *L. Piekarski*

W pracy przedstawiono działanie detektora termojądrowego, uczulonego różnymi solami alkalicznymi na nitrozoaminy. Zmodyfikowano proces zagęszczania ekstraktów nitrozoamin ujmując otrzymane wyniki statystycznie.

Odkrycie kancerogennych właściwości dwumetylonitrozoaminy u szczurów przez *Magee* i *Bernesa* w 1956 r. [6], a także kolejne doniesienia na temat kancerogenności wielu N-nitrozoamin spowodowało wśród badaczy zainteresowanie tym zagadnieniem. W związku z tym, że nitrozoaminy wykryto w artykułach spożywczych, napojach alkoholowych lub dymie tytoniowym stanowią one potencjalne zagrożenie dla organizmu ludzkiego. Dlatego też prowadzone są intensywne badania przez biochemików i analityków w tym zakresie [2, 4, 8].

Spośród wielu metod wykorzystanych w analizie nitrozamin jak polarografia [10], spektrofotometria [7, 10], chromatografia cienkowarstwowa [10] najszersze zastosowanie znalazła chromatografia gazowa [1, 9, 10]. Metoda ta charakteryzuje się wysoką czułością i dużą dokładnością oznaczeń jak również stosunkowo krótkim czasem analizy. Ogólnie znanym faktem jest, że detektor termojonowy z solą alkaliczną jest bardzo czuły wobec związków zawierających azot, do których między innymi należą nitrozoaminy. W zależności od rodzaju zastosowanej soli alkalicznej, a także od sposobu wprowadzenia jej jonów do płomienia wodorowego uzyskuje się różne stopnie uczulenia detektora wobec nitrozoamin.

I tak w badaniach *Kawabata* [5] spośród różnych metali alkalicznych potas dawał najwyższą czułość przy wykrywaniu nitrozodwumetyloaminy. Porównując także uczulenie detektora z nasadką spiralną i końcówką zawierającą sprasowaną sól stwierdzono, że platynowo-irydowa spirala pokryta mieszaniną sodowo-potasowego krzemianu wykazała wyższą czułość niż detektor z końcówką zawierającą krystaliczny KBr. Skonstruowany ostatnio detektor tzw. „cristal on detector" z KBr odznacza się prawie taką samą czułością jak detektor z nasadką spiralną, a przy tym może on pracować przez dłuższy okres bez konieczności poddawania go tzw. procesowi starzenia [5].

Stwierdzono również, że czułość wzrasta bardziej przy zastosowaniu szklanych kolumn, niż podczas pracy z kolumnami stalowymi. W dodatku cały układ konstrukcyjny szklanych kolumn „on column and on detector" podnosi czułość detektora skuteczniej niż zwykły system mający pojemnik odparowywacza i połączenie metalowe kolumny z detektorem [5].

Korzystając z doświadczeń związanych z uczuleniem detektora termojonowego na pestycydy fosforoorganiczne [11] podjęto próby skonstruowania nasadek zawierających różne sole alkaliczne i określenie stopnia podwyższenia czułości detektora wobec nitrozoamin.

W związku z tym, że w artykułach spożywczych nitrozoaminy występują w bardzo małych stężeniach rzędu μg lub mg na kg produktu, niezbędnym jest zatężanie ekstraktów. Zabieg ten z kolei rzutuje na stopień odzysku badanej substancji, bowiem nitrozoaminy łatwo ulegają takim przekształceniom, że obserwuje się pojawienie nowych niezidentyfikowanych „pików" w chromatogramach gazowych otrzymanych zarówno z ekstraktów zagęszczanych, jak też przechowywanych kilka dni w temperaturze od 0 °C do +5 °C.

Dlatego też w badaniach naszych zwróciliśmy również uwagę na sam proces zagęszczania ekstraktów i wpływu warunków ich zagęszczania na zawartość niezmienionych chemicznie nitrozoamin w szeregu homologicznym od najbardziej lotnych do związków charakteryzujących się stosunkowo wysoką temperaturą wrzenia.

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

Oznaczenie nitrozoamin wykonano za pomocą chromatografu gazowego Pye-Unicam seria 104 z detektorem termojonowym. Szklaną kolumnę o długości 1,5 m i średnicy 4 mm wypełniono nośnikiem Chromosorb G AW 100/120 mesh z fazą stacjonarną. Carbowax 20 M (5%). Temperatura rozdziału wynosiła 175°C. Gazem nośnym był argon przepływający przez kolumnę z szybkością 35 cm^3/min. Wydajność powietrza była stała i wynosiła 275 cm^3/min. Szybkość przepływu wodoru nie była stała, dobierano ją odpowiednio do rodzaju soli alkalicznej, tak aby zapewnić wysokie uczulenie detektora. W przypadku końcówki zawierającej KCl wynosiła ona 45 cm^3/min., dla RbBr i RbCl — 34 cm^3/min., dla KBr — 33 cm^3/min. zaś dla CsBr — 30 cm^3/min. Próbki o pojemności 2 μl wprowadzano mikrostrzykawką bezpośrednio do kolumny.

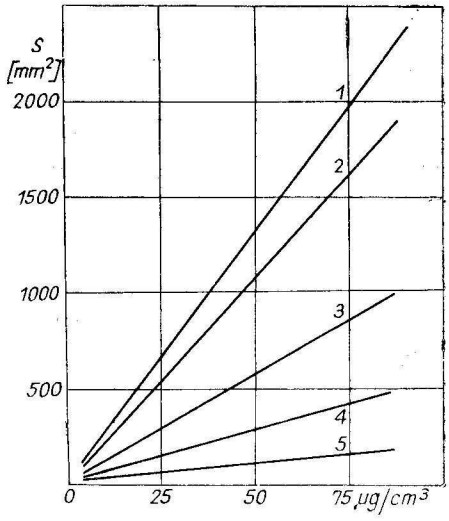
Podstawowy roztwór wzorcowy nitrozoamin sporządzono odważając na wadze analitycznej w specjalnym naczyńku przelewowym następujące ilości tych związków.

N-nitrozodwumetyloamina (DMN)	— 0,12955 g
N-nitrozodwuetyloamina (DEN)	— 0,22343 g
N-nitrozodwupropyloamina (DPrN)	— 0,42544 g
N-nitrozodwubutyloamina (DBN)	— 0,86488 g
N-nitrozopirolidyna (NPirol)	— 1,28350 g
N-nitrozodwupentyloamina (DPnN)	— 1,64573 g

Do kolby miarowej o pojemności 100 cm^3 przeniesiono ilościowo każdą naważkę za pomocą dwuchlorometanu. Następnie z roztworu podstawowego sporządzono wzorcowe roztwory rozcieńczone. W tym celu 0,5 cm^3 podstawowego roztworu wzorcowego przeniesiono do kolby miarowej o pojemności 50 cm^3 i uzupełniono do kreski heksanem otrzymując pierwszy roztwór wzorcowy zawierający w przeliczeniu na nitrozodwubutyloaminę 86,48 μg w 1 cm^3. Rozcieńczając odpowiednio

heksanem ten roztwór uzyskano następne roztwory wzorcowe zawierające coraz mniejsze stężenie nitrozodwubutyloaminy: 43,25 μg/cm³, 8,64 μg/cm³, 4,32 μg/cm³ oraz proporcjonalnie zmniejszające się zawartości wszystkich pozostałych nitrozoamin w roztworze.

Roztwory te posłużyły do wykreślenia zależności wskazań detektora termojonowego, mierzonych powierzchnią pików od rodzaju użytej soli uczulającej w nasadce detektora (ryc. 1).



Ryc. 1. Stopień uczulenia detektora termojonowego na N-nitrozodwubutylaminę solami alkalicznymi: 1 — RbCl, 2 — CsBr, 3 — KBr, 4 — Rb Br, 5 — KCl.

W doświadczeniu tym zastosowano następujące sole pierwiastków alkalicznych: CsBr, KCl, RbBr, RbCl, KBr. Z soli wykonano pierścienie przez sprasowanie substancji w specjalnie skonstruowanym urządzeniu-wytłaczarce. Dokładny opis powyższego urządzenia wraz z rysunkiem został przedstawiony w poprzedniej publikacji [11]. Wprowadzona obecnie innowacja konstrukcyjna wspomnianej wytłaczarki pozwala na bezpośrednie wprasowanie soli do nasadki nakładanej na elektrodę zbiorczą detektora termojonowego.

Zmieniając końcówki (nasadki) detektora zawierające różne sole rejestrowano wartości sygnałów (w mm² powierzchni pików) po wprowadzeniu do kolumny chromatografu 2 μl heksanowego roztworu wzorcowego zawierającego odpowiednią mieszaninę nitrozoamin. Otrzymane wyniki w przeliczeniu na nitrozodwubutyloaminę przedstawiono graficznie na ryc. 1.

Dwuchlorometan jest najczęściej stosowanym rozpuszczalnikiem do ekstrakcji nitrozoamin. Niekorzystne jest jednak wprowadzanie nitrozoamin do kolumny chromatograficznej rozpuszczonych w dwuchlorometanie, wpływa on bowiem w wyraźny sposób na szybsze zużycie końcówki uczulającej detektor, a prawdopodobnie również na właściwości rozdzielcze fazy stacjonarnej kolumny chromatograficznej. Dlatego też dalsze nasze doświadczenia poszły w kierunku zmodyfikowania procesu zagęszczania ekstraktu nitrozoamin rozpuszczonych w dwuchlorometanie z równoczesnym przeprowadzeniem ich do heksanu. Proces zatężania dwuchlorometanowego roztworu mieszaniny nitrozoamin prowadzono w aparacie *Kuderna-Danisha* wprowadzając 5 cm³ tego roztworu do kalibrowanej probówki aparatu. Następnie dodawano 200 cm³ świeżo przedestylowanego dwuchlorometanu i 5 cm³ heksanu. Aparat *Kuderna-Danisha* umieszczano w termostatowanej łaźni wodnej o temp. 50 °C i oddestylowano dwuchlorometan do objętości 4—5 cm³.

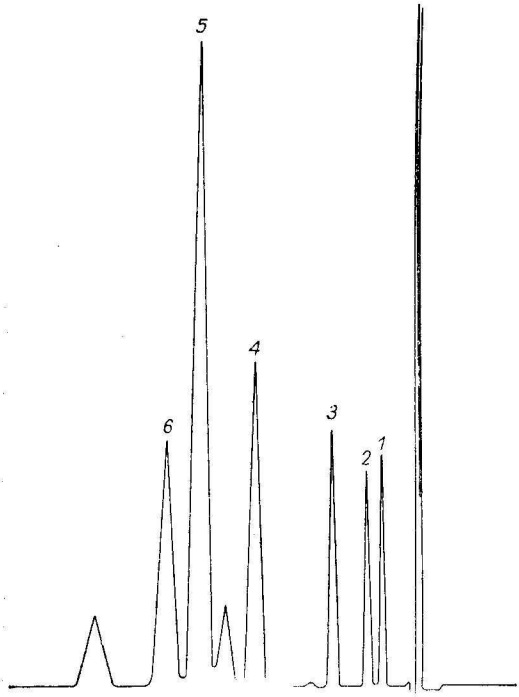
Podczas zatężania utrzymywano poziom wody w łaźni poniżej poziomu cieczy w aparacie. Po odparowaniu do podanej wyżej objętości ustawało jego wrzenie, gdyż pozostał jako rozpuszczalnik już tylko heksan wrzący w temperaturze 65 °C. Aparat wyjmowano z łaźni wodnej i po upływie ok. 15 min., po ostygnięciu, obmywano jego wewnętrzne ściany około 5 cm³ heksanu, po czym zawartość probówki uzupełniono do 10 cm³. Uzyskane w ten sposób „ekstrakty" poddawano analizie chromatograficznej oceniając zawartość nitrozoamin przez porównanie powierzchni pików otrzymanych z „ekstraktów" z pikami uzyskanymi w wyniku analizy roztworu wzorcowego.

W celu obliczenia strat nitrozoamin jakie mogą zachodzić w przedstawionym wyżej procesie zagęszczania ekstraktów wykonano po 5 równoległych oznaczeń dla dwóch mieszanin, z których jedna zawierała 6,475 μg nitrozodwubutyloaminy w 1 cm³ heksanu, a druga — stężenie 10-krotnie mniejsze. Należy podkreślić, że wymieniona nitrozoamina znajdowała się w mieszaninie z pięcioma innymi nitrozoaminami w stosunku wagowym określonym przez wyjściowy roztwór podstawowy.

Otrzymane wyniki przedstawiono w tabeli I.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Wykonane doświadczenia wykazały, że wszystkie wymienione w części doświadczalnej sole pierwiastków alkalicznych można z powodzeniem wykorzystać do uczulania detektora termojonowego na nitrozoaminy.



Ryc. 2. Rozdział mieszaniny nitrozoamin na chromatografie gazowym Pye-Unicam z detektorem termojonowym z CsBr :1 — nitrozodwumetyloamina, 2 — nitrozodwuetyloamina, 3 — nitrozodwupropyloamina, 4 — nitrozodwubutyloamina, 5 — nitrozopirolidyna, 6 — nitrozodwupentyloamina.

Wyniki otrzymane w procesie zmodyfikowanego odparowywania ekstraktów pozwoliły na statystyczną ocenę tzw. odzysków i strat poszczególnych nitrozoamin w toku zatężania roztworów. Zastosowane sole cha-

rakteryzują się nie tylko właściwościami uczulania detektora na związki fosforoorganiczne [11], ale zgodnie z naszymi badaniami oraz *Greenhalgha* i *Wilsona* mają również charakterystyczne, zależne od przepływu wodoru, punkty maksymalnego uczulenia detektorów termojonowych wobec związków zawierających azot [3, 11].

W omówionych warunkach rozdziału chromatograficznego piki poszczególnych nitrozoamin z próbki zawierającej ich mieszaninę są dobrze rozdzielone, ostre i symetryczne (ryc. 2).

Przedstawione wykresy na ryc. 1 wskazują na możliwość zastosowania każdej z badanych soli, wszystkie bowiem uczulają detektor na nitrozoaminy, a także wykazują liniową zależność jego wskazań wobec różnych stężeń nitrozoamin. Warunki pracy detektora dla każdej z tych soli dobierane są indywidualnie tak, aby obok osiągnięcia wysokiej jego czułości można było zapewnić odpowiednio długi czas eksploatacji jednej końcówki (wkładki).

Wykresy na ryc. 1 ujmując zależności między wartościami sygnałów (powierzchnie podpikowe) detektora uczulonego różnymi solami a stężeniem nitrozodwubutyloaminy w roztworze sześciu różnych nitrozoamin. Z przedstawionych krzywych wynika, że najsilniejszy wpływ uczulający na nitrozoaminy ma chlorek rubidowy, najmniejszy zaś — chlorek potasowy. Sól ta nie jest jednak stosowana przez firmę Pye-Unicam w detektorach azotowych natomiast używany jest RbBr, chociaż daje ok. 5-krotnie niższe uczulenie niż RbCl. Powtarza się tutaj zjawisko obserwowane już wcześniej w badaniach nad uczuleniem detektora na związki fosforoorganiczne [11].

W przypadku detektora fosforowego stosuje się głównie CsBr, sól uczulającą detektor ok. 8-krotnie słabiej niż CsCl. Decyduje o tym bowiem lepsza powtarzalność sygnałów związana z mniejszymi skokami impulsów przy jakichkolwiek wahaniach w przepływie wodoru.

Chociaż zjawisko uczulania detektora termojonowego nie jest nadal wyjaśnione od strony teoretycznej, korzysta się z niego powszechnie. Jednocześnie wszyscy, którzy posługują się detektorem termojonowym podkreślają kłopotliwość jego używania w związku z koniecznością stosunkowo częstego czyszczenia elektrod, na których osadzają się odparowujące w płomieniu wodorowym sole nieorganiczne i być może produkty destylacji związków organicznych w połączeniu z jonami metali alkalicznych, co powoduje wytwarzanie się izolującej warstwy na elektrodzie. Ujemną stroną tych detektorów jest ponadto wybitny wpływ najmniejszych nawet zmian w przepływie wodoru na stopień ich uczulenia manifestujący się niepożądanymi skokami sygnałów dla tych samych stężeń substancji badanych.

Z tabeli I przedstawiającej statystyczne opracowanie oznaczeń zagęszczonych „ekstraktów" nitrozoamin wynika, że przy średnim błędzie pomiaru wynoszącym ± 8,76%, średni odzysk dla wszystkich nitrozoamin wynosi 95,67%. Z danych ujętych w tej samej tabeli wynika, że w procesie zagęszczania roztworu nitrozoamin największym stratom ulega nitrozodwubutyloamina. Mniej wyraźne straty obserwuje się w przypadku mieszaniny zawierającej nitrozoaminy w stężeniach od 6 do 82 $\mu g/cm^3$, bowiem średni odzysk dla DBN wynosił 94,14%, podczas gdy w mieszaninie o dziesięciokrotnie niższej zawartości nitrozoamin średni odzysk dla tej nitrozoaminy obniżył się aż do 82,31%. W przypadku pozostałych nitrozoamin ich odzyski nie różniły się między sobą istotnie

dla dwóch różnych stężeń 6 substancji. Posługując się roztworami modelowymi problem strat nie zaznaczył się tak wyraźnie. Należy jednak przypuszczać, iż w przypadku ekstraktów uzyskiwanych z materiału biologicznego straty nitrozoamin w wyniku procesu oczyszczania i zagęszczania będą większe.

Tabela I

Statystyczna interpretacja zawartości nitrozoamin w zagęszczanych roztworach w układzie: dwuchlorometan — heksan

„Ekstrakt"	Nitrozoaminy	Dodano (μg/cm³)	Pomiary z powierzchni pików po rozdziale chromatograficznym mieszaniny nitrozoamin		
			wykryto średnio /μg/cm³)*)	wykryto (%)	błąd pomiaru**)
I	DMN	6,47	6,20 (5,31—6,58)	95,82	6,20±0,58 (95,82%±8,96%)
	DEN	11,17	10,83 (9,81—11,80)	96,95	10,83%±0,96 (96,95%±8,59%)
	DPrN	21,27	20,54 (19,39—22,91)	96,56	20,54%±1,58 (96,56%±7,42%)
	NPirol	64,17	62,92 (56,82—72,56)	98,05	62,92±7,31 (98,05%±11,39%)
	DBN	43,24	40,71 (37,63—46,67)	94,14	40,71±4,57 (94,14%±10,56%)
	DPnN	82,28	81,15 (75,10—90,4)	98,62	81,15±6,77 (98,62%±8,22%)
II	DMN	0,64	0,63 (0,58—0,72)	98,43	0,63±0,071 (98,43%±11,09%)
	DEN	1,11	1,15 (1,06—1,33)	104,32	1,15±0,145 (104,32%±13,15%)
	DPrN	2,12	2,05 (1,90—2,25)	96,69	2,05±0,15 (96,69%±7,07%)
	DBN	4,32	3,55 (3,33—3,80)	82,31	3,55±0,12 (82,31%±2,78%)
	NPirol	6,4	5,78 (5,19—6,27)	90,30	5,78±0,51 (90,30%±7,96%)
	DPnN	8,28	7,94 (7,40—8,87)	95,89	7,94±0,66 (95,89%±7,97%)

*) Równoległe pomiary n = 5. Liczby w nawiasie: najmniejszy i największy odzysk

**) Odzysk z błędem standardowym $\bar{x} \pm S_{\bar{x}} \cdot t$ na poziomie $a = 0{,}05$.

Jednocześnie w badaniach zwrócono uwagę na dolną granicę wykrywalności nitrozoamin metodą chromatografii gazowej z zastosowaniem detektora termojonowego. Zawartość nitrozoamin w „ekstrakcie" II (tabela I) leżała praktycznie na granicy wykrywalności ilościowej dla poszczególnych substancji z dopuszczalnym błędem pomiaru wynoszącym od ±3 do ±10% dla tego typu oznaczeń.

A zatem można przyjąć, że w podanych warunkach analizy przy optymalnie maksymalnym uczuleniu detektora za pomocą RbCl graniczną ilością N-nitrozodwumetyloaminy oznaczonej ilościowo była wielkość rzędu 1 p.p.b. Granica wykrywalności ilościowej pozostałych nitrozoamin rosła wraz z wielkością gramocząsteczki osiągając poziomy: 2 μg/kg (DEN), 4 μg/kg (DPrN), 8 μg/kg (DBN), 12 μg/kg (NPirol) i 16 μg/kg (DPnN).

WNIOSKI

1. Metoda zagęszczania „ekstraktów" nitrozoamin w aparacie *Kuderna-Danisha* połączona z równoczesnym przejściem nitrozoamin z dwuchlorometanu do heksanu — rozpuszczalnika bardziej dogodnego dla chromatografii gazowej, jest metodą prostą, umożliwiającą szybkie i dokładne przygotowanie prób do analizy.

2. Zdeterminowana wytłaczarka przeznaczona do wprasowywania do metalowej nasadki na elektrodę zbiorczą detektora termojonowego ułatwia w istotny sposób wykonanie tych końcówek zapobiegając kruszeniu się wyprasek.

3. Wszystkie przebadane sole z grupy litowców mają właściwości uczulania detektora termojonowego w różnym stopniu na związki zawierające w swej strukturze azot.

4. Każda z badanych soli dla uzyskania odpowiedniego uczulenia selektywnego wymaga indywidualnego dobrania warunków pracy detektora.

5. Uczulenie detektora na nitrozoaminy przy zastosowaniu RbCl było najwyższe i umożliwiało wykrywanie ilościowe różnych nitrozoamin w zakresie od 2 do 16 μg/kg.

Я. Вожьняк, А. Токаж, В. Миськевич

ТЕРМОИОННЫЙ ДЕТЕКТОР В ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ НИТРОЗАМИНОВ

Резюме

Авторы представили свойства термоионного детектора, применяемого в газовой хроматографии нитрозаминов Определение этих соединений провели с помощью газового хроматографа Pye-Unicam со стеклянной колонкой длиной 1,5 м, наполненной хромосорбом GAW с 5% стационарной фазой карбовакс 20 М. Применяя модельные смеси нитрозаминов (N-нитрозодиметиламин, N-нитрозодиэтиламин, N-нитрозодипропиламин, N-нитрозодибутиламин, нитрозопиролидин, N-нитрозодипентиламин), исследовали степень повышения чувствительности термоионного детектора, применяя следующие соли щелочных элементов: KCl, KBr, CsBr, RbCl, RbBr. Указанные соли впрессовали во вкладку, повышающую чувствительность термоионного детектора, с помощью сконструированного авторами пресса.

Провели также исследования влияния концентрации экстрактов, содержащих нитрозамины, на степень их потерь, определённую статистически. Сам процесс их концентрирования изменили таким образом, что в результате получили растворы нитрозаминов в гексане, а не в дихлорметане.

J. Woźniak, A. Tokarz, W. Miśkiewicz

THERMOIONIC DETECTOR FOR CHROMATOGRAPHIC INVESTIGATIONS OF NITROSOAMINES

Summary

The authors describe the features of a thermoionic detector used in gas chromatography of nitrosoamines. Determinations of these compounds were carried out by means of Pye-Unicam gas chromatograph with a glass column 1.5 m long filled with Chromosorb G AW with a 5% Carbowax 20 M stationary phase. Using a standard mixture of nitrosoamnies (N-nitrosodimethylamine, N-nitrosodiethylamine, N-nitrosodipropylamine, N-nitrosodibutylamine, N-nitrosopyrollidine, N-nitrosodipetylamine) the degree of sensitivity of thermoionic detector was determined using the following salts of alkaline elements: KCl, KBr, CsBr. RbCl, RbBr. These salts were pressed into inlays sensitizing thermoionic detector by means of a specially designed press.

Experiments were done also on the effects of increasing concentrations of extracts containing nitrosoamines on the degree of their loss determined statistically. The process of concentrating these extracts was modified for obtaining nitrosoamines solutions in hexane and not in dichloromethane.

PIŚMIENNICTWO

1. *Althorpe J., Goddard D.*: „The Gas Chromatographic Determination of Nitrosoamines of the Picogram Level by Conversion to their Corresponding Nitroamides". J. Chromatography, 1970, 53/2/371. — 2. *Fiddler W., Doerr R. C., Ertek J. R., Wasserman A. E.*: „Determination of N-nitrosodimethylamine in ham by gas-liquid chromatography with an alkali flame ionization detector". J. Assoc. Offic. Analyt. Chemists., 1971, 54, 5, 1160. — 3. *Greenhalgh R., Wilson M.*: „Comments of Evaluation of the Pye Thermionic Detector with Rubidium Chloride Annuls". Column (Pye-Unicam), 1972, 15, 10. — 4. *Howard J. W., Fazio T., Watts J. O.*: „Determination of N-nitrosodimethylamine in smoked fish. Application to smoked nitrite treated chub". J. Assoc. Offic. Analyt. Chemists., 1970, 53, 269. — 5. *Kawabata T.*: „N-Nitroso Compounds in the Environment-Addendum". International Agency for Research on Cancer, 1974, 154. — 6. *Magee P. N., Barnes J.*: „The Production of Malignant Primary Hepatic Tumors in the Rat by Feeding Dimethylnitrosoamine". Brit. J. Cancer, 1956, 10, 114. — 7. *Preussmann R.*: „Investigation on a colorimetric procedure for determination of nitrosoamides in comparison with other methods". International Agency for Research on Cancer, 13—15 October, 1971. — 8. *Sen N. P., Smith D. C., Schminghamer L., Marlean J. J.*: „Diethylnitrosoamine and other N-nitrosoamine in foods". J. Assoc. Offic. Analyt. Chemists., 1969, 52, 47. — 9. *Sen N. P.*: „Gas-liquid chromatographic determination of dimethylnitrosoamines as dimethylnitroamine at picogram levels. J. Chromatography, 1970, 51, 301. — 10. *Wasserman A. E.*: „A survey of analytical procedures for N-nitrosoamines". International Agency for Research on Cancer, 13—15 October, 1971.

11. *Woźniak J., Tokarz A.*: „Termojonowy detektor w chromatograficznych badaniach pestycydów fosforoorganicznych". Roczn. PZH, 1974, 25, 375.

Dn. 15.X.1975 r.

02-097 Warszawa, ul. Banacha 1.