



A REVIEW OF METHODS OF PREPARING SAMPLES FOR CHROMATOGRAPHIC ANALYSIS FOR THE PRESENCE OF ORGANIC EXPLOSIVE SUBSTANCES

Rafał BORUSIEWICZ

Institute of Forensic Research, Krakow

Abstract

The issue of identification and determination of explosives has especially great significance nowadays. The main reason is the threat from terrorist attacks. The toxicity of most explosive substances means that they are also the subject of environmental analyses. Explosive substances are usually detected/determined with the help of chromatographic methods. The most difficult stage of the analytical process is appropriate preparation of samples – in such a way as to selectively isolate the analysed compounds from the matrix and concentrate them. A review of the procedures for preparing samples indicates that methods of solid phase extraction are most frequently used for this purpose, especially in the form of solid phase microextraction (SPME). In the case of analysis of water and liquid waste, this method allows us to isolate analytes directly from the sample. In the case of analysis of solid samples (e.g. material from the scene of an explosion, polluted soil, sediments, plant material, samples of dust on filters), the first stage of preparation is usually solvent extraction. In the extract obtained in this way, numerous interfering compounds are usually present, which is why the second stage of the process of preparation is application of SPME. Appropriate selection of a fibre allows selective adsorption of analytes and elimination in this way of the influence of interferents.

Key words

Organic explosives; Chromatographic analysis; Sample preparation methods; Extraction; SPE; SPME; SDME.

Received 10 August 2007; accepted 18 September 2007

1. Introduction

In an age of increasing threat from organised criminal groups and terrorist organisations, the issue of detecting and identifying traces of explosive substances in material collected from the site of an explosion and revealed on a suspect has special significance. The results of this type of analysis may provide helpful information in the reconstruction of the course of an event and in establishing the perpetrator. Such analysis allows us to ascertain, for example:

- whether the collected material is an explosive substance;

- what type of substance it is and what its probable source is;
- what substance was used to cause the explosion (on the basis of analysis of samples originating from the scene of the explosion);
- whether in the samples originating from the scene of the explosion (e.g. soil, concrete, wood, revealed elements of the explosive device and residues of explosive charge) and samples collected on suspects there are traces of explosives, and if so, whether they are traces of the same kind of substance (evidence indicating a link between the suspect and the crime).

Analysis of explosive substances also lies within the sphere of interest of laboratories dealing with environmental protection and monitoring, since many explosives are toxic, mutagenic and carcinogenic [15, 27, 32, 38, 43, 46, 47, 48]. Formerly out-of-date (not fulfilling standards) ammunition and explosive substances were disposed of by burying them in the ground or dumping them in the sea. Insufficiently treated liquid waste from factories producing explosive substances was released directly into rivers and streams. In effect, the environment was contaminated. In order to assess the dimensions of the problem and the threat linked to it and also to undertake appropriate remedial measures, it has been essential to monitor the concentration of explosive substances in air, water, soil and plant material [11, 15, 18, 21, 28, 32, 37, 48].

Detecting and determining explosive substances is a complex problem. This is above all due to the large number of compounds and mixtures which can be used to cause an explosion. In the specialist literature, about 20 compounds are mentioned that are most frequently applied in the role of primary explosives and about 30 compounds which are used as secondary explosives (boosters and main charges). Amongst organic explosives there are various types, including: nitroaromatic compounds, e.g. TNT* (2,4,6-trinitrotoluene), tetryl (2,4,6-trinitrophenyl-N-methylnitramine), esters of nitric acid, e.g. nitroglycerine, EGDN (ethylene glycol dinitrate), PETN (pentaerythritol tetranitrate), nitroamines, e.g. hexogen (cyclotrimethylenetrinitramine), octogen (cyclotetramethylene-tetranitramine) and peroxides, e.g. HMTD (hexamethylene triperoxide diamine), TATP (triacetone triperoxide).

The fact that makes it more difficult to detect and identify organic explosives is that usually in samples there are only traces of analytes, dispersed in a complex matrix, containing numerous interfering compounds. The techniques used most frequently to separate and identify compounds isolated from a sample are gas and liquid chromatography. A factor having key significance for the success of the whole analytical process is an appropriate preparation of samples, allowing isolation of the analysed compounds from the matrix and their concentration.

2. A review of methods of preparing samples

Methods of samples preparation for chromatographic analysis for the presence of explosives differ de-

pending on the material (matrix) from which the analytes have to be separated:

The matrices can be classified as follows:

- explosive materials i.e. mixtures of explosive compounds and substances (additives) that give them defined use properties;
- gases (e.g. air);
- liquids (e.g. water, liquid waste);
- loose, semi-fluid and slimy materials (e.g. soil, sediments);
- surfaces, both non-absorptive (e.g. large fragments of an explosive device found at the scene of the explosion, surfaces of furniture that could have been in contact with illegally possessed explosive materials) and porous materials (e.g. clothes collected from a suspect);
- human and animal tissues, as well as fragments of plants.

The method of samples preparation also depends on whether the aim of the analysis is only detection of traces of explosive substances (qualitative analysis), or their determination as well (quantitative analysis).

The most frequently applied techniques in preparing samples for analysis for explosive substances are:

1. Liquid extraction:
 - the classical version,
 - single drop microextraction (SDME);
2. Solid phase extraction (SPE):
 - the classical version,
 - solid phase extraction on microcolumns;
3. Solid phase microextraction (SPME).

2.1. Liquid-liquid extraction

In the classical version [51], the sample is placed in a vessel to which the solvent is being added. The content is later sonicated, shaken or is intensively mixed, in order to increase the speed of passing of the analysed compounds into the solvent phase. Then the extract is separated from the phase primarily constituting the matrix of the sample and is subjected to further stages of the analytical process.

The advantages of the method are its being simple and the possibility of isolating almost all (over 99.9%) analysed compounds from the matrix if it is correctly performed.

Its drawbacks are the following:

- the analytical process is very laborious and time-consuming;
- the obtained extract often requires additional purification and concentration. The concentration is usually achieved by evaporation of the solvent. There may, however, be negative results of evapo-

* Abbreviations and specialist terms used in the text are listed in the Appendix 1.

ration: loss of volatile analytes, decomposition of thermolabile compounds, and an increase of concentration of the interfering compounds;

- complicated operations carried out on the sample that can result in contamination;
- the necessity of using significant amounts of organic solvents.

2.2. Single drop microextraction (SDME)

A recently introduced modification of the liquid extraction method is a single drop microextraction (SDME) [19, 22, 25, 33, 34]. It is a technique of analysis of aqueous samples, whereby the needle of a microsyringe with a drop of organic solvent on the tip is immersed in the sample. Organic compounds contained in the aqueous sample pass into the organic phase. After an appropriately long time, a drop of solvent is sucked into the syringe and the compounds dissolved in it are analysed, for example, with gas chromatography.

2.3. Solid phase extraction (SPE)

The solid phase extraction method is used to selectively concentrate the analytes dispersed in the liquid phase. The liquid under its own weight or as a result of an applied vacuum passes through the column filled with the appropriate adsorbent. Molecules of the analyte are selectively bounded. After filtering of the whole sample, a small amount of the appropriate solvent is dispensed onto the top of the column, as a result of which bounded molecules are desorbed and leave the column in the form of a concentrated solution in the applied solvent. The solution is then subjected to further stages of the analytical process. The described method may be used to isolate non-polar compounds from a polar matrix as well as polar compounds from a non-polar matrix.

Normally columns applied in SPE have a diameter of several millimetres and bed of stationary phase of several centimetres height. Increasingly frequently, however, SPE is performed in the micro scale, applying columns of diameter less than 1 millimetre and height of deposit of about 1.5 mm. Such a change allows one to analyse samples of small volume and on-line linking of SPE with apparatus serving to separate and identify analytes (e.g. HPLC, CE).

2.4. Solid phase microextraction (SPME)

Solid phase microextraction was introduced at the end of the nineteen eighties by Pawliszyn and collabo-

rators [1, 4]. It is a method of preparation of samples for analysis based on the selective adsorption of the analysed compounds directly from samples (gas or liquid samples) or from the headspace of samples (liquid, semi-liquid and solid samples).

The fundamental element of an apparatus used for SPME is a layer of adsorbent deposited on a silica fibre. The fibre is attached to a thin metal wire that is a part of apparatus similar in construction to a syringe. By moving the piston one moves the wire, exposing the fibre (during adsorption/desorption) or concealing it inside the needle (during other operations).

Isolation from the matrix and concentration of the analysed compounds is carried out in such a way that the exposed fibre is placed in the analysed medium for the time necessary to establish a balance between particles in the medium and particles bounded with the adsorbent. In the next the adsorbed particles are desorbed (most frequently thermally) and subjected to further stages of the process of analysis, i.e. separation, detection and identification.

The SPME method is becoming increasingly popular due its advantages, including:

- a small amount of sample that is needed for analysis;
- the speed of preparation of sample;
- simplicity of the process and appliances;
- limited influence of the interfering compounds due to selectivity of the method;
- the process of isolation and concentration can be carried out without the use of organic solvents;
- the adsorbent can be re-used.

3. A review of the analytical procedures applied in various laboratories

3.1. Analysis of “pure” explosive materials

Explosive materials, both military and civilian, usually consist of explosive compounds, additives, which give them the appropriate use properties (stabilisers, plasticisers) and additives influencing the explosive properties, e.g. temperature of explosion and oxygen balance. Group identification of pure explosive material can be carried out on the basis of results of microscopic examinations, analysis with use of IR, Raman, SEM-EDX or XRF spectrometry. If there is a need to carry out chromatographic analysis, preparation of samples usually consists in dissolving them and possibly removing solid particles. This procedure is fairly obvious and is thus rarely described in detail in publications.

T. Burns and R. Lewis in a publication concerning analysis of nitroglycerine based explosives by GC-MS [7], describe a method of samples preparation which is as follows: a weighed portion of explosive substance is dissolved in acetone with the use of an ultrasonic bath. The solution obtained in this way is filtered and analysed chromatographically.

3.2. Analysis of air

Analysis of samples of air for the presence of explosive substances is linked with the following issues:

- searching for explosives hidden in luggage, mail, vehicles, airplanes and clothes of passengers;
- searching the scene of an explosion aimed at finding objects on which traces of explosives remained, to secure them for further analysis in the laboratory;
- examination of areas suspected of being contaminated by toxic explosive substances and products of their decomposition with the aim of confirming these suspicions and, if need be, undertaking actions aimed at preventing poisoning of persons and animals;
- detecting land mines. Minefields, remaining after armed conflicts, constitute a threat even many years after the end of a conflict, which is why detection of buried mines is an especially significant issue.

Explosive compounds can be present in the gaseous phase in the form of vapours or as dust particles. In the latter case, particles of dust may be particles of the explosive substance or particles of other materials on which the explosive substances are adsorbed.

Collection of samples and concentration of analytes is usually carried out in such a way that a defined volume of gas is sucked in and passes through a filter/adsorbent, on which organic compounds are collected, including the explosive compounds. The next stage is thermodesorption/evaporation of the collected compounds, which then pass directly to the detector (MS-MS, IMS) or are separated chromatographically and then pass to the appropriate detector – electron capture detector (ECD) or chemoluminescence detector (TEA). Gates at airports serving to detect passengers who have had contact with explosive materials act on this basis [12, 45, 46].

The possibility of detecting an explosive substance by analysis of the gaseous phase depends on the pressure of its vapours. The most frequently applied commercial explosive substances can, in terms of the vapours pressure, be arranged in decreasing order as follows: ethylene glycol dinitrate (EGDN), glyceryl trini-

trate (NG), 2,4,6- trinitrotoluene (TNT), 1,3,5 trinitro-1,3,5,7-triazocyclohexane (RDX), 2,4,6-trinitro-phenyl-N-methylnitramine (tetryl), pentaerythritol tetranitrate (PETN), octahydro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5,7-tetrazine (HMX) [45]. Plastic explosive materials have a significantly lower pressure of vapours of explosive substances than if they were in the pure form.

R. Battle et al. [3] describe a procedure of analysis of nitroaromatic compounds in which the analysed air is pumped with a defined speed and for a defined time through a personal sampler containing polyurethane foam fulfilling the role of an adsorbent. This foam is then placed in the desorption cell of a supercritical fluid extraction system, coupled with HPLC. After extraction by CO₂ in the supercritical phase, analytes are re-adsorbed on a charcoal adsorbent, from which they are next desorbed by the HPLC mobile phase and transferred onto a column. These types of procedures seem to be especially useful for defining exposure of employees to vapours of explosive materials.

Triacetone triperoxide (TATP) is an explosive substance, which, due to its high sensitivity and instability has not been applied commercially, but is synthesised by home-grown “experimenters” and used by terrorists. A particular feature of this substance is its high volatility, due to which the headspace analysis method can be used for its detection.

R. Schulte-Ladbeck i U. Karst [36] worked out a procedure for isolation of TATP from samples of solid materials. In accordance with the mentioned procedure, air from above the studied sample is sucked in and passed through two joined in line bubbling washers containing acetonitrile. Volatile organic compounds, including TATP dissolve in acetonitrile. The solution obtained in this way was analysed by the HPLC. The authors assessed that the developed method could be applied to analysis of material from the site of an explosion and also for collecting of samples directly at the site of the incident.

A. Stambouli et al. [39] successfully used direct (heated) headspace analysis to detect TATP in real post-explosion samples. Samples were placed in airtight glass containers which were heated at a temperature of 90°C for 30 min and then with the aid of a gas syringe, 1 ml of headspace phase was collected and analysed using GC-MS.

3.3. Analysis of liquid samples

Analyses of aqueous samples for the presence of explosives and their derivatives are usually environmental analyses and are linked with the toxicity of these compounds. The sources of pollution are remains

of liquid waste formerly dumped directly into rivers, ammunition dumped in the seas and contaminated soil. Explosive compounds, initially polluting the soil, can dissolve and together with rain water penetrate into deeper layers to the ground water level and move around, polluting local water reservoirs, streams, rivers and water intakes [27, 32].

Since pollution of water by explosive substances is usually at the trace level, the stage of concentration of analytes has decisive significance for the success of the analytical process. The procedures of preparation of water samples differs depending on whether the analysis is quantitative or qualitative. In the former case, the priority is accuracy and precision [50, 51]. In the latter case, the aim is to achieve the lowest limit of detection, while keeping the procedure of samples preparation as simple, fast and inexpensive as possible [14, 15, 26, 28, 29, 30, 34, 37, 43, 50, 51].

A review of the literature from the last several years shows that the most frequently applied methods of concentrating analytes and isolating them from a matrix are solid phase extraction (SPE) methods – either the classical version [15, 28, 30] or with application of microcolumns [26, 34, 37] – and solid phase microextraction (SPME) [14, 29, 30]. Liquid-liquid extraction is applied rarely – it may take the traditional form [50] or the form of extraction with use of a reduced quantity of organic solvent [43] and single-drop microextraction (SDME) [34].

In some cases analysis of samples is possible without isolation and concentration of analytes. A precondition of this is that the concentration of analytes should be higher than the limit of detection of the method and the influence of interfering compounds should be insignificant.

A. Himli et al. [21] describe a method of analysis of samples of ground waters by the liquid chromatography method with amperometric detection. Preparation of the sample is limited to filtering off the suspended particles. The authors consider that the method proposed by them is appropriate for analysis of samples of ground waters, and the limit of detection for nitroaromatic compounds and nitroamines is of the order of ppb.

In accordance with the EPA 8332 [51] method of determination of nitroglycerine in aqueous samples (liquid waste, groundwater and surface water samples) using HPLC, the sample is prepared for analysis by diluting it with acetonitrile in the ratio 1:1 and, if necessary, filtering. The necessity of diluting a sample with acetonitrile results from the fact that the mobile phase is 60% aqueous acetonitrile solution.

Norm EPA 8330A describes a method of determining nitroaromatic compounds and nitroamines in sam-

ples of water, soil and sediments by HPLC [50]. In accordance with this method, samples of water can be prepared in 3 different ways depending on the level of concentration of analytes and available equipment.

Samples with a high concentration of analytes are diluted with methanol 1:1 by volume (the mobile phase in HPLC is a mixture of water and methanol 1:1 (v:v)) and filtered off to separate out suspended particles. After that samples are analysed chromatographically.

Aqueous samples containing trace amounts of analytes are prepared for analysis, applying the method of salting-out solvent extraction. Solvent extraction is carried out with the use of acetonitrile. In the analysed aqueous sample, a defined amount of sodium chloride is dissolved, after which acetonitrile is added and then the entirety is intensively mixed. The greater part of acetonitrile is dissolved in the aqueous phase. The small amount of organic phase left above the aqueous solution is transferred to another vessel, and a successive portion of acetonitrile is introduced into the sample and extraction is performed again. The obtained extracts are mixed, added to a defined volume of aqueous sodium chloride solution and intensively mixed. Part of the acetonitrile dissolves in the aqueous saline solution and the small amount of concentrated organic extract remaining above the solution is separated from the aqueous phase and, after diluting with water 1:1 by volume, analysed chromatographically.

T. Welsh i H. Block [43] present a method of preparing aqueous samples for chromatographic analysis which they call “multiple micro-liquid micro-extraction”. This consists in carrying out liquid extraction with salting out of the analytes and concentrating the extract by evaporation. Thanks to application of suitable laboratory glassware, the authors were able to limit the volume of the necessary water sample to 50 cm³ and the amount of solvent to 750 µl per extraction. A defined amount of sodium chloride is added to the analysed sample and extraction is carried out in turn with four doses of solvent. The obtained extracts are mixed together, concentrated by evaporation and the obtained solution is subjected to analysis.

E. Psillakis and N. Kalogerakis [33, 34] used the single-drop microextraction method described above to isolate and concentrate nitroaromatic explosives from aqueous solutions. Analysis was carried out with the help of a 10 µl microsyringe, containing 1 µl of toluene. The needle of the syringe was introduced into the analysed aqueous solution. By pressing the piston, a droplet of toluene was displayed in such a way that it hung in the aqueous phase attached to the end of

the needle. The analysed sample was mixed with the help of a magnetic stirrer at a rate of 400 revolutions per minute. After 15 min, the droplet was sucked into the syringe and analysed by the GC-MS method.

Solid phase extraction (SPE) is a method which, to a significant extent, has replaced solvent extraction in the preparation of aqueous samples. SPE in turn, in recent years has been dislodged by solid phase microextraction (SPME).

Norms EPA 8330A [50] and EPA 3535A [49] describe application of SPE as one of the methods, which can be used for preparing aqueous samples for determining nitroaromatic compounds and nitroamines by the HPLC method.

In accordance with the mentioned procedures, a sample of water should be placed into a container of volume corresponding to the volume of the sample which is to be analysed. It should be completely filled to make the volume of the headspace as small as possible. Internal standards should be introduced into the container, into which the sample has been placed, and then mixed with the sample.

Extraction can be carried out on Empore™ DSB-RPS discs and their equivalents or on SPE columns filled with Poropak R adsorbent or its equivalent. If discs are used for concentrating, in addition to internal standards, 5 cm³ of methanol should also be added to the sample. Pure water, of volume corresponding to the volume of the samples, is used as a blank sample and it is analysed according to the same procedure as real samples (add internal standards etc). After proper conditioning of the adsorbent the sample is introduced onto the disc/column and filtered with application of a vacuum. In the case of both columns and discs, the adsorbed analytes are eluted with acetonitrile.

As part of studies aimed at defining what amount of explosive materials remain in an unreacted form after an explosion, A. Hewitt et al. [20] carried out experiments consisting in detonation of explosive charges on snow. From places close to the crater, where black soot plumes were visible, a surface layer of snow was collected and packed into plastic bags. Water samples obtained after the melting of the snow were filtered. Explosive compounds present in the filtrate were isolated and concentrated by applying solid phase extraction on (SPE) on Waters Poropak RDX Columns. The adsorbed compounds were eluted with acetonitrile. The filters together with the solid particles deposited on them were subjected to solvent extraction with acetonitrile. Extraction was carried out with the help of Soxhlet's apparatus or by shaking out. The obtained eluates and extracts were analysed using GC-ECD and HPLC.

In the procedure for analysis of aqueous samples described by P. Gates et al. [15], nitroaromatic compounds are separated from the sample and concentrated using solid phase extraction on SPE columns with polymer adsorbent (polystyrene – divinylbenzene).

R. Marple and W. LaCourse [28] describe a procedure of analysis of aqueous samples for explosive substances with application of SPE coupled directly with HPLC, with electrochemical detection. The analysed compounds are concentrated on an SPE column with a C18 stationary phase (4.6 mm × 75 mm, size of grains 5 μm) and separated on an HPLC column with stationary phase C18 (46 mm × 250 mm, size of grains 5 μm). The apparatus is to a large extent, automated and the stage of isolating and concentrating analytes is as follows: the sample, introduced with the help of valve with injection loop is transported and pumped through an SPE column by the mobile phase, which constitutes 7.5% methanol in aqueous solution of sodium chloride (0.5 M) and sodium acetate trihydrate (20 mM). After transferring the sample onto bed of adsorbent, the adsorbent is rinsed by the mobile phase with the aim of washing out interfering compounds. By an appropriate change in the position of valves/outlet valves the regular mobile phase is introduced onto the SPE column (50% methanol in 20 mM water solution of acetate buffer), desorption of analytes takes place and they are transported onto the chromatographic column where they are separated.

Q. Lu et al. [26] applied solid phase extraction on a microcolumn for preparation of samples of sea water for analysis by capillary electrophoresis on a glass microchip. A teflon microcolumn of internal diameter 0.8 mm was applied, containing 1 mg of Lichrolut adsorbent. The column was conditioned by rinsing with 10cm³ methanol and 20 cm³ deionised water, successively. Samples of volume 40 cm³ were pumped through the column with a speed of 3 cm³/min, and then the adsorbent was rinsed with 5 cm³ of water. The remains of the water were removed by pumping air through the adsorbent's bed at a rate of 5 cm³/min. The adsorbed compounds were desorbed with 17 l of acetonitrile and analysed by the capillary electrophoresis method.

M. Smith et al. [37] in a study that was a continuation of earlier research [26] describe apparatus enabling semi-automatic solid phase extraction on microcolumns in field conditions and also the procedure of extraction of explosive compounds and their derivatives from aqueous solutions. The analysed compounds were: RDX; 1,3,5-TNB; TNT; 2,4-DNT; *o*-NT; *p*-NT and *m*-NT. Samples of sea water, well

water and river water were analysed. Microcolumns made from teflon tubes of internal diameter 0.75 mm filled with an appropriate adsorbent over a length of 1 cm were applied. The ends were secured with a nylon mesh in order to prevent movement of grains of the adsorbent. As part of preliminary studies, two types of adsorbent were compared – LiChrolut EN and Poropak R. LiChrolut EN turned out to be better due to its greater sorptive capacity and was applied in further studies.

The developed procedure of extraction is as follows: an aqueous sample of volume 20 ml is pumped through the adsorbent's bed at a rate of 3 ml/min. The adsorbent and joining tubes are then rinsed with water (volume 2.5 ml, flow rate 5 ml/min). The remains of the water are removed from the deposit by pumping air (volume 10 ml) through. The next stage is desorption of analytes by acetonitrile. Acetonitrile is pumped at a flow rate (300 l/min) through the column, and 5 l of eluate is collected in a small glass vial. The last stage is conditioning the adsorbent's bed by rinsing with 1.5 ml acetonitrile and 2.5 ml of air, successively. After finishing the described cycle, the apparatus is immediately ready for the next use.

F. Monteil-Rivera et al. [29] compared SPME and SPE techniques in their application to preparation of water samples for determination of traces of explosive substances by the HPLC-UV method. HMX, RDX, 1,2,5-trinitrobenzene, 1,3-dinitrobenzene, tetryl, 3,4-dinitrotoluene, TNT, 4-amino-2,6-dinitrotoluene and 2,4-dinitrotoluene were analysed. SPME was carried out by complete immersion of a fibre in samples of volume 25–35 cm³, after previous addition of an appropriate amount of NaCl to all of them. Optimisation studies encompassed the type of fibre, the concentration of NaCl, the speed of stirring of the sample during adsorption and also the duration of adsorption and desorption. It was established that the most suitable are the following: a fibre covered by carbowax/templated resin phase, concentration of NaCl 30% w/v, the greatest possible stirring rate during adsorption, duration of adsorption 30 min, duration of desorption 5 min (using an SPME/HPLC interface). The obtained results were compared with results obtained for the SPE method. In the SPE method samples of volume 500 cm³ and Poropak Rdx Sep-Pak adsorption columns were applied. The concentration stage was conducted in accordance with the EPA 3535A procedure described earlier [49]. A comparison of SPE and SPME methods showed that the limit of detection for SPME is about 10 times lower (better) than for SPE; however, the advantages of SPME are: small volume of sample needed for analysis, excellent accuracy and precision and,

above all, the time of preparation of the sample is about 5 times shorter than for SPE.

In a continuation of the above mentioned studies, F. Monteil-Rivera et al. [30] compared SPE and SPME methods in their application to preparation of samples of water and sediments for analysis by the GC-ECD method. 4-ADNT; 2-ADNT; 2,6-DNT; 2,4-DNT; TNB; 1,3-DNB; TNT; RDX and tetryl were analysed. Optimisation studies concerning SPME encompassed type of fibre, time of adsorption, concentration of NaCl and temperature of desorption. It was ascertained that the most appropriate are the following analytical conditions: a fibre covered with carbowax/divinylbenzene phase, duration of adsorption – 60 min, concentration of NaCl – 30% w/v and temperature of desorption – 225°C.

Solid phase extraction was carried out on Poropak Rdx Sep-Pak columns. Samples of volume 500 ml were used. The process was carried out in accordance with norm EPA 3535A.

The precision of analyses performed with the use of SPE and SPME methods was similar. The limit of detection was lower (better) for SPE, especially for RDX, 1,3-DNT and TNB. The advantages of the SPME method in comparison with SPE are the following: a small volume of samples required to carry out analysis, the use of organic solvents is not required and time of analysis with the use of SPME is about 5 times shorter than for application of SPE.

In a paper from 1999, K. Furton et al. [14] present procedures of preparation of aqueous samples for GC-ECD and HPLC analysis with isolation and concentration of analytes by SPME technique. The presented procedures differ in the type of the phase applied in SPME, which is linked to different mechanisms of desorption. The analysed aqueous samples were prepared by dissolving small amounts of acetonitrile solutions of explosive substances in water. Extraction with salting out was carried out. The authors ascertained that when preparing samples for GC analysis (thermo-desorption), CW/DVB is the best adsorbent, whereas in the case of solvent desorption with a mixture of methanol and water (HPLC analysis), CW/TPR phase is best. The performed studies showed that the effectiveness of SPME increases with a drop in the value of the ratio of acetonitrile/water and with an increase in the value of the ratio of NaCl/water. In GC analysis, desorption at a temperature of 220°C was applied. In analysis with use of HPLC the adsorbed compounds were desorbed with solvent by immersing the fibre in 200 l of a mixture of methanol:water (1:1) for 2 min (an appropriate SPME/HPLC interface was applied).

G. Ozhan et al. [31] described a method of preparation of samples of human plasma for HPLC analysis for the presence of RDX. The plasma was deproteinised by addition of methanol (1:9 v/v). The denatured protein was separated by centrifuging, and the supernatant was evaporated to half of its initial volume in a stream of nitrogen. The sample was then filtered by an appropriately conditioned Tox-clean SPE column. The adsorbed compounds were eluted with methanol. The eluate was evaporated in a stream of nitrogen at a temperature of 40°C. The dry remains were dissolved in mobile phase (35% acetonitrile:65% water, v/v) and analysed chromatographically.

3.4. Porous samples – soil, sediments and plant tissues

Materials such as soil sediments constitute a matrix in which it is particularly difficult to determine explosive substances. Development of one optimum procedure is difficult due to the diversity of samples. The term “soil” is used to describe materials as varied, in terms of chemical and physical properties, as sandy soil and humus, which is composed of almost 100% organic material. An additional obstacle is the diversified content of the skeletal fraction (gravel, stones). Insoluble, organic and inorganic components of soil or sediments may adsorb components of explosive substances, whilst soluble compounds may mask their presence and interfere with their determination. For these reasons, the stage of preparation of the samples for analysis (separating from the matrix and concentration of analytes) has particular significance. In papers published before 2000, the most frequently described method of preparing samples of porous materials for chromatographic analysis was solvent extraction. This method, although simple and, if applied appropriately, effective, has two fundamental flaws. The first is that the analytes are diluted in extract which concentration is difficult – volatile analytes (dinitroglycol, nitroglycerine) may evaporate with the solvent, and unstable compounds may decompose. The second drawback is the non-selectivity of solvent extraction – besides the analytes, numerous interfering compounds are also extracted from the sample, making it difficult or even impossible to detect/determine the analysed compounds. Because of that, in newer publications in the procedure for preparing samples, there is an additional stage, aiming at selective concentration of analytes isolated from the sample by means of extraction. Usually SPME is used for this purpose.

Procedures for solvent extraction of explosive compounds from soil being applied in many laborato-

ries are, to a greater or lesser extent, based on the procedure in norm EPA 8330A [9, 17, 35, 40, 41, 42, 50]. This procedure is as follows: a sample of soil dried at room temperature is crushed in a mortar and sieved through a 30 mesh sieve. 2 g of the obtained material is then placed in a glass vial with a teflon stopper, 10 ml acetonitrile is added, the vial is closed, and the contents are mixed for a minute, then the vial is placed for 18 hours in a cooled ultrasonic bath. After finishing extraction, the sample is left for 30 min, after that 5 ml of supernatant is collected and flocculation and filtration are carried out – the extract is mixed with 5 ml of calcium chloride solution ($c = 5 \text{ g/dm}^3$) and filtered using a 0.45 μm teflon syringe filter. The extract prepared in such a way is analysed by the HPLC method.

R. Booparty et al. [5] published a paper concerning biotransformation of explosive substances in aqueous suspensions of soil. Samples were prepared for the chromatographic analysis (HPLC) in the following way: acetonitrile (v:v 1:1) was added to a analysed suspension of soil, the sample was shaken for a minute and centrifuged. The obtained supernatant was filtered and the filtrate was subjected to analysis.

C. Williford and R. Bricka [44] conducted research, in order to develop a procedure of extraction of TNT from elements of soil, of size in the range 1.2–1.9 cm (gravel). Methods involving extraction in an ultrasonic bath and extraction with the use of Soxhlet’s apparatus were compared. Acetonitrile was used as a solvent in both methods.

After preliminary optimisation studies, the following procedure was adopted: extraction with the use of Soxhlet’s apparatus: 10–12 grains (ok. 40 g) were placed in an extraction thimble and extracted for 6 hours with 175 ml of solvent. Extraction with the use of ultrasonic bath: approx 50 g of grains and 250 ml of solvent were placed in an appropriate container and extraction was performed for 18 hours. After this time the extract was separated, the second portion of solvent was added and the extraction was carried out for another 4 hours. After extraction both portions of extract were mixed. Extracts obtained with each of the methods were prepared and analysed with the use of HPLC in accordance with norm EPA 8330.

The results of studies presented in the publication can be summarised as follows: extraction with use of Soxhlet’s apparatus is faster and is linked to less use of solvent (a greater concentration of the analyte is obtained in the extract), but its application is limited to smaller grains (up to 2.5 cm) due to the limited size of the apparatus. Extraction with the use of ultrasonic bath lasts significantly longer and requires using

a greater amount of solvent, but it can be applied to grains of size up to 5 cm.

A. Himli et al. [21] in their publication described a very simple procedure which they used for preparation of samples of soil for analysis HPLC. A sample of soil was placed in an appropriate container and mixed with acetonitrile (10 ml per 1 g of soil), shaken out for 30 min and centrifuged, and the obtained supernatant was subjected to the chromatographic analysis.

C. Bowerbank et al. [6] carried out research concerning application of solvating gas chromatography (SGC) to the analysis of explosive substances. They analysed samples of soil prepared in the following way: acetonitrile was added to the studied sample, extraction was carried out with the use of an ultrasonic bath for 15 min, the obtained suspension was put aside for sedimentation, and the supernatant obtained in this way was analysed.

In 2000, K. Furton et al. [13, 14] published a description of a procedure for preparing samples of soil collected from the site of explosion for chromatographic analysis (gas chromatography with electron capture detector (GC-ECD) and high performance liquid chromatography (HPLC)), in which, apart from solvent extraction they applied solid phase microextraction (SPME). The procedure is as follows: to the sample of soil the solvent (acetonitrile) is added, sample is shaken out manually for 15 min, put aside for sedimentation, decanted and the obtained supernatant is filtered. The obtained extract is diluted with 25% aqueous NaCl solution in a volume ratio of 1:100 and analytes are isolated by the SPME method. Adsorption is carried out on two types of SPME fibres: CW/DVB (Carbowax/polyethylene glycol/polydivinylbenzene) and CW/TPR (Carbowax/polyethylene glycol/template polydivinylbenzene resin). The first of the mentioned fibres was applied in analysis with gas chromatography and the second with high performance liquid chromatography. The necessity of applying various fibres results from various mechanisms of desorption of analytes. In the case of gas chromatography, compounds are thermodesorbed in modified GC injector. In the case of HPLC analysis, compounds are desorbed by solvent using the appropriate desorption chamber coupled with a chromatograph.

S. Calderara et al. in their article [9] compared two methods of preparing post-explosion debris (small pieces of plastic) for GC-ECD analysis. In the case of the first method fragments of plastic were subjected to solvent extraction with acetone. In the second one the extraction was carried out with water and adsorption of analytes from the aqueous phase by means of SPME method, with use of PDMS/DVB (polydimethylsil-

oxane/divinylbenzene) fibre. Better results were obtained using the SPME technique.

The aims of the studies carried out by F. Monteil-Rivera et al. [29] were optimisation of parameters of the SPME process, application of this technique to analysis of explosive substances in samples of sediment from the sea floor and comparison of the obtained results with results with these gained using solvent extraction alone. Samples of sediment, to which a standard mixture of explosive compounds was introduced, were extracted with acetonitrile in accordance with norm EPA 8330, but with a modification, i.e. application of a smaller amount of solvent relative to the mass of the sample than stated in the norm. The obtained extract was divided – a part was used for direct analysis with application of GC-ECD, and another part was used for extraction by the SPME method. The optimised method of carrying out SPME extraction is as follows: the acetonitrile extract is evaporated to dryness in a stream of nitrogen, and the remains are dissolved in 30% aqueous NaCl solution. A vial containing the solution prepared in this way is placed on a magnetic stirrer (990 revolutions per min), a CW/DVB fibre is immersed and adsorption is carried out for an hour at room temperature. The adsorbed compounds are desorbed in a chromatograph injector and analysed with ECD method.

After carrying out analyses, it was ascertained that detection of the explosive compounds (that had been introduced into the sediment) in the extract obtained in accordance with EPA 83.30 norm is impossible, due to the presence of interfering compounds. Application of the SPME technique improved the selectivity of the whole analytical process, so it became possible to detect the introduced compounds.

The necessity of determining explosive compounds in plant material is linked with their toxicity for people and animals. Some explosive compounds exhibit a capacity for bioaccumulation, thus their concentration in plants is significantly greater than in the soil in which the plants grow [17, 18]. This phenomenon has two significant consequences. The first of these is that plants growing on earth with a relatively low level of pollution can turn out to be toxic for humans and animals and cannot be used for production of food or fodder. The second consequence is the possibility of using defined plants for recultivation of polluted areas – compounds taken up from the soil by the plants, concentrated and bound in their tissues can be relatively easily removed – the parts of the plant above the earth can be harvested, dried and burned.

S. Harvey et al. [18] developed a method of isolating TNT and RDX from plant material, which is

described here (in simplified form): plant tissues, after freeze-drying are subjected to acid hydrolysis (HCl) and the obtained hydrolysate is subjected to solvent extraction with use of ethyl acetate. The extract is evaporated to dryness and the remains are dissolved in dichloromethane. The obtained solution is introduced onto an SPE column (Florisil Sep-Pak) and the analytes are eluted: TNT using dichloromethane with an addition of ethyl acetate, and RDX using dichloromethane with an addition of acetonitrile. The obtained solutions are analysed with HPLC.

S. Larson et al. [24] used a modified procedure of analysis of soil described in norm EPA 8330 to isolate explosive compounds from plant tissues. The obtained extracts were analysed by HPLC method. In order to remove a possible contamination present on the surface, plant elements were washed three times by immersion in distilled water, followed by drying of the surface with a paper towel. The plants were weighed and cut into pieces not bigger than 1 cm, placed in a chamber cooled to a temperature lower than 5°C and homogenised. The material obtained in this way was divided into analytical samples and freeze-dried. Samples prepared in this way were then subjected to the procedure according to norm EPA, with the difference that a mixture of water and acetonitrile in the volume ratio of 30:70 was used for extraction instead of pure acetonitrile. This divergence from EPA procedure results from studies carried out by the authors which showed that the concentration of the determined compounds is significantly higher in an extract obtained using a mixture of acetonitrile and water than when using acetonitrile alone.

C. Groom et al. [16] used a method developed on the basis of Larson's method [24] to extract RDX, HMX and their metabolites from plant tissues. Cut plant tissues were homogenised in a cooled chamber, freeze-dried and extracted with acetonitrile using an ultrasonic bath for 18 hours. The samples were then centrifuged, the supernatant was separated by decantation, and then diluted with water in the volume ratio of 1:1, filtered and analysed applying HPLC as well as capillary electrophoresis (CE).

In another paper of these authors, A. Halasz et al. [17] a comparison of the above described method of solvent extraction of explosive compounds from plant tissues [16] with extraction carried out with the use of CO₂ in a supercritical state (SC-CO₂) was performed. Extraction was carried out in such a way that the freeze-dried plant tissues, mixed with inert sand playing the role of a filler, were placed in an extraction cell of supercritical fluid extractor (Dionex SFE 703).

CO₂ in a supercritical state flows through the extraction cell. The pressure of the liquid with the extracted compounds after passing through the restrictor gradually decreases, the carbon dioxide goes into gaseous form and the extracted compounds remain in vials containing a small amount of acetonitrile. Extraction was also carried out using a small (4–5%) admixture of acetonitrile or water as a modifier of the supercritical fluid. The modifiers were added to CO₂ and/or introduced into the extracted material. In the discussion of the results of the compared methods of extraction, the authors expressed their favourable opinion on the extraction by supercritical fluid, indicating that it is ten times faster than extraction with the use of ultrasonic bath; carbon dioxide is non-toxic; in the supercritical fluid easily penetrates the extracted material and the process of extraction is conducted at a low temperature, which prevents thermal decomposition of thermally labile analytes. The results of HMX analysis obtained for 10 different plant tissues extracted with each of the compared methods are presented in the publication. They indicate, however, that solvent extraction is a more effective method than supercritical fluid extraction – higher coefficients of recovery are obtained.

4. Collecting samples from surfaces

Surfaces examined for the presence of traces of explosives can be divided into smooth, slightly absorptive and porous ones. Examples of the first category are surfaces of furniture, containers, packing, plastic and leather elements of cars and surfaces of metal sheets (e.g. advertisements, road signs etc located in the vicinity of a place where a detonation occurred). Examples of objects with large absorbing surfaces are parts of clothes, upholstery etc.

Although all laboratories dealing with analysis of explosives have a procedure for collecting samples from large surfaces, surprisingly few publications describe the exact procedure in detail. The information presented below is mainly based on personal communication with experts.

Samples from smooth surfaces are usually collected by swabbing with a tampon of clean, inert material (e.g. cellulose swabs, cellulose filter paper) moistened with the appropriate solvent (e.g. acetonitrile, methanol-water, ethanol-water).

Samples from textiles are collected with the aid of the appropriate appliances working like a vacuum cleaner. The particles present on the material are sucked in and separated out on the filter. The procedure for

the obtained tampons/filters is the same as for other solid materials, i.e. they are subjected to solvent extraction, the obtained extract is purified (usually by filtration or centrifuging), concentrated and analysed.

If the interfering compounds must be eliminated, an additional step – selective adsorption by the SPE or SPME method – is introduced.

In the case of an analysis of surfaces with mobile devices in field condition extraction can not be carried out because proper equipment is not available. In the case of analysing the surface of a body, clothes and luggage of passengers on the airports solvent extraction is also not an option because results of analysis must be known very quickly and extraction is a time consuming process. An alternative to solvent extraction is thermodesorption. Smooth surfaces are wiped with a dry filter and textiles are “vacuum-cleaned”. The filter is then placed in the appropriate chamber and heated, and the evaporated/desorbed organic compounds pass to a detector (e.g. IMS, MS/MS and TEA), either directly or after preliminary chromatographic separation (GC) [8, 45].

5. Summary

A review of procedures applied in various laboratories for preparing samples for analysis of explosives by chromatographic methods indicates the growing popularity of the SPME method. This is because it is a simple, quick and does not require use of organic solvents. Its biggest advantage is the possibility of simultaneous elimination of interfering compounds and concentration of analytes, through their selective adsorption. It can be applied to preparation of samples for analysis by means of both, GC and HPLC.

In the case of aqueous samples, the preparation procedure consists in diluting an appropriate amount of salt in the sample and immersing an SPME fibre in the continuously stirred sample for a defined time period. Salt is added to the samples, since hydration of ions introduced in this way facilitates adsorption of diluted organic compounds on the fibre phase (so called “salting-out” effect).

The majority of explosive compounds are characterised by low pressures of vapours and some of them are thermolabile. These features mean that they cannot be selectively concentrated by adsorption from the headspace because the pressure of their vapours is too low in a room temperature and increasing the pressure by heating the sample could cause decomposition of the analytes. For this reason, the first stage of preparation of solid samples is usually solvent extraction. Its

main drawback is that not only the analytes are extracted but also interfering compounds present in the sample, which presence may in some cases make the analysis impossible. Application of SPME as the second stage of preparation of a sample allows one to overcome these difficulties. A defined volume of organic extract is dissolved in aqueous solution of salt and analytes are adsorbed with use of SPME.

The increasing accessibility of the automated equipment for SPME-GC and also an intensive work on the automation and coupling of SPME and HPLC methods mean that it is likely that in time SPME will be even more often used in laboratories dealing with analysis of explosives.

References

1. Arthur C. L., Pawliszyn J., Solid-phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers, *Analytical Chemistry* 1990, 62, 2145–2148.
2. Barshick S., Griest W. H., Trace analysis of explosives in seawater using solid-phase microextraction and gas chromatography/ion trap mass spectrometry, *Analytical Chemistry* 1998, 70, 3015–3200.
3. Batlle R., Carlson H., Holmgren E. [et al.], On-line coupling of supercritical fluid extraction with high-performance liquid chromatography for the determination of explosives in vapour phases, *Journal of Chromatography A* 2002, 963, 73–82.
4. Berlardi R., Pawliszyn J., The application of chemically modified fused silica fibers in the extraction of organics from water matrix samples and their rapid transfer to capillary columns, *Water Pollution Research Journal of Canada* 1989, 24, 179–186.
5. Boopathy R., Manning J., Kulpa C. F., Biotransformation of explosives by anaerobic consortia in liquid culture and in soil slurry, *International Biodeterioration & Biodegradation* 1998, 41, 67–74.
6. Bowerbank C. R., Smith P. A., Fetterolf D. D., Solvating gas chromatography with chemiluminescence detection of nitroglycerine and other explosives, *Journal of Chromatography A* 2000, 902, 413–419.
7. Burns T. D., Lewis R. J., Analysis and characterisation of nitroglycerine-based explosives by gas chromatography-mass spectrometry, *Analytica Chimica Acta* 1995, 307, 89–95.
8. Buxton T. L., Harrington P. B., Rapid multivariate curve resolution applied to identification of explosives by ion mobility spectrometry, *Analytica Chimica Acta* 2001, 434, 269–282.
9. Calderara S., Gardbas D., Martinez F., Solid phase micro extraction coupled with on-column GC/ECD for the post-blast analysis of organic explosives, *Forensic Science International* 2003, 137, 6–12.

10. Clausen J., Robb J., Curry D. [et al.], A case study of contaminants on military ranges: Camp Edwards, Massachusetts, USA, *Environmental Pollution* 2004, 129, 13–21.
11. Darrach M. R., Ghutjian A., Plett G. A., Trace Explosives Signatures from World War II Unexploded Undersea Ordnance, *Environmental Science and Technology* 1998, 32, 1354.
12. Ewing R. G., Atkinson D. A., Eiceman G. A. [et al.], A critical review of ion mobility spectrometry for the detection of explosives and explosive related compounds, *Talanta* 2001, 54, 515–529.
13. Furton K. G., Almirall J. R., Bi M. [et al.], Application of solid-phase microextraction to the recovery of explosives and ignitable liquids residues from forensic specimens, *Journal of Chromatography A* 2000, 885, 419–432.
14. Furton K., G., Wu L., Almirall J. R., Optimization of solid phase microextraction (SPME) for the recovery of explosives from aqueous and post explosion debris followed by gas and liquid chromatographic analysis, *Journal of Forensic Sciences* 2000, 45, 857–864.
15. Gates P. M., Furlong E. T., Dorsey T. F. [et al.], Determination of nitroaromatic explosives and their degradation products in unsaturated-zone water samples by high-performance liquid chromatography with photodiode-array, mass spectrometric, and tandem mass spectrometric detection, *Trends in Analytical Chemistry* 1996, 15, 319–325.
16. Groom C. A., Beaudet S., Halasz A. [et al.], Detection of the cyclic nitramine explosives hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine (RDX) and octahydro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5,7-tetrazine (HMX) and their degradation products in soil environments, *Journal of Chromatography A* 2001, 909, 53–60.
17. Halasz A., Groom C., Zhou E. [et al.], Detection of explosives and their degradation products in soil environments, *Journal of Chromatography A* 2002, 963, 411–418.
18. Harvey S. D., Galloway H., Krupsha A., Trace analysis of military high explosives (2,4,6-trinitrotoluene and hexahydro-1,3,5-trinitro-triazine) in agricultural crops, *Journal of Chromatography A* 1997, 775, 17–24.
19. He Y., Lee H. K., Liquid-phase microextraction in a single drop of organic solvent by using a conventional microsyringe, *Analytical Chemistry* 1997, 69, 4634–4640.
20. Hewitt A. D., Jenkins T. F., Walsh M. E. [et al.], RDX and TNT residues from live-fire and blow-in-place detonations, *Chemosphere* 2005, 61, 888–894.
21. Hilmi A., Luong J. H. T., Nguyen S., Determination of explosives in soil and ground water by liquid chromatography – amperometric detection, *Journal of Chromatography A* 1998, 844, 97–110.
22. Jeannot, M. A., Cantwell F. F., Mass transfer characteristics of solvent extraction into a single drop at the tip of a syringe needle, *Analytical Chemistry* 1997, 69, 235–239.
23. Lang M., Burns S. E., Improvement of EPA method 8330: complete separation using a two-phase approach, *Journal of Chromatography A* 1999, 849, 381–388.
24. Larson S. L., Weiss C. A., Escalon B. L. [et al.], Increased extraction efficiency of acetone/water mixtures for explosives determination in plant tissues, *Chemosphere* 1999, 30, 2153–2162.
25. Liu H., Dasgupta P. K., Analytical chemistry in a drop solvent extraction in a microdrop, *Analytical Chemistry* 1996, 68, 1817–1821.
26. Lu Q., Collins G., Smith M. [et al.], Sensitive capillary electrophoresis microchip determination of trinitroaromatic explosives in nonaqueous electrolyte following solid phase extraction, *Analytica Chimica Acta* 2002, 469, 253–260.
27. Lynch J. C., Brannon J. M., Delfino J. J., Dissolution rates of three high explosive compounds: TNT, RDX and HMX, *Chemosphere* 2002, 47, 725–734.
28. Marple L., LaCourse W., A platform for on-site environmental analysis of explosives using high performance liquid chromatography with UV absorbance and photo-assisted electrochemical detection, *Talanta* 2005, 66, 581–590.
29. Monteil-Rivera F., Beaulieu C., Deschamps S. [et al.], Determination of explosives in environmental water samples by solid-phase microextraction-liquid chromatography, *Journal of Chromatography A* 2004, 1048, 213–221.
30. Monteil-Rivera F., Beaulieu C., Hawari J., Use of solid-phase microextraction/gas chromatography electron capture for the determination of energetic chemicals in marine samples, *Journal of Chromatography A* 2005, 1066, 177–187.
31. Ozhan G., Topuz S., Alpertunga B., Determination of cyclonite (RDX) in human plasma by high-performance liquid chromatography, *Il Farmaco* 2003, 58, 445–448.
32. Pennington J. C., Brannon J. M., Environmental fate of explosives, *Terrestrial Chemistry* 2002, 384, 163–172.
33. Psillakis E., Kalogerakis N., Application of solvent microextraction to the analysis of nitroaromatic explosives in water samples, *Journal of Chromatography A* 2001, 907, 211–219.
34. Psillakis E., Kalogerakis N., Solid-phase microextraction versus single-drop microextraction for the analysis of nitroaromatic explosives in water samples, *Journal of Chromatography A* 2001, 938, 113–120.
35. Radtke C. W., Gianotto D., Roberto F. F., Effect of particulate explosives on estimating contamination at a historical explosives testing area, *Chemosphere* 2002, 46, 3–9.
36. Schulte-Ladbeck R., Karst U., Determination of triacetone triperoxide in ambient air, *Analytica Chimica Acta* 2003, 482, 183–188.
37. Smith M., Collins G.E., Wang J., Microscale solid-phase extraction system for explosives, *Journal of Chromatography A* 2003, 991, 159–167.

38. Spiegel K., Welsch T., Monitoring degradation processes by HPLC analysis with UV and amperometric detection, *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 1997, 357, 333–337.
39. Stambouli A., El Bouri A., Bouayoun T. [et al.], Headspace-GC/MS detection of TATP traces in post-explosion debris, *Forensic Science International* 2004, 146, 191–194.
40. Taylor S., Campbell E., Perovich L. [et al.], Characteristics of composition B particles from blow-in-place detonations, *Chemosphere* 2006, 65, 1405–1413.
41. Walsh M. E., Determination of nitroaromatic, nitramine, and nitrate ester explosives in soil by gas chromatography and an electron capture detector, *Talanta* 2001, 54, 427–438.
42. Walsh M. E., Ramsey C. A., Jenkins T. F., The effect of particle size reduction by grinding on subsampling variance for explosives residues in soil, *Chemosphere* 2002, 49, 1267–1273.
43. Welsh T., Block H., Separation and enrichment of explosives and their by-products from water by multiple micro liquid extraction for their determination by capillary gas chromatography, *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 1997, 357, 904–908.
44. Wiliford C. W., Bricka R. M., Extraction of TNT from aggregate soil fractions, *Journal of Hazardous Materials* 1999, 66, 1–13.
45. Yinon J., Field detection and monitoring of explosives, *Trends in Analytical Chemistry* 2002, 21, 292–301.
46. Yinon J., Forensic and environmental detection of explosives, John Wiley & Sons Ltd, Chichester 1999.
47. Yinon J., Toxicity and metabolism of explosives, CRC Press, Boca Raton 1990.
48. Yinon J., Trace analysis of explosives in water by gas chromatography-mass spectrometry with temperature-programmed injector, *Journal of Chromatography A* 1999, 742, 205–209.

Norms

49. U.S. Environmental Protection Agency Method 3535A, Solid-phase microextraction (SPE), Office of Solid Waste, Washington DC, 1998.
50. U.S. Environmental Protection Agency Method 8330A, Nitroaromatics and nitramines by high performance liquid chromatography (HPLC), Office of Solid Waste, Washington DC, 1998.
51. U.S. Environmental Protection Agency Method 8332, Nitroglycerine by high performance liquid chromatography, Office of Solid Waste, Washington DC, 1996.

Corresponding author

Rafał Borusiewicz
Instytut Ekspertyz Sądowych
ul. Westerplatte 9
PL 31-033 Kraków
e-mail: rborusiewicz@ies.krakow.pl

APPENDIX 1. GLOSSARY OF ABBREVIATIONS AND SPECIALIST TERMS USED IN THE TEXT

ADNT	Aminodinitrotoluene
CE	Capillary electrophoresis
CV	Carbowax
DNT	Dinitrotoluene
DVB	Divinyl benzene (1,3-diethenylbenzene)
ECD	Electron capture detector
EGDN	Ethylen glikol dinitrate
GC	Gas chromatography
Hexogen	Cyclotrimethylene-trinitramine
HMTD	Hexamethylene triperoxide diamine
HMX	Cyclotetramethylene-tetranitramine
HPLC	High performance liquid chromatography
IMS	Ion mass spectrometry
IR	Infra red spectrometry
MS	Mass spectrometry
NG	“Nitroglycerine”, glyceryl trinitrate
Nitroglycerin(e)	Glyceryl trinitrate
Nitroglycol	Ethylen glikol dinitrate
Octogen	Cyclotetramethylene-tetranitramine
PETN	Pentaerythritol tetranitrate
RDX	Cyclotrimethylene-trinitramine
SDME	Single drop microextraction
SEM-EDX	Electron microscopy coupled with energy dispersive X-ray spectrometry
SPE	Solid phase extraction
SPME	Solid phase microekstraktion
TATP	Triacetone triperoxide
TEA	Thermal energy analyzer
Tetryl	2,4,6-trinitrophenyl-N-methylnitramine
TNB	Trinitrobenzene
TNT	Trinitrotoluene
XRF	X-ray fluorescence spectrometry

PRZEGLĄD METOD PRZYGOTOWANIA PRÓBEK DO ANALIZY CHROMATOGRAFICZNEJ NA OBECNOŚĆ ORGANICZNYCH ŚRODKÓW WYBUCHOWYCH

1. Wprowadzenie

W dobie rosnącego zagrożenia ze strony zorganizowanych grup przestępczych i organizacji terrorystycznych szczególnego znaczenia nabiera zagadnienie wykrywania i identyfikacji śladów środków wybuchowych w materiale zabezpieczonym z miejsca eksplozji oraz ujawnionym u podejrzanego. Wyniki tego rodzaju analizy mogą dostarczyć wiadomości pomocnych w rekonstrukcji przebiegu zdarzenia i ustaleniu jego sprawcy. Analiza taka pozwala stwierdzić np.:

- czy zabezpieczony materiał jest środkiem wybuchowym;
- jakiego rodzaju jest to środek i jakie jest prawdopodobne źródło jego pochodzenia;
- jaki środek został użyty do wywołania eksplozji (na podstawie analizy próbek pochodzących z miejsca eksplozji);
- czy w próbkach pochodzących z miejsca wybuchu (np. próbkach podłoża, ujawnionych elementach ładunku wybuchowego) i próbkach zabezpieczonych u podejrzanego znajdują się ślady środka wybuchowego, a jeśli tak, to czy są to ślady środka tego samego rodzaju (dowód wskazujący na związek podejrzanego z przestępstwem).

Analiza środków wybuchowych stanowi również dziedzinę zainteresowań laboratoriów zajmujących się ochroną środowiska i monitorowaniem jego stanu, ponieważ wiele środków wybuchowych jest toksyczna, mutagenna i kancerogenna [15, 27, 32, 38, 43, 46, 47, 48]. Niegdyś pozbywano się przeterminowanej (niespełniającej standardów) amunicji i środków wybuchowych, zakopując je w ziemi czy zatapiając w morzu. Niedostatecznie oczyszczone ścieki zakładów produkujących środki wybuchowe odprowadzano bezpośrednio do rzek i strumieni. W efekcie dochodziło do skażenia środowiska. Aby ocenić jego rozmiar i związane z tym zagrożenie oraz podjąć właściwe środki zaradcze, niezbędne jest więc monitorowanie stężenia środków wybuchowych w powietrzu, wodzie, glebie i materiale roślinnym [11, 15, 18, 21, 28, 32, 37, 48].

Wykrywanie i oznaczanie środków wybuchowych jest zagadnieniem złożonym. Wynika to przede wszystkim z dużej liczby związków i mieszanin, którymi można się posłużyć do wywołania eksplozji. W specjalistycznej literaturze wymienia się około 20 związków najczęściej stosowanych w roli ładunków inicjujących (ang. primary

explosives) i około 30 związków najczęściej wchodzących w skład detonatorów pośrednich lub ładunków głównych (ang. secondary explosives).

Wśród organicznych środków wybuchowych wyróżnia się m.in. związki nitroaromatyczne, np. TNT* (2,4,6-trinitrotoluen), tetryl (2,4,6-trinitrofenylo-N-metylonitroamina), estry kwasu azotowego, np. nitrogliceryna, EGDN (diazotan glikolu etylenowego), PETN (tetraazotan pentaerytrytu), nitroaminy, np. heksogen (cyklotrimetylenotritroamina), oktogen (cyklotetrametylenotetranitroamina) i nadtlarki, np. HMTD (nadtlarek urotropiny) czy TATP (nadtlarek acetonu).

Czynnikiem utrudniającym wykrycie i identyfikację organicznych środków wybuchowych jest fakt, że zwykle w próbkach znajdują się jedynie śladowe ilości analitów rozproszonych w złożonej matrycy zawierającej liczne związki przeszkadzające. Technikami używanymi najczęściej do rozdzielania i identyfikacji wyosobnionych z próbki związków są chromatografia gazowa i chromatografia cieczowa, jednak czynnikiem mającym kluczowe znaczenie dla powodzenia całego procesu analitycznego jest odpowiednie przygotowanie próbek pozwalające na wyosobnienie analizowanych związków z matrycy i ich zateżenie.

2. Przegląd metod przygotowania próbek

Metody przygotowania próbek do analiz chromatograficznych na obecność związków wybuchowych różnią się w zależności od materiału, z którego należy wyosobnić anality. Można wyróżnić:

- materiały wybuchowe, tj. mieszaniny związków wybuchowych i środków nadających im określone właściwości użytkowe;
- gazy (np. powietrze);
- ciecze (np. woda, ścieki);
- materiały sypkie, półpłynne i maziste (np. gleba, osady denne);
- powierzchnie, zarówno nienasiąkliwe (np. znalezione na miejscu wybuchu duże fragmenty rządu wybuchowego, powierzchnie mebli, które mogły mieć kontakt z posiadanymi nielegalnie materiałami wybuchowymi), jak i porowate (np. odzież zabezpieczona od podejrzanego);

* Lista skrótów i niektórych nazw zwyczajowych użytych w tekście jest zamieszczona w załączniku nr 1.

– tkanki roślinne i zwierzęce, w tym ludzkie.

Sposób przygotowania próbek zależy również od tego, czy celem analizy jest jedynie ewentualne wykrycie śladów środków wybuchowych, czy również ich oznaczenie.

Technikami stosowanymi najczęściej w przygotowaniu próbek do analizy środków wybuchowych są:

1. ekstrakcja cieczowa:
 - w wersji klasycznej,
 - do pojedynczej kropli (ang. single drop microextraction – SDME);
2. ekstrakcja do fazy stałej (ang. solid phase extraction – SPE):
 - w wersji klasycznej,
 - na mikrokolumnach;
3. mikroekstrakcja do fazy stałej (ang. solid phase microextraction – SPME).

2.1. Ekstrakcja ciecz-ciecz

W wersji klasycznej proces przeprowadza się w ten sposób, że próbkę umieszcza się w naczyniu, do którego następnie dodaje się rozpuszczalnik. Zawartość poddaje się działaniu ultradźwięków, wytrząsa się lub intensywnie miesza, by zwiększyć prędkość przechodzenia analizowanych związków do fazy rozpuszczalnika. Następnie fazę rozpuszczalnika zawierającą analizowane związki oddziela się od fazy stanowiącej pierwotnie matrycę próbki i poddaje dalszym etapom procesu analitycznego.

Za zalety tej metody można uznać jej prostotę oraz fakt, że właściwie przeprowadzona pozwala wyosobnić niemal całość (ponad 99,9%) analizowanych związków z matrycy.

Jej wadami są:

- duża praco- i czasochłonność;
- uzyskany ekstrakt często wymaga dodatkowego oczyszczenia i zateżenia. Ekstrakt zwykle zateża się przez odparowanie nadmiaru rozpuszczalnika. Negatywnymi skutkami odparowania może być jednak utrata lotnych analitów, rozkład związków termolabilnych i zateżenie związków przeszkadzających;
- operacje prowadzone na próbce niosą niebezpieczeństwo jej kontaminacji;
- konieczność posługiwania się znacznymi ilościami często toksycznych rozpuszczalników organicznych.

2.2. Mikroekstrakcja ciecz-ciecz do pojedynczej kropli

Niedawno wprowadzoną modyfikacją metody ekstrakcji cieczowej jest mikroekstrakcja do pojedynczej kropli (SDME) [19, 22, 25, 33, 34]. Jest to technika analizy próbek wodnych polegająca na tym, że w próbce zanurza się igłę mikrostrzykawki z kroplą organicznego rozpuszczalnika na końcu. Związki organiczne zawarte

w próbce wodnej przenikają do fazy organicznej. Po odpowiednio długim czasie kropla rozpuszczalnika jest wciągana do strzykawki, a rozpuszczone w niej związki są analizowane np. za pomocą chromatografii gazowej.

2.3. Ekstrakcja do fazy stałej

Metoda ekstrakcji do fazy stałej jest stosowana do selektywnego zateżenia analitów rozproszonych w fazie ciekłej. Ciecz pod własnym ciężarem lub w wyniku odpowiednio przyłożonego podciśnienia przesączana jest przez złożę fazy stacjonarnej wykazującej powinowactwo do zateżanego analitu. Cząsteczki analitu są selektywnie wiązane. Po przesączeniu całej próbki na złożę podaje się niewielką ilość odpowiedniego rozpuszczalnika, w wyniku czego związane związki ulegają desorpcji i opuszczają złożę adsorbentu w postaci zateżonego roztworu w zastosowanym rozpuszczalniku. Roztwór ten jest przedmiotem dalszych etapów procesu analitycznego. Opisana metoda może być stosowana zarówno do wyosabniania niepolarnych związków z polarnej matrycy, jak i polarnych związków z niepolarną matrycą.

Normalnie kolumny stosowane w SPE mają średnicę kilku milimetrów i złoża fazy stacjonarnej o wysokości kilku centymetrów. Coraz częściej jednak prowadzi się SPE w skali mikro, stosując kolumny o średnicy mniejszej od milimetra i wysokości złoża ok. 1,5 mm. Taka zmiana pozwala na analizę próbek o niewielkiej objętości i połączenie *on-line* SPE z aparaturą służącą rozdzielaniu i identyfikacji analitów (np. HPLC, CE).

2.4. Mikroekstrakcja do fazy stałej

Mikroekstrakcja do fazy stałej została wprowadzona z końcem lat 80. dwudziestego wieku przez Janusza Pawliszyna i współpracowników [1, 4]. Jest to metoda przygotowania próbek do analizy oparta na selektywnej adsorpcji analizowanych związków bezpośrednio z próbek (próbki gazowe lub ciekłe) lub z fazy nadpowierzchniowej próbek (próbki ciekłe, maziste i stałe).

Zasadniczym elementem aparatury używanej do SPME jest warstwa adsorbentu naniesiona na krzemionkowe włókno. Włókno przymocowane jest do cienkiego, metalowego drucika będącego częścią aparatu podobnego w konstrukcji do strzykawki. Przesuwając tłoczek, przesuwają się drucik w igłę, eksponując włókno (podczas adsorpcji/desorpcji) lub chowając je wewnątrz igły (podczas innych operacji).

Wyosobnienie z matrycy i zateżenie analizowanych związków przeprowadza się w ten sposób, że odsłonięte włókno umieszcza się w analizowanym medium na czas potrzebny do ustalenia się równowagi pomiędzy cząsteczkami w medium i cząsteczkami związanymi z adsorbentem. Następnie zaadsorbowane cząsteczki są desorbowane (najczęściej termicznie) i poddawane dal-

szym etapom procesu analizy, tj. rozdzieleniu, detekcji i identyfikacji.

Metoda SPME zyskuje coraz większą popularność ze względu na swoje zalety, wśród których wymienia się:

- niewielką ilość próbki, jaka jest potrzebna do przeprowadzenia analizy;
- dużą szybkość przygotowania próbki;
- prostotę urządzeń i niewielką liczbę operacji, jakie trzeba przeprowadzić na próbce;
- ograniczenie wpływu związków przeszkadzających dzięki selektywności metody;
- proces wyosabniania i zateżniania można przeprowadzić bez użycia rozpuszczalników organicznych;
- adsorbent może być używany wielokrotnie.

3. Przegląd procedur analitycznych stosowanych w różnych laboratoriach

3.1. Analiza „czystych” materiałów wybuchowych

Materiały wybuchowe przeznaczone zarówno do celów wojskowych, jak i cywilnych, składają się zwykle ze związków wybuchowych, dodatków, które nadają im odpowiednie właściwości użytkowe (stabilizatory, plastyfikatory) i dodatków wpływających na właściwości wybuchowe, np. temperaturę wybuchu czy bilans tlenowy. Identyfikację grupową czystego materiału wybuchowego można zwykle przeprowadzić na podstawie wyników oględzin mikroskopowych, analizy z użyciem spektrometrii IR, Ramana, SEM-EDX czy XRF. Jeśli zachodzi konieczność przeprowadzenia analizy chromatograficznej, przygotowanie próbek sprowadza się zwykle do ich rozpuszczenia, i ewentualnie, usunięcia cząstek stałych. Taki sposób postępowania jest dość oczywisty i z tego powodu rzadko szczegółowo opisywany w publikacjach.

T. Burns i R. Lewis w pracy dotyczącej analizy środków na bazie nitrogliceryny [7] metodą GC-MS opisują sposób przygotowania próbek polegający na tym, że niewielką ilość środka wybuchowego rozpuszczano w acetonie z użyciem łaźni ultradźwiękowej. Uzyskany w ten sposób roztwór filtrowano i wstrzykiwano do dozownika chromatografu.

3.2. Analiza powietrza

Analiza próbek powietrza na obecność środków wybuchowych związana jest z takimi zagadnieniami, jak:

- poszukiwanie ukrytych środków wybuchowych w bagażu, przesyłkach pocztowych, pojazdach, samolotach i ubraniach podróżujących;
- przeszukiwania miejsca wybuchu w celu znalezienia pozostałości, na których zachowały się ślady środków wybuchowych w celu zabezpieczenia ich do dalszej analizy w laboratorium;

- badanie, czy dany teren zanieczyszczony jest toksycznymi środkami wybuchowymi oraz produktami ich rozkładu, by w razie potrzeby podjąć działania mające na celu zapobieżenie zatruciu ludzi i zwierząt;
- wykrywanie min lądowych będących pozostałościami konfliktów zbrojnych; miny ukryte pod warstwą gleby stanowią zagrożenie nawet po wielu latach od zakończenia konfliktu, dlatego wykrywanie ich jest zagadnieniem szczególnie istotnym.

Związki wybuchowe mogą być obecne w fazie gazowej w postaci par lub pyłu. W tym drugim przypadku cząstki pyłu mogą być cząstkami środka wybuchowego lub cząstkami innych materiałów, na których zaadsorbowane są związki wybuchowe.

Pobieranie próbek i zateżnienie analitów jest zwykle realizowane w ten sposób, że określona objętość gazu jest zasysana i przechodzi przez filtr lub adsorbent, na którym zatrzymywane są związki organiczne, w tym związki wybuchowe. Kolejnym etapem jest termodesorpcja bądź odparowanie zatrzymanych związków, które następnie trafiają bezpośrednio do detektora (MS-MS, IMS) albo są rozdzielane chromatograficznie i trafiają do odpowiedniego detektora – detektora wychwytu elektronów (ECD) czy detektora chemoluminescencyjnego (TEA). Na tej zasadzie działają m.in. bramki na lotniskach służące do wytypowania pasażerów, którzy mieli kontakt z materiałami wybuchowymi [12, 45, 46].

Możliwość wykrycia danego środka wybuchowego poprzez analizę fazy gazowej zależy od prężności jego par. Najczęściej stosowane komercyjne środki wybuchowe można, ze względu na prężność par, uszeregować w porządku malejącym następująco: diazotan etanodiolu (EGDN), triazotan propanotriolu (NG), 2,4,6-trinitrotoluen (TNT), 1,3,5-trinitro-1,3,5,7-triazocykloheksan (RDX), 2,4,6,N-tetranitro-N-metyloanilina (tetryl), tetraazotan pentaerytriolu (PETN) i 1,3,5,7-tetranitro-1,3,5,7-tetraazocyklooktan (HMX) [45]. Plastikowe materiały wybuchowe wykazują znacznie niższą prężność par środków wybuchowych od prężności odpowiednich środków wybuchowych w postaci czystej.

R. Battle i współautorzy [3] opisują procedurę analizy związków nitroaromatycznych, w której badane powietrze jest pompowane z określoną prędkością i przez określony czas przez osobisty próbnik zawierający piankę poliuretanową pełniącą rolę adsorbenta. Pianka ta jest następnie umieszczana w komorze desorpcyjnej systemu do ekstrakcji fazą nadkrytyczną sprężonego z HPLC. Po ekstrakcji CO₂ w fazie nadkrytycznej anality są wtórnie adsorbowane na adsorbencie węglowym, z którego są desorbowane rozpuszczalnikowo fazą mobilną HPLC i przenoszone na kolumnę. Tego rodzaju procedury wydają się szczególnie przydatne do określenia narażenia pracowników mających kontakt z parami materiałów wybuchowych.

Nadtlenek acetonu (TATP) to środek wybuchowy, który ze względu na swoją dużą wrażliwość i nietrwałość

nie znalazł zastosowań komercyjnych, jest jednak syntezowany przez domorosłych „eksperymentatorów” i wykorzystywany przez terrorystów. Jego szczególną cechą jest duża lotność, dzięki czemu do jego wykrywania można stosować metody analizy fazy nadpowierzchniowej.

R. Schulte-Ladbeck i U. Karst [36] opracowali procedurę izolacji TATP z próbek materiałów stałych. Zgodnie ze wspomnianą procedurą powietrze z nad badanej próbki jest zasysane i przechodzi przez dwie połączone szeregowo płuczki bełkotkowe zawierające acetonitryl. Lotne związki organiczne, w tym TATP, rozpuszczają się w acetonitrylu. Uzyskany w ten sposób roztwór analizowano metodą HPLC. Autorzy ocenili, że opracowana metoda mogłaby być stosowana w analizie materiału z miejsca wybuchu oraz do pobierania próbek bezpośrednio na miejscu zdarzenia.

A. Stambouli i współpracownicy [39] do wykrywania TATP w rzeczywistych próbkach powybuchowych z powodzeniem posłużyli się metodą bezpośredniej analizy fazy nadpowierzchniowej (ang. direct (heated) headspace analysis). Próbki umieszczane były w szczelnych, szklanych pojemnikach, które wygrzewano w temperaturze 90°C przez 30 min, a następnie przy pomocy strzykawki gazowej pobierano 1 ml fazy nadpowierzchniowej i analizowano za pomocą metody GC-MS.

3.3. Analiza próbek ciekłych

Analizy próbek wody na obecność środków wybuchowych i ich pochodnych mają zwykle charakter analiz środowiskowych i wiążą się z toksycznością tych związków. Źródłem zanieczyszczeń są pozostałości ścieków niegdyś odprowadzanych bezpośrednio do rzek, zatopiona w morzu amunicja, zanieczyszczona gleba. Związki wybuchowe zanieczyszczające glebę mogą wraz z wodami opadowymi przenikać do głębszych warstw aż do lustra wód gruntowych i przemieszczać się, zanieczyszczając lokalne zbiorniki wodne, ciekły i ujęcia wody [27, 32].

Ponieważ zanieczyszczenia wody środkami wybuchowymi mają zwykle charakter śladowy, etap zateżenia analitów ma decydujące znaczenie dla powodzenia procesu analizy. Postępowanie z próbkami różni się w zależności od tego, czy analiza ma charakter ilościowy, czy jakościowy. W pierwszym wypadku priorytetem jest dokładność i precyzja oznaczenia [50, 51]. W drugim wypadku celem jest osiągnięcie jak najniższego progu wykrywalności przy zachowaniu możliwie prostej, szybkiej i mało kosztownej procedury przygotowania próbki [14, 15, 26, 28, 29, 30, 34, 37, 40, 50, 51].

Przegląd literatury z okresu ostatnich kilku lat wskazuje, że najczęściej stosowanymi metodami zateżenia analitów i wyosobnienia ich z matrycy są metody ekstrakcji do fazy stałej w wersji klasycznej [15, 28, 30] lub z zastosowaniem mikrokolumn [26, 34, 37] oraz mikroekstrakcja do fazy stałej [14, 29, 30]. Rzadziej stosowana

jest ekstrakcja ciecz-ciecz, przy czym może mieć ona formę tradycyjną [50], ekstrakcji z użyciem zredukowanej ilości rozpuszczalnika organicznego [43] lub mikroekstrakcji do pojedynczej kropli (SDME) [34].

W niektórych przypadkach można analizować próbki bez wyosobniania i zateżenia analitów. Warunkiem jest, by stężenie analitów było wyższe od progu wykrywalności metody, a wpływ związków przeszkadzających był niewielki.

A. Himli i współpracownicy [21] opisują metodę analizy próbek wód gruntowych za pomocą chromatografii cieczowej z detekcją amperometryczną. Przygotowanie próbki ogranicza się do odfiltrowania cząstek zawieszonych. W ocenie autorów proponowana przez nich metoda jest odpowiednia do analizy próbek wód gruntowych, a próg wykrywalności dla związków nitroaromatycznych i nitroamin jest rzędu ppb.

Zgodnie z metodą EPA 8332 [51] przeznaczoną do oznaczania nitrogliceryny w próbkach wody (próbkach ścieków, wód gruntowych i powierzchniowych) metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej, próbkę przygotowuje się do analizy, rozcieńczając ją acetonitrylem w stosunku 1:1 i w razie potrzeby filtrując. Konieczność rozcieńczenia próbki acetonitrylem wynika z faktu, że fazą mobilną jest 60% roztwór acetonitrylu w wodzie.

Norma EPA 8330A opisuje sposób oznaczania związków nitroaromatycznych i nitroamin w próbkach wody, gleby i osadów metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej [50]. Zgodnie ze wskazaniem tej metody, próbki wody można przygotować na 3 różne sposoby w zależności od poziomu stężenia analitów i dostępnego sprzętu. Próbki o dużym stężeniu analitów rozcieńcza się metanolem w stosunku objętościowym 1:1 (fazą mobilną w metodzie HPLC jest mieszanina wody i metanolu 1:1 (v:v)) i filtruje w celu oddzielenia cząstek zawieszonych, po czym analizuje chromatograficznie.

Próbki wodne zawierające śladowe ilości analitów przygotowuje się do analizy, stosując metodę ekstrakcji rozpuszczalnikowej z wysalaniem. Ekstrakcję rozpuszczalnikową przeprowadza się za pomocą acetonitrylu. W badanej próbce wodnej rozpuszcza się określoną ilość chlorku sodu, po czym dodaje się acetonitryl i intensywnie miesza. Większa część acetonitrylu rozpuszcza się w fazie wodnej. Niewielką ilość fazy organicznej pozostałej nad roztworem wodnym przenosi się do innego naczynia, a do próbki wprowadza kolejną porcję acetonitrylu i ponownie przeprowadza ekstrakcję. Uzyskane ekstrakty miesza się, wprowadza do określonej objętości wodnego roztworu chlorku sodu i znów intensywnie miesza. Część acetonitrylu rozpuszcza się w wodnym roztworze soli, a niewielką ilość zateżonego ekstraktu organicznego pozostałą nad roztworem oddziela się od fazy wodnej i po rozcieńczeniu wodą w stosunku objętościowym 1:1 analizuje chromatograficznie.

T. Welsh i H. Block [43] podają sposób przygotowania próbek wodnych do analizy chromatograficznej, który nazywają „wielokrotną mikroekstrakcją cieczą”. Polega on na przeprowadzeniu ekstrakcji cieczowej z wysalaniem i zateżeniem ekstraktu przez odparowanie. Dzięki zastosowaniu odpowiedniego szkła laboratoryjnego, autorom udało się ograniczyć objętość potrzebnej próbki wodnej do 50 cm³ i ilość rozpuszczalnika do 750 µl na ekstrakcję. Do analizowanej próbki dodaje się określoną ilość chlorku sodu i prowadzi ekstrakcję kolejno czterema porcjami rozpuszczalnika. Uzyskane ekstrakty łączy się, zateża przez odparowanie i uzyskany w ten sposób roztwór poddaje analizie.

E. Psillakis i N. Kalogerakis [33, 34] do wyosobnienia i zateżenia nitroaromatycznych środków wybuchowych z próbek wodnych posłużyli się opisaną wcześniej metodą ekstrakcji do pojedynczej kropli. Analiza prowadzona była przy pomocy mikrostrzykawki o pojemności 10 µl zawierającej 1 µl toluenu. Igła strzykawki wprowadzana była do analizowanej próbki wodnej. Przez naciśnięcie tłoczka ekspozowano kroplę rozpuszczalnika w taki sposób, że wisiała ona w fazie wodnej przyczepiona do końca igły. Analizowana próbka mieszana była przy pomocy mieszadła magnetycznego z prędkością 400 obrotów na minutę. Po 15 min kroplę wciągano do wnętrza strzykawki i analizowano metodą GC-MS.

Ekstrakcja do fazy stałej (SPE) to metoda, która w znacznej mierze zastąpiła ekstrakcję rozpuszczalnikową w przygotowaniu próbek wodnych, a która z kolei w ostatnich latach jest wypierana przez mikroekstrakcję do fazy stałej (SPME).

Wspominana wcześniej norma EPA 8330A [50] wraz z normą EPA 3535A [49] opisują zastosowanie SPE jako jednej z metod, której można użyć do przygotowania próbek wodnych do oznaczania związków nitroaromatycznych i nitroamin metodą HPLC.

Zgodnie ze wspomnianymi procedurami, próbkę wody należy pobrać do pojemnika o pojemności odpowiadającej objętości próbki, która ma być analizowana. Należy go wypełnić w całości tak, by objętość fazy nadpowierzchniowej była jak najmniejsza. Do pojemnika, do którego pobrano próbkę, należy wprowadzić wzorce wewnętrzne i wymieszać z próbką.

Ekstrakcję można prowadzić na dyskach EmporeTM DSB-RPS lub ich odpowiednikach bądź też na kolumnach SPE wypełnionych adsorbentem Poropak R lub jego odpowiednikiem. Jeśli do zateżenia używa się dysków, do próbki, oprócz wzorców wewnętrznych, należy dodać 5 cm³ metanolu. Ślepą próbę stanowi czysta woda w objętości odpowiadającej objętości próbek, z którą postępuje się tak, jak z próbkami (dodaje wzorce wewnętrzne etc.). Adsorbent kondycjonuje się, a następnie na dysk lub kolumnę wprowadza się próbkę i przesącza, stosując podciśnienie. Zarówno w przypadku kolumn, jak i dysków, zaadsorbowane anality eluuje się acetonitrylem.

W ramach badań mających na celu określenie, jaka ilość materiałów wybuchowych pozostaje nieprzereagowana po eksplozji, A. Hewitt i współpracownicy [20] prowadzili eksperymenty polegające na detonacji ładunków wybuchowych na śniegu. Z miejsc w pobliżu krateru, gdzie widoczne były osmalenia, pobierano zewnętrzną warstwę śniegu i pakowano do plastikowych toreb. Uzyskane po stopieniu śniegu próbki wodne filtrowano. Związki wybuchowe zawarte w przesączu izolowano i zateżano, stosując ekstrakcję do fazy stałej (SPE) na kolumnach Waters Poropak RDX. Zaadsorbowane związki eluowano acetonitrylem. Filtry wraz z oddzielnymi na nich cząstkami stałymi poddawano ekstrakcji rozpuszczalnikowej acetonitrylem. Ekstrakcję prowadzono za pomocą aparatu Soxhleta lub poprzez wytrząsanie. Uzyskane eluaty i ekstrakty analizowano metodami GC-ECD i HPLC.

W procedurze analizy próbek wodnych opisanej przez P. Gatesa i współpracowników [15] związki nitroaromatyczne wyosabnia się z próbki i zateża, stosując ekstrakcję do fazy stałej na kolumnach SPE z adsorbentem polimerowym (polistyren – diwinylobenzen).

R. Marple i W. LaCourse [28] opisują procedurę analizy próbek wodnych pod kątem oznaczania środków wybuchowych z zastosowaniem SPE sprzężonego bezpośrednio z HPLC z detekcją elektrochemiczną. Analizowane związki zateża się na kolumnie SPE z fazą stacjonarną C18 (4,6 mm × 75 mm, rozmiar ziaren 5 µm) i rozdziela na kolumnie HPLC z fazą stacjonarną C18 (4,6 mm × 250 mm, rozmiar ziaren 5 µm). Aparatura jest w dużej mierze zautomatyzowana, a etap wyosabniania i zateżenia analitów przebiega następująco: próbka wprowadzona przy pomocy pętli dozowniczej jest transportowana i przetłaczana przez kolumnę SPE przez fazę mobilną, którą stanowi 7,5% metanolu w wodnym roztworze chlorku sodu (0,5 M) i trójwodnego octanu sodu (20 mM). Po przeniesieniu próbki na złożę adsorbentu złożę jest przepłukiwane fazą mobilną w celu wymycia związków przeszkadzających. Przez odpowiednią zmianę pozycji zaworów na kolumnę SPE wprowadzana jest właściwa faza mobilna (50% metanolu w 20 mM buforze octanowym), dochodzi do desorpcji analitów i są one przenoszone na kolumnę chromatograficzną, gdzie ulegają rozdzielaniu.

Q. Lu i współpracownicy [26] zastosowali ekstrakcję do fazy stałej na mikrokolumnie do przygotowania próbek wody morskiej do analizy metodą elektroforezy kapilarnej na mikrochipie szklanym. Stosowano teflonową mikrokolumnę o średnicy wewnętrznej 0,8 mm zawierającą 1 mg adsorbentu Lichrolut. Kolumnę kondycjonowano, przepłukując kolejno 10 cm³ metanolu i 20 cm³ dejonizowanej wody. Próbki o objętości 40 cm³ przetłaczano przez kolumnę z prędkością 3 cm³/min, a następnie przepłukiwano adsorbent 5 cm³ wody. Resztki wody usuwano, przetłaczając przez złożę powietrze z prędkością

cią 5 cm³/min. Zaadsorbowane związki były desorbowane 17 µl acetonitrylu i analizowane metodą elektroforezy kapilarnej.

M. Smith i in. [37] w pracy będącej kontynuacją wcześniejszych badań [26] opisują zarówno aparaturę umożliwiającą półautomatyczną ekstrakcję do fazy stałej na mikrokolumnach w warunkach polowych, jak i samą procedurę ekstrakcji związków wybuchowych i ich pochodnych z próbek wodnych. Analizowanymi związkami były: RDX, 1,3,5-TNB, TNT, 2,4-DNT, o-NT, p-NT i m-NT. Badano próbki wody morskiej, wody studziennej i wody rzecznej. Stosowano mikrokolumny sporządzone z teflonowych rurek o średnicy wewnętrznej 0,75 mm, które były wypełniane na długości 1 cm odpowiednim adsorbentem. Końce zabezpieczano nylonową siatką, by zapobiec przemieszczaniu się ziaren adsorbentu. W ramach badań wstępnych porównano dwa różne adsorbenty – LiChrolut EN i Poropak R. LiChrolut EN okazał się lepszy ze względu na większą pojemność sorpcyjną, więc stosowano go w dalszych badaniach. Opracowana procedura ekstrakcji przedstawia się następująco: próbka wodna o objętości 20 ml jest pompowana przez złoże z prędkością 3 ml/min. Adsorbent i przewody łączące płukane są następnie wodą (objętość 2,5 ml, prędkość przepływu 5 ml/min). Resztki wody są usuwane ze złoża poprzez przetłaczanie powietrza (objętość 10 ml). Kolejnym etapem jest desorpcja analitów acetonitrylem. Acetonitryl z niewielką prędkością (300 µl/min) pompowany jest przez kolumnę, a 5 µl eluatu jest zbierane w niewielkiej szklanej fiolce. Ostatnim etapem jest kondycjonowanie złoża przez przepłukiwanie kolejno 1,5 ml acetonitrylu i 2,5 ml powietrza. Po zakończeniu opisanego cyklu aparat jest natychmiast gotowy do ponownego użycia.

F. Monteil-Rivera i współpracownicy [29] porównali techniki SPME i SPE zastosowane do przygotowania próbek wody do oznaczania śladów środków wybuchowych metodą HPLC-UV. Analizowano HMX, RDX, 1,2,5-trinitrobenzen, 1,3-dinitrobenzen, tetryl, 3,4-dinitrotoluen, TNT, 4-amino-2,6-dinitrotoluen i 2,4-dinitrotoluen. SPME prowadzono poprzez całkowite zanurzenie włókna w próbkach o objętości 25–35 cm³ po uprzednim dodaniu do nich odpowiedniej ilości NaCl. Badania optymalizacyjne obejmowały rodzaj włókna, stężenie NaCl, szybkość mieszania próbki podczas adsorpcji oraz czas adsorpcji i desorpcji. Ustalono, że najbardziej odpowiednie są: włókno pokryte fazą carbowax/templated resin, stężenie NaCl 30% w/v, możliwie największa szybkość mieszania próbki podczas adsorpcji, czas adsorpcji 30 min, czas desorpcji 5 min (przy użyciu interfejsu SPME/HPLC). Otrzymane wyniki porównywano z wynikami uzyskanymi metodą SPE. W metodzie SPE stosowano próbki o objętości 500 cm³ i kolumny adsorpcyjne Poropak Rdx Sep-Pak. Etap zateżnienia prowadzono zgodnie z opisaną wcześniej procedurą EPA 3535A [49].

Porównanie metod SPE i SPME wykazało, że próg wykrywalności dla SPME jest ok. 10 razy większy niż SPE, jednakże zaletami SPME jest niewielka objętość próbki potrzebna do przeprowadzenia analizy, doskonała dokładność i precyzja, a przede wszystkim czas przygotowania próbki ok. 5 razy krótszy niż dla SPE.

Kontynuując opisane wyżej badania, F. Monteil-Rivera i współpracownicy [30] porównali metody SPE i SPME zastosowane do przygotowania próbek wody i sedimentów do analizy metodą GC-ECD. Analizowano 4-ADNT, 2-ADNT, 2,6-DNT, 2,4-DNT, TNB, 1,3-DNB, TNT, RDX i tetryl. Badania optymalizacyjne dotyczące SPME obejmowały rodzaj włókna, czas adsorpcji, stężenie NaCl i temperaturę desorpcji. Stwierdzono że najbardziej odpowiednie są: włókno pokryte fazą carbowax/diwinylolobenzen, czas adsorpcji równy 60 min, stężenie NaCl równe 30% w/v i temperatura desorpcji równa 225°C.

Ekstrakcja do fazy stałej prowadzona była na kolumnach Poropak Rdx Sep-Pak. Stosowano próbki o objętości 500 ml. Proces prowadzono zgodnie z normą EPA 3535A.

Precyzja analiz przeprowadzonych z wykorzystaniem metod SPE i SPME była podobna. Granica wykrywalności była niższa (lepsza) dla SPE, w szczególności dla RDX, 1,3-DNT i TNB. Zaletami metody SPME w porównaniu z SPE są: niewielka objętość próbek wymagana do przeprowadzenia analizy, nie jest konieczne użycie rozpuszczalników organicznych, a czas analizy z użyciem SPME jest ok. 5 razy krótszy niż przy zastosowaniu SPE.

W pracy z 1999 roku K. Furton i współautorzy [14] przedstawili procedury przygotowania próbek wodnych do analizy GC-ECD i HPLC z wyosabnianiem i zateżnieniem analitów techniką SPME. Przedstawione procedury różnią się rodzajem fazy stosowanej przy metodzie SPME, co wiąże się z różnym mechanizmem desorpcji. Analizowane próbki wodne przygotowywano przez rozpuszczenie w wodzie niewielkich ilości acetonitrylowych roztworów środków wybuchowych. Prowadzono ekstrakcję z wysalaniem. Autorzy stwierdzili, że w przygotowaniu próbek do analizy GC (termodesorpcja) jako adsorbent najlepiej sprawdza się faza CW/DVB, podczas gdy w przypadku desorpcji rozpuszczalnikowej mieszaniną metanolu i wody (analiza HPLC) najlepsza jest faza CW/TPR. Przeprowadzone badania wykazały, iż efektywność mikroekstrakcji do fazy stałej rośnie ze spadkiem wartości stosunku acetonitryl:woda i ze wzrostem wartości stosunku NaCl:woda. W analizie GC stosowano desorpcję w temperaturze 220°C. W analizie z użyciem HPLC zaadsorbowane związki desorbowano rozpuszczalnikowo, zanurzając włókno w 200 l mieszaniny metanol:woda (1:1) przez 2 min (stosowano odpowiedni interfejs SPME/HPLC).

G. Ozhan i współautorzy [31] opisali sposób przygotowania próbek osocza ludzkiego do analizy HPLC na

obecność RDX. Osocze było odbiałczane przez dodatek metanolu (1:9 v/v). Zdenaturowane białko oddzielano przez wirowanie, a supernatant odparowywano do połowy początkowej objętości w strumieniu azotu. Tak przygotowaną próbkę przesączano przez odpowiednio wykondycjonowaną kolumnę SPE Tox-clean. Zaadsorbowane związki eluowano metanolem. Eluat odparowywano w strumieniu azotu w temperaturze 40°C. Sucha pozostałość rozpuszczano w fazie mobilnej (35% acetonitryl:65% woda, v/v) i analizowano chromatograficznie.

3.4. Próbki porowate – gleba, osady denne, tkanki roślinne

Materiały takie jak gleba czy osady denne stanowią matrycę, w której szczególnie trudno jest oznaczyć środki wybuchowe. Opracowanie jednej, optymalnej procedury jest trudne ze względu na zróżnicowanie próbek. „Gleba” są nazywane materiały tak różne pod względem właściwości chemicznych i fizycznych, jak gleba piaszczysta oraz próchnica, składająca się niemal w 100% z materii organicznej. Dodatkową przeszkodą jest zróżnicowana zawartość frakcji szkieletowej (żwir, kamienie). Nierozpuszczalne, organiczne i nieorganiczne składniki gleby czy osadów dennych mogą adsorbować składniki środków wybuchowych, zaś związki rozpuszczalne mogą maskować ich obecność i przeszkadzać w oznaczeniu. Z wymienionych względów w analizie tego rodzaju próbek etap przygotowania do analizy (wyośabniania z matrycy i zateżenia analitów) ma szczególnie duże znaczenie. W pracach opublikowanych przed rokiem 2000 najczęściej opisywaną metodą przygotowania próbek materiałów porowatych do analizy chromatograficznej była ekstrakcja rozpuszczalnikowa. Ta metoda, chociaż prosta i przy odpowiednim zastosowaniu efektywna, ma dwie zasadnicze wady. Pierwszą z nich jest to, że anality są rozcieńczone w ekstrakcie, którego zateżenie jest kłopotliwe – anality lotne (dinitroglukol, nitrogluceryna) mogą odparować z rozpuszczalnikiem, a związki niestabilne mogą ulec rozkładowi. Drugą wadą jest nieselektywność ekstrakcji rozpuszczalnikowej – oprócz analitów z próbki ekstrahują się również liczne związki przeszkadzające, które mogą utrudnić albo nawet uniemożliwić wykrycie lub oznaczenie badanych związków. W związku z tym procedury przygotowania próbek opisywane w nowszych publikacjach zawierają dodatkowy etap, którego celem jest selektywne zateżenie analitów wyośabnionych z próbki na drodze ekstrakcji. Zwykle w tym celu stosuje się technikę mikroekstrakcji do fazy stałej (SPME).

Procedury ekstrakcji rozpuszczalnikowej związków wybuchowych z gleby stosowane w wielu laboratoriach są w mniejszym lub większym stopniu oparte na procedurze ujętej w normie EPA 8330A [9, 17, 35, 39, 40, 41, 42,

50]. Procedura ta przedstawia się następująco: wysuszoną w temperaturze pokojowej próbkę gleby rozdrabnia się w moździerz i przesiewa przez sito o wielkości oczek 30 mesh. Z uzyskanego w ten sposób materiału do szklanej fiolki z teflonowym zamknięciem pobiera się 2 g, dodaje 10 ml acetonitrylu, zamyka, miesza przez minutę, po czym umieszcza na 18 godzin w chłodzonej łaźni ultradźwiękowej. Po zakończeniu ekstrakcji próbkę pozostawia się na 30 min, po czym pobiera się 5 ml cieczy z nad osadu i przeprowadza flokulację i filtrację, mieszając z 5 ml roztworu chlorku wapnia ($c = 5 \text{ g/dm}^3$) i filtrując z użyciem teflonowego filtra strzykawkowego o wielkości otworów 0,45 μm . Tak przygotowany ekstrakt analizuje się metodą HPLC.

R. Booparty i współpracownicy [5] opublikowali pracę dotyczącą biotransformacji środków wybuchowych w wodnych zawiesinach gleby. Próbki przygotowywano do analizy chromatograficznej (HPLC) w ten sposób, że do badanej zawiesiny gleby dodawano acetonitryl (v:v 1:1), wytrząsano przez minutę i odwirowywano. Uzyskany supernatant filtrowano, a przesącz poddawano analizie.

C. Williford i R. Bricka [44] prowadzili badania, których celem było opracowanie procedury ekstrakcji trotylu z elementów szkieletowych gleby o wielkości mieszczącej się w zakresie 1,25–1,9 cm. Porównywanymi metodami była ekstrakcja w łaźni ultradźwiękowej i ekstrakcja z wykorzystaniem aparatu Soxhleta. Jako rozpuszczalnika w obu metodach użyto acetonitrylu. Po wstępnych badaniach optymalizacyjnych przyjęto następujący sposób postępowania: ekstrakcja z użyciem aparatu Soxhleta: 10–12 ziaren (ok. 40 g) umieszczano w gilzie i ekstrahowano za pomocą 175 ml rozpuszczalnika przez 6 godzin. Ekstrakcja z użyciem łaźni ultradźwiękowej: ok. 50 g ziaren i 250 ml rozpuszczalnika umieszczano w odpowiednim pojemniku i prowadzono ekstrakcję przez 18 godzin. Po tym czasie ekstrakt zlewano, a do materiału wlewano drugą porcję rozpuszczalnika i ekstrahowano przez kolejne 4 godziny.

Ekstrakty uzyskane każdą z metod przygotowywano i analizowano z użyciem HPLC zgodnie z normą EPA 8330.

Przedstawione w publikacji wyniki badań można podsumować następująco: ekstrakcja z użyciem aparatu Soxhleta jest szybsza i wiąże się z mniejszym zużyciem rozpuszczalnika (uzyskuje się większe stężenie analitu w ekstrakcie), ale jej zastosowanie jest ograniczone do mniejszych ziaren (do 2,5 cm) ze względu na wielkość aparatury. Ekstrakcja z wykorzystaniem ultradźwięków trwa znacznie dłużej i wymaga użycia większej ilości rozpuszczalnika, ale można ją stosować do ziaren o wielkości do 5 cm.

A. Himli i współpracownicy [21] w swojej publikacji opisali bardzo prostą procedurę, którą wykorzystywali do przygotowania próbek gleby do analizy metodą chroma-

tografii cieczowej. Próbkę gleby umieszczoną w odpowiednim pojemniku miesza się z acetonitrylem (10 ml na 1 g gleby), wytrząsa przez 30 min i wiruje, a uzyskany supernatant jest przedmiotem analizy chromatograficznej.

C. Bowerbank i współpracownicy [6] analizowali próbki gleby przygotowane w ten sposób, że do badanej próbki dodawali acetonitryl, prowadzili ekstrakcję z użyciem łaźni ultradźwiękowej przez 15 min, odstawiali uzyskaną zawiesinę do sedimentacji i analizowali uzyskany w ten sposób supernatant.

W 2000 roku K. Furton i współpracownicy [13, 14] opublikowali opis procedury przygotowania próbek gleby pobranych z miejsca wybuchu do analizy metodami GC-ECD i HPLC, w której, oprócz ekstrakcji rozpuszczalnikowej, zastosowali mikroekstrakcję do fazy stałej (SPME). Procedura ta przedstawia się następująco: do próbek gleby dodaje się rozpuszczalnik (acetonitryl), ręcznie wytrząsa przez 15 min, odstawia, dekantuje i filtruje uzyskany supernatant. Uzyskany ekstrakt rozcieńcza się 25% wodnym roztworem NaCl w stosunku objętościowym 1:100 i wyosabnia anality metodą SPME. Adsorpcję prowadzono na dwóch rodzajach włókien SPME: CW/DVB i CW/TPR. Pierwsze z wymienionych włókien stosowane było dla analizy metodą chromatografii gazowej, a drugie wysokosprawnej chromatografii cieczowej. Konieczność zastosowania różnych włókien wynika z różnych mechanizmów desorpcji analitów. W przypadku chromatografii gazowej związki są desorbowane w wyniku działania wysokiej temperatury w odpowiednio zmodyfikowanym iniektorze chromatografu. W przypadku analizy HPLC związki desorbowane są rozpuszczalnikowo przy użyciu odpowiedniej komory desorpcyjnej sprzężonej z chromatografem.

S. Calderara i współpracownicy w swoim artykule [9] porównali dwa sposoby przygotowania do analizy GC-ECD pozostałości powybuchowych, którymi były niewielkie kawałki plastiku.

W pierwszym przypadku fragmenty ekstrahowano acetonem (w publikacji nie podano, w jaki sposób prowadzono ekstrakcję) i uzyskany ekstrakt wstrzykiwano do iniektora chromatografu. Drugim sposobem była ekstrakcja wodą (autorzy nie podają, w jaki sposób ją prowadzili) i adsorpcja analitów z fazy wodnej metodą SPME z użyciem włókna PDMS/DVB. Lepsze wyniki uzyskano, stosując technikę SPME.

Jednym z celów badań przeprowadzonych przez F. Monteil-Rivera i współpracowników [29] była optymalizacja parametrów procesu SPME, zastosowanie tej techniki do analizy środków wybuchowych w próbkach osadów z dna morskiego i porównanie uzyskanych wyników z wynikami uzyskanymi przy wykorzystaniu tylko ekstrakcji rozpuszczalnikowej. Próbki osadu, do którego wprowadzono wzorcową mieszaninę związków wybuchowych, ekstrahowano acetonitrylem zgodnie z normą EPA 8330 z tą tylko różnicą, że stosowano mniejszą ilość

rozwpuszczalnika w przeliczeniu na masę próbki niż podaje norma. Uzyskany ekstrakt był dzielony – część wykorzystywano do bezpośredniej analizy z użyciem GC-ECD, a część wykorzystywano do ekstrakcji metodą SPME. Zoptymalizowany sposób prowadzenia ekstrakcji SPME przedstawiał się następująco: acetonitrylowy ekstrakt odparowywano w strumieniu azotu, a suchą pozostałość rozpuszczano w 30% wodnym roztworze NaCl. Fiolkę z tak przygotowanym roztworem umieszczano na mieszadle magnetycznym, zanurzano włókno CW/DVB i przez godzinę prowadzono adsorpcję w temperaturze pokojowej, mieszając roztwór z prędkością 990 obrotów na minutę. Zaadsorbowane związki desorbowano w iniektorze chromatografu i analizowano metodą GC-ECD.

Po przeprowadzeniu analiz stwierdzono, że wykrycie wprowadzonych do osadu związków wybuchowych w ekstrakcie uzyskanym zgodnie z normą EPA jest niemożliwe ze względu na obecność związków przeszkadzających, maskujących sygnały analitów. Zastosowanie techniki SPME poprawiło selektywność całego procesu analitycznego tak, że dało się wykryć wprowadzone związki.

Konieczność oznaczania związków wybuchowych w materiale roślinnym jest związana z ich toksycznością dla ludzi i zwierząt. Niektóre związki wybuchowe wykazują zdolność do bioakumulacji – ich stężenie w roślinach jest znacznie większe niż w glebie, na której rosną [17, 18]. To zjawisko ma dwie istotne konsekwencje. Pierwsza z nich to ta, że rośliny rosnące na glebie o stosunkowo niewielkim zanieczyszczeniu mogą się jednak okazać toksyczne dla ludzi i zwierząt i nie mogą być użyte do produkcji żywności czy paszy. Drugą konsekwencją jest możliwość wykorzystania określonych roślin do rekultywacji zanieczyszczonych terenów – związki pobrane przez rośliny z gleby, zateżone i związane w ich tkankach, mogą być stosunkowo łatwo usunięte – części nadziemne roślin można skosić wysuszyć i spalić.

S. Harvey i współpracownicy [18] opracowali metodę wyosabniania TNT i RDX z materiału roślinnego, która, w uproszczeniu, przedstawia się następująco: tkanki roślinne po liofilizacji poddano hydrolizie kwasowej (HCl), a uzyskany hydrolizat ekstrahowano przy użyciu octanu etylu. Ekstrakt odparowano do sucha, a pozostałość rozpuszczono w dichlorometanie. Uzyskany roztwór wprowadzono na kolumnkę do SPE (Florisil Sep-Pak) i eluowano anality dichlorometanem z dodatkiem octanu etylu dla TNT i dichlorometanem z dodatkiem acetonitrylu dla RDX. Uzyskane roztwory analizowano metodą HPLC.

S. Larson i współpracownicy [24] do wyosobnienia związków wybuchowych z tkanek roślinnych wykorzystali zmodyfikowaną procedurę analizy gleby zawartą w normie EPA 8330. Uzyskane ekstrakty analizowano metodą HPLC. Aby usunąć ewentualne zanieczyszczenia obecne na powierzchni, elementy roślinne przeznaczone

do analizy były trzykrotnie myte poprzez zanurzenie w wodzie destylowanej, a ich powierzchnię osuszono papierowym ręcznikiem. Następnie rośliny ważono i cięto na kawałki nie większe niż 1 cm, umieszczano w komorze chłodzonej do temperatury niższej niż 5°C i homogenizowano. Uzyskany w ten sposób materiał dzielono na próbki analityczne i liofilizowano. Z tak przygotowanymi próbkami postępowano dalej w sposób zgodny z procedurą zawartą w normie EPA, z tą różnicą, że do ekstrakcji używano nie czystego acetonitrylu, lecz mieszaniny wody i acetonitrylu w stosunku objętościowym 30:70. To odstępstwo od procedury EPA wynikało z przeprowadzonych przez autorów badań, które wykazały, że stężenie oznaczanych związków jest istotnie większe w ekstrakcie uzyskanym przy pomocy mieszaniny acetonitryl-woda, niż kiedy próbki były ekstrahowane samym acetonitrylem.

C. Groom, A. Halasz i współpracownicy [16], aby wyekstrahować RDX, HMX i ich metabolity z tkanek roślinnych, posłużyli się metodą opracowaną w oparciu o metodę Larsona [24]. Pocięte tkanki roślinne były homogenizowane w chłodzonej komorze, liofilizowane i ekstrahowane acetonitrylem z wykorzystaniem łaźni ultradźwiękowej przez 18 godzin. Próbki następnie odwirowano, supernatant oddzielano przez dekantację, a następnie rozcieńczano wodą w stosunku objętościowym 1:1, filtrowano i analizowano, stosując metodę HPLC i elektroforezy kapilarnej (CE).

W kolejnej swojej pracy A. Halasz, C. Groom i współpracownicy [17] porównują opisaną wyżej metodę rozpuszczalnikowej ekstrakcji związków wybuchowych z tkanek roślinnych [16] z ekstrakcją prowadzoną przy pomocy dwutlenku węgla w stanie nadkrytycznym (SC-CO₂). Ekstrakcję prowadzono w ten sposób, że liofilizowane tkanki roślinne wymieszane z nieaktywnym piaskiem pełniącym funkcję wypełniacza umieszczano w komorze ekstrakcyjnej urządzenia do ekstrakcji fazą nadkrytyczną (Dionex SFE 703). Dwutlenek węgla w stanie nadkrytycznym przepływał przez komorę ekstrakcyjną. Ciśnienie płynu z wyekstrahowanymi związkami po przejściu przez restryktor stopniowo się zmniejsza, dwutlenek węgla przechodzi w formę gazową, a wyekstrahowane związki pozostają w fiolkach zawierających niewielką ilość acetonitrylu. Ekstrakcję prowadzono również, stosując niewielką (4–5%) domieszkę acetonitrylu lub wody jako modyfikatorów fazy nadkrytycznej. Modyfikatory dodawane były do dwutlenku węgla i (lub) wprowadzane do ekstrahowanego materiału. W dyskusji wyników, porównując metody ekstrakcji, autorzy pozytywnie wyrażają się o ekstrakcji płynem w stanie nadkrytycznym, wskazując, że jest ona dziesięciokrotnie szybsza od ekstrakcji z użyciem ultradźwięków, dwutlenek węgla jest nietoksyczny, w stanie nadkrytycznym łatwo penetruje ekstrahowany materiał, a proces ekstrakcji prowadzony jest w niskiej temperaturze, co za-

pobiega rozkładowi termicznie niestabilnych analitów. Zaprezentowane w publikacji zestawienie wyników analizy HMX uzyskanych dla 10 różnych tkanek roślinnych ekstrahowanych każdą z porównywanych metod wskazują jednak, że ekstrakcja rozpuszczalnikowa jest metodą bardziej efektywną – przy jej pomocy uzyskuje się wyższe współczynniki odzysku.

4. Pobieranie próbek z powierzchni

Powierzchnie, które bada się pod kątem obecności na nich śladów środków wybuchowych, podzielić można na gładkie, mało nasiąkliwe oraz porowate. Przykładem tych pierwszych mogą być powierzchnie mebli, pojemników, pakunków, plastikowych i skórzanycy elementów wyposażenia samochodów czy też powierzchnie metalowych płyt (np. reklamy i znaki drogowe znajdujące się w pobliżu miejsca, gdzie doszło do detonacji). Przykładem obiektów o dużych nasiąkliwych powierzchniach są elementy odzieży, tapicerka etc.

Chociaż każde z laboratoriów zajmujących się analizą środków wybuchowych ma opracowaną procedurę pobierania próbek z dużych powierzchni, zaskakująco niewiele publikacji przedstawia dokładny sposób postępowania. Zamieszczone poniżej informacje opierają się głównie na osobistej wymianie doświadczeń.

Próbki z gładkich powierzchni pobiera się zwykle poprzez przetarcie ich tamponem z czystego, nieaktywnego materiału (np. wata celulozowa, celulozowa bibuła filtracyjna) zwilżonego odpowiednim rozpuszczalnikiem (np. acetonitryl, metanol-woda, etanol-woda).

Próbki z materiałów włókienniczych pobiera przy pomocy odpowiednich urządzeń działających na zasadzie odkurzacza. W wyniku działania podciśnienia obecne na materiale cząstki są zasysane wraz z powietrzem i oddzielane na filtrze.

Z uzyskanymi tamponami lub filtrami postępuje się jak z innymi materiałami stałymi, tj. poddaje się ekstrakcji rozpuszczalnikowej. Uzyskany ekstrakt jest oczyszczony (zwykle przez filtrację lub wirowanie), w razie potrzeby zateżony i analizowany.

Jeśli zachodzi konieczność zateżenia analitów i (lub) oddzielenia związków przeszkadzających, wprowadza się dodatkowy etap w postaci selektywnej adsorpcji metodą SPE lub SPME.

W przypadku analizy powierzchni za pomocą urządzeń przenośnych i urządzeń stosowanych na lotniskach, przeprowadzenie ekstrakcji cieczowej jest niemożliwe – w pierwszym przypadku nie ma warunków do jej przeprowadzenia, a w przypadku badania powierzchni ciała, ubrania i bagażu pasażerów wyniki analizy muszą być znane bardzo szybko, podczas gdy ekstrakcja jest procesem czasochłonnym. Alternatywą dla ekstrakcji rozpuszczalnikowej jest termodesorpcja. Gładkie powierzch-

nie przeciera się suchym filtrem, a materiały włókiennicze „odkurza”. Filtr umieszcza się następnie w odpowiedniej komorze i ogrzewa, a odparowane lub zdesorbowane związki organiczne trafiają do detektora (m.in. IMS, MS/MS, TEA) bądź bezpośrednio, bądź po wstępnym rozdzieleniu chromatograficznym (GC) [8, 45].

5. Podsumowanie

Przegląd stosowanych w różnych laboratoriach procedur przygotowywania próbek do analizy środków wybuchowych metodami chromatograficznymi wskazuje na rosnącą popularność metody mikroekstrakcji do fazy stałej. Tendencja ta wynika z faktu, że jest to metoda prosta, szybka i nie wymagająca użycia rozpuszczalników organicznych. Jej największą zaletą jest możliwość jednoczesnej eliminacji związków przeszkadzających i zateżenia analitów poprzez selektywną ich adsorpcję. Można ją stosować do zarówno do przygotowywania próbek do analizy metodą GC, jak i HPLC.

W przypadku próbek wodnych procedura przygotowania sprowadza się do rozpuszczenia w próbce odpowiedniej ilości soli i zanurzenia w mieszanej próbce włókna SPME na określony czas. Do próbek dodaje się sól, ponieważ hydratacja wprowadzonych w ten sposób jonów ułatwia przechodzenie rozpuszczonych związków organicznych do fazy włókna.

Większość związków wybuchowych cechuje się niską prężnością par, a niektóre z nich są termolabilne. Te cechy powodują, że nie można ich selektywnie zateżać przez adsorpcję z fazy nadpowierzchniowej – prężność ich par w temperaturze pokojowej jest zbyt niska, a jej zwiększenie poprzez ogrzanie próbki mogłoby powodować rozkład analitów. Z tego względu w przygotowaniu próbek stałych pierwszym etapem jest zwykle ekstrakcja rozpuszczalnikowa. Jej główną wadą jest to, że ekstrahowane są nie tylko anality, ale też obecne w próbce związki przeszkadzające, których obecność może w pewnych wypadkach uniemożliwić analizę. Zastosowanie SPME jako kolejnego etapu przygotowania próbki pozwala przezwyciężyć te trudności. Określoną objętość organicznego ekstraktu rozpuszcza się w wodnym roztworze soli i adsorbuje anality z użyciem SPME.

Dostępność aparatury pozwalającej w sposób automatyczny prowadzić analizę SPME-GC oraz intensywne prace nad pełną automatyzacją i sprzężeniem metod SPME i HPLC pozwalają sądzić, że z czasem zastosowanie metody SPME będzie coraz powszechniejsze.

ZAŁĄCZNIK 1. OBJAŚNIENIE SKRÓTÓW I NIEKTÓRYCH NAZW ZWYCZAJOWYCH UŻYTYCH W TEKŚCIE

ADNT	Aminodinitrotoluen
CE	Elektroforeza kapilarna
CV	Carbowax
DNT	Dinitrotoluen
DVB	Diwinylobenzen (1,3-dietenobenzen)
ECD	Detektor wychwytu elektronów
EGDN	Diazotan glikolu etylenowego
GC	Chromatografia gazowa
Heksogen	Cyklotrimetylenotrinitroamina
HMTD	Nadtlenek urotropiny
HMX	Cyklotetrametylenotetranitroamina
HPLC	Wysokosprawna chromatografia cieczowa
IMS	Spektrometria ruchliwości jonów
IR	Spektrometria w podczerwieni
MS	Spektrometria mas
NG	„Nitrogliceryna”, triazotan propanotriolu
Nitrogliceryna	Triazotan propanotriolu
Nitroglikol	Diazotan glikolu etylenowego
Oktogen	Cyklotetrametylenotetranitroamina
PETN	Tetraazotan pentaerytrytu
RDX	Cyklotrimetylenotrinitroamina
SDME	Mikroekstrakcja do pojedynczej kropli
SEM-EDX	Elektronowa mikroskopia skaningowa z detekcją promieniowania rentgenowskiego
SPE	Ekstrakcja do fazy stałej
SPME	Mikroekstrakcja do fazy stałej
TATP	Nadtlenek acetonu
TEA	Detektor chemoluminescencyjny
Tetryl	2,4,6-trinitrofenylo-N-metylonitoramina
TNB	Trinitrobenzen
TNT	Trinitrotoluen
XRF	Spektrometria fluorescencji rentgenowskiej
