



TLC AS A SCREENING TECHNIQUE IN THE ANALYSIS OF EXPLOSIVES – DEVELOPMENT OF A NEW ANALYTICAL PROCEDURE

Rafał BORUSIEWICZ¹, Sebastian LERG²

¹ *Department of Criminalistics, Institute of Forensic Research, Kraków, Poland*

² *Hochschule Fresenius, Idstein, Germany*

Abstract

TLC analysis on silica plates is commonly used as a screening technique in the analysis of explosives. As various solvent systems are used in different laboratories, the question arises as to which of these systems is most effective. To answer this question various solvent systems were used to separate a mixture of six common organic explosive compounds: NC, EGDN, NG, TNT, RDX and PETN on silica plates and the results were evaluated. Because of medium polarity, CN modified TLC plates seem to be more appropriate for the analysis of explosives than silica plates. To check if in fact CN modified plates are more effective in this application, mobile phase optimization was conducted. Mobile phases were found enabling separation of all six explosive compounds, which was not possible on silica plates, proving that CN modified plates are better for screening analysis of explosives.

Key words

TLC; HPTLC; Explosives; Screening analysis; PRISMA model.

Received 10 November 2009; accepted 18 December 2009

1. Introduction

The issue of detection and identification of traces of explosive substances in material collected from the site of an explosion or revealed on items belonging to a suspect has special significance. The results of such analysis may provide information enabling investigators to reconstruct the course of an event and find the perpetrator.

An effective screening technique is of special importance as explosive compounds differ in their physical and chemical properties and different methods of samples preparation and confirmatory analysis should be employed depending on the kind of explosive present in the sample. Sometimes many samples are collected from the place of explosion and an effective screening method, enabling selection of samples in

which traces of explosive may be present allows one to shorten the time of analyses and to decrease the costs.

Thin Layer Chromatography (TLC) is the method of choice in screening analysis of explosives, because it is relatively cheap and fast, many samples may be analysed in a single run and the sample preparation is comparatively simple – extracts do not have to be cleaned or very concentrated. It also has a low limit of detection and can be selective when proper visualization methods are used. TLC is used in world-leading laboratories as a screening technique, but procedures employed in these laboratories differ. A literature search provides the reader with further procedures of TLC analysis of explosives. The question arises as to which of these procedures is most effective and whether, by using modern TLC equipment (HPTLC plates, modified stationary phases), TLC analysis of explosives

may be further improved. The aim of the presented research was to answer these questions.

2. Aim of the research

The presented research had two main objectives:

- to compare the effectiveness of existing procedures of TLC analyses of explosives and to choose the most effective ones on the basis of their ability to separate the most common organic explosives: TNT, RDX, PETN, NG, EGDN and NC;
- to develop a method of TLC analysis of common organic explosives utilizing CN-modified HPTLC plates and to compare the effectiveness of this with the best methods utilizing HPTLC silica plates. The PRISMA model was used for optimization of the composition of the mobile phase.

3. Materials and methods

Investigations were performed using:

- Merck TLC plates (silica-gel 60), Macherey-Nagel Nano SILGUR-20/UV254 (HPTLC silica plates with preconcentration zone) and Macherey-Nagel Nano-SIL CN/UV254 (HPTLC CN-modified-plates). All plates were glass-backed and had the format 10 × 10 cm;
- a horizontal development chamber, model CHROM-DES DS-II-10 20;
- organic solvents which were used as the components of tested mobile phases: toluene, ethyl acetate, cyclohexane; petroleum ether (50°–70°C), acetone, isopropanol, methanol, chloroform, dichloroethane, acetonitrile, trichloroethene and hexane. These solvents were obtained from different suppliers and were at least “pure” grade;
- to prepare modified Griess reagent, the following chemicals were used: Sulfanilamide (Fluka, purum), N-(1-naphthyl)ethylenediamine (Fluka, purum), orthophosphoric acid (Fluka, purum p.a.), KCl (Chempur, pure p.a.), ethanol (Chempur, pure p.a.);
- standard solutions of TNT, RDX, PETN, NG, EGDN and NC were prepared by dissolving pure explosives in acetone. Also a mixed standard was prepared, containing TNT, RDX, PETN, NG and EGDN.

4. Results and discussion

4.1. Optimization of visualization process

Separation was carried out on UV active plates. After development, the plates were dried and examined under UV-light, $\lambda = 254$ nm, to detect UV-absorbing substances. Under these conditions, TNT and RDX appear as black spots. In the next step, a 3% solution of KOH in ethanol was applied to the plate with a cotton swab. After this treatment, TNT appears as brown spot. Plates were then heated and modified Griess-reagent was sprayed immediately onto the warm plate. This caused all nitro- and nitrate ester compounds to form pinkish spots. The modified Griess reagent was prepared before use by mixing equal volumes of two solutions, containing sulfanilamide (SUA) and N-(1-naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride (NED). These solutions were prepared as follows:

- 20 g of SUA diluted in 25 ml of 85% phosphoric acid and brought to a volume of 250 ml with deionised water;
- 1.38 g of NED diluted in 25 ml of 85% phosphoric acid and brought to a volume of 250 ml with deionised water.

As a part of the preliminary experiments, the process of spots visualization was optimized in order to obtain intensive coloured spots with minimal operations, in a short time and using the lowest possible temperature to avoid evaporation/degradation of the analytes. The starting point was a procedure according to which, after developing, the plates were put into an oven for 15 min at a temperature of 120°C. After the application of KOH, the plates were put into the oven again, this time for 5 min at 120°C. The results of optimization are summarized in Table I. The results showed that 10 min of heating at 100°C after application of KOH is enough to obtain good results – these conditions are presented in Table I and were used in further experiments.

4.2. Comparison of the effectiveness of published procedures of TLC analysis of explosives

An overview of TLC solvent systems routinely used in some of the world's leading laboratories, such as the Forensic Explosives Laboratory UK [9] and Mass Spectrometry and Explosives Analysis Laboratory, Israel [8] as well as some other popular solvent systems found in the literature, is given in Table II. In the column entitled “declared explosives”, a list of compounds is given which, according to the Authors,

TABLE I. RESULTS OF EXPERIMENTS CONCERNING OPTIMISATION OF SPOT VISUALISATION PROCESS

No	Conditions	Comment	Results
1	15 min drying at 120°C Application of KOH in EtOH 5 min drying at 120°C Application of Griess-reagent	Conditions found in the literature	Good results, but procedure is time-consuming
2	Application of KOH in EtOH 5 min drying at room temperature Application of Griess-reagent	No heating	EGDN, PETN not visible, temperature is too low
3	Application of KOH in EtOH 10 min drying at 60°C Application of Griess-reagent	60°C single heating	EGDN, PETN not visible, temperature is too low
4	Application of KOH in EtOH 10 min drying at 80°C Application of Griess-reagent	80°C single heating	Colours of spots are light, temperature is too low
5	Application of KOH in EtOH 10 min drying at 100°C Application of Griess-reagent	100°C single heating	Good results, all spots are clearly visible
6	15 min drying at 80°C Application of KOH in EtOH 5 min drying at 80°C Application of Griess-reagent	80°C double heating	Colours of spots are light – temperature is too low. Heating twice does not improve the results – does not seem to be necessary
7	15 min drying at 100°C Application of KOH in EtOH 5 min drying at 100°C application of Griess-reagent	100°C double heating	Good results, but procedure is time-consuming
8	10 min drying at 110°C Application of KOH in EtOH 5 min drying at 110°C Application of Griess-reagent	110°C double heating	Good results, but procedure is time-consuming

can be separated with specific solvent mixture on silica plates.

The effectiveness of all of the solvent systems specified in Table II as well as some additionally prepared solvent mixtures with comparable Polarity Index P' was checked experimentally. They were used to separate investigated explosives (EGDN, NG, PETN, RDX, TNT and NC) on silica plates. Mixed standard solution as well as standards of every compound were applied to the plate with a glass capillary and after drying, plates were developed in a horizontal chamber using a specific solvent mixture. For the separated compounds, retardation factor (R_f) values were calculated. For separations carried out more than once, the uncertainty was calculated as a standard deviation of the results. In some cells in Tables III, IV and V, the abbreviation "n.a." (not applicable) is given, instead

of R_f values. These signs mean that for a specific compound/solvent system, the R_f could not be calculated because the compound was not separated from others, or because of an irregular spot shape (a double spot because of creation of a beta front, or a long streak instead of a spot).

The results are summarized in Table III and Table V. For the following mixtures (v:v): petroleum ether : acetone (1:1); petroleum ether : isopropanol (4:1) and hexane : isopropanol (4:1), the phenomenon of creating secondary solvent fronts ("beta fronts") occurred, so they turned out not to be useful. The best results were obtained for trichloroethene : acetone (8:2) and toluene : ethyl acetate (9:1). For these systems, additional analyses were carried out on HPTLC plates – their results are summarized in Table IV.

TABLE II. COMPOSITION OF SOLVENT MIXTURES USED FOR SEPARATION OF EXPLOSIVE COMPOUNDS ON TLC SILICA PLATES

Source	Solvent mixture	Ratio	Declared explosives
1, 9	Toluene/ethyl acetate	9/1	NG, tetryl, TNT, RDX, PETN, HMX, TATP, HMTD
1	Toluene/cyclohexane	7/3	NG, EGDN
2	petroleum ether/acetone	1/1	RDX, HMX, PETN, NG
2	Petroleum ether/isopropanol	8/2	TNT, TNB, 2,4-DNB, tetryl, 2-amino-4,6-DNT, 4-amino-2,6-DNT
1	Methanol/acetone	2/3	Movement of NC
1	Chloroform/acetone	2/1	Nitramines, movement of NC
8	Petroleum ether/dichloroethane	8/2	NG, EGDN
8	Dichloroethane/acetonitrile	9/1	TNT, RDX, PETN, NG
1, 8	Trichloroethene/acetone	8/2	TNT, RDX, PETN, NG
8	Petroleum ether/ethyl acetate	9/1	TNT, RDX, PETN, NG

TABLE III. RESULTS OF SEPARATION OF NG, EGDN, PETN, RDX, TNT AND NC ON SILICA PLATES WITH DIFFERENT SOLVENT SYSTEMS

Source	Solvent mixture	Ratio (v/v)	Type of plate	n	R _f values					
					NG	EGDN	PETN	RDX	TNT	NC
8	Dichloroethane/acetonitrile	9/1	TLC	1	0.92	n.a.	0.94	0.63	0.90	n.a.
1, 8	Trichloroethene/acetone	8/2	TLC	1	0.65	n.a.	0.71	0.27	0.77	n.a.
8	Petroleum ether/ethyl acetate	9/1	TLC	1	0.24	n.a.	0.39	0.00	0.48	n.a.
1, 9	Toluene/ethyl acetate	9/1	TLC	3	0.64 ± 0.02	n.a.	0.69 ± 0.01	0.13 ± 0.01	0.76 ± 0.01	n.a.
–	Butyl acetate/hexane	4/6	HPTLC	1	0.87	0.77	1.00	0.17	1.00	0.00
–	Butyl acetate/hexane	1/3	TLC	1	0.49	n.a.	0.74	0.04	0.75	0.00
2	Petroleum ether/acetone	1/1	HPTLC	1	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
2	Petroleum ether/isopropanol	4/1	TLC	1	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
–	Hexane/isopropanol	4/1	TLC	1	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.

TABLE IV. RESULTS OF SEPARATION OF ANALYZED EXPLOSIVES ON HPTLC SILICA PLATES AND BEST PERFORMING SOLVENT SYSTEMS

Source	Solvent mixture	Ratio (v/v)	Type of plate	n	R _f values					
					NG	EGDN	PETN	RDX	TNT	NC
1, 8	Trichloroethene/acetone	8/2	HPTLC	2	0.68 ± 0.01	n.a.	0.75 ± 0.00	0.30 ± 0.01	0.80 ± 0.00	0.00
1, 9	Toluene/ethyl acetate	9/1	HPTLC	4	0.66 ± 0.01	n.a.	0.71 ± 0.01	0.14 ± 0.02	0.77 ± 0.02	0.00

n.a. – not applicable (see explanation in the text).

Unfortunately, neither of these two systems enables separation of NG and EGDN, so an additional solvent system must be used for separation of NG and EGDN. Two solvent systems were found in the literature, which, according to the authors, are able to separate EGDN and NG on silica plates. These systems were tested and the results are presented in Table V. Both tested solvents mixtures enabled separation of EGDN and NG, but the results obtained for toluene:cyclohexane (7:3) were slightly better. For this system, additional separations on HPTLC silica plates were carried out – their results are presented in Table V.

None of the tested solvent systems gave satisfactory results for nitrocellulose. Although a mixture of methanol and acetone (2:3) [1] caused NC to move from its starting point, the result was not a spot, but a long streak stretching from the starting line to the solvent front, while all other analytes migrated with the solvent front. This effect is probably caused by the heterogeneity of nitrocellulose, as nitrocellulose is a polymeric material and its molecules are chains of different length.

This part of the research showed that among solvent systems designed for TLC analysis of organic explosives on silica plates, mixtures of toluene : ethyl acetate (9:1) and trichloroethene : acetone (8:2) are most effective. However, even these mixtures are not able to separate EGDN and NG – if a spot is detected corresponding to these analytes, the sample should be analyzed again using toluene : cyclohexane (7:3). Nitrocellulose cannot be directly detected by TLC as there is no solvent mixture able to move it from the start line, but if in the sample, a substance is present which stays on the starting line and gives a positive result in the Griess reaction, then this is a strong indication that nitrocellulose may be present.

4.3. Developing a new method of HPTLC analysis of explosives on CN modified plates with mobile phase optimization using a PRISMA model

The procedures of TLC analysis of explosives which are used in forensic laboratories and those which can be found in the literature describe separation of analytes on silica plates only. Nowadays less polar, modified silica TLC plates are available and because the explosive compounds are medium polar or non-polar, these plates seem to be more suitable for separation of these compounds. For the experiments, CN modified plates were chosen because of their medium-polar character.

The PRISMA model is one of the systematic approaches which can be used to optimize the composition of the mobile phase for isocratic elution in liquid chromatography. The optimized parameters are solvents strength and selectivity. The PRISMA system may be visualized as a prism – shaped, three dimensional geometric model (Figure 1).

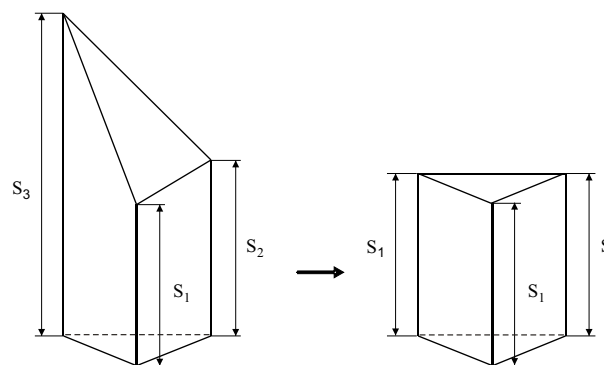


Fig. 1. Scheme of PRISMA mobile phase optimization model. S_1 , S_2 , S_3 – solvent strengths of solvents 1, 2 and 3.

TABLE V. RESULTS OF EXPERIMENTS WHOSE AIM WAS TO COMPARE SOLVENT SYSTEMS ENABLING SEPARATION OF EGDN AND NC ON SILICA PLATES

Source	Solvent mixture	Ratio (v/v)	Type of plate	n	R_f values					
					NG	EGDN	PETN	RDX	TNT	NC
8	Petroleum ether/dichloroethane	8/2	TLC	4	0.12 ± 0.01	0.24 ± 0.02	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
1	Toluene/cyclohexane	7/3	TLC	3	0.41 ± 0.01	0.52 ± 0.01	n.a.	0.03 ± 0.00	0.49 ± 0.01	n.a.
1	Toluene/cyclohexane	7/3	HPTLC	3	0.45 ± 0.01	0.56 ± 0.01	0.48 ± 0.05	0.03 ± 0.01	0.53 ± 0.01	n.a.

n.a. – not applicable (see explanation in the text).

The optimization process consists of three parts. In the first part, the stationary phase and the three most promising solvents belonging to different selectivity groups according to the Snyder classification are chosen [8]. These three solvents (1, 2 and 3) form three edges of the prism. As they differ in solvent strength, S_1 , S_2 and S_3 , the two solvents with higher solvent strength must be adjusted to the one with the lowest solvent strength by adding an appropriate volume of solvent with $S = 0$, i.e. hexane for normal phase separation or water for reversed phase separation. Consequently, all three solvents have the same strength but differ in selectivity. All the points on the equilateral triangle formed by the top of the prism represent mixtures of the same solvent strength but different selectivity (Figure 2). A mixture of equal volumes of the three solvents, which is represented by the central point of the triangle, is used for optimization of solvent strength. This mixture is used to separate the analytes and, on the basis of the results obtained, the solvent strength is adjusted by adding additional volume of solvent with $S = 0$ (i.e. decreasing the height of the prism).

In the second part, the selectivity of the mobile phase is optimized. On the triangle representing the solvent strength determined in the first part, three points near the edges are chosen and three experiments with mobile phases represented by these points are carried out (Figure 2). The results serve as a guideline for

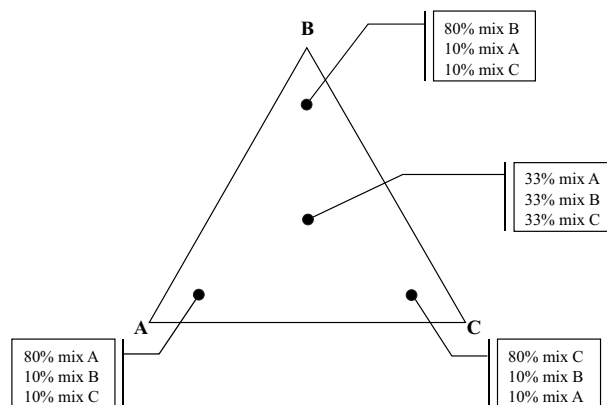


Fig. 2. “Selectivity triangle” from the PRISMA optimization model. Points marked on the triangle represent the composition of solvents mixtures which are used in the optimization process.

further experiments whose aim is to choose the mixture with best selectivity.

The third step consists in final optimization of solvent strength to obtain satisfactory resolution with minimal time. A detailed description of the PRISMA model can be found in the literature [3, 4, 5, 6].

As the first step of the optimization process, 12 pure solvents were chosen, at least one from each of Snyder’s selectivity groups [3]. They were used to separate analytes on HPTLC CN plates. The results are presented in Table VI. The “n.a.” (not applicable) ab-

TABLE VI. RESULTS OF SEPARATION OF ANALYTES ON HPTLC CN-MODIFIED PLATES WITH PURE SOLVENTS BELONGING TO DIFFERENT SNYDER’S SELECTIVITY GROUPS

Group	Solvent	Time of development [min]	Polarity index	R_f values					
				NG	EGDN	PETN	RDX	TNT	NC
–	Hexane	20	0	0.02	0.11	0	0	0.04	0
2	Isopropanol	140	3.9	0.53	0.65	0.33	0.42	0.4	0
2	Ethanol	75	4.3	0.73	n.a.	0.59	0.63	0.65	0
3	NN-DMF	50	6.4	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
4	Acetic acid	75	6.0	0.78	n.a.	0.69	0.76	0.82	0
5	Trichloroethene	40	1	0.35	0.57	0.27	0.03	0.57	0
5	Dichloroethane	25	3.5	0.86	n.a.	0.87	0.69	0.96	0
6	Ethyl acetate	20	4.4	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
6	1,4-dioxane	30	4.8	1	n.a.	1	0.77	1	0
6	Butyl acetate	30	3.9	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
7	Toluene	15	2.4	0.62	0.75	0.52	0.24	0.85	0
8	Chloroform	20	4.1	0.76	0.9	0.77	0.48	0.93	0

n.a. – not applicable (see explanation in the text).

breviation in some cells of the table means that R_f could not be calculated because the compound was not separated from others or because of irregular spot shape. Three solvents with the best result were selected for further experiments: toluene, isopropanol and trichloroethene (highlighted in Table VI). An interesting thing to note is the very good results obtained for pure toluene – good separation of all analytes in a relatively short time of 15 min. The solvent strengths of selected solvents were equalized to the solvent strength of toluene by mixing isopropanol with hexane and trichloroethene with chloroform. In this way, solvents A, B and C were prepared. Each of these mixtures was used to separate analytes on HPTLC CN-modified plates. The results are presented in Table VII.

In the next step in the optimization process, the solvents from the centre and the three corners of the “solvents triangle” (Figure 2) were used in the analysis. The results are presented in Table VIII. A mixture of 33:33:33 and a mixture of 10:80:10 of solvents A, B and C enabled separation of all five analytes proving that the PRISMA method is an effective tool in the optimization of the mobile phase. Using the PRISMA optimization procedure, it is possible to control the migration distance of single substances. Though further optimization of the composition of mobile phase was

probably possible, additional experiments were not undertaken, because satisfying results had already been obtained and trying other points from the “solvent triangle” would only slightly change the R_f values compared to those already obtained. Another reason why further experiments were not embarked on was because during preliminary experiments an almost perfect solvent – pure toluene – was found. With toluene, very good separation of analyzed explosives was obtained and using a single component mobile phase enabled us to avoid all the problems connected with using mixtures, i.e. problems with reproducibility and unmixing of the components of the mobile phase during the chromatographic process. As a result of the experiments with HPTLC CN plates, two solvent systems were chosen: toluene as the first one and a mixture of isopropanol : hexane 62:38 (v:v) for confirmatory analysis. The isopropanol : hexane mixture was chosen because it provides acceptable separation of all compounds of interest and the order of elution is different than with toluene. For the chosen mobile phases, the separation of analytes was carried out three times and standard deviations of R_f values were calculated (Table IX). The obtained results showed that the reproducibility of separations is acceptable.

TABLE VII. RESULTS OF SEPARATION OF ANALYZED EXPLOSIVES ON HPTLC CN MODIFIED PLATES WITH CHOSEN SOLVENTS AFTER EQUALIZING THE SOLVENTS' STRENGTH

Solvent mixture	Ratio (v/v)	Time of development [min]	R_f values					
			NG	EGDN	PETN	RDX	TNT	NC
Isopropanol/hexane	0,62/0,38	35	0.53	0.66	0.28	0.36	0.39	0
Trichloroethene/chloroform	0,45/0,55	25	0.61	0.75	0.52	0.21	0.79	0
Toluene	–	15	0.62	0.75	0.52	0.24	0.85	0

TABLE VIII. RESULTS OF SEPARATION OF ANALYZED EXPLOSIVES ON HPTLC CN MODIFIED PLATES WITH FOUR MIXTURES OF CHOSEN SOLVENTS FROM THE “SOLVENTS TRIANGLE”

Solvent mixture	Ratio (v/v)	R_f values					
		NG	EGDN	PETN	RDX	TNT	NC
A/B/C	3/3/3	0.69	0.8	0.6	0.44	0.87	0
A/B/C	1/1/8	0.69	n.a.	0.61	0.38	0.87	0
A/B/C	1/8/1	0.72	0.79	0.65	0.41	0.83	0
A/B/C	8/1/1	0.61	0.72	0.42	0.45	0.61	0

A – mixture 62/38 (v/v) of isopropanol and hexane; B – mixture 55/45 (v/v) of trichloroethene and chloroform; C – toluene; n.a. – not applicable (see explanation in the text).

TABLE IX. RESULTS OF SEPARATION OF ANALYZED EXPLOSIVES ON HPTLC CN MODIFIED PLATES WITH BEST PERFORMING MOBILE PHASES

Solvent mixture	Ratio (v/v)	R_f values					
		NG	EGDN	PETN	RDX	TNT	NC
Toluene	–	0.63 ± 0.01	0.75 ± 0.01	0.53 ± 0.03	0.25 ± 0.02	0.85 ± 0.01	0
Isopropanol/hexane	0.62/0.38	0.52 ± 0.02	0.65 ± 0.01	0.29 ± 0.01	0.37 ± 0.01	0.39 ± 0.01	0

5. Conclusions

Comparison and evaluation of existing methods of TLC analysis of explosives on silica plates proved that mixtures of toluene : ethylacetate (9:1) and trichloroethene : acetone 8:2) were the most effective solvent systems. However, even with these mixtures, it is not possible to separate all investigated compounds – EGDN and NG can not be separated. To separate EGDN and NG on a silica plate, a mixture of toluene and cyclohexane (7:3) must be used.

The research concerning use of CN modified HPTLC plates in analysis of explosives showed that they are much more effective than silica plates. Mobile phases enabling us to separate all analyzed compounds, including EGDN and NG, in one chromatographic process were easily found, which was not possible for silica plates.

Toluene was found to be the best mobile phase, enabling us to separate all analyzed compounds within a period of time as short as 15 min. If there is a need for confirmation of compound identification by analysis with a different mobile phase, a mixture of isopropanol : hexane (62:38) should be used.

The PRISMA optimization procedure proved to be an effective tool, but mobile phases created with use of it have at least 4 components, which can cause some problems with reproducibility. As simple and very effective mobile phases were found during the research, it is these phases which are recommended for carrying out separation on CN-modified silica plates.

References

1. Forensic investigation of explosions, Beveridge A. [ed.], Taylor & Francis, London 1998.
2. Nam S. I., On-site analysis of explosives in soil evaluation of thin-layer chromatography for confirmation of analyte identity, U.S. Army Cold Regions Research and Engineering Laboratory, 1997 [http://www.crrel.usace.army.mil/library/specialreports/SR97_21.pdf].
3. Nyiredy Sz., Erdelmeier C. A. J., Meier B. [et al.], The PRISMA mobile phase optimization model in thin-layer

chromatography – separation of natural compounds, *Planta Medica* 1985, 3, 241–246.

4. Nyiredy Sz., Meier B., Erdelmeier C. A. J. [et al.], PRISMA: a geometrical design for solvent optimization in HPLC, *Journal of High Resolution & Chromatography Communications* 1985, 8, 186–188.
5. Nyiredy Sz., Wosniok W., Thiele H. [et al.], PRISMA model for computer-aided mobile phase optimization based on automatic peak identification approach, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 1991, 14–16, 3077–3310.
6. Outinen K., Vuorela H., Hiltunen R., Optimization of HPLC separation by computer-assisted optimization methods. Comparison of three methods, *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 1996, 4, 199–210.
7. Snyder L., R. Carr P. W., Rutan S. C., Solvatochromically based solvent-selectivity triangle, *Journal of Chromatography* 1993, 656, 537–547.
8. Tamiri T., Analysis of explosives [in:] *Encyclopaedia of forensic science*, Siegel J. A., Saukko P. J., Knupfer G. C. [eds.], Academic Press, London 2000.
9. Procedure of TLC analysis of the explosives used in Forensic Explosive Laboratory, DSTL [personal communication].

APPENDIX 1. GLOSSARY OF THE ABBREVIATIONS OF THE NAMES OF EXPLOSIVE COMPOUNDS USED IN THE TEXT

Acronym	Customary name (s)	Chemical name
NG	Nitroglycerine	1,2,3-trinitroxypropane
NC	Nitrocellulose	–
PETN	Pentaerythritol tetranitrate, pentrite	1,3-bis(nitryloxy)-2,2-bis(nitriloxy-methyl)-propane
RDX	Hexogen	1,3,5-trinitroperhydro-1,3,5-triazine
EGDN	Ethylene glycol dinitrate	1,2-ethanediol dinitrate
TNT	Trinitrotoluene	2-methyl-1,3,5-trinitrobenzene

Corresponding author

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

TLC JAKO TECHNIKA PRZESIEWOWA STOSOWANA W ANALIZIE ŚRODKÓW WYBUCHOWYCH – OPRACOWANIE NOWEJ PROCEDURY ANALITYCZNEJ

1. Wprowadzenie

Problem wykrywania i identyfikacji śladów środków wybuchowych w materiale pochodzącym z miejsca eksplozji lub w próbkach zabezpieczonych od podejrzanego ma specjalne znaczenie. Wyniki analiz tego rodzaju mogą dostarczyć informacji umożliwiających odtworzenie przebiegu zdarzenia i zidentyfikowanie sprawcy.

Zastosowanie efektywnej metody analizy przesiewowej jest szczególnie istotne, ponieważ związki wybuchowe różnią się właściwościami fizykochemicznymi i w zależności od rodzaju związku obecnego w próbce, należy zastosować różne techniki przygotowania próbki i analizy potwierdzającej. Bywa, że z miejsca eksplozji pobieranych jest wiele próbek. W takich wypadkach efektywna metoda analizy przesiewowej umożliwia wyselekcjonowanie tych próbek, w których mogą być ślady środka wybuchowego, a co za tym idzie, skrócić czas oczekiwania na wyniki analiz i obniżyć ich koszt.

Chromatografia cienkowarstwowa (TLC) jest uważana za najlepszą metodę analizy przesiewowej środków wybuchowych, ponieważ jest stosunkowo tania, szybka, umożliwia jednoczesną analizę kilku próbek, a sposób przygotowania próbek do analizy jest względnie prosty – analizowane ekstrakty nie muszą być oczyszczane ani zatężane. Cechuje się również niskim progiem wykrywalności i selektywnością, jeśli zastosuje się odpowiednie metody wizualizacji rozdzielonych związków. TLC jest stosowana w wiodących laboratoriach jako metoda przesiewowa, ale procedury stosowane w tych laboratoriach są różne. W specjalistycznej literaturze można znaleźć jeszcze inne procedury analizy środków wybuchowych metodą TLC. Powstaje zatem pytanie, która z tych procedur jest najbardziej efektywna i czy stosując nowoczesny sprzęt, taki jak płytki wysokosprawne (HPTLC) czy płytki z modyfikowaną fazą krzemionkową, można udoskonalić analizę środków wybuchowych metodą TLC? Celem prezentowanych badań było udzielenie odpowiedzi na te pytania.

2. Cel badań

Cel badań stanowiło:

- porównanie efektywności istniejących procedur analizy środków wybuchowych metodą TLC i wybranie metody (bądź metod) najlepszych na podstawie ich zdolności do rozdzielenia najważniejszych organicz-

nych środków wybuchowych: TNT, RDX, PETN, NG, EGDN i NC;

- opracowanie metody analizy TLC organicznych środków wybuchowych z zastosowaniem płytek HPTLC z fazą stacjonarną typu CN i optymalizacją składu fazy mobilnej z zastosowaniem modelu PRISMA oraz porównanie efektywności tej metody z najlepszymi metodami wykorzystującymi płytki HPTLC z niemodyfikowaną fazą krzemionkową.

3. Materiały i metody

Do badań wykorzystano:

- płytki TLC z fazą krzemionkową firmy Merck (silica-gel 60), płytki HPTLC z fazą krzemionkową i strefą prekoncentracji firmy Macherey-Nagel (Nano SIL-GUR-20/UV254) oraz płytki HPTLC z fazą stacjonarną typu CN firmy Macherey-Nagel (Nano-SIL CN/UV254). Stosowano płytki szklane o wymiarach 10 cm 10 cm;
- poziomą komorę do chromatografii cienkowarstwowej, model CHROMDES DS-II-10 20;
- rozpuszczalniki organiczne, które były stosowane jako składniki testowanych faz mobilnych: toluen, octan etylu, cykloheksan, eter naftowy (50–70°C), aceton, izopropanol, metanol, chloroform, dichloroetan, acetonitryl, trichloroeten i heksan. Rozpuszczalniki te zostały zakupione u różnych dostawców i miały stopień czystości co najmniej „czysty”;
- zmodyfikowany odczynnik Griesa, do przygotowania którego użyto następujących odczynników: sulfanilamidu (Fluka, purum), N-(1-naftyl)etylenodiaminy (Fluka, purum), kwasu ortofosforowego(V) (Fluka, purum p.a.), KCl (Chempur, pure p.a), etanolu (Chempur, pure p.a.);
- roztwory wzorcowe TNT, RDX, PETN, NG, EGDN i NC. Roztwory te zostały przygotowane przez rozpuszczenie czystych środków wybuchowych w acetonie. Przygotowano również mieszaninę wzorcową zawierającą TNT, RDX, PETN, NG i EGDN.

4. Wyniki i dyskusja

4.1. Optymalizacja procesu wizualizacji

Rozdział był prowadzony na płytkach fluoryzujących w świetle UV. Po rozwinięciu chromatogramu płytki suszono i badano w świetle UV o długości $\lambda = 254$ nm, aby wykryć substancje absorbujące promieniowanie UV. W tych warunkach roztwory TNT i RDX są widoczne jako ciemne plamki. Następnie наносono na płytki 3% roztwór KOH w etanolu za pomocą tamponu z waty celulozowej – na płytce uwidaczniała się brązowa plamka pochodząca od TNT. W dalszej kolejności płytki suszono przez wygrzewanie w piecu i ciepłe spryskiwano odczynnikiem Griessa, co powodowało, że wszystkie związki nitrowe i nitroestry uwidaczniały się jako różowe plamki. Zmodyfikowany odczynnik Griessa był przygotowywany przed użyciem przez wymieszanie równych objętości dwóch roztworów zawierających odpowiednio: sulfanilamid (SUA) i chlorowodorek N-(1-naftyl)-etylenodiaminy (NED). Wspomniane roztwory przygotowano w następujący sposób:

- 20 g SUA rozpuszczono w 25 ml 85% kwasu fosforowego i uzupełniono wodą dejonizowaną do objętości 250 ml;
- 1,38 g NED rozpuszczono w 25 ml 85% kwasu fosforowego i uzupełniono wodą dejonizowaną do objętości 250 ml.

Jako część badań wstępnych przeprowadzono eksperymenty, których celem było opracowanie takiego sposobu wizualizacji, by otrzymać plamki o intensywnych kolorach przy minimalnej liczbie potrzebnych operacji, w możliwie krótkim czasie i przy zastosowaniu najniższej temperatury tak, by zapobiec odparowaniu czy rozkładowi analitów. Punktem wyjściowym była procedura, zgodnie z którą po rozwinięciu płytki były wygrzewane w piecu w temperaturze 120°C przez 15 min. Po nanieśieniu KOH płytki ponownie wygrzewano w piecu w temperaturze 120°C przez 5 min. Wyniki przeprowadzonych eksperymentów zostały zestawione w tabeli I. Przeprowadzone badania dowiodły, że wygrzewanie płytek po ich rozwinięciu nie jest konieczne. Wygrzewanie przez 10 min w temperaturze 100°C po zastosowaniu roztworu KOH jest wystarczające do uzyskania dobrych rezultatów – warunki te, zaprezentowane w tabeli I, zostały wykorzystane do dalszych eksperymentów.

4.2. Porównanie efektywności opublikowanych procedur analizy środków wybuchowych metodą TLC

Przegląd faz mobilnych stosowanych rutynowo w wiodących światowych laboratoriach, takich jak Sądowe Laboratorium Materiałów Wybuchowych w Wielkiej Brytanii [7] czy Laboratorium Spektrometrii Masowej i Ana-

liz Materiałów Wybuchowych w Izraelu [9], jak również przeglądy innych faz mobilnych, jakie znaleźć można w fachowej literaturze, zamieszczono w tabeli II. W kolumnie zatytułowanej „declared explosives” podano listę związków, które, według autorów, mogą być rozdzielone za pomocą określonej fazy mobilnej na płytkach z fazą krzemionkową.

Efektywność wszystkich faz mobilnych wymienionych w tabeli II, jak również niektórych innych, dodatkowo przygotowanych faz mobilnych, z porównywalnym indeksem polarności P' sprawdzono eksperymentalnie. Zostały one użyte do rozdzielania badanych związków wybuchowych (EGDN, NG, PETN, RDX, TNT i NC) na płytkach krzemionkowych. Mieszaninę wzorcową oraz roztwory każdego ze związków наносono na płytki za pomocą szklanych kapilar. Po odparowaniu rozpuszczalnika chromatogramy były rozwijane w poziomej komorze przy użyciu określonej fazy mobilnej. Dla rozdzielonych związków obliczano wartości wskaźnika retencji R_f . Jeśli analiza była prowadzona więcej niż raz, obliczano niepewność uzyskanej wartości R_f , jako odchylenie standardowe wyników. W niektórych komórkach w tabelach II, IV i V zamiast wartości R_f umieszczono oznaczenie „n.a.” (ang. not applicable), co oznacza, że dla określonego związku i fazy mobilnej nie można było obliczyć wartości R_f . Wynikało to zwykle z faktu, że dla danej fazy mobilnej określony związek nie został rozdzielony od innych lub też, że dla danego związku nie uzyskano regularnej plamki, lecz plamkę podwójną (w przypadku zjawiska tworzenia przez rozpuszczalnik podwójnego czoła) lub smugę.

Wyniki analiz przedstawiono w tabelach III i V. Dla następujących mieszanin (v:v): eter naftowy : aceton (1:1); eter naftowy : izopropanol (4:1) i heksan : izopropanol (4:1) wystąpiło zjawisko tworzenia podwójnego czoła fazy mobilnej, w związku z czym okazały się one nieprzydatne. Najlepsze wyniki uzyskano dla mieszanin trichloroeten : aceton (8:2) i toluen : octan etylu (9:1). Dla tych faz mobilnych przeprowadzono dodatkowe analizy z użyciem płytek wysokosprawnych (HPTLC) – ich wyniki przedstawiono w tabeli IV.

Niestety nawet najlepiej działające fazy mobilne nie pozwoliły na rozdzielenie NG i EGDN, zatem zaszła konieczność znalezienia dodatkowej fazy mobilnej, przy pomocy której można by rozdzielić te związki. W literaturze fachowej znaleziono informację o dwóch mieszaninach, których zastosowanie umożliwia, według autorów, rozdzielenie nitrogliceryny i dinitroglukolu na płytkach z fazą krzemionkową. Sprawdzono działanie wspomnianych mieszanin, a wyniki rozdziału przedstawia tabela V. Obydwie z testowanych mieszanin umożliwiły rozdzielenie EGDN i NG, jednak efekty zastosowania mieszaniny toluen : cykloheksan (7:3) okazały się nieco lepsze. Dla tej fazy mobilnej przeprowadzono dodatkowe

eksperymenty z użyciem płytek HPTLC z fazą krzemionkową, a ich wyniki zamieszczono w tabeli V.

Żadna z testowanych faz mobilnych nie dała zadowalającego rezultatu dla nitrocelulozy. Chociaż mieszanina metanolu i acetonu (2:3) [1] spowodowała, że NC przemieściła się z punktu wyjściowego, to rezultatem nie była plamka, lecz smuga ciągnąca się od linii startu do czoła rozpuszczalnika, podczas gdy wszystkie inne analizowane związki przemieszczały się wspólnie z czołem rozpuszczalnika. Opisany efekt jest prawdopodobnie wynikiem niehomogeniczności nitrocelulozy, jako że jest to materiał polimerowy, a jej cząsteczki są łańcuchami o różnej długości.

Przeprowadzone badania dowiodły, że spośród testowanych faz mobilnych przeznaczonych do analizy organicznych środków wybuchowych metodą TLC na płytkach z fazą krzemionkową najlepsze wyniki uzyskuje się, stosując mieszaniny toluen : octan etylu (9:1) lub trichloroeten : aceton (8:2). Niemniej nawet mieszaniny te nie pozwalają na rozdzielenie EGDN i NG – jeśli w wyniku analizy uzyska się plamkę odpowiadającą tym analitom, to próbka powinna być przeanalizowana ponownie z użyciem mieszaniny toluen : cykloheksan (7:3). Stosując TLC, nie można bezpośrednio wykryć nitrocelulozy, jako że żadna faza mobilna nie jest w stanie przemieścić jej z punktu startu, ale jeśli w próbce obecna jest substancja, która pozostaje na linii startu i daje pozytywny wynik reakcji z odczynnikiem Griesa, można to uznać za mocną przesłankę wskazującą, że w próbce obecna jest nitroceluloza.

4.3. Opracowanie nowej metody analizy środków wybuchowych metodą HPTLC na płytkach z żelem krzemionkowym modyfikowanym CN

Procedury analizy TLC środków wybuchowych, które są stosowane w laboratoriach zajmujących się chemią sądową, jak i te, które można znaleźć w literaturze, dotyczą rozdzielania środków wybuchowych tylko na płytkach z fazą krzemionkową. Obecnie dostępne są płytki TLC z mniej polarnymi fazami stacjonarnymi, a ponieważ związki wybuchowe są średnio polarne, tego rodzaju płytki wydają się bardziej odpowiednie do ich rozdzielania. Do badań wybrano płytki z fazą krzemionkową modyfikowaną CN ze względu na ich średnio polarny charakter.

Wykorzystanie modelu PRISMA jest jednym ze sposobów optymalizacji składu fazy mobilnej w analizie izokratycznej metodą chromatografii cieczowej. Schemat modelu PRISMA może być przedstawiony jako graniastosłup o podstawie trójkąta (rycina 1). Na proces optymalizacji składają się trzy etapy. W etapie pierwszym wybiera się fazę stacjonarną oraz trzy przypuszczalnie optymalne w działaniu rozpuszczalniki należące do różnych grup selektywności, zgodnie z klasyfikacją

Snydera [7]. Te trzy rozpuszczalniki (1, 2 i 3) stanowią krawędzie graniastosłupa. Ponieważ rozpuszczalniki różnią się siłą elucji S_1 , S_2 i S_3 , te o wyższej sile należy dopasować do rozpuszczalnika o najniższej sile elucji poprzez domieszczenie do nich rozpuszczalnika o zerowej sile ($S = 0$), tj. heksanu dla rozdzielu prowadzonego w normalnym układzie faz, albo wody dla odwróconego układu faz. W rezultacie wszystkie trzy rozpuszczalniki mają tę samą siłę elucji, ale różnią się selektywnością. Wszystkie punkty na równoramiennym trójkącie uformowanym przez szczyt graniastosłupa reprezentują mieszaniny o takiej samej sile elucji, lecz różnej selektywności (rycina 2). Do optymalizacji siły elucji używa się równoobjętościowej mieszaniny trzech rozpuszczalników, którą reprezentuje punkt na środku trójkąta. Mieszaniny tej używa się jako fazy mobilnej do rozdzielania analitów i na podstawie uzyskanych wyników ewentualnie zmniejsza się jej siłę elucji poprzez domieszczenie dodatkowej ilości rozpuszczalnika o $S = 0$ (zmniejszając w ten sposób wysokość graniastosłupa).

W etapie drugim optymalizuje się selektywność fazy mobilnej. Na trójkącie reprezentującym siłę elucji określoną na etapie pierwszym wybiera się trzy punkty leżące w pobliżu wierzchołków i przeprowadza trzy eksperymenty, stosując fazy mobilne o składzie reprezentowanym przez te punkty (rycina 2). Uzyskane wyniki stanowią wskazówkę co do tego, jakie fazy mobilne powinny być wypróbowane w toku dalszych eksperymentów, których celem jest wybór fazy o najlepszej selektywności.

Trzeci etap polega na ostatecznej optymalizacji siły elucji tak, by uzyskać zadowalające rozdzielanie w możliwie najkrótszym czasie. Szczegółowy opis modelu PRISMA można znaleźć w literaturze [3, 4, 5, 6].

W pierwszym etapie procesu optymalizacji wybrano 12 czystych rozpuszczalników, przynajmniej po jednym z każdej z grup selektywności Snydera [3]. Użyto ich do rozdzielania analitów na modyfikowanych CN płytkach HPTLC. Rezultaty przedstawia tabela VI. Oznaczenie „n.a.” w niektórych komórkach tabeli oznacza, że wartości wskaźnika retencji R_f nie można było obliczyć, ponieważ dany związek nie został rozdzielony od innych. Trzy rozpuszczalniki, dla których uzyskano najlepsze wyniki, zostały wybrane do dalszych eksperymentów: toluen, izopropanol i trichloroeten (zaznaczone w tabeli VI). Rzeczą wartą odnotowania jest bardzo dobry wynik uzyskany dla czystego toluenu – wszystkie badane związki zostały kompletnie rozdzielone w stosunkowo krótkim czasie 15 min. Siła elucji wybranych rozpuszczalników została wyrównana do siły elucji toluenu poprzez wymieszanie, w odpowiednich proporcjach, izopropanolu z heksanem i trichloroetenu z chloroformem – w ten sposób powstały rozpuszczalniki A, B i C. Każda z tych mieszanin została użyta do rozdzielania analitów na modyfikowanych CN płytkach HPTLC. Wyniki przedstawiono w tabeli VII.

W następnym etapie procesu optymalizacji do rozdzielania analitów zostały użyte rozpuszczalniki z centrum i z trzech rogów „trójkąta rozpuszczalników”. Wyniki przedstawiono w tabeli VIII. Mieszanina 33:33:33 i mieszanina 10:80:10 rozpuszczalników A, B i C umożliwiła rozdzielanie wszystkich pięciu analitów, co dowodzi, że metoda PRISMA jest efektywnym sposobem optymalizacji składu fazy mobilnej. Stosując procedurę optymalizacyjną PRISMA, można kontrolować odległość migracji poszczególnych substancji.

Chociaż prawdopodobnie możliwa byłaby dalsza optymalizacja składu fazy mobilnej, nie podjęto kolejnych eksperymentów, ponieważ już przeprowadzone dały satysfakcjonujące wyniki, a eksperymenty z mieszaninami odpowiadającymi innym punktom na „trójkącie rozpuszczalników” mogłyby spowodować tylko niewielkie zmiany w wartościach R_f w stosunku do tych, które już uzyskano. Zrezygnowano z dalszych eksperymentów również dlatego, że podczas badań wstępnych udało się znaleźć bardzo dobrze działającą fazę mobilną – toluen. Przy użyciu toluenu uzyskano dobre rozdzielanie badanych związków wybuchowych w krótkim czasie, a zastosowanie jednoskładnikowej fazy mobilnej pozwoliło uniknąć wszystkich problemów związanych z użyciem mieszanin, tj. problemów z powtarzalnością i rozdzielaniem się składników fazy mobilnej w trakcie procesu chromatograficznego.

W wyniku eksperymentów związanych z zastosowaniem płytek HPTLC modyfikowanych CN wybrano dwie fazy mobilne: toluen jako fazę pierwszą i mieszaninę izopropanol : heksan 62:38 (v:v) do ewentualnej analizy potwierdzającej. Mieszanina ta zapewnia akceptowalne rozdzielanie wszystkich analizowanych związków, a jednocześnie kolejność elucji jest inna niż dla toluenu. Przy pomocy każdej z wybranych faz mobilnych trzykrotnie przeprowadzono analizę badanych związków i dla uzyskanych wartości R_f obliczono odchylenia standardowe (tabela IX). Uzyskane wyniki dowodzą powtarzalności analizy.

5. Wnioski

Porównanie i ocena istniejących metod analizy związków wybuchowych metodą TLC na płytkach z fazą krzemionkową dowiodły, że najlepszymi fazami mobilnymi są mieszaniny toluen : octan etylu (9:1) i trichloroeten : aceton (8:2), jednak nawet przy pomocy tych faz mobilnych nie można rozdzielić wszystkich badanych związków – nie udało się rozdzielić EGDN i NG. Aby rozdzielić EGDN i NG na płytkach z fazą krzemionkową, należy użyć mieszaniny toluenu i cykloheksanu (7:3).

Badania dotyczące zastosowania płytek z fazą krzemionkową modyfikowaną CN w analizie związków wybuchowych dowiodły, że w rozpatrywanym zastosowa-

niu są one znacznie lepsze od płytek z fazą krzemionkową. Z łatwością udało się znaleźć fazy mobilne umożliwiające rozdzielanie wszystkich badanych związków w jednym procesie chromatograficznym, włącznie z EGDN i NG, co nie było możliwe w przypadku płytek krzemionkowych. Stwierdzono, że najlepszą fazą mobilną jest toluen, który umożliwia rozdzielanie wszystkich badanych związków w krótkim czasie 15 min. Jeśli istnieje potrzeba przeprowadzenia analizy potwierdzającej z zastosowaniem innej fazy mobilnej, należy użyć mieszaniny izopropanol : heksan (62:38).

Procedura optymalizacji PRISMA okazała się efektywnym narzędziem, jednak fazy mobilne skomponowane zgodnie z tą procedurą zawierają co najmniej 4 składniki, co może powodować problemy z powtarzalnością. Jako że podczas badań znaleziono proste i efektywne fazy mobilne, właśnie te fazy są polecane do prowadzenia rozdzielania na płytkach z fazą krzemionkową modyfikowaną CN.