DOI: 10.17814/mechanik.2015.10.504

Dr inż. Mariusz Mazurek
Wydział Inżynierii Bezpieczeństwa Cywilnego
Szkoła Główna Służby Pożarniczej w Warszawie

WSPÓŁCZESNE TECHNIKI CHROMATOGRAFICZNE STOSOWANE DO ANALIZY BOJOWYCH ŚRODKÓW CHEMICZNYCH ZATOPIONYCH NA DNIE MORZA BAŁTYCKIEGO

STRESZCZENIE

W pracy przedstawiono najnowsze osiągnięcia aparaturowe w chromatografii, która jest najczęściej stosowaną metodą w analizie bojowych środków chemicznych zatopionych na dnie Morza Bałtyckiego. Podano przykłady zastosowań technik chromatograficznych w rzeczywistych badaniach środowiskowych, gdzie szczegółowej analizie poddano frakcje wyłowionej bryły iperytu siarkowego. Ponadto, za pomocą tych technik chromatograficznych dokonano również oceny możliwości zniszczenia toksycznych związków arsenoorganicznych, w tym zatopionego adamsytu, w procesie stapiania z siarką.

Słowa kluczowe: *zatopiona amunicja chemiczna, bojowe środki trujące, techniki chromatograficzne, monitoring środowiska morskiego.*

CONTEMPORARY CHROMATOGRAPHIC TECHNIQUES ADOPTED FOR ANALYSIS OF THE CHEMICAL WARFARE AGENTS DUMPED ON THE SEABED OF THE BALTIC SEA

SUMMARY

In this paper the latest achievements in the chromatography were described. These techniques are most often applied in analysis of the chemical warfare agents dumped in the Baltic Sea. Examples of applications of the chromatographic techniques in the real investigations of environmental samples were given, where a detailed analysis of the caught lump fractions of sulphuric mustard gas were described. Moreover, the evaluation process of arsenoorganic toxic compounds destruction due to melting with sulphur, eg. adamsite, was also made by these chromatographic techniques.

Keywords: dumped chemical ammunition, chemical agents, chromatographic techniques, monitoring of the marine environment.

WPROWADZENIE

Region Morza Bałtyckiego charakteryzuje się wyjątkowym ekosystemem, w którym występują różnorodne gatunki zarówno słodko- jak i słonowodne. Stąd jest on szczególnie wrażliwy na zmiany składu fizycznego i chemicznego wód. Jednym z istotnych zagrożeń Morza Bałtyckiego jest obecność na jego dnie zatopionej amunicji chemicznej, która z upływem lat coraz częściej staje się nieszczelna i prowadzi do wzrostu zanieczyszczeń środowiska morskiego [1]. Analizy związków zanieczyszczających środowisko naturalne z uwagi na ich wysoką toksyczność, możliwość kumulacji w organizmach żywych i złożone matryce próbek wymagają stosowania wyrafinowanych i czułych technik analitycznych.

TECHNIKI CHROMATOGRAFICZNE

Wśród różnorodnych technik analitycznych coraz większe znaczenie mają techniki chromatograficzne. Obecnie są one najczęściej wykorzystywane do analizy bojowych środków toksycznych (BST) stanowiących wypełnienie broni chemicznej. Istota ich działania polega na rozdzieleniu jednorodnych mieszanin badanych próbek na pojedyncze składniki, które następnie mogą być wykrywane, identyfikowane i oznaczane ilościowo.

W chromatografii rozdzielanie składników badanych mieszanin następuje w wyniku ich różnego oddziaływania z ruchomą fazą (ciekłą lub gazową) i nieruchomą fazą stacjonarną (stałą lub ciekłą). W zależności od rodzaju użytej fazy ruchomej wyróżnia się tutaj chromatografię gazową (ang. *gas chromatography*, GC), chromatografię nadkrytyczną (ang. *supercritical fluid chromatography*, SFC), chromatografię cieczową (ang. *liquid chromatography*, LC) lub elektroforezę (ang. *capillary electrophoresis*, CE). W większości rodzajów chromatografii rozdziały wykonuje się w kolumnach, przy czym chromatografia cieczowa może być realizowana także na płaszczyźnie, np. w wysokociśnieniowej chromatografii planarnej (ang. *overpressured layer chromatography*, OPLC), podobnie jak i elektroforezie.

Duża popularność technik chromatograficznych związana jest m.in. z możliwością ich łączenia między sobą i/lub z różnorodnymi detektorami, np. ze spektrometrem masowym (ang. *mass spectrometry*, MS), spektroskopią w podczerwieni (ang. *infrared spectroscopy*, IR) lub magnetycznym rezonansie jądrowym (ang. *nuclear magnetic resonance*, NMR). Dzięki stosowaniu technik łączonych uzyskuje się dodatkowe informacje pozwalające bardziej precyzyjnie określić strukturę analizowanych związków i zmniejszyć poziom szumów w złożonych matrycach próbek środowiskowych. Przykłady łączenia technik chromatograficznych w układy wielowymiarowe i hybrydowe podano w tabeli 1 [2-6].

Tabela 1. Techniki chromatograficzne łączone stosowane do analizy BST

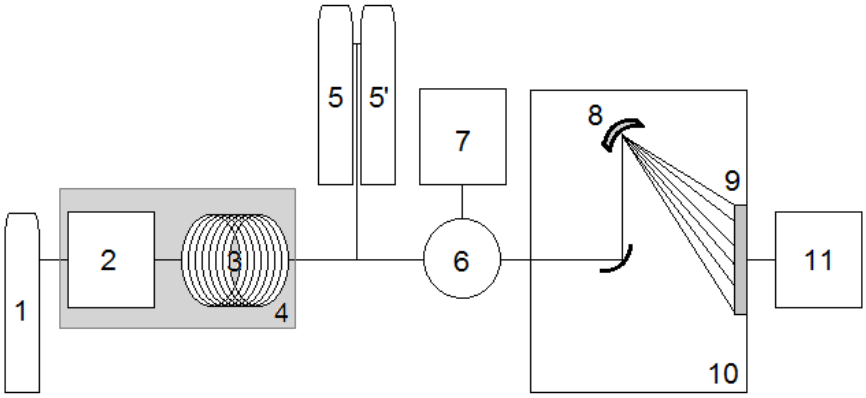
Gazowa	Nadkrytyczna	Kombinowana	Cieczowa	Elektroforeza
GC-MS GC-IR GC-IR-MS GC-AED GC-MS-MS GC-GC-MS	SFC-MS	LC-GC-MS LC-GC-IR	LC-MS LC-IR LC-NMR LC-MS-MS LC-LC-MS OPLC-MS	CE-MS CE-MS-MS

Źródło: opracowanie własne

Poniżej zostaną omówione niektóre z nich, które są wykorzystywane do analizy próbek BST wyłowionych z Morza Bałtyckiego.

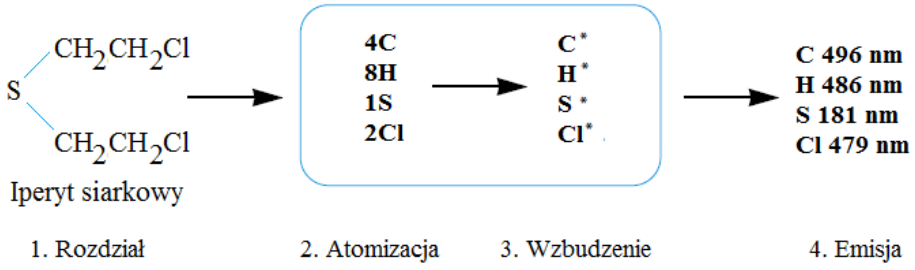
CHROMATOGRAFIA GAZOWA Z DETEKTOREM EMISJI ATOMOWEJ (GC-AED)

Analizę chromatograficzną wykonuje się za pomocą chromatografu gazowego, którego schemat przedstawiono na rys. 1 [7]. Rozdzielone w kolumnie składniki próbki są wprowadzane do plazmy helowej, gdzie zachodzi atomizacja związków. Powstające atomy pierwiastków wzbudzone w wysokiej temperaturze plazmy (od 3000 do ponad 10000^{o}C) przechodzą do stanu podstawowego emitując światło o charakterystycznej dla każdego pierwiastka długości fali (rys. 2).



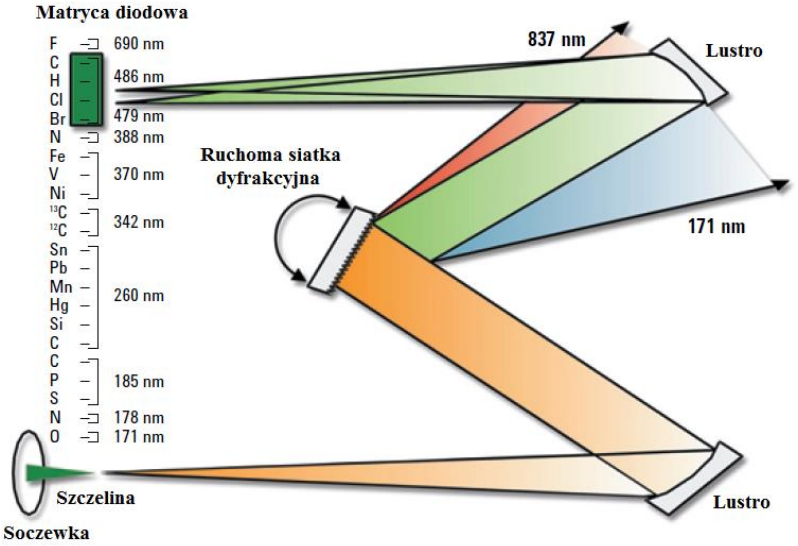
Rys. 1. Schemat blokowy chromatografu gazowego GC-AED
Źródło: opracowanie własne

Oznaczenia: 1 - butla ze sprężonym helem, 2 - dozownik, 3 - kolumna chromatograficzna, 4 - termostat, 5,5' - gazy reakcyjne, 6 - plazma helowa, 7 - generator mikrofal, 8 - siatka dyfrakcyjna, 9 - matryca fotodiodowa, 10 - detektor (spektrometr), 11 - rejestrator



Rys. 2. Podstawowe procesy zachodzące w chromatografie gazowym GC-AED
Źródło: opracowanie własne

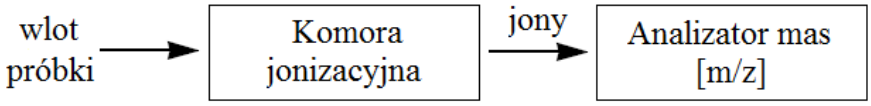
W układzie detektora emitowane światło jest ogniskowane a następnie rozszczepiane na ruchomej siatce dyfrakcyjnej. Powstałe fale o różnych długościach charakterystycznych dla poszczególnych pierwiastków są rejestrowane na matrycy fotodiodowej, co pokazano na rys. 3. Matryca umożliwia rejestrację fal w zakresie od 171 do 690 nm.



Rys. 3. Schemat działania detektora emisji atomowej (AED)
Źródło: opracowanie własne na podstawie materiałów firmy Hewlet Packard

CHROMATOGRAFIA GAZOWA Z DETEKTOREM SPEKTROMETRII MASOWEJ (GC-MS)

Analizę chromatograficzną wykonuje się w podobny sposób jak w GC-AED. Istota działania spektrometrii masowej polega na określaniu masy (a ściślej stosunku masy do ładunku m/z) cząstek naładowanych elektrycznie (jonów). Najważniejsze elementy spektrometru mas pokazano na rys. 4.



Rys. 4. Ogólny schemat działania detektora spektrometrii masowej (MS)
Źródło: opracowanie własne

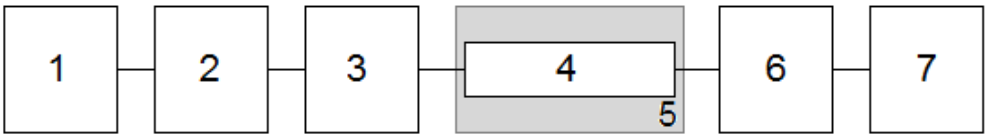
W detektorze MS zachodzą następujące procesy [8]:

- wytwarzanie jonów analizowanej próbki (źródło jonów),
- rozdzielanie jonów (analizator),
- wykrywanie jonów i przypisanie im masy do ładunku (m/z) oraz intensywności (detektor),
- rejestrowanie i przetwarzanie danych (komputer).

W spektrometrach mas wykorzystuje się fakt jednoczesnego oddziaływania pola elektrycznego i magnetycznego na poruszający się ładunek elektryczny (jon). Dzięki temu można z mieszaniny jonów wybrać te o konkretnym stosunku m/z i skierować je do detektora oraz określić ich ilość w mieszaninie. Analizując widmo masowe związku chemicznego można otrzymać informacje o strukturze jego cząsteczki.

WYSOKOSPRAWNA CIECZOWA CHROMATOGRAFIA KOLUMNOWA (HPLC)

Analizę chromatograficzną wykonuje się za pomocą odpowiedniego chromatografu cieczowego, którego schemat przedstawiono na rys. 5.



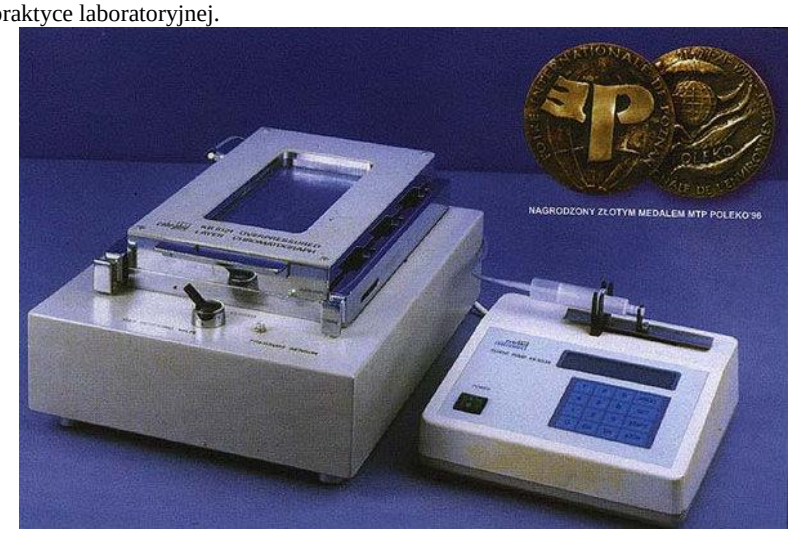
Rys. 5. Schemat blokowy chromatografu cieczowego
Oznaczenia: 1 - zbiornik cieczy, 2 - pompa, 3 - dozownik, 4 - kolumna chromatograficzna, 5 - termostat, 6 - detektor i rejestrator, 7 - kolektor frakcji
Źródło: opracowanie własne

Istota analizy chromatograficznej polega na przepływie rozpuszczalnika lub mieszaniny rozpuszczalników przez kolumnę chromatograficzną, wypełnioną odpowiednią nieruchomą fazą stacjonarną [9]. Stanowią one fazę ruchomą, przy czym jeżeli skład fazy ruchomej jest stały to chromatografia nosi nazwę izokratycznej. W przypadku zmiennego składu fazy

ruchomej mamy do czynienia z chromatografią gradientową. Ta ostatnia jest stosowana do analizy złożonych próbek środowiskowych, gdzie występuje wiele trudno rozdzielających się składników. Rodzaj i skład fazy ruchomej dobiera się w zależności od analizowanej próbki i wypełnienia kolumny chromatograficznej.

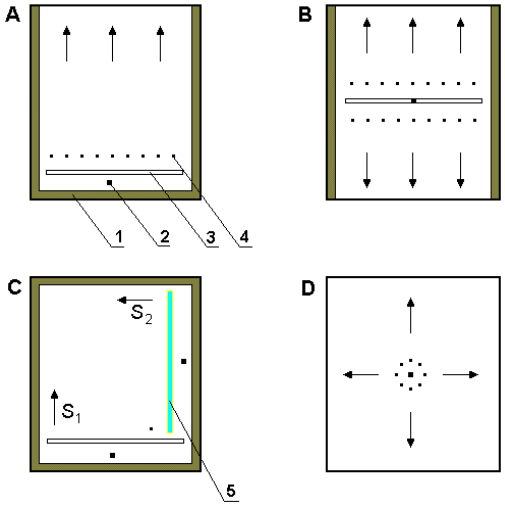
CIŚNIENIOWA CHROMATOGRAFIA PLANARNA (OPLC)

W ostatnich latach obserwuje się znaczny wzrost zainteresowania chromatografią planarną z wymuszonym przepływem (OPLC) (ang. *overpressured layer chromatography*) [10]. Jest to spowodowane przede wszystkim nowymi osiągnięciami w konstruowaniu lepszych komór chromatograficznych, przyśpieszających znacznie proces rozdzielania i polepszających jego sprawność. Na rys. 6 pokazano widok komory do OPLC. Z tego też względu nowoczesna chromatografia planarna może skutecznie rywalizować z innymi technikami chromatograficznymi. Jej zalety sprawiają, że jest ona coraz częściej wykorzystywana w praktyce laboratoryjnej.



Rys. 6. Widok zestawu do ciśnieniowej chromatografii planarnej OPLC (komory i pompy dozującej) produkowanej przez firmę COBRABiD w Warszawie
Źródło: zdjęcie z folderu firmy COBRABiD

Analizę chromatograficzną wykonuje się w podobny sposób jak w HPLC. Wyjątkiem jest rozdzielanie badanych próbek na płytkach chromatograficznych, zamiast w kolumnie chromatograficznej. Przyrząd przedstawiony na rys. 6 umożliwia rozwijanie chromatogramów na płytkach o maksymalnych wymiarach 10 x 20 cm. Na takiej płytce można analizować jednocześnie od 10 do 20 próbek stosując różne sposoby rozwijania chromatogramów, co pokazano na rys. 7.

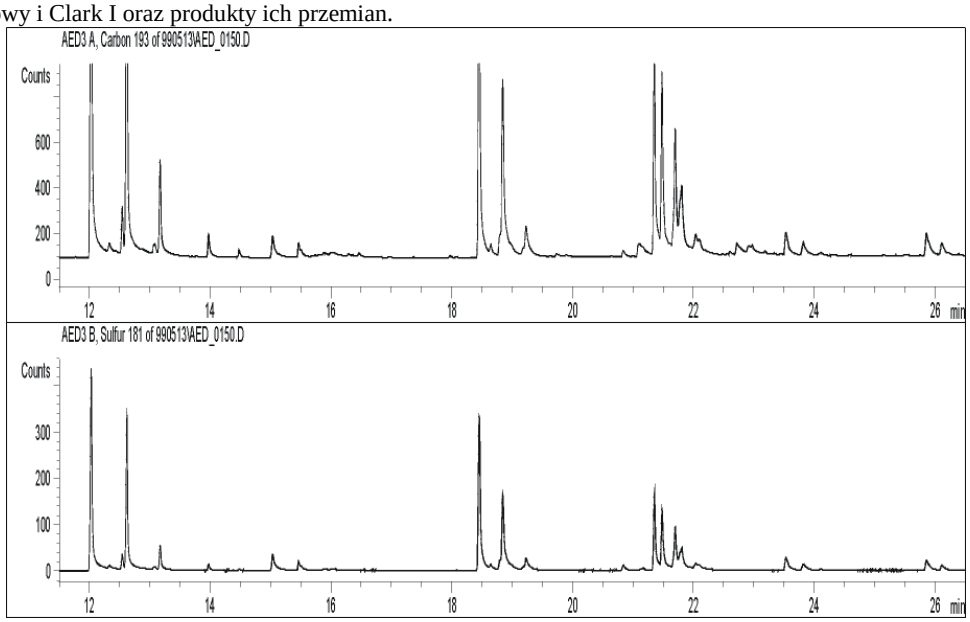


Rys. 7. Płytki chromatograficzne przygotowane do rozwijania chromatogramów w OPLC
Oznaczenia: (A) liniowe jednokierunkowe rozwijanie chromatogramu, (B) liniowe dwukierunkowe rozwijanie chromatogramu, (C) liniowe rozwijanie chromatogramu w układzie 2-D, (D) radialne rozwijanie chromatogramu
Źródło: opracowanie własne

PRZYKŁADY ZASTOSOWAŃ TECHNIK CHROMATOGRAFICZNYCH W ANALIZIE BST

GC-AED

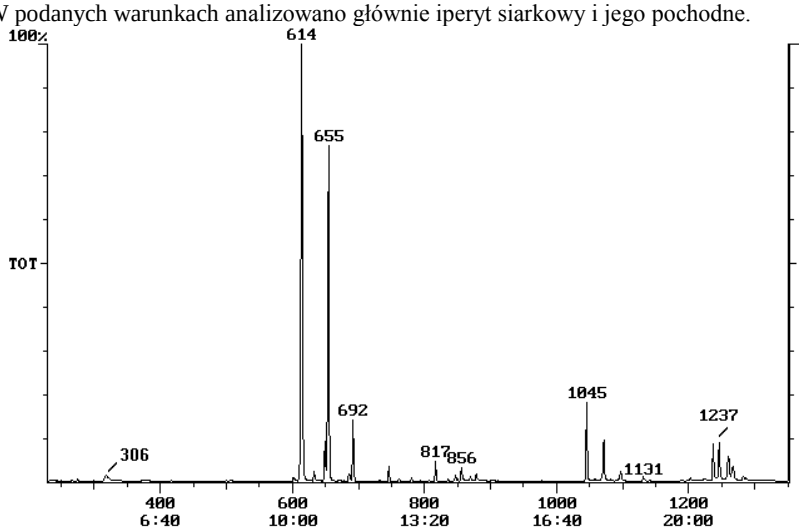
Rozdziały chromatograficzne wykonywano za pomocą chromatografu gazowego firmy Hewlett Packard HP 6890 (Avondale, PA, USA) sprzężonego z detektorem emisji atomowej HP 2350A [11]. Do sterowania pracą przyrządu oraz do rejestracji chromatogramów pierwiastkowych i obróbki wyników stosowano program ChemStation HP 35920A. Do rozdzielania składników analizowanych próbek używano kolumny kapilarnej HP-5, 30 m x 0,32 mm, pokrytej fazą 5% difenylo- i 95% dimetylopolisiloksanu o grubości filmu 0,25 µm. Objętość próbki wynosiła 1 µl z podziałem strumienia w stosunku 20:1 lub 60:1. Jako gaz nośny stosowano hel. Natężenie przepływu gazu nośnego było stałe i wynosiło 2 ml/min. Jako gazy reakcyjne stosowano tlen, wodór i mieszaninę metanu z azotem (1:9, V/V). Temperatura dozownika wynosiła 320^0C; temperatura linii transferowej między kolumną a detektorem: 280^0C. Temperatura kolumny była programowana: od 40^0C (3 min) z szybkością wzrostu 10^0C/min do 280^0C (30 min). Przykładowy chromatogram pierwiastkowy pokazano na rys. 8. W podanych warunkach analizy wykryto kilkadziesiąt różnych związków chemicznych, w tym kilka BST: głównie iperyt siarkowy i Clark I oraz produkty ich przemian.



Rys. 8. Chromatogram pierwiastkowy badanej próbki bryły iperytowej na kanale węgla (193 nm) i siarki (181 nm)
Źródło: opracowanie własne

GC-MS

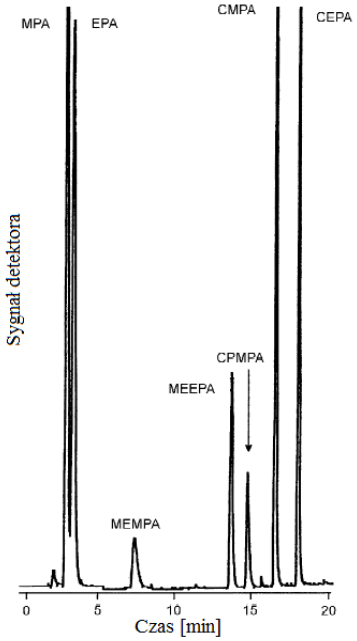
Widma masowe analizowanych związków mierzono za pomocą spektrometru masowego w układzie jonizacji elektronowej (EI) [12]. Energia elektronów wynosiła 70 eV; natężenie prądu emisji - 400 mA, a temperatura źródła jonów – 215^0C. Jony badanych związków wykrywano w zakresie od 40 do 400 amu przy szybkości skaningowania 0.7 s/scan. Czas opóźnienia włączenia źródła jonów wynosił 200 s. Przykładowy chromatogram masowy pokazano na rys. 9. W podanych warunkach analizowano głównie iperyt siarkowy i jego pochodne.



Rys. 9. Chromatogram masowy próbki iperytu siarkowego rozdzielanej w układzie GC-MS
Źródło: opracowanie własn

HPLC

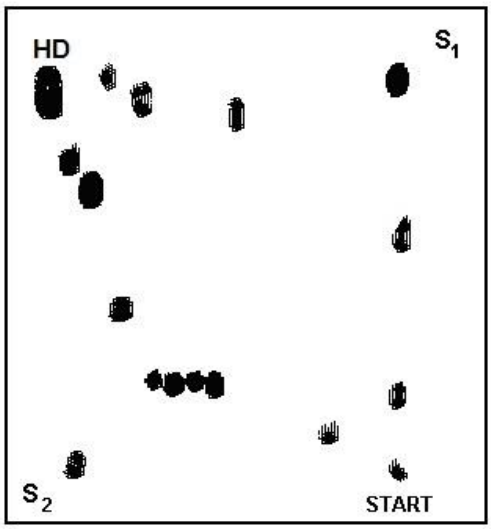
Rozdziały chromatograficzne wykonywano za w kolumnie 7 µm Hypercarb S (150 mm x 2,1 mm) [13]. Stosowano elucję gradientową 0-3 min 0,1% kwas trifluorooctowy w wodzie; 3-18 min do 0,1% kwasu trifluorooctowego w acetonitrylu. Przykładowy chromatogram pierwiastkowy pokazano na rys. 10. W podanych warunkach analizowano kwasy alkilofosfonowe będące prekursorami toksycznych związków fosforoorganicznych z grupy fosfonianów, np. sarinu.



Rys. 10. Chromatogram cieczowy kwasów alkilofosfonowych
Oznaczenia: MPA, EPA, MEMPA, MEEPA, CPMPA i CEPA - pochodne kwasów alkilosulfonowych
Źródło: opracowanie własne na podstawie [13]

OPLC

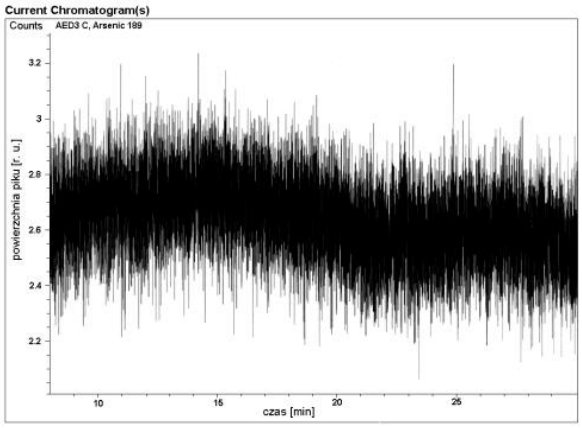
Chromatogramy rozwijano w ciśnieniowej komorze chromatograficznej (OPLC) typu KB-5121 (COBRABiD, Warszawa) [14]. Do badań stosowano płytki na folii aluminiowej firmy Merck z fazą normalną oznaczone numerami 5553 i 5548 oraz płytki szklane z fazą związaną grupami oktadecylowymi oznaczone nr 13724. Próbki analizowano wobec wzorca iperytu siarkowego stosując różne układy rozwijające. Do wizualizowania chromatogramów stosowano odczynnik zawierający 0,8 g chlorku rtęci(II) i 0,2 g tetraetylo-N,N-diaminobenzofenonu (keton Michlera) w 10 ml etanolu. Przykładowe chromatogramy pokazano na rys. 11. W podanych warunkach analizowano głównie iperyt siarkowy i jego produkty rozkładu.



Rys. 11. Chromatogram dwukierunkowy próbki iperytu siarkowego rozdzielanej w komorze OPLC. Faza stacjonarna: HPTLC żel krzemionkowy; faza ruchoma: S_1 - toluen + dichlorometan + n-propanol + n-heksan (25:25:1:50, V/V); S_2 - eter diizopropylowy + chloroform + n-heksan (1:1:3, V/V); droga rozwijania - 8 cm.
Oznaczenia: HD – iperyt siarkowy
Źródło: opracowanie własne

PROCES NISZCZENIA ADAMSYTU ZE STOPIONĄ SIARKĄ

Proces stapiania adamsytu z siarką krystaliczną prowadzono w hermetycznym naczyniu zaopatrzonym w mieszadło mechaniczne i termometr [15]. Stosunek masowy adamsytu do siarki wynosił od 1:4 do 1:5. Początkowo reakcję stapiania prowadzono w temperaturze 160^{o}C przez 2 godziny, a następnie w temperaturze około 200^{o}C przez 1 godzinę. Oznaczenia powstałych analitów wykonywano pośrednio przez ekstrakcję próbek w układzie ciało stałe – ciecz. Efektywność procesu niszczenia adamsytu badano za pomocą chromatografii gazowej ze spektrometrią emisji atomowej, co pokazano na rys. 12. W podanych warunkach analizowano obecność śladów adamsytu i pochodnych związków arsenu.



Rys. 12. Chromatogram pierwiastkowy ekstraktu produktu stapiania adamsytu z siarką otrzymany za pomocą GC-AED na kanale arsenu (189 nm)
Źródło: opracowanie własne

Powstały produkt stapiania adamsytu z siarką nie rozpuszcza się w wodzie i w większości roztworów, zarówno nieorganicznych (kwasy, zasady) jak i organicznych. W badanych ekstraktach nie stwierdzono obecności wolnego adamsytu i pochodnych arsenu. Przykładowy chromatogram pierwiastkowy badanego ekstraktu otrzymano na kanale arsenu (As-189 nm) i najwyższej czułości systemu GC-AED, tj. 50 pg/s.

PODSUMOWANIE

Analiza bojowych środków trujących w środowisku morskim jest jednym z ważniejszych przedsięwzięć, która wchodzi w zakres systemu monitoringu Morza Bałtyckiego. Istotnym elementem tego systemu jest dobór odpowiednich technik i metod analitycznych. Przedstawione techniki chromatograficzne mają pewne zalety, każda w stosunku do drugiej. Jednoczesne ich stosowanie wzajemnie się uzupełnia i pozwala osiągnąć większą wiarygodność uzyskanych wyników pomiarów. Zmniejsza to tym samym możliwość powstania błędu podczas identyfikacji i analizy ilościowej BST na poziomie śladów. Dlatego współczesne techniki chromatograficzne mogą być z powodzeniem stosowane do analiz złożonych próbek środowiskowych Morza Bałtyckiego.

LITERATURA

1. Mazurek M. "Międzynarodowe aspekty ochrony środowiska Morza Bałtyckiego w odniesieniu do zatopionej amunicji chemicznej". Zeszyty SGSP, nr 42 (2011), s. 167-182,
2. Brickhouse M.D., Creasy W.R., Williams B.R., Morrissey K.M., O'Connor R.J., Durst H.D. "Multiple-technique analytical characterization of a mixture containing chemical-weapons simulant from a munition", J. Chromatogr. A. nr 883 (2000), s, 185-198,
3. D'Agostino P. A., Chenier C. L. "*Analysis of Chemical Warfare Agents: General Overview, LC-MS Review, In-House LC-ESI-MS Methods and Open Literature Bibliography*", Suffield: DRDC, 2005,
4. Anders Östin A. "*Review of Analytical Methods for the Analysis of Agents Related to Dumped Chemical Weapons for the CHEMSEA project*", CHEMSEA Chemical Munitions Search and Assessment, Umeå: 2012,
5. Subramaniam R. "*Simplified Routines for Sample Preparation and Analysis of Chemical Warfare Agent Degradation Products*", Umeå: VMC, 2012,
6. Kasten S. A., Zulli S., Jones J. L., Dephillipo T., Cerasoli D. M. "Chiral Separation of G-type Chemical Warfare Nerve Agents via Analytical Supercritical Fluid Chromatography", Chirality nr 26 (2014), s. 817–824,
7. Witkiewicz Z. "Chromatografia gazowa z detektorem emisji atomowej w analizie organicznych zanieczyszczeń środowiska", Biuletyn COBRABiD. nr 2 (1997), s. 6-12,
8. Hoffmann de E., Charette J., Stroobant V. "*Spektrometria mas*", Warszawa: WNT, 1998,
9. Witkiewicz Z., Mazurek M., Stefaniak Z. "Chromatografia cieczowa", Biuletyn COBRABiD. nr 1 (1996), s. 7-16,
10. Mazurek M., Witkiewicz Z., Stefaniak Z. "Overpressured layer chromatography", Anal. Chem. nr 42 (1997), s. 767-786,
11. Mazurek M., Popiel S., Witkiewicz Z., Śliwakowski M. "Capillary gas chromatography – atomic emission spectroscopy – mass spectrometry analysis of sulphur mustard and transformation products in a block recovered

from the Baltic Sea", J. Chromatogr. nr 919 (2001), s .133-145,
12. Mazurek M., Witkiewicz Z., Śliwakowski M. "Identyfikacja za pomocą GC-MS produktów przemian iperytu siarkowego w bryle iperytowej wyłowionej z Morza Bałtyckiego", Biul. Wojsk. Akad. Techn. nr 49 (2000), s. 89-100,
13. Mercier J.-P., Morin Ph., Dreux M., Tambute´ A, J. Chromatogr. A. nr 849 (1999), s. 197-207,
14. Mazurek M., Witkiewicz Z., Śliwakowski M. "Analysis of the Yperite Block Fished up from the Baltic Sea". J. Planar Chromatogr. A. nr 13 (2000), s. 359-364,
15. Mazurek M. "Degradacja toksycznych substancji arsenoorganicznych w procesie zestalania z siarką". Ochrona środowiska i zasobów naturalnych. nr 33 (2007), s. 40-44.