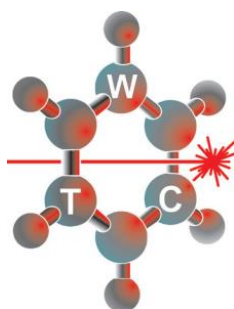


WOJSKOWA AKADEMIA TECHNICZNA
im. Jarosława Dąbrowskiego
WYDZIAŁ NOWYCH TECHNOLOGII I CHEMII



mgr inż. Barbara Dawidziuk

***Opracowanie metod analizy materiałów wybuchowych
i produktów ich przemian
w osadach dennych Morza Bałtyckiego***

Rozprawa doktorska

Promotor:
dr hab. inż. Stanisław Popiel, prof. WAT

WARSZAWA 2020

Serdecznie dziękuje

Panu dr hab. inż. Stanisławowi Popielowi, prof. WAT

*za poświęcony czas oraz cenne rady związane z niniejszą rozprawą,
a także za wsparcie, cierpliwość i wyrozumiałość.*

Jakubowi Nawale, Dianie Gordon i Danielowi Dziedzicowi

*za to, że zawsze służyli pomocną dłonią i radą, kiedy tego potrzebowałam,
a także motywowali mnie do dalszej pracy.*

Doktorantom i Pracownikom

Zakładu Radiometrii i Monitoringu Skażeń

*za pomoc w realizacji badań oraz wieloletnią
współpracę i nauczanie mnie laboratoryjnego warsztatu.*

Pragnę również podziękować

Rodzicom, Siostram oraz Pawłowi Kowalczykowi

*za cierpliwość i wytrwałość oraz wiarę w moje możliwości
nawet wtedy, kiedy sama w sobie wątpiłam.
Bez nich nie osiągnęłabym tego wszystkiego.*

SPIS TREŚCI

WYKAZ SKRÓTÓW I AKRONIMÓW	9
WSTĘP.....	13
I. CZĘŚĆ LITERATUROWA	15
1. Ogólna charakterystyka materiałów wybuchowych	15
1.1. Materiały inicjujące	15
1.2. Materiały kruszące.....	17
1.2.1. Trotyl.....	17
1.2.2. Heksogen.....	18
1.2.3. Oktogen.....	20
1.2.4. Mieszanki wybuchowe.....	20
1.3. Materiały miotające	22
1.4. Mieszanki pirotechniczne	22
2. Degradacja materiałów wybuchowych w środowisku Morza Bałtyckiego	23
3. Przygotowanie próbek środowiskowych do analizy chromatograficznej.....	26
3.1. Problemy spotykane w czasie przygotowania próbek.....	26
3.2. Izolacja związków z próbek ciekłych.....	27
3.2.1. Ekstrakcja rozpuszczalnikiem typu ciecz-ciecz.....	27
3.2.2. Ekstrakcja do fazy stałej	28
3.2.3. Mikroekstrakcja do fazy stacjonarnej	29
3.2.4. Mikroekstrakcja do fazy upakowanej	31
3.2.5. Ekstrakcja ruchomym elementem sorpcyjnym	32
3.2.6. Mikroekstrakcja kroplą rozpuszczalnika	32
3.2.7. Pasywna technika pobierania próbek z wykorzystaniem zintegrowanego próbnika dla polarnych związków organicznych	32
3.3. Izolacja związków z próbek stałych.....	33

3.3.1.	Ekstrakcja za pomocą rozpuszczalnika organicznego w aparacie Soxhleta.....	33
3.3.2.	Ekstrakcja rozpuszczalnikiem przez wytrząsanie	34
3.3.3.	Ekstrakcja za pomocą rozpuszczalnika wspomagana mikrofalami i ultradźwiękami.....	35
3.3.4.	Przyspieszona ekstrakcja za pomocą rozpuszczalnika	36
3.4.	Przygotowania próbek zawierających materiały wybuchowe.....	36
4.	Analiza chromatograficzna	39
4.1.	Chromatografia cieczowa.....	39
4.2.	Chromatografia gazowa	39
4.3.	Detektory używane w chromatografii	40
4.3.1.	Spektrometria mas	40
4.3.2.	Detektor spektrofotometryczny absorpcji promieniowania UV-Vis ..	58
4.3.3.	Detektor wychwytu elektronów	60
4.4.	Analiza chromatograficzna materiałów wybuchowych przedstawiona w literaturze.....	61
II.	Założenia, zakres i cel rozprawy doktorskiej.....	64
III.	Część doświadczalna	66
5.	Materiały i procedury wykorzystywane w procesie badawczym	66
5.1.	Aparatura	66
5.2.	Odczynniki i materiały	68
5.3.	Zasady bezpieczeństwa pracy z materiałami wybuchowymi.....	69
5.4.	Metodyka badań	69
5.4.1.	Opracowanie warunków analizy chromatograficznej.....	70
5.4.2.	Opracowanie metody skażenia osadu dennego.....	73
5.4.3.	Wybór najlepszej metody przygotowania próbek do analizy	74
5.4.4.	Sporządzenie wykresów kalibracyjnych.....	76

5.4.5.	Walidacja opracowanych metod analizy materiałów wybuchowych	76
5.4.6.	Przygotowanie próbek rzeczywistych do analizy chromatograficznej	80
5.4.7.	Wyznaczenie suchej masy próbki	80
5.4.8.	Kontrola jakości	80
5.5.	Standaryzacja i błędy pomiarowe	81
6.	Otrzymane wyniki i ich dyskusja	82
6.1.	Warunki analizy za pomocą GC-MS/MS	82
6.2.	Warunki analizy za pomocą LC-MS/MS	87
6.3.	Metoda skażenia próbek osadów dennych	94
6.4.	Przygotowanie próbek do analizy chromatograficznej	95
6.4.1.	Ekstrakcja za pomocą rozpuszczalnika organicznego w aparacie Soxhleta	98
6.4.2.	Ekstrakcja rozpuszczalnikiem przez wytrząsanie z osadem	99
6.4.3.	Ekstrakcja za pomocą rozpuszczalnika wspomagana mikrofalami	101
6.4.4.	Przyspieszona ekstrakcja za pomocą rozpuszczalnika	103
6.5.	Walidacja opracowanych metod analizy materiałów wybuchowych	109
6.5.1.	Walidacja zoptymalizowanej metody analizy za pomocą chromatografii gazowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas	109
6.5.2.	Walidacja zoptymalizowanej metody analizy za pomocą chromatografii ciekłowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas	117
6.6.	Podsumowanie uzyskanych wyników badań procesów ekstrakcji i analizy materiałów wybuchowych oraz produktów ich degradacji	127
6.7.	Analiza próbek rzeczywistych pobranych z Morza Bałtyckiego	130
III.	Podsumowanie i wnioski	133
	BIBLIOGRAFIA	138

DOROBEK NAUKOWY	149
STRESZCZENIE.....	154
ABSTRACT.....	155

WYKAZ SKRÓTÓW I AKRONIMÓW

AKRONIM /SKRÓT	PEŁNA NAZWA	
	Termin w języku angielskim	Termin w języku polskim
1,3-DNB	1,3-Dinitrobenzene	1,3-Dinitrobenzen
2,4-DNA	2,4-Dinitroaniline	2,4-Dinitroanilina
2,4-DNT	2,4-Dinitrotoluene	2,4-Dinitrotoluen
2,6-DNT	2,6-Dinitrotoluene	2,6-Dinitrotoluen
4-NT	4-Nitrotoluene	4-Nitrotoluen
AE	Agitation extraction	Ekstrakcja rozpuszczalnikiem przez wytrząsanie
AED	Atomic emission detector	Detektor emisji atomowej
AFID	Alkali flame ionization detector	Alkaliczny detektor jonizacji płomieniowej
APCI	Atmospheric pressure chemical ionization	Jonizacja chemiczna pod ciśnieniem atmosferycznym
APPI	Atmospheric pressure photoionization	Fotojonizacja pod ciśnieniem atmosferycznym
ASE	Accelerated solvent extraction	Przyspieszona ekstrakcja za pomocą rozpuszczalnika
CI	Chemical Ionization	Jonizacja chemiczna
CID	Collision induced dissociation	Dysocjacja indukowana zderzeniami
DAD	Diode array detector	Matryca fotodiodowa
DC	Direct current	Napięcie stałe
DVB/CAR/PDMS	Divinylbenzene/ carboxen/ polydimethylsiloxane	Diwinylobenzen/ karboksen/ polidimetylosiloksan
ECD	Electron capture detector	Detektor wychwytu elektronów
EI	Electron Ionisation	Jonizacja strumieniem elektronów
E_k	Kinetic energy	Energia kinetyczna
E_p	Potential energy	Energia potencjalna
ESI	Electrospray ionisation	Jonizacja przez elektrorozpylanie
FID	Flame Ionization Detector	Detektor płomieniowo-jonizacyjny
FPD	Flame Photometric Detector	Detektor płomieniowo-fotometryczny

AKRONIM /SKRÓT	PEŁNA NAZWA	
	Termin w języku angielskim	Termin w języku polskim
FT-ICR	Fourier transform ion cyclotron resonance	Spektrometria cyklotronowego rezonansu jonowego z fourierowską transformacją wyników
GC	Gas chromatography	Chromatografia gazowa
HMX	1,3,5,7-Tetranitro-1,3,5,7-tetrazoctane	1,3,5,7-Tetranitro-1,3,5,7-tetraazacyklooktan, oktogen
ICH	The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use	Międzynarodowa Rada Harmonizacji Wymagań Technicznych dla Rejestracji Produktów Leczniczych Stosowanych u Ludzi
ICP	Inductively coupled plasma	Wzbudzenie w plazmie sprzężonej indukcyjnie
IMW	Primary explosive	Inicjujące materiały wybuchowe
IT	Ion Trap	Pułapka jonowa
KMW	Secondary explosives	Kruszące materiały wybuchowe
LC	Liquid chromatography	Chromatografia cieczowa
LIT	Linear ion trap	Liniowa pułapka jonowa
LLE	Liquid-liquid extraction	Ekstrakcja typu ciecz-ciecz
LOD	Limit of detection	Granica wykrywalności
LOQ	Limit of quantitation	Granica oznaczalności
MAE	Microwave assisted extraction	Ekstrakcja ciała stałe - ciecz wspomagana mikrofalami
MALDI	Matrix assisted laser desorption/ionization	Laserowa desorpcja i jonizacja wspomagana matrycą
MEDINA	N,N'-Dinitromethanedi-amine	N,N'-Dinitrometanodiamina, Metylenodinitroamina
MEPS	Microextraction by packed sorbent	Mikroekstrakcja do fazy upakowanej
MMW	Propellant	Miotające materiały wybuchowe
MRM	Multiple reaction monitoring	Tryb monitorowania reakcji następczych
MS	Mass spectroscopy	Spektrometria mas
MS/MS	Tandem mass spectrometry	Tandemowa spektrometria mas
MW	Explosive materials	Materiały wybuchowe
NDAB	4-Nitro-2,4-diazabutanol	4-Nitro-2,4-diazabutanol

AKRONIM /SKRÓT	PEŁNA NAZWA	
	Termin w języku angielskim	Termin w języku polskim
Neutral Loss	Neutral Loss	Tryb monitorowania utraty cząsteczek obojętnych
NPD	Nitrogen–phosphorus detector	Detektor azotowo-fosforowy
PA	Polyacrylate	Poliakrylan
PDMS	Polydimethylsiloxane	Polidimetylosiloksan
PETN	Pentaerythritol tetranitrate	Tetraazotan pentaerytrytu
PFPD	Pulsed flame photometric detector	Pulsacyjny detektor płomieniowo fotometryczny
POCIS	Polar organic chemical integrative sampler	Zintegrowany próbnik dla polarnych związków organicznych
Pre-IS	Precursor Ion Scan	Tryb monitorowania jonów prekursorowych
Pro-IS	Product Ion Scan	Tryb monitorowania jonów fragmentacyjnych pochodzących od wybranego jonu prekursora
Q	Quadrupole	Analizator kwadrupolowy
QC	Quality control	Kontrola jakości
QIT	Quadrupole ion trap	Kwadrupolowa pułapka jonowa
RDX	1,3,5-Trinitro-1,3,5-triazinane	1,3,5-Trinitro-1,3,5-triazynan, heksogen
RF	Radio frequency	Napięcie o częstotliwości radiowej
SBSE	Stir bar sorptive extraction	Ekstrakcja za pomocą ruchomego elementu sorpcyjnego
SCAN	Full Scan	Tryb pełnego skanowania wszystkich docierających jonów wytworzonych w źródle jonów
SDME	Single drop microextraction	Mikroekstrakcja kroplą rozpuszczalnika
SE	Soxhlet extraction	Ekstrakcja w aparacie Soxhleta
SPE	Solid phase extraction	Ekstrakcja do fazy stałej
SIM	Selected ion monitoring	Tryb monitorowania wybranych jonów
SPME	Solid phase microextraction	Mikroekstrakcja do fazy stacjonarnej
TCD	Thermal conductivity detector	Detektor cieplno-przewodnościowy
TMETN	Trimethylolethane trinitrate	Triazotan trimetylolektanu

AKRONIM /SKRÓT	PEŁNA NAZWA	
	Termin w języku angielskim	Termin w języku polskim
TNT	2,4,6-trinitrotoluene	2,4,6-Trinitrotoluen, trotyl
TOF	Time of Flight	Analizator czasu przelotu
UAE	Ultrasound assisted extraction	Ekstrakcja ciała stałe - ciecz wspomagana ultradźwiękami
USEPA	United States Environmental Protection Agency	Agencję Ochrony Środowiska Stanów Zjednoczonych
UV	Ultraviolet	Promieniowanie ultrafioletowe
UV-Vis	Ultraviolet-visible spectroscopy	Spektroskopia z zakresu nadfioletu i światła widzialnego

WSTĘP

Na podstawie decyzji z dnia 2 sierpnia 1945 r. na konferencji w Poczdamie po drugiej wojnie światowej w Morzu Bałtyckim zatopiono duże ilości różnego rodzaju amunicji przejętej od armii hitlerowskiej. Według raportu „HELCOM Maritime Assessment 2018” ocenia się, że około 300 000 ton amunicji konwencjonalnej zatopiono na samych niemieckich wodach morskich [1]. Istnieją przesłanki, że niektóre z nich mogły zostać wyrzucone za burtę statku w drodze do oficjalnych stref zatopienia - Głębi Gotlandzkiej i Bornholmskiej [1]. W związku z tym możliwe jest napotkanie zatopionej amunicji w niemal całym basenie Morza Bałtyckiego, co może mieć bezpośredni wpływ na ekosystem morski.

Z oficjalnych raportów, artykułów naukowych i prac monograficznych [1-6] uzyskujemy informację dotyczącą rodzaju zatopianej amunicji (pociski artyleryjskie, granaty, bomby lotnicze, a także inne materiały militarne) oraz jakimi kompozycjami wybuchowymi były elaborowane. Najbardziej popularne materiały wybuchowe stosowane podczas drugiej wojny światowej to 2,4,6-trinitrotoluen (TNT, trotyl) i 1,3,5-trinitro-1,3,5-triazynan (RDX, heksogen). Spośród nich, szczególnie TNT jest podatny na szereg reakcji degradacji i transformacji, które tworzą między innymi różne pochodne aminowe. Zarówno TNT, jak i RDX wykazują toksyczność wobec receptorów biologicznych. Podobna sytuacja występuje w przypadku pochodnych TNT, które powstają w procesie jego degradacji i wykazują stabilność struktury. Podczas badań laboratoryjnych stwierdzono, że są toksyczne dla bakterii, glonów, roślin, dżdżownic, bezkręgowców wodnych i wyższych gatunków zwierząt, a także dla ludzi [7]. Z tego względu, do dnia dzisiejszego pozostałości amunicji stanowią poważny problem w aspekcie bezpieczeństwa i ochrony środowiska. Próby rozwiązania tego problemu podjęto dopiero po upływie około 70 lat od jej zatopienia. Jednakże, z powodu korozji pocisków i zakłóceń antropogenicznych, wskutek rozszczelnienia powłoki amunicji, środowisko morskie uległo już częściowemu skażeniu. W związku z tym, bardzo ważnym zagadnieniem staje się możliwość wykrywania i oznaczania materiałów wybuchowych oraz produktów ich degradacji na niskich poziomach stężeń. Pozwoli to rzetelnie określić czy skażenie występuje, ewentualnie poznać stopień tego skażenia.

Coraz większa świadomość społeczna związana z ekologią i ochroną środowiska, jest powodem do opracowywania nowych metod oznaczania nawet śladowych ilości materiałów wybuchowych. Materiały wybuchowe i produkty ich degradacji, które obecne są w środowisku naturalnym mogą sprawiać pewne trudności analityczne, jak: dobór odpowiedniej techniki ekstrakcyjnej lub użycie właściwego rozpuszczalnika. Problemy te wynikają głównie ze złożonej matrycy, w której znajdują się anality, tj. woda morska lub osad denny. Toksyczne substancje wybuchowe oraz ich produkty degradacji, pomimo niskiej rozpuszczalności

w wodzie, po pewnym czasie przedostają się przez skorodowaną powłokę do środowiska morskiego. Następnie, za pośrednictwem fauny i flory morskiej, mogą przeniknąć do ostatniego ogniwa łańcucha pokarmowego – do organizmu człowieka. Dodatkowym zagrożeniem jest to, że pomimo zalegania materiałów wybuchowych w środowisku morskim, nadal posiadają one niemal niezmiennione parametry detonacyjne i mogą zostać ponownie wykorzystane, np. przez osoby przypadkowe lub niepowołane.

Dlatego też, podejmowane są próby opracowania nowych metod analitycznych oraz modyfikowania już istniejących w celu uzyskania takich, które będą charakteryzowały się niższymi granicami wykrywalności i oznaczalności oraz większą precyzją, dokładnością i powtarzalnością. Głównym problemem związanym z monitoringiem środowiska morskiego jest też to, że opracowane metody analizy chemicznej powinny polegać na oznaczaniu minimalnej liczby próbek środowiskowych, być bezpieczne dla analityka, a jednocześnie powinny umożliwiać szybki, precyzyjny i wykonany z dużą dokładnością pomiar.

Monitoring ekosystemu morskiego można podzielić na dwie części: a) analize płynów ustrojowych, tkanek fauny i flory morskiej; b) analizę zanieczyszczeń w elementach środowiska morskiego - wody morskiej i osadów dennych. Podczas analizy materiałów wybuchowych i produktów ich przemian w matrycy wodnej najczęściej stosowaną metodą przygotowania próbek jest ekstrakcja ciecz-ciecz oraz ekstrakcja do fazy stałej. Rzadziej stosowana jest pasywna technika pobierania próbek z wykorzystaniem zintegrowanego próbnika dla polarnych związków organicznych. Najczęściej stosowaną metodą analizy skażeń chemicznych fauny i flory morskiej oraz osadów dennych jest ekstrakcja wspomagana ultradźwiękami. Zazwyczaj do analizy śladowej materiałów wybuchowych w próbkach środowiskowych, stosuje się chromatografię cieczową lub gazową w połączeniu z różnymi detektorami. Są to: a) spektrometr mas (z pojedynczym kwadrupolem, z tandemowym spektrometrem mas lub wysokorozdzielczym spektrometrem mas z typu orbitrap); b) detektor płomieniowo-jonizacyjny, c) detektor wychwytu elektronów [8-11].

Jednak w dotychczas opublikowanych pracach nie przedstawiono opracowania, walidacji i porównania metod analitycznych odpowiednich do analizy materiałów wybuchowych i produktów ich degradacji w próbkach osadów dennych. Metody przedstawione w opublikowanych pracach najczęściej nie zawierają opisu pełnego procesu ich walidacji, bądź obejmują małą liczbę związków. Jest to temat w dalszym ciągu wymagający dalszych badań, które pozwolą na opracowanie uniwersalnej i kompleksowej metody analizy, wraz z przedstawieniem jej pełnej walidacji umożliwiającej oznaczenie nawet śladowych ilości materiałów wybuchowych i produktów ich degradacji w próbkach osadów dennych.

I. CZĘŚĆ LITERATUROWA

1. Ogólna charakterystyka materiałów wybuchowych

Definicja materiałów wybuchowych (MW) według Cudziło i współpr. jest następująca: „Związki wybuchowe to względnie mało stabilne indywidua chemiczne, które pod wpływem zewnętrznych bodźców są zdolne do szybkich, samopodtrzymujących się przemian chemicznych, zachodzących z wydzieleniem znacznej ilości energii i uwolnieniem trwałych termodynamicznie produktów gazowych” [12]. Uważa się, że materiały wybuchowe zostały wynalezione przez Chińczyków w siódmym wieku naszej ery, a pierwszym znanym materiałem był czarny proch (znany również, jako proch strzelniczy), który jest mieszaniną węgla drzewnego, siarki i azotanu potasu.

Klasyfikacją materiałów wybuchowych zajmowało się wielu naukowców w wyniku czego powstało wiele podziałów. Jednym z nich jest podział ze względu na zastosowanie, obejmujący cztery główne klasy materiałów wybuchowych: a) materiały inicjujące (IMW); b) materiały kruszące (KMW); c) materiały miotające (paliwa, MMW); d) mieszaniny pirotechniczne. Materiały kruszące i miotające, które zostały właściwie zainicjowane, wydzielają duże ilości gazowych produktów. Różnica między nimi to szybkość, z jaką przebiega reakcja. Podczas detonacji materiałów wybuchowych szybka reakcja prowadzi do powstania fali uderzeniowej o bardzo wysokim ciśnieniu w otaczającym medium. W przypadku MMW wolniejsza reakcja wytwarza niższe ciśnienie w dłuższym okresie czasu. To niższe, utrzymujące się ciśnienie jest wykorzystywane do napędzania obiektów. W przypadku mieszanin pirotechnicznych wydzielana jest znacznie mniejsza ilość produktów gazowych. Materiał ten charakteryzuje się dużą ilością energii przejawiającej się w postaci płomienia, pewnej ilości dymu, światła i gazu [4].

1.1. Materiały inicjujące

Inicjujące materiały wybuchowe są bardzo wrażliwymi związkami, które łatwo ulegają detonacji pod wpływem działania prostych bodźców, takich jak: uderzenie, tarcie, bodźce elektrostatyczne, czy cieplne. Substancje te charakteryzują się zdolnością do detonacji występując nawet w bardzo małych ilościach. IMW wykorzystywane są do zapoczątkowania reakcji egzotermicznej w mniej wrażliwych materiałach wybuchowych, takich jak materiały kruszące lub miotające. Zwykle używa się miligramowych ilości, które są pierwszym ogniwem w łańcuchu reakcji wybuchowych. Inicjujące materiały wybuchowe są szeroko stosowane w wielu konstrukcjach spłonek i zapalników. Pomimo dużej różnorodności konstrukcyjnych

układów aplikacyjnych zawierających IMW, od dziesięcioleci praktyczne zastosowanie mają w nich przeważnie dwie substancje: azydek ołowiu i trinitrorezorcynian ołowiu.

Azydek ołowiu ($\text{Pb}(\text{N}_3)_2$) jest obecnie najczęściej stosowanym inicjującym materiałem wybuchowym. Jest toksycznym związkim krystalicznym wrażliwym na ciepło, wstrząsy, a przede wszystkim na uderzenie i tarcie. Charakteryzuje się bardzo krótkim przejściem od zapłonu do detonacji, co oznacza, że nawet niewielkie jego ilości przechodzą w pełną detonację. Prędkość detonacji wynosi około 4500-5300 m/s [13]. Azydek ołowiu w stanie wilgotnym nie traci właściwości wybuchowych. Chroniony przed wilgocią jest całkowicie stabilny podczas przechowywania. Azydek ołowiu jest trujący, słabo rozpuszczalny w gorącej wodzie i alkoholu, ale bardzo dobrze rozpuszczalny w rozcieńczonym kwasie azotowym (lub octowym), z dodatkiem niewielkiej ilości azotanu sodu. Reaguje z metaliczną miedzią, cynkiem, kadmem lub stopami zawierającymi wymienione metale, tworząc azydki, które są niestabilne. Na przykład azydek miedzi jest jeszcze bardziej wybuchowy i zbyt wrażliwy, aby można go było stosować komercyjnie. Azydek ołowiu zwykle przenoszony i przechowywany jest pod wodą w izolowanych gumowych pojemnikach. Aby wykorzystać go do celów komercyjnych lub wojskowych produkowane są specjalne spłonki z glinu, które są niereaktywne z $\text{Pb}(\text{N}_3)_2$. Azydek ołowiu wytwarza się w reakcji azydku sodu i azotanu ołowiu w roztworze wodnym. Można także stosować octan ołowiu. Do roztworu dodaje się dekstrynę lub alkohol poliwinylowy w celu stabilizacji wytrąconego produktu [4, 14].

Trinitrorezorcynian ołowiu ($\text{C}_6\text{H}_3\text{N}_3\text{O}_8\text{Pb}$), inaczej nazywany styfnińnian ołowiu, jest ciałem stałym, drobnokrystalicznym, o złoto-żółtym zabarwieniu ciemniejącym pod wpływem promieni słonecznych. Jest on znacznie mniej wrażliwy na uderzenie niż azydek ołowiu, ale znacznie bardziej czuły na płomień. Trójnitrorezorcynian ołowiu łatwo elektryzuje się, co w związku z jego wielką wrażliwością na wyładowania elektryczne czyni szczególnie niebezpiecznymi operacje przesypywania i sortowania tej substancji. Duża wrażliwość na bodźce cieplne przy małej wrażliwości na uderzenie i tarcie jest powodem, że trójnitrorezorcynian ołowiu dobrze nadaje się do napełniania artyleryjskich spłonek detonujących podlegających działaniu dużych sił w momencie wystrzału. Jednak niewielka zdolność inicjująca, na skutek dużej zawartości metalu (44,25%) [4], nie pozwala na stosowanie tej substancji, jako samodzielnego materiału inicjującego. W spłonkach detonujących inicjowanych przez nakłucie jest stosowany w mieszaninie z tetrazenem. Stosowany jest również, jako dodatek do azydku ołowiu w spłonkach detonujących do zwiększenia zdolności

zapalenia, od płomienia lub iskry. Wytwarza się go przez reakcję strącania zachodzącą między azotanem ołowiu i trinitrorezorcynianem magnezu [13].

1.2. Materiały kruszące

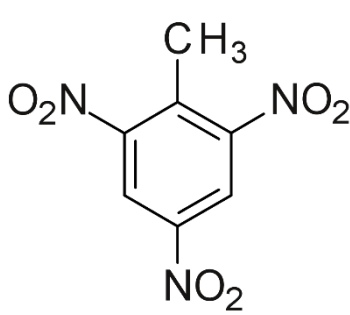
W kruszących materiałach wybuchowych prędkość rozchodzenia się fali detonacyjnej, powodującej rozpad struktury chemicznej materiału powinna być większa niż 1000 m/s. Materiały kruszące różnią się od IMW tym, że nie mogą być łatwo detonowane w wyniku dostarczenia ciepła lub poddania wstrząsom lub tarcia. Na ogół wybuch kruszącego materiału wysokoenergetycznego jest silniejszy niż wybuch materiału inicjującego. Jednakże materiały inicjujące są niezbędne do zapoczątkowania detonacji KMW. Niektóre materiały kruszące są tak stabilne, że strzał pociskiem karabinowym lub ich podpalenie nie wywołuje detonacji. Najbardziej popularnymi KMW są TNT, RDX i 1,3,5,7-tetranitro-1,3,5,7-tetraazacyklooktan (oktogen, HMX). Wartości ich prędkości detonacji mieszczą się w zakresie 5500-9000 m/s [4].

1.2.1. Trotyl

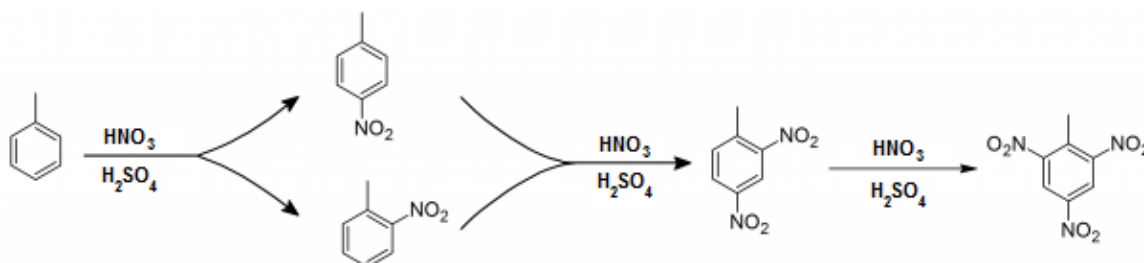
Trinitrotoluen jest jasnożółtym, bezwonnym, krystalicznym ciałem stałym. TNT nie występuje naturalnie w środowisku. Jest to najbardziej popularny materiał wybuchowy stosowany w amunicji wojskowej, a także w wielu gałęziach gospodarki, jak na przykład w budownictwie podczas procesu wyburzania budynków. Aby TNT mógł być użyty jako materiał wybuchowy, musi być użyty detonator, ponieważ materiał ten wybucha w temperaturach powyżej 240°C. TNT topi się jednak w temperaturze około 81°C, co pozwala bezpiecznie stopić materiał i napelnić nim pociski artyleryjskie. Ponadto, w przeciwieństwie do niektórych innych rodzajów materiałów wybuchowych, TNT zasadniczo nie eksploduje pod wpływem tarcia, czy wstrząsów i nie reaguje z metalami, ani nie pochłania wilgoci. W związku z tym, materiał może być bezpiecznie przechowywany przez znaczny czas, chociaż łatwo reaguje z chemicznymi środkami redukującymi. TNT często stosowany jest w mieszaninach z innymi materiałami wybuchowymi, takimi jak np. azotan amonu, tworząc amatol.

W tabeli 1 zostały przedstawione wybrane parametry fizykochemiczne trotylu.

Tabela 1. Podstawowe właściwości fizykochemiczne TNT [4, 13, 15].

Wzór empiryczny	$C_7H_5N_3O_6$	CAS: 118-96-7 
Masa molowa [g/mol]	227,1	
Prędkość detonacji [m/s]	6 900	
Temperatura zapłonu [°C]	300,0	
Temperatura topnienia [°C]	80,2	
Temperatura rozkładu [°C]	240,0	
Gęstość kryształu [g/cm ³]	1,65	
Entalpia tworzenia [kJ/kg]	- 295,3	
Prężność par w temp. 100°C [mm Hg]	0,1050	

Najbardziej popularną metodą syntezy TNT jest kilkuetapowe nitrowanie toluenu. W każdym z etapów należy zastosować odpowiednią mieszaninę kwasu azotowego(V) i kwasu siarkowego(VI) o określonym stężeniu i wzajemnym stosunku wagowym [12]. Reakcje syntezy przebiegają zgodnie z poniższym schematem (rys. 1).

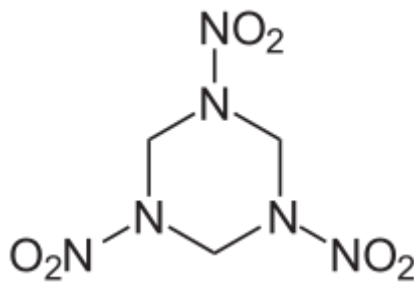


Rys. 1. Schemat trój etapowej syntezy TNT.

1.2.2. Heksogen

W swojej czystej postaci heksogen (RDX) jest stabilnym, białym, krystalicznym proszkiem. W temperaturze pokojowej pali się zamiast eksplodować. RDX jest uważany za najważniejszy wojskowy materiał wybuchowy we współczesnym użyciu ze względu na jego wysoką zdolność do niszczenia, stabilność w przechowywaniu i niską wrażliwość na uderzenia i tarcie, co czyni go bardzo pożądanym materiałem wybuchowym. W tabeli 2 zostały przedstawione wybrane parametry fizykochemiczne heksogenu.

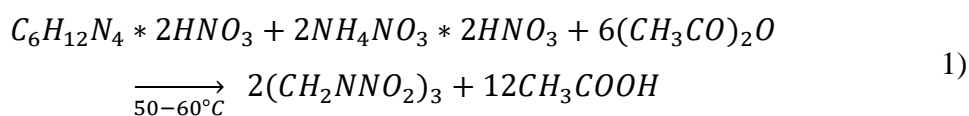
Tabela 2. Podstawowe właściwości fizykochemiczne RDX [4, 13, 15].

Wzór empiryczny	C ₃ H ₆ N ₆ O ₆	CAS: 121-82-4 
Masa molowa [g/mol]	222,1	
Prędkość detonacji [m/s]	8 750	
Temperatura zapłonu [°C]	260	
Temperatura topnienia [°C]	205	
Gęstość kryształu [g/cm ³]	1,82	
Entalpia tworzenia [kJ/kg]	+ 301,4	
Prężność par w temp. 110°C [mm Hg]	0,0004	

RDX został po raz pierwszy zsyntezowany w 1899 r. przez niemieckiego naukowca Henninga do celów leczniczych. Jego wartość, jako materiału wybuchowego nie została rozpoznana aż do 1920 r., w którym to roku Herz otrzymał RDX przez bezpośrednie nitrowanie heksametylenotetraminy, ale wydajność procesu była niska, a koszt wysoki. Z tego powodu synteza ta była nieatrakcyjna dla produkcji na dużą skalę. Wkrótce potem Hale opracował warunki procesu, w którym wytwarzał RDX z 68% wydajnością [12, 16].

W kolejnych latach nadal pracowano nad efektywnością procesu syntezy RDX. Dwa najbardziej popularne podejścia w czasie drugiej wojny światowej przedstawiają procesy:

- a) Proces Banchmanna [17] (proces KA), w którym do syntezy RDX (typ B) używa się heksaminy w postaci soli azotanowej, azotanu amonu i bezwodnika octowego.



Wydajność tego procesu jest duża, jednakże w jego trakcie powstaje ubocznie około 8-12% 1,3,5,7-tetranitro-1,3,5,7-tetraazacyklooktan (oktogen, HMX) w postaci zanieczyszczenia.

- b) W procesie Brockmana [18] w zasadzie produkuje się czysty RDX (typ A). RDX jest w tym wypadku syntezowany przez utlenianie 1,3,5-trinitrozo-1,3,5-triazacykloheksanu. W wyniku utleniania otrzymuje się 1-nitrozo-3,5-dinitro-1,3,5-triaxacykloheksan, jako produkt pośredni, który następnie jest przekształcany w RDX po dodaniu 30% roztworu nadtlenu wodoru i 99% roztworu kwasu azotowego w temperaturze (-40)°C.

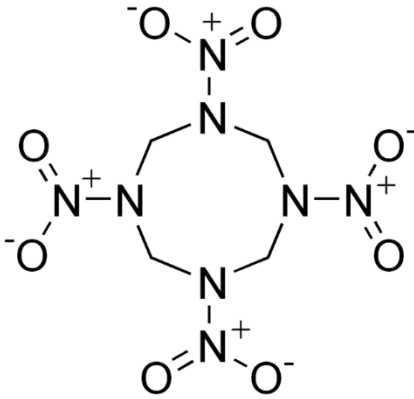


1.2.3. Oktogen

Oktogen (HMX) ma strukturę pierścienia heterocyklicznego o ośmiu członach. Jest to bezbarwne ciało stałe, które rozpuszcza się nieznacznie w wodzie. Ze względu na wysoką gęstość i dużą szybkość detonacji, HMX daje więcej energii na jednostkę objętości niż RDX, co czyni go jednym z najpotężniejszych wyprodukowanych chemicznych materiałów wybuchowych. Niektóre z właściwości fizykochemicznych przedstawiono w tabeli 3.

HMX jest stosowany jako wojskowy materiał wybuchowy zarówno indywidualnie (w postaci różnego rodzaju ładunków), jak i w formie składnika kompozycji wybuchowych [12].

Tabela 3. Podstawowe właściwości fizykochemiczne HMX [4, 13, 15].

Wzór empiryczny	C ₄ H ₈ N ₈ O ₈	<p>CAS: 2691-41-0</p> 
Masa molowa [g/mol]	296,2	
Prędkość detonacji [m/s]	9 100	
Temperatura zapłonu [°C]	384	
Temperatura topnienia [°C]	Ok. 281	
Gęstość kryształu [g/cm ³]	1,93	
Entalpia tworzenia [kJ/kg]	+ 253,3	
Prężność par [mm Hg]	2,41 x 10 ⁻⁸	

Oktogen jest syntezowany z tych samych substancji chemicznych co RDX, to znaczy: heksaminy, azotanu amonu, kwasu azotowego, bezwodnika i kwasu octowego. O rodzaju i wydajności produktu końcowego decydują ilościowe stosunki substratów reakcji, kolejność ich dodawania, a także temperaturowe warunki prowadzenia syntezy [12].

1.2.4. Mieszanki wybuchowe

Mieszanki wybuchowe to jedno- lub wielofazowe układy fizyczne, zawierające minimum dwa składniki. Mogą one występować w postaci ciekłej, gazowej, stałej lub heterogenicznej (np. ciekłe materiały wybuchowe zawierające cząstki metali). Mieszanki te tworzone są w następującym celu: zwiększenia asortymentu materiałów wybuchowych, zmiany parametrów detonacyjnych, obniżenia temperatury topnienia, poprawienia trwałości fizykochemicznej, a także obniżenia kosztów produkcji.

Tabela 4. Przykładowe kompozycje wybuchowe używanych podczas drugiej wojny światowej [4-6].

Nazwa	Skład	Zastosowanie
Amatol	Azotan amonu i TNT	Wykorzystywany w bombach, ładunkach głębinowych i minach morskich
Torpex	42% RDX, 40% TNT i 18% proszku glinu	Opracowany do użytku w torpedach, był szczególnie stosowany podczas podwodnych eksplozji
Baratol	Azotan baru i TNT	Brytyjskie granaty ręczne
Kompozycja A	88,3% RDX i 11,7% plastyfikatora	Używany przez wojsko w minach lądowych i rakietach 2,75 i 5 cali
Kompozycja B	RDX, TNT i wosk	Główne wypełnienie wybuchowe pocisków artyleryjskich, rakiet, min lądowych, granatów ręcznych i różnych innych rodzajów amunicji
Kompozycja H6	45% RDX, 30% TNT, 20% proszku glinu i 5% wosku	Stosowany zamiast TORPEX-u w zastosowaniach morskich
DBX	21% RDX, 21% azotan amonu, 40% TNT, 18% proszku glinu	Alternatywa dla TORPEX-u, w której wykorzystywano mniej RDX
Minol	40% TNT, 40% azotan amonu i 20% proszku glinu (Minol-2)	Opracowany przez British Royal Navy stosowany w torpedach, ładunkach głębinowych i minach morskich. Nie nadaje się do pocisków ze względu na ryzyko wybuchu, jeśli poddany jest bardzo dużym przyspieszeniom
Oktol	75% HMX i 25% TNT	Stosowany w ładunkach kumulacyjnych i głowicach używanych w pociskach kierowanych
Pentolit	50% PETN i 50% TNT	Głowice i ładunki detonujące

Można wyróżnić dwie grupy mieszanin: a) mieszaniny do celów wojskowych – mają dobre parametry detonacyjne i termochemiczne, trwałość, zdolność do detonacji od inicjatorów o małej masie oraz możliwość elaboracji amunicji w bezpiecznym zakresie temperatur;

b) mieszaniny do celów przemysłowych – charakteryzują się dużym bezpieczeństwem i niską ceną.

W tabeli 4 zamieszczono wybrane mieszaniny wybuchowe stosowane podczas drugiej wojny światowej wraz z ich składem i zastosowaniem [12].

1.3. Materiały miotające

Miotające materiały wybuchowe to materiały palne zawierające w swojej strukturze wystarczającą ilość tlenu potrzebnego do ich spalania. Zaprojektowane i skonstruowane są w taki sposób, aby reagowały ze starannie kontrolowaną szybkością, powodując propagowanie dużego ciśnienia przez dłuższy czas w porównaniu do KMW. Ich podstawową cechą jest duża ilość gazowych produktów reakcji, służąca do napędzania między innymi pocisków broni palnej. MMW palą się, ale nie wybuchają gwałtownie, a ich spalanie zwykle przebiega bardzo szybko i towarzyszy mu płomień lub iskry. Ponadto, podczas tego procesu występuje syczący lub trzaskający dźwięk, ale nie ostry, głośny huk, jak w przypadku detonacji kruszących materiałów wybuchowych. Materiały miotające mogą być formułowane jako ciała stałe lub jako ciecze. Stałe materiały pędne są częściej używane w działach, armatach i mniejszych raketach, podczas gdy paliwa ciekłe są używane w wysokowydajnych systemach raketowych i innych wybranych zastosowaniach. Związki te mogą być inicjowane przez płomień lub iskrę, a przemiana ze stanu stałego w stan gazowy przebiega względnie powoli, tj. w ciągu kilku milisekund. Przykładami MMW są: proch czarny, prochy bezdymne oraz materiały wybuchowe na bazie azotanu amonu, które nie zawierają nitrogliceryny ani żadnych związków aromatycznych [19].

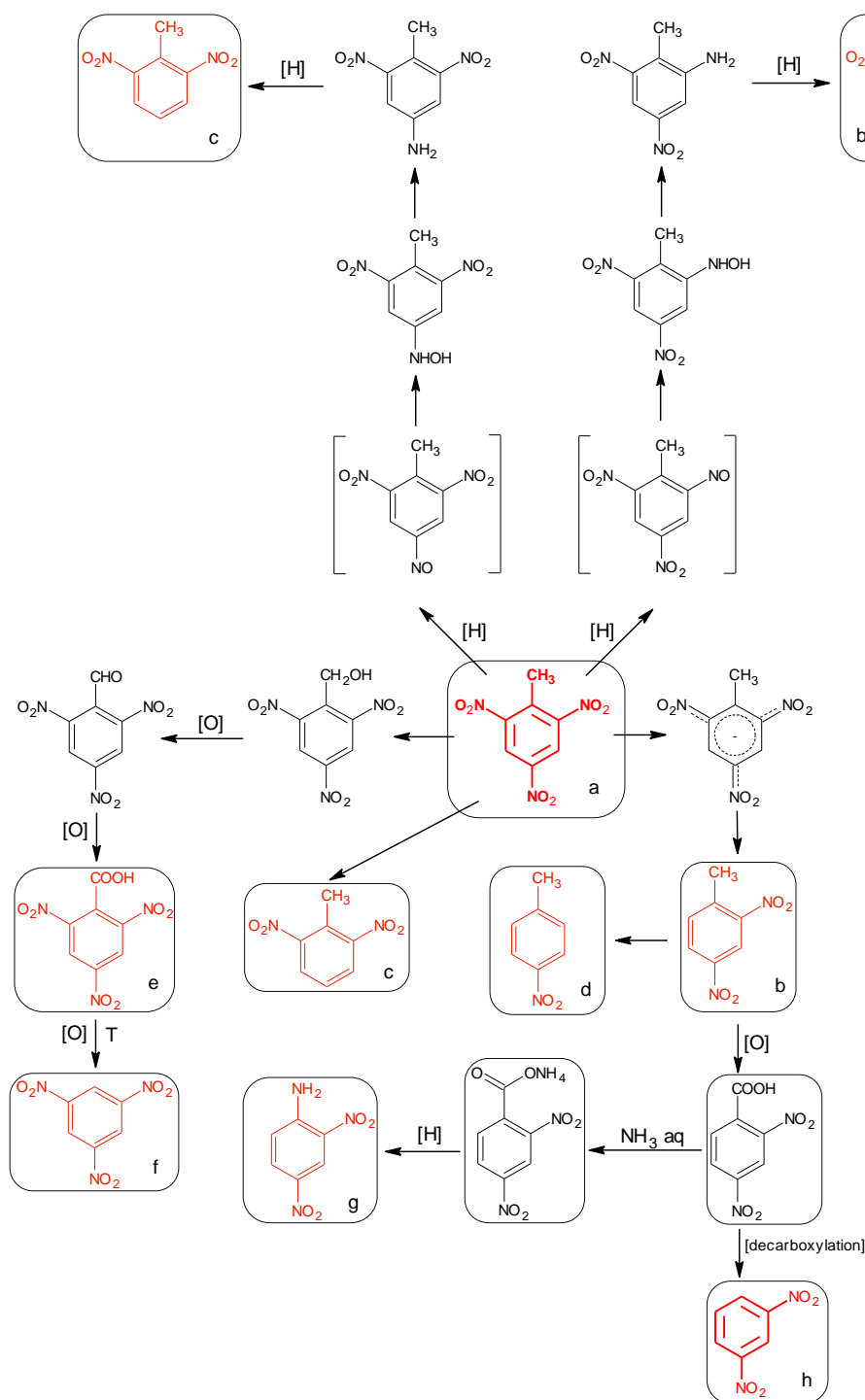
1.4. Mieszaniny pirotechniczne

Kompozycja pirotechniczna to substancja lub mieszanina substancji zaprojektowana w celu wywołania efektu za pomocą ciepła, światła, dźwięku, gazu lub dymu, a także ich kombinacji w wyniku nie detonacyjnych, samopodtrzymujących się, egzotermicznych reakcji chemicznych. Substancje pirotechniczne nie potrzebują tlenu ze źródeł zewnętrznych w celu podtrzymania reakcji. Podobnie, jak w przypadku kruszących materiałów wybuchowych lub materiałów miotających, efekty pirotechniczne opierają się również na reakcjach silnie egzotermicznych, przy czym KMW wykazują największe, a MMW względnie najmniejsze szybkości reakcji. Szybkość reakcji zachodzących w materiałach pirotechnicznych znajduje się pomiędzy tymi dwoma skrajnymi szybkościami. W przeciwieństwie do KMW, które uwalniają duże ilości gazu podczas reakcji, materiały pirotechniczne tworzą dodatkowo produkty stałe,

oprócz gazowych. Ogólnie każdy materiał pirotechniczny składa się z utleniacza, a także środka redukującego. Ponadto, w zależności od zamierzonego zastosowania, mogą również zawierać lepiszcze, ładunek miotający i barwnik, a także dodatki wytwarzające dym i hałas. Wiele reakcji pirotechnicznych biegnie w stanie stałym, czego wynikiem jest dobrze określony rozmiar cząstek i najwyższa możliwa jednorodność. Energia uwolniona podczas reakcji zwykle powoduje powstanie płomienia i pewnej ilości dymu, światła i gazu [16].

2. Degradacja materiałów wybuchowych w środowisku Morza Bałtyckiego

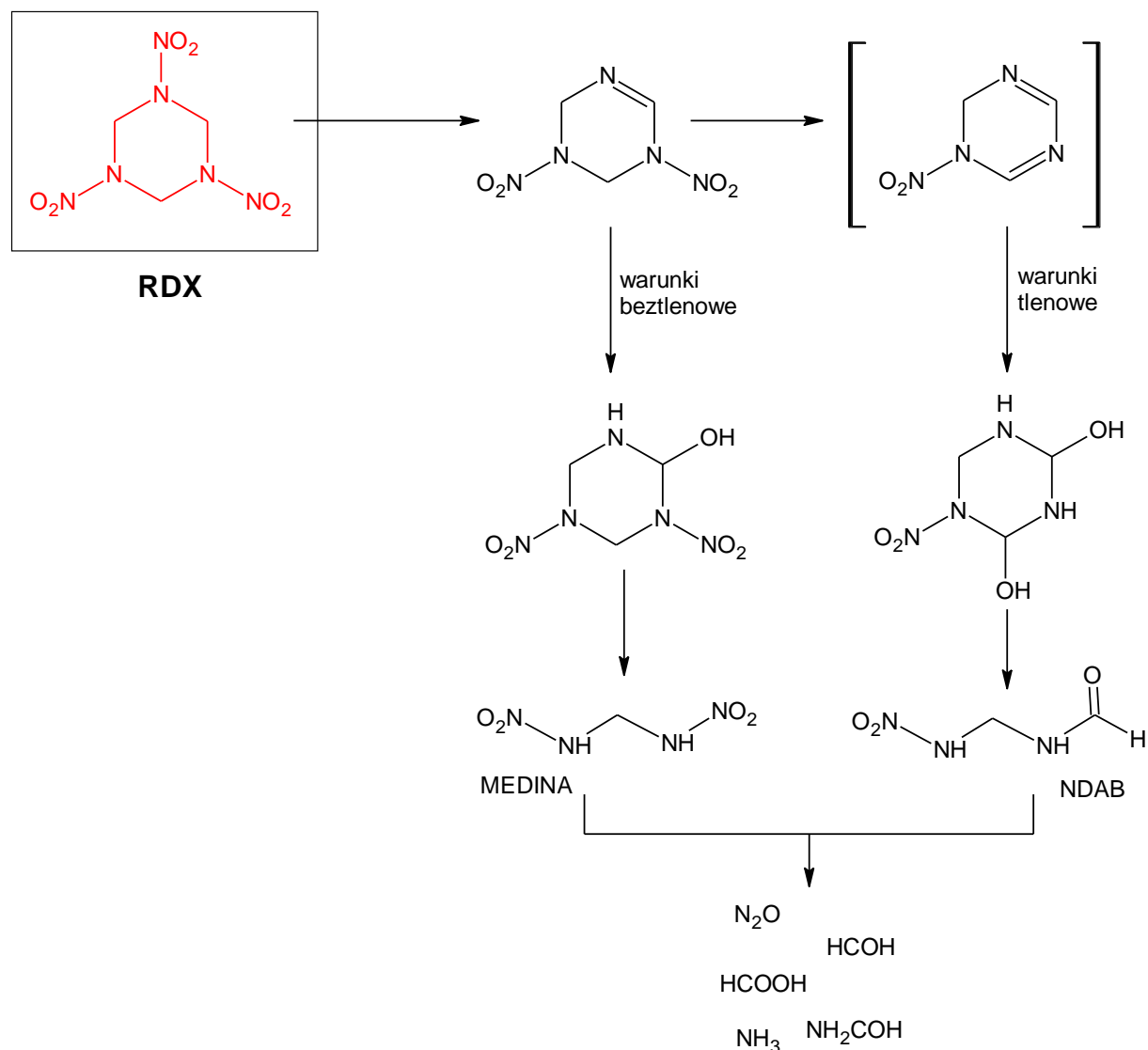
W obu Wojnach Światowych wykorzystano ogromną ilość różnego rodzaju uzbrojenia. Składowiska powojennej amunicji w dalszym ciągu stanowią poważny problem w zakresie bezpieczeństwa, ochrony środowiska i aspektów ekonomicznych [20, 21]. Po zakończeniu drugiej wojny światowej postanowiono zatopić część przestarzałej amunicji w morzach i oceanach [22]. Są też doniesienia, że dość częstą praktyką w czasie wojny było zrzucanie do morza niewykorzystanych w czasie bombardowania ładunków. Wynika to z niebezpieczeństwa jakie stwarza samolot lądujący z ładunkiem bombowym. Co gorsza, torpedy zrzucane z samolotów i wystrzeliwane z wody były wysoce zawodne, bo rzadko wybuchały, nawet jeśli trafiły w cel. Z kolei bomby głębinowe zrzucane zarówno przez okręty jak i samoloty w kierunku okrętów podwodnych były na tyle nieprecyzyjne, że rzadko osiągały trafienie [23]. Niezwykle trudnym zadaniem jest znalezienie oficjalnych informacji, dotyczących miejsca i rodzaju zatopionych materiałów wybuchowych. Wiadomo jednak, jakiego rodzaju materiały były używane podczas drugiej wojny światowej (tabela 4). Najczęściej były to TNT oraz RDX [4]. Od tych wydarzeń minęło ponad 70 lat, ale nadal występuje stałe zagrożenie z powodu uwalniania się substancji niebezpiecznych, bądź produktów ich degradacji. Na rysunku 2 i 3 przedstawiono schematy przemian TNT i RDX w Morzu Bałtyckim opracowane na podstawie dostępnych danych literaturowych [24-26].



Rys. 2. Schemat przemian TNT w środowisku morskim: a) TNT, b) 2,4-dinitrotoluen (2,4-DNT), c) 2,6-dinitrotoluen (2,6-DNT), d) 4-nitrotoluen (4-NT), e) kwas trinitrobenzoesowy (TNBA), f) trinitrobenzen (TNB), g) 2,4-dinitroanilina (2,4-DNA), h) 1,3-dinitrobenzen (1,3-DNB) [24].

Główne reakcje, którym ulega TNT w środowisku naturalnym to reakcje utlenienia, bądź redukcji jego grup funkcyjnych. Podczas utleniania grupy metylowej TNT w procesie końcowym powstaje kwas trinitrobenzoesowy, który następnie może ulec reakcji dekarboksylacji, tworząc trinitrobenzen. TNT może również ulegać procesom denitracji, prowadząc do powstania takich produktów rozkładu jak 2,4-dinitrotoluen, 2,6-dinitrotoluen

oraz 4-nitrotoluen. Z rekombinacji wcześniej wspomnianych procesów, a mianowicie denitracji, utleniania i dekarboksylacji powstaje 1,3-dinitrobenzen. Innym ważnym produktem degradacji TNT jest 2,4-dinitroanilina, która powstaje w wyniku redukcji soli amonowej kwasu 2,4-dinitrobenzoesowego [24]. TNT i produkty jego degradacji zaznaczone kolorem czerwonym na rysunku 2 charakteryzują się niską rozpuszczalnością w wodzie. Ponadto należy zwrócić szczególną uwagę na to, iż produkty przemiany w dalszym ciągu posiadają właściwości wybuchowe, a także są toksyczne i mutagenne [27].



Rys. 3. Schemat przemian RDX w warunkach morskich [25, 26].

RDX zbudowany jest z cykloalifatycznego pierścienia zawierającego trzy symetrycznie ułożone atomy azotu, do których przyłączone są trzy nitrowe grupy funkcyjne. W RDX, podobnie jak TNT, grupy nitrowe są głównym celem pierwszych etapów degradacji poprzez sekwencyjną redukcję lub denitrację. W trakcie biodegradacji następuje denitracja grup

nitrowych. Powstające w wyniku tego procesu związki ulegają rozerwaniu pierścienia i w zależności od warunków, w których się znajdują, powstają jako nietrwałe produkty przejściowe: N,N'-dinitrometanodiamina (MEDINA), bądź 4-nitro-2,4-diazabutanal (NDAB). Te przejściowe produkty degradacji RDX są nietrwałe i w konsekwencji dość szybko rozkładają się do produktów gazowych [25, 28]. Z tego względu, podczas analizy próbek osadów dennych, należy się nastawić jedynie na monitorowanie pierwotnego materiału wybuchowego, który jak powszechnie wiadomo jest toksyczny.

3. Przygotowanie próbek środowiskowych do analizy chromatograficznej

Próbki środowiskowe dostarczane do laboratorium występują w różnej formie, między innymi w postaci płynnej, stałej lub gazowej. Z tego względu przed analizą należy przeprowadzić proces przygotowania próbki, który pozwoli na przeniesienie analitów do odpowiedniego medium. Proces ten pozwala również oczyścić próbkę z części zanieczyszczeń występujących w matrycy próbki.

3.1. Problemy spotykane w czasie przygotowania próbek

Etap przygotowania próbek odgrywa kluczową rolę w całym procesie analitycznym, a w szczególności w przypadku próbek środowiskowych czy biologicznych o bardzo skomplikowanych matrycach. Etap ten ma przede wszystkim na celu selektywną izolację analitu. Dodatkowymi atutami wynikającymi z przygotowania próbek może być oczyszczanie i wzbogacanie analitu. Jeśli analizowane związki nie mogą być oznaczone jakąś metodą, należy je przeprowadzić w pochodne. Proces ten, nazywamy derywatyzacją. Polega on na przeprowadzeniu analitów w wyniku reakcji chemicznej, w odpowiednie pochodne o właściwościach umożliwiających ich oznaczenie. Według ankiety przeprowadzonej przez czasopismo „LCGC North America” do najczęściej spotykanych problemów na etapie przygotowania próbek do analizy można zaliczyć: długi czas procesu, duży koszt, mały odzysk, brak powtarzalności, niewystarczająca wiedza o próbce oraz złożoność matrycy - duża liczba rodzajów zanieczyszczeń i ich duże stężenie [29].

Jak można się było spodziewać, długi czas trwania procesu i duży nakład pracy związany z przygotowaniem próbek nadal stanowią poważny problem, pomimo dostępności wielu nowych technik. Należy bardzo wyraźnie podkreślić, że nie ma jednej uniwersalnej i idealnej techniki izolacji, i wzbogacania analitów z pobranych próbek. To, jaką technikę zastosujemy do przygotowania danej próbki uzależnione jest od wielu czynników, takich jak:

stan skupienia analitu w warunkach eksperymentu, rodzaj matrycy, polarność związku, a także rodzaj metody analitycznej.

3.2. Izolacja związków z próbek ciekłych

Próbki ciekłe podzielić można na takie, w których matrycą jest woda i na takie, w których matrycą jest rozpuszczalnik organiczny. Próbki z matrycą organiczną najczęściej nie wymagają zmiany matrycy, a jedynie ewentualnego zatężenia, bądź oczyszczenia ekstraktu. W przypadku próbek wodnych niejednokrotnie występuje konieczność zmiany matrycy na organiczną, ze względu na wykorzystywaną technikę chromatograficzną.

3.2.1. Ekstrakcja rozpuszczalnikiem typu ciecz-ciecz

Najbardziej powszechnym podejściem do izolacji związków z próbek wodnych jest ekstrakcja rozpuszczalnikiem typu ciecz-ciecz (*Liquid-liquid extraction* – LLE). Pierwsza udana komercyjnie operacja ekstrakcji ciecz-ciecz została opracowana dla przemysłu naftowego w 1909 roku, kiedy proces Edeleanu zastosowano do usuwania węglowodorów aromatycznych z nafty, wykorzystując ciekły dwutlenek siarki, jako rozpuszczalnik. Od tego czasu wiele innych procesów zostało opracowanych przez przemysł naftowy, chemiczny, metalurgiczny, nuklearny, farmaceutyczny i przetwórstwa spożywczego [30]. Ekstrakcja LLE polega na rozprowadzeniu lub podzieleniu próbki między dwie niemieszające się ciecze, w których związek analizowany i zanieczyszczenia mają różne rozpuszczalności. Zwykle jedna faza jest wodna, a druga faza jest rozpuszczalnikiem organicznym. Podstawą procesu ekstrakcji jest to, że bardziej polarne związki hydrofilowe preferują fazę wodną (polarną), a bardziej niepolarne związki hydrofobowe preferują rozpuszczalnik organiczny o charakterze niepolarnym.

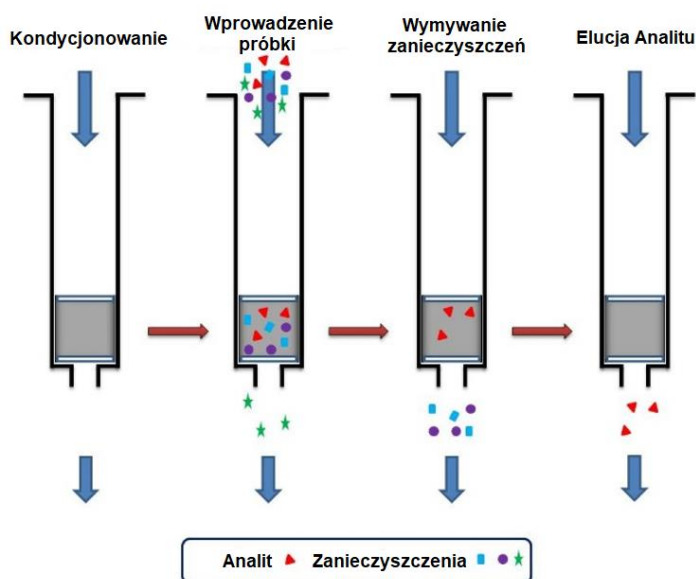
Dużą selektywność i wydajność (odzysk) ekstrakcji LLE można osiągnąć poprzez dobór właściwego rozpuszczalnika, stosując następujące kryteria: mała rozpuszczalność w fazie wodnej (zazwyczaj <10%), duża lotność (zaleta przy zatężaniu próbki i w przypadku analizy za pomocą chromatografii gazowej (GC)), duża czystość rozpuszczalnika w celu uniknięcia zatężenia zanieczyszczeń obecnych w rozpuszczalniku. Powinna być też zapewniona zgodność rozpuszczalnika z rodzajem wybranej techniki chromatograficznej, na przykład, nie używa się chlorowanych rozpuszczalników, takich jak dichlorometan, podczas stosowania metody analizy za pomocą GC sprzężonego z detektorem wychwytu elektronów (Electron capture detector – ECD) lub rozpuszczalników silnie absorbujących promieniowanie ultrafioletowe (UV), jeśli stosuje się chromatografię cieczową (LC) w sprzężeniu z detektorem UV. W celu

zwiększenia odzysku polarnych analitów można dobrać bardziej polarne rozpuszczalniki lub o zwiększonej obecności wiązań wodorowych, co wpływa korzystnie na zwiększenie wartości współczynnika podziału K_d .

Ekstrakcję można przeprowadzać manualnie, bądź za pomocą mechanicznej "wytrząsarki". Wytrząsanie umożliwia dokładne przemieszanie pomiędzy dwoma niemieszającymi się rozpuszczalnikami, maksymalizując w ten sposób powierzchnię kontaktu obu faz, a tym samym wspomagając przenoszenie masy i wydajną izolację analitów.

3.2.2. Ekstrakcja do fazy stałej

Jedną z pierwszych i stosunkowo prostych metod przygotowania próbek wodnych mających na celu izolację, zateżenie i oczyszczenie analitu jest ekstrakcja do fazy stałej (*Solid phase extraction* – SPE). Różne źródła przedstawiają niejednoznaczne informacje odnośnie wynalazcy tej techniki, a jej wynalezienie datuje się na około 1970 r [31]. Ekstrakcja ta polega na przepuszczeniu analizowanego roztworu przez kolumnę ekstrakcyjną, w której znajduje się złożo sorbentu (rys. 4). Faza stała jest zwykle pakowana w małe kolumnienki lub wkłady. Proces ten może być wykonany dla dużych objętości cieczy, dzięki czemu możliwe jest zateżenie analitów na powierzchni sorpcyjnej złoża. Kolejnym etapem tego procesu jest przemycie kolumny rozpuszczalnikiem odpowiednio dobranym do analizowanych związków, aby pozbyć się zanieczyszczeń lub przynajmniej ich części, nie wypłukując przy tym analitów. Następnie eluuje się zatrzymane anality przy pomocy niewielkiej ilości odpowiednio dobranego rozpuszczalnika. Alternatywną kolejnością etapów procedury SPE może być elucja w pierwszej kolejności badanego analitu, a następnie kondycjonowanie (przemywanie) kolumny, na której złożo zaadsorbowane zostały zanieczyszczenia i różne interferenty pochodzące z matrycy. Bardzo ważne jest dobranie odpowiedniego wypełnienia kolumny oraz rozpuszczalnika do elucji.



Rys. 4. Etapy prowadzenia ekstrakcji do fazy stałej [32].

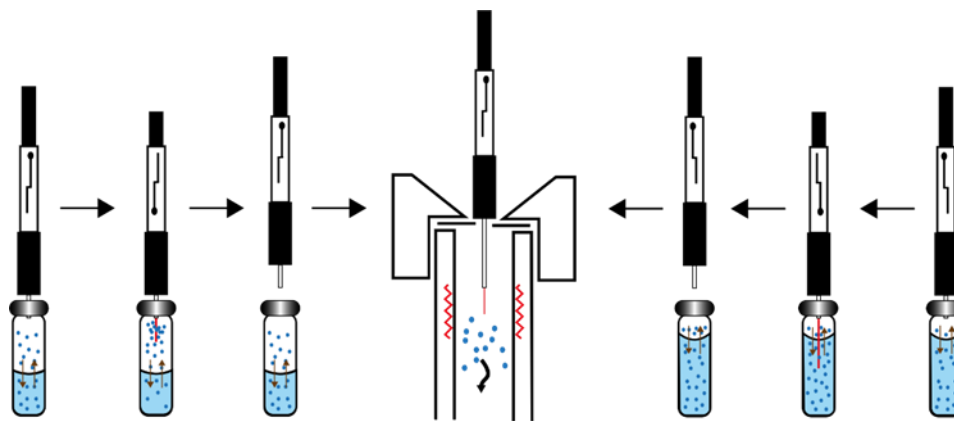
Ostatnio nastąpiło wiele zmian w technologii SPE, w tym nowe formaty (np. dyski, końcówki do pipety wypełnionej sorbentem [33-34] i płytki 96-studzienkowe [35-36]), nowe sorbenty (np. krzemionka lub nośniki na bazie polimerów [34, 36] i nośniki z powłoką mieszaną [37]) oraz rozwój w stronę układów on-line i automatyzacji [38]. Wszystkie te unowocześnienia mają na celu polepszenie selektywności techniki, skrócenie czasu procesu oraz zmniejszenie nakładu pracy użytkownika.

3.2.3. Mikroekstrakcja do fazy stacjonarnej

Mikroekstrakcja do fazy stacjonarnej (*Solid phase microextraction – SPME*) jest nowoczesną techniką izolacji i zateżenia analitów. Opracowana została w 1990 r. na Uniwersytecie w Waterloo (Kanada) przez zespół prof. Pawliszyna [39]. Jest ona prostą w obsłudze, szybką techniką, w której użycie rozpuszczalników nie jest konieczne. Obecnie SPME jest najczęściej stosowaną metodą do izolacji lotnych lub średniolotnych substancji z próbek zarówno o prostych, jak i ze skomplikowanych matryc.

Proces SPME przebiega w dwóch etapach (rys. 5):

- Sorpcja – podział analitów między próbkę, a warstwę sorpcyjną włókna SPME.
- Desorpcja – uwolnienie analitu z powierzchni włókna do aparatury analitycznej.



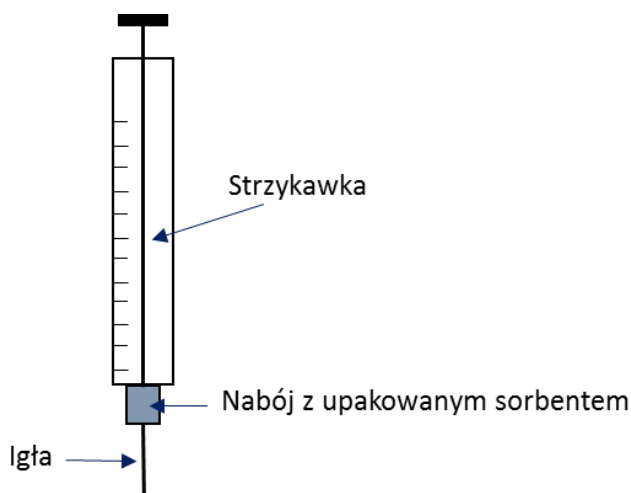
Rys. 5. Schemat przebiegu analizy chromatograficznej z wykorzystaniem SPME [40].

Kluczowym parametrem wpływającym na wydajność ekstrakcji i czułość metody jest współczynnik podziału, który zależy od temperatury, polarności matrycy, siły jonowej roztworu, a także rodzaju warstwy sorpcyjnej włókna. Na czułość oznaczenia mogą wpływać również: objętość fazy stacjonarnej, fazy nadpowierzchniowej a także objętość samej próbki. Ważnym parametrem jest także czas ekstrakcji, który zależy od temperatury i intensywności mieszania. Ogólnie można stwierdzić, że wszystkie parametry wpływające na wartość współczynnika podziału determinują czułość, selektywność oraz wydajność metody. Wybór sorbentu jest jednym z kluczowych elementów przeprowadzenia poprawnej ekstrakcji, ponieważ analizowane związki muszą mieć silne powinowactwo do fazy stacjonarnej. Zakres i wybór dostępnych w handlu rodzajów warstw sorpcyjnych prawie w ogóle nie rośnie. Najbardziej popularnymi fazami stacjonarnymi do ekstrakcji SPME są: polidimetylosiloksan (PDMS), poliakrylan (PA), czy kompozyt diwinylobenzen/karboksen/polidimetylosiloksan (DVB/CAR/PDMS). Ta grupa włókien pozwala na przesiewową analizę dowolnego rodzaju próbek.

W celu przeprowadzenia analizy metodą SPME, próbkę umieszcza się w fiołce, a następnie szczelnie zamyka kapsłem posiadającym membranę. Przez membranę wprowadza się włókno, umieszczone w urządzeniu do SPME, które eksponuje się w fazie nadpowierzchniowej lub wprowadza bezpośrednio do próbki. Po wprowadzeniu włókna z powłoką sorpcyjną do fazy nadpowierzchniowej (lub bezpośrednio do próbki) anality są ekstrahowane z matrycy do fazy stacjonarnej włókna. Gdy proces ekstrakcji zostanie zakończony, powłoka włókna zawierająca anality chowana jest do wnętrza igły i całe urządzenie przenosi się do dozownika chromatografu. W dozowniku chromatografu gazowego (częściej) lub cieczowego odbywa się desorpcja analitów.

3.2.4. Mikroekstrakcja do fazy upakowanej

Mikroekstrakcja do fazy upakowanej (Microextraction by packed sorbent - MEPS) to nowa technika miniaturyzacji ekstrakcji SPE. Urządzenie MEPS można bezpośrednio stosować zamiast konwencjonalnej strzykawki wprowadzającej próbkę do chromatografu gazowego lub wysokosprawnego chromatografu cieczowego. W MEPS sorbent znajduje się w komorze lub naboju między igłą a strzykawką (rys. 6).



Rys. 6. Urządzenie do mikroekstrakcji do fazy upakowanej.

Technika MEPS może być wykorzystana w analizie próbek wodnych o szerokim spektrum analitów. W celu pobrania próbki roztwór zaciąga się do strzykawki przepuszczając go przez nabój z upakowanym sorbentem, a następnie zawartość wypuszcza się, ponownie przepuszczając kolejną porcję cieczy przez warstwę sorbującą. Czynność tą można powtarzać wielokrotnie, aby zwiększyć ilości poszczególnych analitów sorbowanych w fazie stacjonarnej. Po procesie izolacji i zateżenia analizowanych substancji następuje proces ich desorpcji z próbki. Prowadzi się go za pomocą małej ilości odpowiednio dobranego rozpuszczalnika, który pozwoli na jednorazowe wymycie związków z fazy sorbującej. Czynność tę można wykonać bezpośrednio do dozownika chromatografu gazowego lub za pomocą zaworu dozującego w chromatografie cieczowym. Proces ten można całkowicie zautomatyzować za pomocą dozownika automatycznego. Metodę MEPS wykorzystano do oznaczania materiałów wybuchowych w wodzie i próbkach biologicznych [41], a także podczas wykrywania narkotyków w osoczu [42].

3.2.5. Ekstrakcja ruchomym elementem sorpcyjnym

Ekstrakcja za pomocą ruchomego elementu sorpcyjnego (Stir bar sorptive extraction – SBSE) została wynaleziona w 1999 roku przez profesora Sandra [43] jako technika przygotowania próbek, która nie wymaga wykorzystania rozpuszczalników organicznych. W metodzie tej anality sorbowane są w fazie stacjonarnej osadzonej na ruchomym elemencie, podobnym do mieszadełka magnetycznego. Po procesie pobierania i jednoczesnego zatężania anality poddawane są desorpcji w małej objętości rozpuszczalnika organicznego, a następnie konwencjonalnie wstrzyknięty do chromatografu gazowego lub wysokosprawnego chromatografu cieczowego. Drugim sposobem jest desorpcja termiczna zasorbowanych analitów z wykorzystaniem jednostki desorpcyjnej sprzężonej z chromatografem gazowym [44].

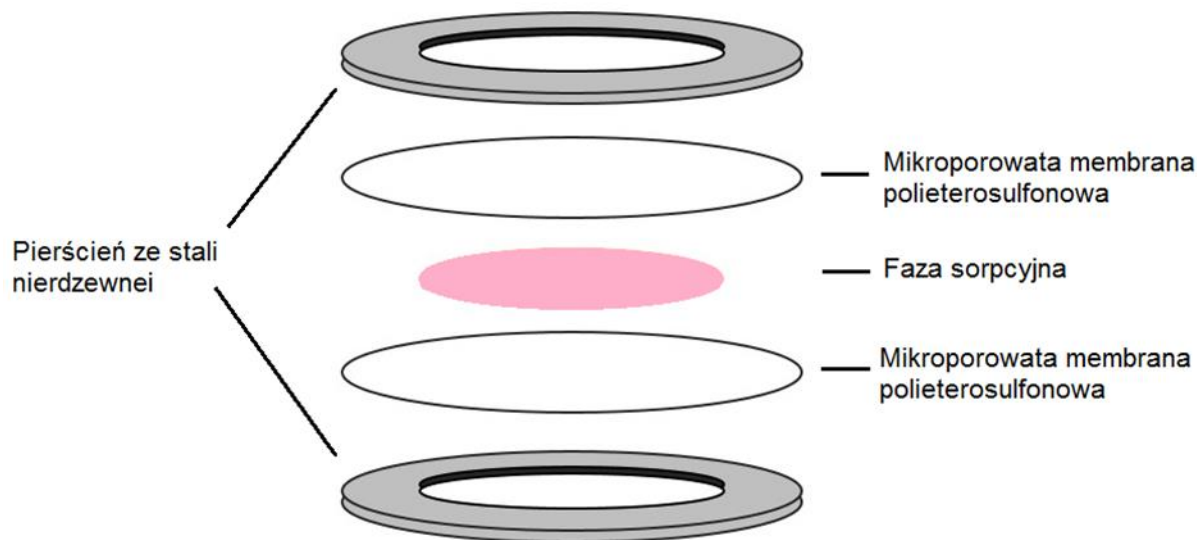
3.2.6. Mikroekstrakcja kroplą rozpuszczalnika

Mikroekstrakcja kroplą rozpuszczalnika (*Single drop microextraction – SDME*) początek swój ma w połowie lat 90' ubiegłego wieku, jako wynik prac prowadzonych przez Liu i Dasgupta [45]. W metodzie tej izolacja analitu następuje przez ekstrakcję składników próbki do kropli cieczy zawieszanej na końcu igły strzykawki zanurzonej bezpośrednio w próbce lub w fazie nadpowierzchniowej tej próbki. Warunkiem przeprowadzenia ekstrakcji jest większa rozpuszczalność analitu w rozpuszczalniku ekstrahującym niż w próbce. Główną zaletą tego podejścia jest mała ilość używanego rozpuszczalnika organicznego w celu uzyskania szybkiej ekstrakcji i wstępnego zatężania związków organicznych z próbek wodnych. Głównym problemem tej techniki jest wybór odpowiedniego rozpuszczalnika, który utworzy i zachowa odrębną kroplę do ekstrakcji. Poza tym precyzyjność i powtarzalność postępowania osoby wykonującej ekstrakcję jest źródłem kolejnych błędów tej metody [46].

3.2.7. Pasywna technika pobierania próbek z wykorzystaniem zintegrowanego próbnika dla polarnych związków organicznych

W 2004 r. po raz pierwszy przedstawiono urządzenie do pasywnego pobierania próbek z wykorzystaniem zintegrowanego próbnika dla polarnych związków organicznych (*Polar organic chemical integrative sampler – POCIS*). Jego twórcą jest Alvarez wraz ze współpracownikami [47]. POCIS składa się z sorbentu umieszczonego między dwiema mikroporowatymi polieterosulfonowymi membranami ograniczającymi dyfuzję (rys. 7). Wybór sorbentu wpływa na selektywność próbnika względem wybranych związków organicznych. Podczas procesu ekstrakcji urządzenie do POCIS musi być zanurzone w wodzie

na kilka dni lub tygodni. Następnie jest wyławiane i transportowane do laboratorium w celu wyjęcia fazy sorbującej, a następnie desorpcji zasorbowanych substancji. Anality ekstrahuje się ze stałego sorbentu za pomocą rozpuszczalnika/ów z wykorzystaniem ekstrakcji SPE, ekstrakcji ciało stałe - ciecz wspomaganej ultradźwiękami (Ultrasound assisted extraction – UAE) lub przyspieszonej ekstrakcji za pomocą rozpuszczalnika (Accelerated solvent extraction – ASE). Eluat jest następnie analizowany na ogół za pomocą LC sprzężonego ze spektrometrią mas (Mass spectroscopy - MS) lub GC-MS.



Rys. 7. Schematyczne przedstawienie urządzenia do ekstrakcji metodą POCIS [65].

3.3. Izolacja związków z próbek stałych

Próbki stałe są często niejednorodne pod względem struktury fizycznej i składu chemicznego. Z tego względu należy zwrócić szczególną uwagę na reprezentatywność pobranej próbki. Podczas przygotowania materiałów stałych do analizy często należy je rozdrobnić, co sprzyja homogenizacji, ułatwia rozpuszczenie i ekstrakcję. Ekstrakcja najczęściej stosowana jest do wyizolowania z próbek stałych substancji organicznych. Niektóre z tych metod izolacji opisano poniżej.

3.3.1. Ekstrakcja za pomocą rozpuszczalnika organicznego w aparacie Soxhleta

Ekstrakcja za pomocą rozpuszczalnika organicznego w aparacie Soxhleta (Soxhlet extraction – SE), w skrócie ekstrakcja Soxhleta, wykorzystywana jest do izolacji analitów z próbek o matrycach stałych (gleba, osad denny, stałe próbki biologiczne). Nazwa techniki wywodzi się od jej wynalazcy, Franza Rittera von Soxhleta, niemieckiego chemika, który pracował nad zagadnieniami chemii mleka. Opracował procedurę oddzielenia tłuszczów od

stałych składników mleka, którą opisał w 1879 r. [48]. Jednak SE nie ogranicza się tylko do ekstrakcji lipidów. Zazwyczaj jest stosowana tylko wtedy, gdy pożądanym związek chemiczny ma ograniczoną rozpuszczalność w określonym medium, a zanieczyszczenie jest w nim nierozpuszczalne. Aparat do SE składa się z kolby z rozpuszczalnikiem, korpusu ekstraktora, elektrycznego źródła ciepła i chłodnicy zwrotnej. Przejście ciepłego rozpuszczalnika przez gilzę zawierającą próbkę, powoduje ekstrakcję wszelkich zawartych w niej związków organicznych. Wzrost służy cieczy rozpuszczalnika w nasadce ekstraktora następuje do wysokości syfonu, a po przekroczeniu tej wysokości, następuje opróżnienie rozpuszczalnika z powrotem do kolby kulistej. Ponieważ badane anality znajdujące się w rozpuszczalniku są znacznie mniej lotne od rozpuszczalnika ekstrahującego, to podczas parowania do nasadki ekstrakcyjnej trafia kolejna porcja czystego rozpuszczalnika. Ten cykl może być powtarzany wiele razy w celu uzyskania możliwie największego odzysku. SE jest zwykle uważana za technikę odniesienia w ekstrakcji ciała stałe-ciecz, a rezultaty uzyskane tą techniką porównuje się z rezultatami wszystkich innych zastosowanych technik ekstrakcyjnych. Dzieje się tak dlatego, że stosując ekstrakcję w aparacie Soxhleta zazwyczaj uzyskuje się największe odzyski analitów z próbki, przy czym jest to technika, w której zużywa się stosunkowo dużo rozpuszczalników, a do tego jest ona czasochłonna.

3.3.2. Ekstrakcja rozpuszczalnikiem przez wytrząsanie

Ekstrakcja związków organicznych, w tym pestycydów i wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych z różnych matryc (gleby, osady ściekowe, warzywa, rośliny), była od dawna przeprowadzana przy użyciu ekstrakcji Soxhleta. Istnieją jednak alternatywne rozwiązania ekstrakcji Soxhleta, do których zaliczyć można, między innymi, mechaniczne wstrząsanie, często określane, jako ekstrakcja z zastosowaniem wstrząsania (*Agitation extraction* – AE). Jest to jedna z najprostszych technik ekstrakcyjnych, która do zwiększenia powierzchni kontaktu między rozpuszczalnikiem a próbką, wykorzystuje dynamiczne mieszanie. Na rynku występuje wiele typów urządzeń stosowanych do mieszania m.in. mieszadła, wytrząsarki. Typ mieszania oraz jego parametry (rodzaj ruchu oraz jego szybkość) zależą między innymi od wielkości i kształtu naczynia, a także od rodzaju i właściwości mieszanej próbki. Im większa liczba wykonanych ekstrakcji mniejszymi porcjami rozpuszczalnika, tym uzyskiwany odzysk jest większy. Jednakże, najczęściej przeprowadza się 2-3 krotną ekstrakcję, za każdym razem używając świeżej porcji rozpuszczalnika [49-51].

3.3.3. Ekstrakcja za pomocą rozpuszczalnika wspomagana mikrofalami i ultradźwiękami

Klasyczną ekstrakcję ciała stałe – ciecz skutecznie można modyfikować poprzez zastosowanie czynników zewnętrznych, takich jak promieniowanie mikrofalowe, czy ultradźwięki. Stosowanie fizycznych metod wspomagania ekstrakcji znacznie zwiększa selektywność i wydajność ekstrakcji, redukuje jej czas, a także zmniejsza ilości używanego rozpuszczalnika [52-53].

Pierwsze informacje dotyczące wykorzystania ekstrakcji wspomaganej mikrofalami (*Microwave assisted extraction* – MAE) pojawiają się w pracy Abu-Samraeta i współpr. w roku 1975 [54]. Użyli oni tradycyjnych kucharek mikrofalowych do przygotowania próbek biologicznych do analizy śladowych ilości metali. Natomiast pierwszy patent na ekstrakcje związków organicznych z wykorzystaniem promieniowania mikrofalowego został opracowany przez Pare w 1995 r [55]. Ekstrakcja wspomagana mikrofalami polega na ogrzewaniu badanej próbki w wyniku absorpcji energii mikrofalowej przez cząsteczki zwiększające w ten sposób penetrację rozpuszczalnika do matrycy próbki. W przeciwieństwie do konwencjonalnego ogrzewania, w którym naczynie potrzebuje dużo czasu na podgrzanie, a następnie przekazanie energii do rozpuszczalnika, czas ogrzewania w MAE jest bardzo szybki, ponieważ ciepło jest przekazywane bezpośrednio do całej objętości rozpuszczalnika. Jednakże technika ta posiada też kilka wad, które przyczyniły się do jej powolnej akceptacji wśród grona naukowców. Są nimi takie jak: ekstrakty muszą być filtrowane po ekstrakcji, co wydłuża proces przygotowania próbek; potrzebne są rozpuszczalniki posiadające zdolność absorbowania i propagacji mikrofal; konieczne jest oczyszczenie ekstraktów, ponieważ MAE jest bardzo wydajny. Oprócz tego w wyniku ekstrakcji ulega wyodrębnieniu również wiele składników matrycy, co powoduje, że selektywność takiej ekstrakcji jest mała.

W przypadku ekstrakcji ciała stałe - ciecz wspomaganej ultradźwiękami, jedno z pierwszych doniesień na temat jej wykorzystania można znaleźć w pracy Nakamury i Itoha [56]. W opisanych badaniach wykorzystano ultradźwięki do ekstrakcji inhibitora wzrostu mikoplazmatycznego z komórek mikoplazmy. Podczas oddziaływania ultradźwiękami na próbkę, okresowa kompresja tworzy w roztworze tysiące mikroskopijnych pęcherzyków. Zapadają się one w ciągu kilku mikrosekund po osiągnięciu krytycznego rozmiaru, powodując wystąpienie kawitacji. Powstają silne fale wibracji, które uwalniają ogromną energię w polu kawitacyjnym, co zakłóca oddziaływania międzycząsteczkowe, np. oddziaływania między cząsteczkami wody, a także oddziela grudki cząstek i ułatwia mieszanie.

3.3.4. Przyspieszona ekstrakcja za pomocą rozpuszczalnika

Przyspieszona ekstrakcja za pomocą rozpuszczalnika (ASE) jest stosunkowo nową techniką ekstrakcyjną, która wspomagana jest zarówno wysoką temperaturą jak i podwyższonym ciśnieniem. Podwyższone ciśnienie umożliwia stosowanie, jako rozpuszczalników ekstrahujących cieczy w temperaturach wyższych niż ich temperatura wrzenia pod normalnym ciśnieniem. Metoda ta została po raz pierwszy opisana w 1995 r [57]. Stosowanie wysokich ciśnień w połączeniu z wysoką temperaturą zwiększa szybkość procesu ekstrakcji (zazwyczaj kilka minut) oraz wymaga niewielkich ilości rozpuszczalników. Wynika to ze zwiększonej rozpuszczalności analitów, lepszej desorpcji z matrycy próbki i zwiększonej dyfuzji [58-59]. W ASE ciśnienie nie odgrywa aż tak dużej roli jak temperatura, jednak pozwala na lepszą penetrację rozpuszczalnika w matrycy i ekstrakcję analitów zatrzymanych w porach. Wymuszanie penetracji jest szczególnie korzystne przy wilgotnych próbkach i matrycach, które silnie adsorbują anality. Technika ASE daje możliwość zastosowania różnych rozpuszczalników, nawet tych, które nie są skuteczne w konwencjonalnych metodach. Odbywa się to przez regulację temperatury i ciśnienia podczas procesu, a wzrost obu parametrów zwiększa wydajność ekstrakcji. Poważną wadą ASE jest to, że proces może jednak prowadzić do rozpuszczania składników matrycy, które w warunkach konwencjonalnej ekstrakcji pozostałyby nierozpuszczalne. Dlatego selektywność jest często trudna do osiągnięcia w tej metodzie, a zwłaszcza, gdy analizowane są próbki środowiskowe [60].

3.4. Przygotowania próbek zawierających materiały wybuchowe

Najbardziej popularną procedurą przygotowania próbek gleby/osadów dennych, zawierających materiały wysokoenergetyczne jest metoda opisana w normie EPA 8330B zalecana przez Agencję Ochrony Środowiska Stanów Zjednoczonych (USEPA) [61]. Opiera się ona na ekstrakcji ciała stałe - ciecz wspomaganą ultradźwiękami z użyciem acetonitrylu, jako rozpuszczalnika. Do głównych wad tej metody należy zaliczyć: stosunkowo długi czas przygotowania próbki oraz wpływ wielu innych czynności na końcowy wynik analizy - sposób ekstrakcji, suszenie, homogenizacja, filtracja, itp. Postępując w sposób opisany w normie narażamy się na utratę części analitów, a także możliwość wprowadzenia dodatkowych zanieczyszczeń. W przypadku próbek wodnych zgodnie z normą EPA 8330B zaleca się stosowanie ekstrakcji typu ciecz-ciecz z wykorzystaniem soli wysalającej i/lub ekstrakcji SPE. Ze względu na wady techniki LLE, takie jak: czasochłonność, wykorzystywanie dużej ilości rozpuszczalników organicznych oraz stosunkowo małe wartości odzysku analitów w celu

przygotowania próbek wody zawierających materiały wybuchowe zaleca się wykorzystanie techniki SPE.

Podczas doboru odpowiedniej techniki ekstrakcyjnej bierze się pod uwagę przede wszystkim rodzaj badanej matrycy oraz właściwości fizyczne i chemiczne analizowanych związków. Możemy wyróżnić pięć podstawowych typów próbek: woda, gleba, osady denne, gazy oraz próbki organiczne. Próbuąc wyizolować materiały wybuchowe, takie jak: TNT, RDX lub HMX z próbek wodnych, najczęściej używaną metodą jest ekstrakcja SPE [62-64]. Jednakże, oprócz tej metody, w literaturze można znaleźć wykorzystanie następujących technik: ekstrakcja SPME [65-67], ekstrakcja SDME [66], ekstrakcja UAE [68-69], a także tradycyjna ekstrakcja LLE z uwzględnieniem jej modyfikacji [62, 68-69]. Specyficzną techniką ekstrakcji, która w ostatnim czasie zyskała na znaczeniu, jest pasywna technika pobierania próbek materiałów energetycznych z wykorzystaniem zintegrowanego próbnika dla polarnych związków organicznych [70]. Technika ta w sposób ciągły pozwala na kumulowanie analitów przez wiele tygodni albo miesięcy i zapewnia możliwość rejestrowania zdarzeń epizodycznych lub wahań stężeń uwalnianych zanieczyszczeń, nawet przy niskich stężeniach, ponieważ prowadzi do zateżenia próbki podczas jej pobierania.

Próbki gleby zawierające materiały wybuchowe i produkty ich rozkładu najczęściej pochodzą z terenów, gdzie odbywały się manewry wojskowe, bądź z okolic zakładów produkujących materiały wybuchowe. Podczas przygotowania tego typu próbek do analizy za pomocą chromatografii pomijany jest zwykle proces osuszania, co zaoszczędza czas. Wcześniej wspomniana metoda EPA z wykorzystaniem UAE często pojawia się w literaturze dotyczącej analizy próbek gleby [71, 72]. W celu skrócenia czasu ekstrakcji, zmniejszenia ilości rozpuszczalnika, jak również liczby etapów niezbędnych do przygotowania próbki w dalszym ciągu prowadzone są prace mające na celu opracowanie nowych metod lub modyfikację istniejących technik. Jako alternatywną metodę ekstrakcji MW z gleby Mayfield i współpr. zastosowali SPME [73], jednak związki takie jak RDX i HMX nie zostały wykryte przy żadnych warunkach ekstrakcji. Najprawdopodobniej wynika to z bardzo niskiej prężności par tych substancji. Dodatkowo stwierdzili oni, że związki te pozostają wyzwaniem dla chromatografii gazowej połączonej z techniką SPME. W celu izolacji MW z próbek gleby wykorzystano również technikę ASE [74], jak również ekstrakcję MAE, która daje możliwość ekstrakcji TNT i produktów jego przemian w glebie, bez ich rozkładu [75]. Trzeba jednak pamiętać, że pomimo prawie stuletniego użytkowania, ekstrakcja za pomocą rozpuszczalnika organicznego w aparacie Soxhleta jest nadal poważnie traktowaną techniką i może być

stosowana do izolacji materiałów wybuchowych z próbek gleby [76]. Nawet jeśli jest uważana za czasochłonna i zużywającą duże ilości rozpuszczalników. Zaletą SE jest to, że zapewnia stosunkowo duże wartości odzysków.

Badania kontrolujące zanieczyszczenie osadów dennych związkami wybuchowymi są stosunkowo mało popularne. Odnotowuje się znacznie mniejszą liczbę pozycji literaturowych poświęconych tej matrycy. Może to być spowodowane dużym stopniem skomplikowania procesu przygotowania próbki do analizy (jest to zarówno matryca wodna, jak i stała), jak również z małą dostępnością materiału odniesienia do badań laboratoryjnych. Najczęściej stosowaną metodą przygotowania próbek osadów dennych jest ekstrakcja UAE, która jest zalecana przez USEPA [68, 77-81].

Jednakże, w literaturze można znaleźć także wykorzystanie innych metod przygotowania próbek osadów dennych do analizy chromatograficznej. Jedną z nich jest ekstrakcja rozpuszczalnikiem przez wytrząsanie przedstawiona przez Pennington i współpracowników [82]. Do analizy TNT, RDX i HMX zastosowali oni wieloetapową metodę wykorzystującą jedynie ekstrakcję przez wytrząsanie. Każdą ekstrakcję prowadzono w przedziale od 1 do nawet 24 godzin. Autorzy nie przedstawili procesu optymalizacji metody ekstrakcji, a jedynie jej zoptymalizowane parametry. Podobną sytuację przedstawili Wilson i Cupples [83]. W swoich badaniach nad RDX zastosowali oni AE z wykorzystaniem konkretnych już parametrów prowadzenia procesu.

Inną techniką zastosowaną do przygotowania próbek zawierających HMX i RDX była ekstrakcja ASE. Badania te przedstawili Onuska i współpr. [84], którzy zaprezentowali optymalizację metody ASE i porównali ją do tradycyjnej ekstrakcji SE, która była przeprowadzona zgodnie z procedurą normy 3540 USEPA [85].

Nie ma jednak w literaturze opisu optymalizacji procesu przygotowania próbek różnymi technikami pod kątem izolacji materiałów wybuchowych, ich porównania oraz pełnej walidacji metody. Ponadto, w większości prac, przedstawiono badania dotyczące analizy tylko kilku substancji, pomijając badania nad większą liczbą analitów z tej grupy związków i opracowania kompleksowej metody analizy.

Podobnie jak w przypadku próbek osadów dennych, analiza matryc biologicznych jest zagadnieniem o dużym stopniu złożoności. Ważne jest, aby pamiętać, iż wiele organicznych związków należących do grupy materiałów wysokoenergetycznych i produktów ich degradacji jest na tyle silnie związana w tkankach biologicznych, że ekstrakcja rozpuszczalnikiem

i identyfikacja są utrudnione. Również tutaj najbardziej popularną metodą ekstrakcji jest metoda zaproponowana przez USEPA, czyli UAE [78-80, 86].

4. Analiza chromatograficzna

W pracy przedstawiono oraz scharakteryzowano metody detekcji sprzężone z chromatografią powszechnie wykorzystywane w analizie materiałów wybuchowych. Są to między innymi: detektor mas (MS), detektor UV-Vis, czy detektor wychwytu elektronów (ECD)

4.1. Chromatografia cieczowa

Chromatografia cieczowa jest fizykochemiczną metodą rozdzielania składników jednorodnych mieszanin na poszczególne jej części. W kolumnowej chromatografii cieczowej, gdy ciepla faza ruchoma przechodzi przez kolumnę, anality znajdujące się w fazie ruchomej oddziałują w różnym stopniu ze stałą fazą stacjonarną. Cząsteczki analitu rozdzielane są na podstawie ich oddziaływania fizykochemicznego z fazą stacjonarną i fazą ruchomą. Oddziaływania te mogą być oparte na różnicy w wielkości cząsteczek (chromatografia wykluczania) [87], różnicy wielkości ładunku elektrycznego (chromatografia jonowymienna) [87], różnicy w hydrofilowości (chromatografia oddziaływań hydrofilowych) [88], różnicy w sile wiązań (chromatografia powinowactwa) [89] lub ich kombinacji (chromatografia wielomodalna lub mieszana) [90]. Skład fazy ruchomej jest zwykle zmieniany w trakcie trwania analizy tak, aby zmienić siłę elucji układu chromatograficznego. Dzięki czemu wszystkie składniki próbki eluują z kolumny w określonej kolejności.

4.2. Chromatografia gazowa

Chromatografia gazowa jest techniką chromatografii kolumnowej polegającą na separacji związków mieszaniny, w której fazą ruchomą jest gaz, a fazą stacjonarną jest warstwa cieczy lub polimeru o grubości od 0,1 do 1,0 μm na obojętnym stałym podłożu, wewnątrz kwarcowej kapilary zwanej kolumną kapilarną. Oprócz kolumn kapilarnych wykorzystuje się również kolumny pakowane, które wypełniane są sorbentem lub cieczą polimeryczną pokrywającą cząstki nośnika w całej swej objętości. GC stosuje się do oddzielenia termicznie trwałych lotnych składników mieszaniny. Proces chromatografii gazowej polega na odparowaniu próbki w dozowniku i jej przejściu na czoło kolumny. W stałej temperaturze (rzadziej) lub kontrolowanym gradiencie temperatury (najczęściej) próbka jest transportowana przez kolumnę w wyniku przepływu obojętnej, gazowej fazy ruchomej. Najczęściej stosowany jest hel lub inny gaz obojętny, taki jak np. azot, argon lub nawet wodór. Substancje lotne

rozdzielane są na skutek kilku właściwości, w tym: temperatury ich wrzenia, rozmiaru cząsteczek i ich polarności, długości i średnicy wewnętrznej kolumny, programu temperaturowego zastosowanego podczas analizy, ale również w zależności od natężenia przepływu gazu nośnego [91].

4.3. Detektory używane w chromatografii

Jak już wcześniej wspomniano chromatografia jest techniką separacji i do celów detekcji analitów najczęściej łączona jest z odpowiednim detektorem. Poniżej zostaną opisane najczęściej stosowane sprzężenia. Dostępność szerokiego spektrum detektorów umożliwia wykrywanie wszystkich składników rozdzielanej mieszaniny, albo wybranej grupy związków chemicznych z bardzo wysoką selektywnością. Detektory mogą być klasyfikowane, jako ogólne detektory niespecyficzne, w których wszystkie substancje mieszaniny są wykrywane niezależnie od ich tożsamości albo, jako specyficzne detektory, które wykrywają ograniczoną grupę substancji wchodzących w skład mieszaniny – na przykład związki zawierające fluorowce lub azot. Detektory mogą być nieniszczące, dzięki czemu wykrywanie poszczególnych składników mieszaniny nie zmienia ich natury, jak np. w przypadku absorpcji światła w detektorze, więc mogą być gromadzone i wykorzystane do dalszych badań. Z drugiej strony, nawet specyficzne detektory, podczas wykrywania rozdzielonych w kolumnie substancji mogą je niszczyć. Detektory zbudowane są nie tylko z komponentu, który wykrywa poszczególne substancje opuszczające kolumnę po ich rozdzieleniu, ale w skład ich budowy wchodzi także takie elementy, które wykonują wzmocnienie elektroniczne i odczyt końcowy.

4.3.1. Spektrometria mas

Spektrometria mas jest techniką analityczną, która służy zarówno do identyfikacji jakościowej i oznaczenia ilościowego określonych związków w mieszaninie jak i do badania lub potwierdzania struktury związków organicznych. Umożliwia wykrycie substancji nawet na poziomie femtogramów. Wykorzystywana jest w wielu dziedzinach, do których można zaliczyć: naukę o żywności i żywieniu [92], kryminalistykę [93], przemysł farmaceutyczny [94], perfumeryjny [95], petrochemiczny [96], kontrolę antydopingową [97], a także podczas analizy klinicznej [98] i wielu innych. Podstawowymi zaletami MS, w porównaniu do innych detektorów, są: szybkość analizy, wysoka czułość, możliwość uzyskania informacji o strukturze związków, analiza składu elementarnego, analiza składu izotopowego, jednoznaczna identyfikacja badanej substancji [99].

Każdy spektrometr mas zbudowany jest z trzech podstawowych elementów (rys. 8):

- Źródła jonów, w którym obojętne cząstki zamieniane są na jony,
- Analizatora, odpowiedzialnego za rozdzielanie jonów o różnych stosunkach masy do ładunku,
- Detektora, zliczającego liczby jonów o poszczególnych wartościach m/z .



Rys. 8. Schemat budowy spektrometru mas

Pierwszym etapem analizy za pomocą MS jest przeprowadzenie analitów w jony, które następnie transportowane są do analizatora mas. Jony rozdzielane są tam zgodnie z ich stosunkiem masy do ładunku i wykrywane proporcjonalnie do ich intensywności w detektorze. Wynik przedstawiany jest w postaci wykresu słupkowego, gdzie dla każdej wartości m/z przypisana jest intensywność sygnału, najczęściej jest to intensywność względna w odniesieniu do jonu o największej wartości sygnału. W widmie czystego związku jon molekularny, jeśli jest obecny i nie występuje w formie jonu wielokrotnie naładowanego, pojawia się najczęściej przy najwyższej wartości m/z i pozwala wyznaczyć masę cząsteczkową związku.

Podsumowując omówione zagadnienie należy stwierdzić, że spektrometr przeprowadza analizy w jony, oddziela je zgodnie z ich specyficznym stosunkiem masy do ładunku (m/z), a następnie rejestruje ich intensywność. W przypadku spektrometrii mas należy pamiętać o tym, że każdy związek będzie w różny sposób ulegał jonizacji, w konsekwencji czego sygnał uzyskany dla dwóch różnych związków o tych samych stężeniach nie musi być jednakowy.

4.3.1.1. Źródła jonów w GC – metody jonizacji

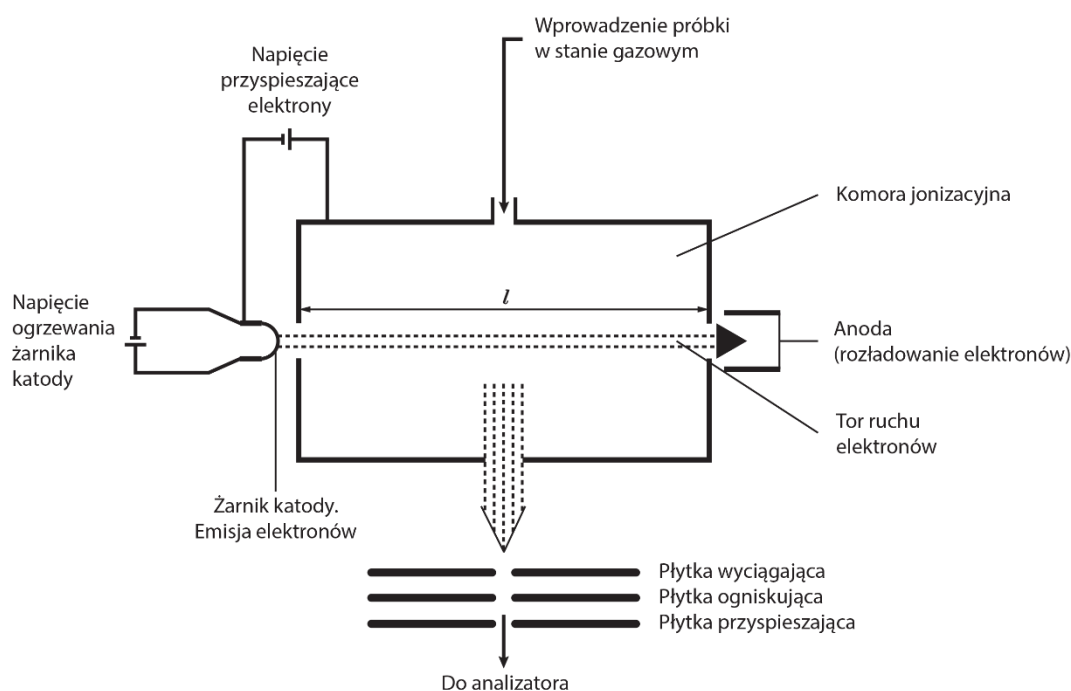
W spektrometrii mas sprzężonej z chromatografią gazową stosuje się dwa główne rodzaje jonizacji. Pierwsza z nich to **jonizacja strumieniem elektronów** (*Electron Ionisation* -EI). Odbywa się ona w próżni i zwykle powoduje fragmentację badanych cząsteczek. EI charakteryzuje się stosunkowo małą wydajnością – poniżej 0,1% cząsteczek ulega jonizacji [100]. Na widmie obserwuje się jony fragmentacyjne, charakterystyczne dla określonej struktury cząsteczki. W niektórych przypadkach występuje również jon cząsteczkowy M^+ .

Głównym ograniczeniem tej techniki jest konieczność odparowania próbki. Nie nadaje się ona do analizy związków nietrwałych termicznie i o dużych masach cząsteczkowych.

Typowe źródło EI generuje strumień elektronów o energii 70 eV, które w próżni oddziałują z cząsteczkami analitu. Elektrony są wytwarzane w rezystancyjnie ograniczonym żarniku (najczęściej wolframowym). Bliskie przejście wysokoenergetycznych elektronów do neutralnej cząsteczki analitu powoduje duże fluktuacje w lokalnym polu elektrycznym, co indukuje jonizację poprzez usunięcie pojedynczego elektronu z najwyższego zajętego orbitalu molekularnego atomu w cząsteczce, tworząc kation rodnikowy zgodnie z ogólnym schematem:



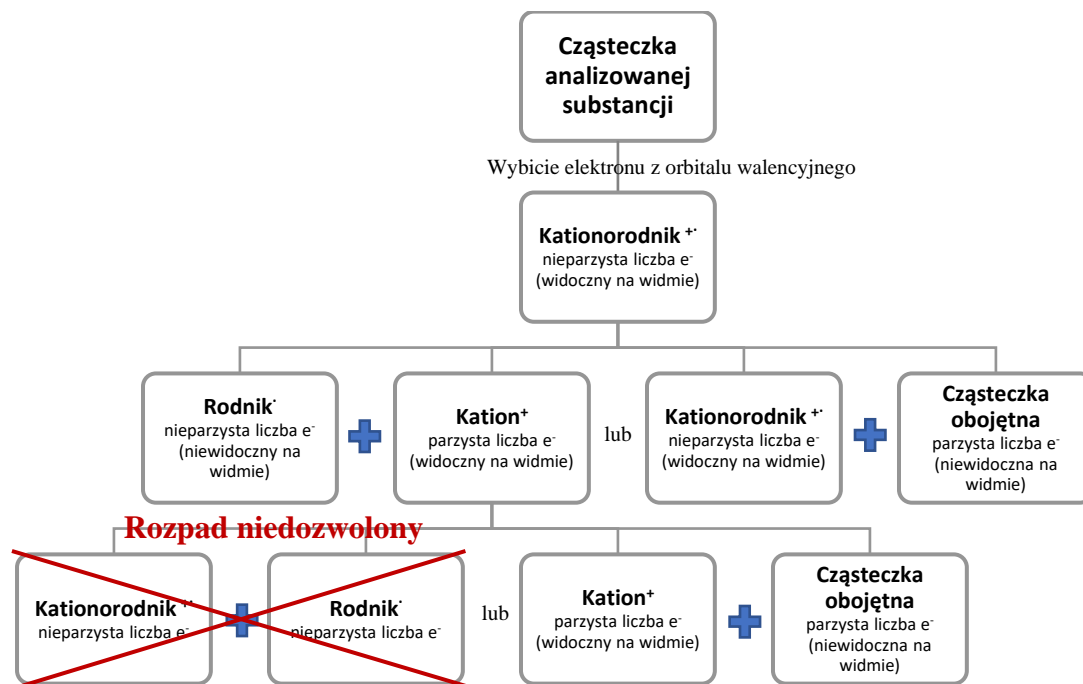
Kationy utworzone w źródle jonów mogą być następnie wyrzucane elektrostatycznie ze źródła jonizacji przy użyciu napięcia odpychania przyłożonego do tylnego elementu źródła (repeler). Jony analitu są następnie kolimowane, skupione i przyspieszane przez szereg soczewek elektrostatycznych, po czym trafiają do analizatora mas (rys. 9) [101].



Rys. 9. Schemat źródła jonizacji EI [125].

Ścieżki fragmentacji i przegrupowania są dobrze opisane i możliwe do przewidzenia zgodnie z podstawowymi zasadami, ponieważ zrywanie wiązań nie jest procesem przypadkowym. W wyniku fragmentacji pękają wiązania o najniższej energii. Jednocześnie stabilność powstałych rodników, kationów i kationorodników ma znaczący wpływ na to, które fragmenty cząsteczki będą widoczne na widmie i jaka będzie ich intensywność. „Reguła parzystego

elektronu” przedstawiona na rysunku 10 [99], może zostać wykorzystana do przewidywania jakie fragmenty mogą powstać w wyniku jonizacji EI.



Rys. 10. Schemat przedstawiający możliwe fragmentacje podczas jonizacji EI.

Stosunek masy do ładunku i intensywność jonów powstałych wskutek fragmentacji analitów działają jak „odcisk palca”, który można wykorzystać do identyfikacji porównując go z tysiącami wpisów bibliotecznych uzyskanych w podobnych warunkach operacyjnych. Jonizacja za pomocą elektronów jest najbardziej popularną metodą jonizacji stosowaną w sprzężeniu z chromatografem gazowym. EI jest znana, jako technika „twardej jonizacji”, ze względu na stopień indukowanej fragmentacji. Możliwe jest zmniejszenie energii jonizacji elektronów, aby zmniejszyć stopień fragmentacji, wtenczas jednak czułość techniki znacznie się zmniejsza.

Jonizacja chemiczna (*Chemical Ionization - CI*) polega na jonizacji gazu reakcyjnego, w wyniku czego powstają jony, które następnie jako indywidua pośrednie jonizują cząsteczki związków będących przedmiotem analizy [102]. Typowe gazy powszechnie stosowane podczas jonizacji chemicznej to: amoniak, metan i izobutan [103-104]. Liczba cząsteczek gazu reakcyjnego jest znacznie większa niż cząsteczek analitów. W tabeli 5 przedstawiono poszczególne etapy jonizacji - od jonizacji gazu reakcyjnego, aż po jonizację analitu.

Tabela 5. Najczęściej używane gazy reakcyjne w jonizacji CI, powstające jony pierwotne i wtórne oraz typy reakcji z analitem.

	Powstawanie jonów pierwotnych	Powstawanie jonów wtórnych	Reakcja z analitem
CH_4	$CH_4 + e^- \rightarrow CH_4^{+\bullet} + 2e^-$	$CH_4^{+\bullet} + CH_4 \rightarrow CH_5^+ + CH_3^{\bullet}$ $CH_3^{\bullet} + CH_4 \rightarrow C_2H_5^+ + H_2$	$CH_5^+ + M \rightarrow [M + H]^+ + CH_4$ $C_2H_5^+ + M \rightarrow [M - H]^+ + C_2H_6$ $C_2H_5^+ + M \rightarrow [M + C_2H_5]^+$
NH_3	$NH_3 + e^- \rightarrow NH_3^{+\bullet} + 2e^-$	$NH_3^{+\bullet} + NH_3 \rightarrow NH_4^+ + NH_2^{\bullet}$	$NH_4^+ + M \rightarrow [M + H]^+ + NH_3$
C_4H_{10}	$C_4H_{10} + e^- \rightarrow C_4H_{10}^{+\bullet} + 2e^-$	$C_4H_{10}^{+\bullet} + C_4H_{10} \rightarrow C_4H_9^+ + C_4H_{10} + H_2$	$C_4H_9^+ + M \rightarrow [M + H]^+ + C_4H_8$ $C_4H_9^+ + M \rightarrow [M + C_4H_9]^+$

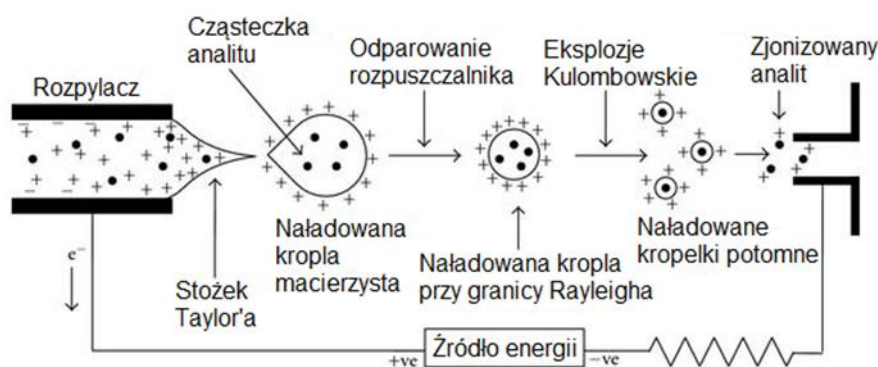
W wyniku jonizacji CI pierwotna masa cząsteczkowa związku pozostaje najczęściej nienaruszona [102]. W otrzymanym widmie obserwuje się jon (lub jony) o masie związanej w określony sposób z masą cząsteczkową badanego analitu (najczęściej M+1 jako rezultat addycji jonu H^+ do cząsteczki analitu). Ze względu na to, iż powstałe jony mają mniejszą energię, CI jest uważana za jonizację „miękką”. W przeciwieństwie do EI, jonizacja CI może wytwarzać jony, które są dodatnie lub ujemne.

4.3.1.2. Źródła jonów w LC – metody jonizacji

W spektrometrii mas sprzężonej z chromatografią cieczową w odróżnieniu od GC-MS jonizację analitów prowadzi się pod ciśnieniem atmosferycznym. Związki są najpierw jonizowane, a następnie mechanicznie i elektrostatycznie oddzielane od obojętnych cząsteczek i wprowadzane do analizatora mas. Wyróżnić można pięć najpopularniejszych źródeł jonizacji: jonizację przez elektrorozpylanie (*Electrospray ionisation* - ESI), jonizację chemiczną pod ciśnieniem atmosferycznym (*Atmospheric pressure chemical ionization* – APCI), fotojonizacja pod ciśnieniem atmosferycznym (*Atmospheric pressure photoionization* – APPI), laserowa desorpcja i jonizacja wspomagana matrycą (*Matrix assisted laser desorption/ionization* – MALDI) oraz wzbudzenie w plazmie sprzężonej indukcyjnie (*Inductively coupled plasma* – ICP).

Jonizacja ESI została wynaleziona i opatentowana przez profesora Fenna z uniwersytetu Yale. W roku 2002 profesor za swoje wybitne osiągnięcie otrzymał nagrodę Nobla w dziedzinie chemii. Jonizacja ta polega na wygenerowaniu jonów analitu w roztworze, zanim dotrą one do spektrometru mas (rys.11). Punktem wyjścia procesu jonizacji jest dyspersja eluentu na bazie elektrorozpylania. Wylot kapilary otoczony jest strumieniem gazu,

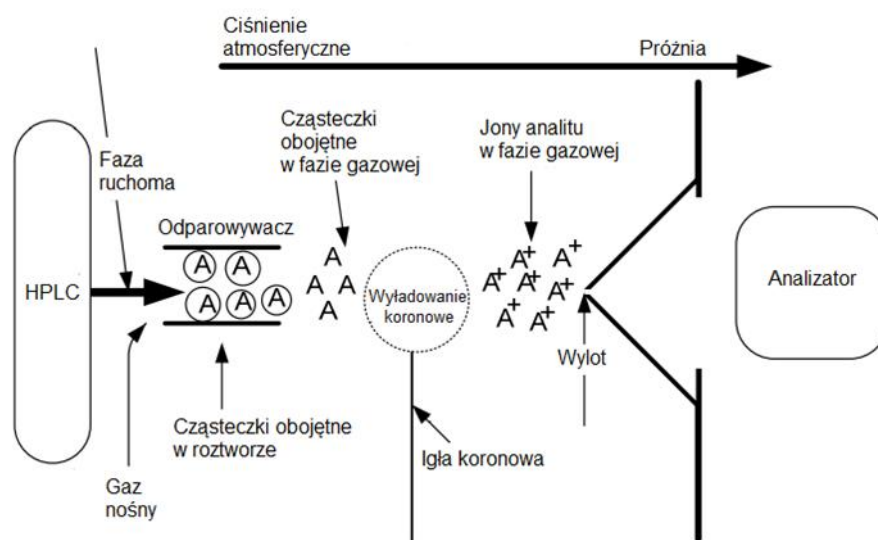
najczęściej N_2 , który ma za zadanie stabilizować strumień jonów oraz wspomagać proces osuszania kropelek rozpuszczalnika. Dzięki zastosowaniu różnicy potencjałów (zwykle w zakresie od 2,5 do 5 kV) ciecz wychodząca z kapilary wydłuża się do kształtu eliptycznego. Kształt ten formuje się na zasadzie równowagi między dwiema dominującymi siłami dla każdego punktu jego powierzchni. Siła pochodząca od napięcia powierzchniowego próbuje wciągnąć ciecz z powrotem do kapilary, aby zminimalizować niekorzystne energetycznie pole powierzchni. Z kolei oddziaływanie kulombowskie przyciąga ciecz do przeciwelektrody. Przy pewnym napięciu powierzchnia cieczy nagle zmienia swój kształt i staje się spiczastym stożkiem Taylora. Z samego końca stożka emitowany jest strumień kropelek aerozolu o tej samej polaryzacji, co ładunek na igle. Gdy zachodzi odparowywanie rozpuszczalnika, powstałe krople kurczą się, aż osiągną punkt, w którym napięcie powierzchniowe nie może dłużej wytrzymać ładunku (granica Rayleigha). W momencie przekroczenia granicy dochodzi do „eksplozji kulombowskiej” i kropla zostaje rozerwana na drobniejsze kropelki. Powoduje to wytwarzanie coraz mniejszych kropelek, które mogą powtarzać proces, aż do momentu ostatecznego osuszenia z uwolnieniem tzw. „suchych jonów”. Te naładowane cząsteczki analitu mogą być naładowane pojedynczo lub wielokrotnie. Jest to bardzo miękka metoda jonizacji, ponieważ bardzo mało energii zatrzymywane jest przez analit po jonizacji [105].



Rys. 11. Schematyczne przedstawienie procesu jonizacji przez elektrorozpraszanie [95].

Gorąca kapilara na końcu układu ESI oprócz podstawowego zadania, jakim jest osuszanie analitu, stanowi połączenie między strefą ciśnienia atmosferycznego zewnętrznej części źródła jonów, a wysoką próżnią wewnątrz analizatora. Dzięki różnicy potencjałów oraz dużej różnicy ciśnień po obu stronach kapilary, strumień jonów jest przyspieszany i kierowany dalej do spektrometru.

Jonizacja APCI jest alternatywną techniką „miękkiej” jonizacji, która została zaprojektowana w celu skompensowania ograniczenia czułości źródła EI. Dzięki zastosowaniu tej techniki można uzyskać minimalną fragmentację jonu molekularnego, co skutkuje wyższą intensywnością sygnału [106-107]. Schemat działania źródła przedstawiono na rysunku 12. W APCI eluent napływający z LC jest rozpylany przez ogrzewany odparowalnik pod ciśnieniem atmosferycznym. Pod wpływem ciepła ciecz odparowuje ulegając przemianom w gaz. Cząsteczki rozpuszczalnika przeniesione do fazy gazowej są tam jonizowane przez elektrony uwalniane z igły koronowej. Powstałe w ten sposób jony rozpuszczalnika następnie przenoszą ładunek do cząsteczek analitu poprzez reakcje chemiczne (jonizacja chemiczna). Jony analitu przechodzą przez kapilarny otwór do analizatora masy [108]. APCI ma zastosowanie do związków o dużym zróżnicowaniu ich polarności i z tego względu może być stosowany zarówno do cząsteczek polarnych, jak i niepolarnych. Ten rodzaj jonizacji rzadko powoduje powstanie cząstek z wielokrotnymi ładunkami, więc jest zwykle stosowany do cząsteczek o masie poniżej 1500 u. Z tego powodu i ze względu na wysokie temperatury, APCI jest mniej odpowiedni niż ESI do analizy dużych cząsteczek (np. białek), które mogą być niestabilne termicznie. APCI stosuje się w chromatografii z normalnym układem faz częściej niż w przypadku ESI, ponieważ anality są zwykle niepolarne [109].

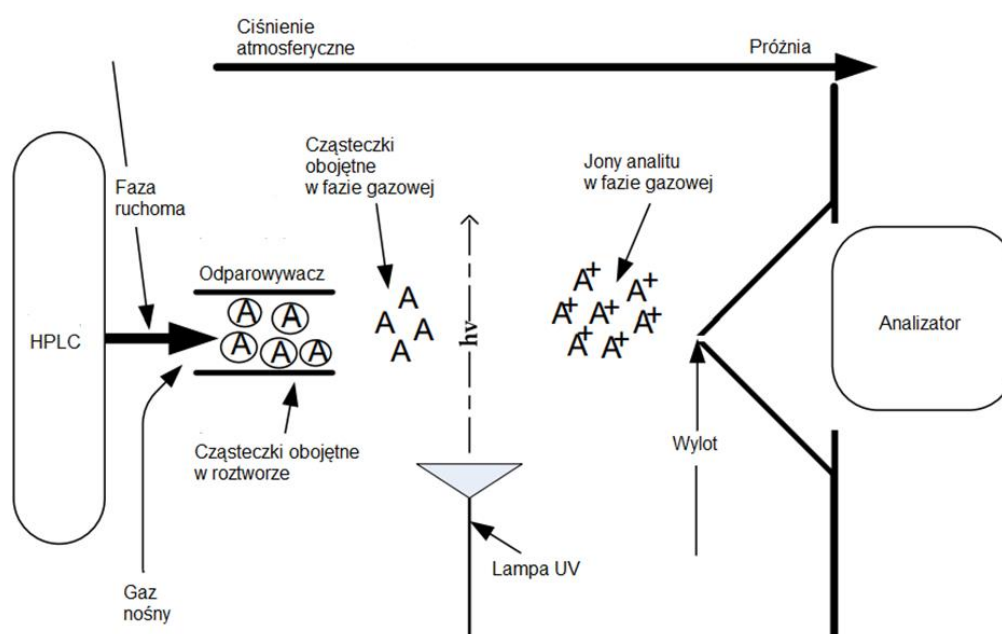


Rys. 12. Schemat źródła APCI [108].

Jonizacja APCI posiada wiele zalet. Pierwszą z nich jest duża różnorodność związków, które można skutecznie zjonizować. To duże zróżnicowanie związków chemicznych dotyczy ich masy cząsteczkowej i polarności. Inną zaletą APCI jest miękkość jonizacji, pozwalająca na zjonizowanie większości związków jako jonów molekularnych, adduktów protonowych i/lub adduktów amonowych. Miękka jonizacja, w połączeniu z analizatorem mas o wysokiej

rozdzielczości, pozwala na wyznaczenie wzoru strukturalnego każdego związku rozdzielonego na kolumnie chromatograficznej [110-111].

Jonizacja APPI w połączeniu z chromatografią ciekłą jest stosunkowo nową techniką. Podobnie jak w APCI, odparowalnik przekształca eluent LC w fazę gazową, a następnie jest ona jonizowana eliminując potencjalne problemy wynikające z jonizacji w fazie rozpuszczalnikowej. Lampa wyładowcza wytwarza fotony w wąskim zakresie energii jonizacji. Zazwyczaj jest to kryptonowa lampa wyładowcza wysyłająca promieniowanie 10 eV. Zakres energii jest starannie dobierany tak, aby jonizować jak najwięcej cząsteczek analitu, przy jednoczesnej minimalizacji jonizacji cząsteczek rozpuszczalnika [112]. Na rysunku 13 przedstawiony został schemat źródła APPI.



Rys. 13. Schemat źródła APPI [108].

APPI to technika, która ma zdolność jonizowania związków o szerokim zakresie polaryzacji, a jednocześnie jest wyjątkowo tolerancyjna na składniki matrycy dodatków do HPLC. Wykazuje szczególne zastosowanie do analizy wysoce niepolarnych związków. Ponadto umożliwia wykorzystanie małych prędkości przepływu ($<100 \mu\text{L}/\text{min}$) w chromatografii ciekłej, podczas gdy czułość APCI ulega czasami znacznemu zmniejszeniu przy tak małych natężeniach przepływu [113].

Jonizacja za pomocą ICP jest kolejnym rodzajem jonizacji występującym w spektrometrach mas sprzężonych z LC. Metoda ta pozwala na czułą ilościowo i jakościowo analizę jonów metali o bardzo dużym liniowym zakresie dynamicznym, sięgającym nawet

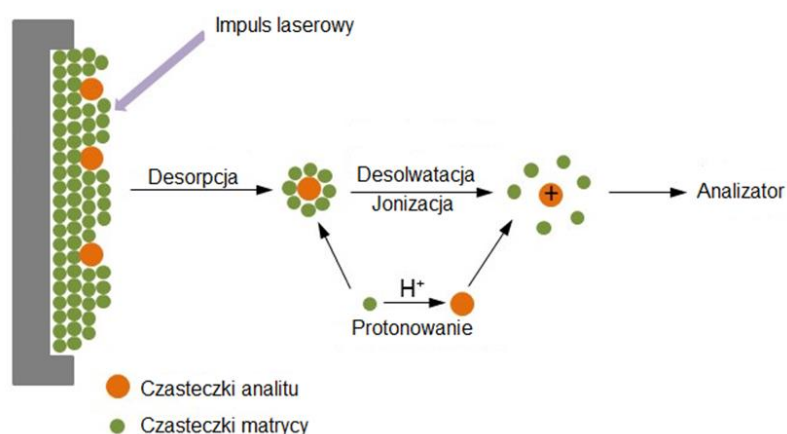
9 rzędów wielkości [114]. Jonizacja ta pozwala na analizę niemal wszystkich pierwiastków układu okresowego i może być stosowana zarówno do roztworów, jak i ciał stałych oraz gazów. W przypadku połączenia z LC próbkę odparowuje się za pomocą rozpylacza, a następnie wprowadzana do plazmy argonowej składającej się z elektronów i dodatnio naładowanych jonów argonu. W plazmie cząsteczki analizowanych związków rozpadają się na pojedyncze atomy, które z kolei tracą elektrony i stają się dodatnio naładowanymi jonami (aniony nie są wykrywane przez ICP-MS).

Najważniejszymi dziedzinami nauki w których stosuje się ICP-MS są: biochemia, geologia, medycyna, farmacja, kontrola jakości produktów żywnościowych [115-116], analiza zanieczyszczeń środowiska [117] i kryminalistyka [118-119], a w szczególności toksykologia [120-121].

MALDI jest ostatnim z omawianych źródeł jonizacji. Jest to technika wykorzystująca stałą matrycę, która pochłania energię promieniowania i wspomaga jonizację dużych cząsteczek, takich jak sfunkcjonalizowane nanocząstki (DNA, białka, peptydy, cukry) [122-123] i polimery [124], przy minimalnej ich fragmentacji. Jonizacja MALDI składa się z trzech podstawowych etapów (rys.15):

a) Tworzenie „stałego roztworu”

Istotne jest to, aby cząsteczki matrycy były w nadmiarze w stosunku do liczby badanych makromolekuł, prowadząc do całkowitego odizolowania poszczególnych cząsteczek analitu. Utworzenie jednorodnego „roztworu stałego” jest podstawą do uzyskania stabilnej desorpcji analitu.



Rys. 14. Jonizacja analitu za pomocą MALDI [125].

b) Wzbudzenie matrycy

Wiązka lasera (najczęściej lasera impulsowego) jest skupiana na powierzchni roztworu stałego. Cząsteczki matrycy absorbują promieniowanie lasera, co wywołuje szybkie wzbudzenie drgań, powodując miejscowy rozpad roztworu stałego. Klastry wyrzucane z powierzchni składają się z cząsteczek analitu otoczonych cząsteczkami matrycy i jonami soli. Cząsteczki matrycy odparowują z dala od skupisk, pozostawiając wolny analit w fazie gazowej.

c) Jonizacja analitu

Foto-wzbudzone cząsteczki matrycy ulegają stabilizacji (relaksacji) poprzez przekazanie protonów do makromolekuł analitu. Podczas tego procesu następuje również przyłączenie kationów metali alkalicznych do makromolekuł analitu. W ten sposób powstają charakterystyczne jony analityczne $[M + X]$, gdzie ($X = H, Na, K$ i inne). Reakcje jonizacji zachodzą w zdesorbowanej chmurze zbudowanej z pewnej liczby cząsteczek matrycy i makromolekuły analitu tuż nad powierzchnią matrycy. Powstałe w ten sposób jony makrocząsteczek następnie są przyspieszane i kierowane do analizatora mas.

Aby osiągnąć skuteczną jonizację próbki, wybrana matryca musi mieć znaczny współczynnik absorpcji przy długości fali odpowiadającej długości fali wysyłanej przez laser zastosowany w źródle jonizacji. Matryca początkowo działa, jako separator analitu, ponieważ zmniejsza siły międzycząsteczkowe przez zjawisko zwane izolacją matrycy [126]. W związku z tym zapobiega tworzeniu się skupisk cząsteczek analitu.

4.3.1.3. Analizatory mas – metody rozdziału jonów

Analizator masy nazywany jest również separatorem jonów. Ten element spektrometru jest jego sercem. Po przejściu jonów z źródła do analizatora następuje ich rozdział w oparciu o wartości stosunku masy do ładunku. Analizator masy powinien się charakteryzować możliwie jak największą rozdzielczością oraz dużym współczynnikiem transmisji jonów. Istnieje kilka typów analizatorów mas, do których możemy zaliczyć: analizator magnetyczny i magneto-elektrostatyczny, analizator kwadrupolowy (*Quadrupole* - Q), analizator czasu przelotu (*Time of Flight* - TOF), pułapka jonowa (*Ion Trap* - IT) oraz analizatory hybrydowe, czyli mieszane, składające się z połączonych kombinacji poszczególnych pojedynczych analizatorów.

W **analizatorze mas z sektorem magnetycznym** cząsteczki obdarzone ładunkiem po opuszczeniu źródła jonów zostają przyspieszone przez pole elektryczne o potencjale od 2000 do 8000 V. Pod wpływem siły Lorentza w polu magnetycznym generowanym przez

elektromagnes dochodzi do zakrzywienia toru ruchu jonów. Jony o jednakowym pędzie i ładunku, przy określonej wartości indukcji magnetycznej, będą poruszać się po krzywiźnie o tym samym promieniu. Pęd jonu o określonym ładunku powiązany jest z jego masą, dzięki czemu ostatecznie możliwe jest wyznaczenie wartości m/z dla analizowanej cząsteczki. Lżejsze jony mają większe zagięcie niż cięższe. Wielkość zagięcia zależy również od liczby ładunków danego jonu. Te jony, których tor lotu nie będzie odpowiadał krzywiźnie wnętrza analizatora, zderzą się z dowolną stroną ściany rury przelotowej lub nie przejdą przez szczelinę do detektora. Korzystając tylko z sektora magnetycznego, można uzyskać rozdzielczość rzędu tylko kilkuset jednostek. Wynika to głównie z ograniczeń związanych z różnicami prędkości jonów. Aby to poprawić, można dodatkowo umieścić sektor elektryczny przed lub za sektorem magnetycznym w instrumentach z podwójnym ogniskowaniem. W odróżnieniu od poprzedniego rozwiązania, sektor elektrostatyczny rozdziela jony w zależności od ich energii kinetycznej, niezależnie od wartości m/z . Oba te sektory łączy się w celu kompensacji rozrzutu energii kinetycznej jonów o tych samych m/z , podwyższając w ten sposób rozdzielczość pomiarów. Dwuogniskowe analizatory mas były standardem w spektroskopii mas od wielu dziesięcioleci [127].

Analizator kwadrupolowy zbudowany jest z czterech równoległych metalowych prętów, a każda przeciwna para jest ze sobą połączona. Do jednej pary prętów przyłożone jest napięcie o częstotliwości radiowej (*Radio frequency* – RF), a do drugiej napięcie stałe (*Direct current* – DC). W danej kombinacji DC i RF tylko jony o określonym stosunku m/z charakteryzują się stabilną trajektorią lotu i mogą dotrzeć do detektora, podczas gdy inne jony o niestabilnych trajektoriach lotu nie docierają do celu, ponieważ amplituda ich oscylacji staje się nieskończona. Para dodatnio naładowanych prętów w analizatorze kwadrupolowym działa, jako filtr wyższych mas, gdyż umożliwia im przejście przez analizator, „wpychając” je między pręty. Natomiast jony o masach mniejszych od zadanego jonu nie są przepuszczane, gdyż pod wpływem sumarycznego działania stałego i zmiennego potencjału rozładowują się na prętach. W przypadku pary prętów naładowanych ujemnie, działają one, jako filtr niższych mas, ponieważ jony te reagują na zmienne pole elektryczne. Pole utrzymuje jony między prętami, natomiast jony cięższe ulegają rozładowaniu na prętach w wyniku działania na nie ujemnego potencjału. Zmieniając w czasie DC i RF, zwykle w ustalonym stosunku, jony o różnych wartościach m/z mogą być przesyłane do detektora jeden po drugim [128].

Spektrometry mas posiadające analizator zbudowany z pojedynczego kwadrupola mogą monitorować tylko jony powstające w źródle jonów. Opierając się na tym ograniczeniu,

pojedyncze kwadrupolowe spektrometry mas nie zapewniają odpowiednio obszernego zbioru informacji strukturalnych, a także ich uzyskiwana selektywność jest ograniczona w porównaniu z tandemowymi kwadrupolowymi spektrometrami mas.

Gdy stosuje się **dwa kwadrupole** połączone całą kolizyjną, uzyskuje się **tandemowy spektrometr mas**, który jest w stanie zarówno filtrować, jak i fragmentować strumień jonów. W większości przypadków element pierwszy (Q1) i trzeci (Q2) to kwadrupole, które działają jako filtr mas, podczas gdy element łączący fragmentuje jony przepuszczane przez pierwszy kwadrupol, powodując ich zderzenie z cząsteczkami gazu obojętnego (Ar, He, N₂) o określonej energii. Tandemowy spektrometr mas może zbierać dane w różnych trybach, do których należy zaliczyć:

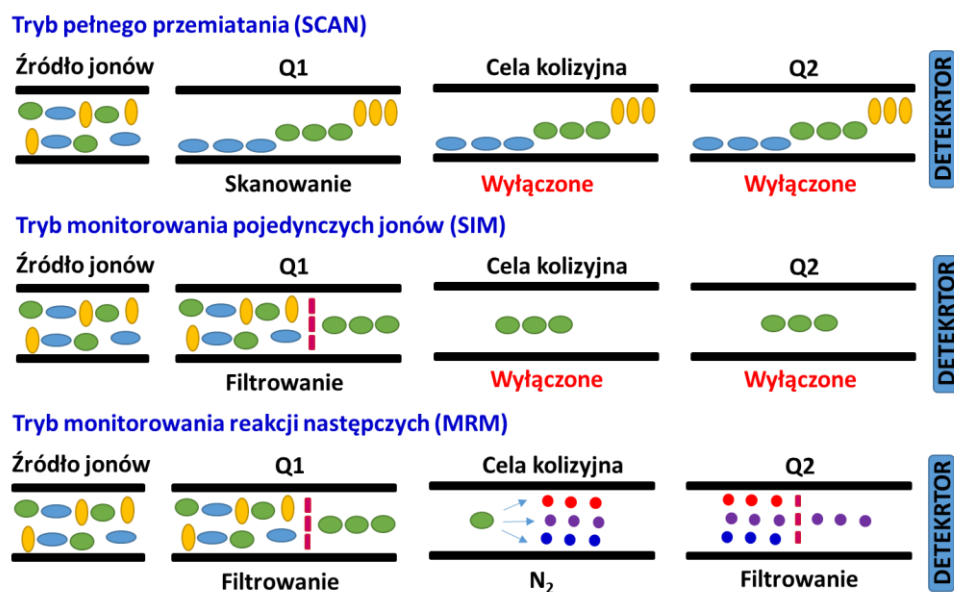
a) Tryby wspólne z pojedynczym spektrometrem mas:

- Tryb pełnego skanowania (SCAN) - zapewnia jakościowy obraz składu próbki. To tryb pracy pojedynczego analizatora kwadrupolowego (rys. 15), który polega na skanowaniu mas jonów z zakresu od najmniejszej do najwyższej oczekiwanej dla powstających fragmentów. Zakres powinien być tak dobrany aby wyeliminować jak najwięcej zakłóceń z matrycy próbki i gazów atmosferycznych, nie tracąc przy tym sygnału pochodzącego od analitów. Zbyt niskie ustawienia mas mogą powodować zakłócenia spowodowane obecnością azotu ($m/z = 28$) lub dwutlenku węgla ($m/z = 44$). W przypadku wybrania bardzo dużego zakresu mas czułość analizy spada, ponieważ możliwe jest wykonanie mniejszej ilości skanów na sekundę.
- Monitorowanie wybranych jonów (*Selected ion monitoring* - SIM) - jest techniką szeroko stosowaną do analizy śladów. W tej technice również stosowany jest pojedynczy analizator kwadrupolowy, jednakże zamiast skanowania we wcześniej określonym zakresie mas i rejestrowania pełnych widm masowych, ustawia się monitorowanie intensywności określonych wartości m/z (rys. 15). Tryb SIM służy do wprowadzenia selektywności do analizy i poprawy czułości. Czułość jest zwiększona w porównaniu z analizą pełnego skanowania, ponieważ w trybie SCAN duża część czasu skanowania spędzana jest na rejestrowaniu obszarów widma, w których nie występują jony będące przedmiotem zainteresowania. W trybie SIM skanowane jest jeden, bądź kilka wybranych jonów. Zatem analizator mas przesyła te jony przez dłuższy procent czasu, w którym są wytwarzane, a zatem rejestruje się więcej jonów o zadanych wartościach m/z .

b) Tryby wyłącznie przy zastosowaniu tandemowego spektrometru mas:

- Monitorowanie reakcji następczych (*Multiple reaction monitoring* – MRM) - to tryb charakteryzujący się dużą selektywnością, w którym przez Q1 przepuszczany jest tylko jon o zadanym stosunku m/z – jon prekursora (rys. 15). Następnie trafia on do komory kolizyjnej, gdzie w wyniku zderzeń z cząsteczkami gazu kolizyjnego ulega fragmentacji na drodze dysocjacji indukowanej zderzeniami (Collision induced dissociation - CID) na mniejsze jony i cząsteczki obojętne. Powstałe jony trafiają do Q2, gdzie dozwolone jest przejście tylko jonu o określonym stosunku m/z (rodzaj jonu jest wybierany przez operatora sprzętu). W trybie MRM oba analizatory mas pracują z maksymalną wydajnością. Nie wszystkie jony badanego analitu docierają do detektora, ponieważ w procesie fragmentacji powstaje zazwyczaj więcej niż jeden fragment jonowy. Ilość docierających jonów do detektora jest mniejsza niż w przypadku obserwacji jonu prekursora (mniejsza bezwzględna intensywność) jednakże, dzięki znacznie większej selektywności, możliwe jest uzyskanie znacznie większej czułości niż za pomocą pojedynczego kwadrupola.
- Monitorowanie jonów fragmentacyjnych pochodzących od wybranego jonu prekursora (*Product Ion Scan* - Pro-IS) - w pierwszym module tandemowego spektrometru mas (Q1) filtrowany jest jon molekularny oznaczanego związku. Wyselekcjonowany jon poddawany jest następnie fragmentacji w CID na skutek zderzeń z cząsteczkami gazu kolizyjnego. W Q3 uzyskiwane jest widmo fragmentacyjne w wyniku skanowania jonów produktów powstałych w komorze kolizyjnej.
- Monitorowanie jonów prekursorowych (*Precursor Ion Scan* - Pre-IS) – w tym trybie pracy analizatora Q3 przepuszcza jedynie jony fragmentacyjne o znanych wartościach m/z , podczas gdy Q1 pracuje w trybie skanowania w zadeklarowanym zakresie mas przepuszczając wszystkie jony prekursorów, które w kolejnym etapie ulegają fragmentacji w CID. Detektor rejestruje sygnał, tylko wtedy gdy jon przepuszczony przez moduł Q1 po sfragmentowaniu daje jon selektywnie przepuszczany przez moduł Q3.
- Monitorowanie utraty cząsteczek obojętnych (*Neutral Loss*) - W tym trybie skanowania oba kwadrupole Q1 i Q3 pracują w trybie skanowania, przepuszczając jony przez Q3 tylko wtedy, gdy różnica w ich wartościach m/z odpowiada masie neutralnej cząsteczki utraconej w wyniku fragmentacji w CID. Jony produktów, które powstały na skutek

utruty innej masy, niż masa wybranej neutralnej cząsteczki np. wody, nie są przepuszczane przez Q3 analizatora.



Rys. 15. Wybrane tryby pracy potrójnego kwadrupolowego analizatora masy [129].

Pary jonów (prekursor – produkt) nazywane są przejściami mas. Gdy pola elektryczne i energia zderzenia są utrzymywane na stałym poziomie, to tylko jony o określonym przejściu mas są w stanie dotrzeć do detektora, w wyniku czego otrzymujemy specyficzną analizę za pomocą tandemowego spektrometru mas. Rozbijając jon na jego fragmenty, analizowany związek chemiczny można zidentyfikować nie tylko na podstawie jego masy, ale także dzięki powstałym jonom produktów [129-130]. Główną zaletą stosowania potrójnego kwadrupola, jako zaawansowanego analizatora mas jest to, że pozwala on przewyciężyć problem złożoności próbki i usunąć szum tła, zwiększając zarówno czułość, selektywność jak i zakres dynamiczny [131].

Analizator czasu przelotu określa stosunek masy do ładunku na podstawie pomiaru czasu lotu jonu. Jony są przyspieszane przez pole elektryczne o znanym potencjale. To przyspieszenie powoduje, że jon ma taką samą energię kinetyczną jak każdy inny jon o tym samym ładunku. Lżejsze jony tego samego ładunku, które poruszają się szybciej, docierają do detektora wcześniej, a następnie kolejne jony ze wzrastającą wartością masy. Na podstawie wyliczonego stosunku m/z i znanych parametrów eksperymentalnych można zidentyfikować jon [132].

Energia potencjalna naładowanej cząstki w polu elektrycznym wynika z ładunku cząstki i siły pola elektrycznego:

$$E_p = q * U \quad 4)$$

gdzie: E_p - energia potencjalna cząstki, q - ładunek cząstki, a U - różnica potencjału elektrycznego (znana również, jako napięcie).

Gdy naładowana cząstka jest przyspieszana przez napięcie U przed wejściem do analizatora czasu przelotu, to jej E_p jest przekształcana w energię kinetyczną (E_k). E_k dowolnej, poruszającej się cząstki z prędkością v o masie m wyraża się wzorem:

$$E_k = \frac{mv^2}{2} \quad 5)$$

Uwzględniając równania (4) i (5) wzór na energię kinetyczną można wyrazić:

$$q * U = \frac{mv^2}{2} \quad 6)$$

Prędkość naładowanej cząstki po początkowym jej przyspieszeniu przed analizatorem czasu przelotu, nie zmieni się w komorze, ponieważ porusza się ona ze stałą prędkością, bez udziału pola elektrycznego. Prędkość cząstki można określić znając długość ścieżki (d) dryftu jonu w analizatorze i czas lotu (t), który zmierzony zostanie za pomocą precyzyjnych mierników czasu, więc:

$$v = \frac{d}{t} \quad 7)$$

Podstawiając v do równania (6) i przekształcając je można wyznaczyć czas przelotu:

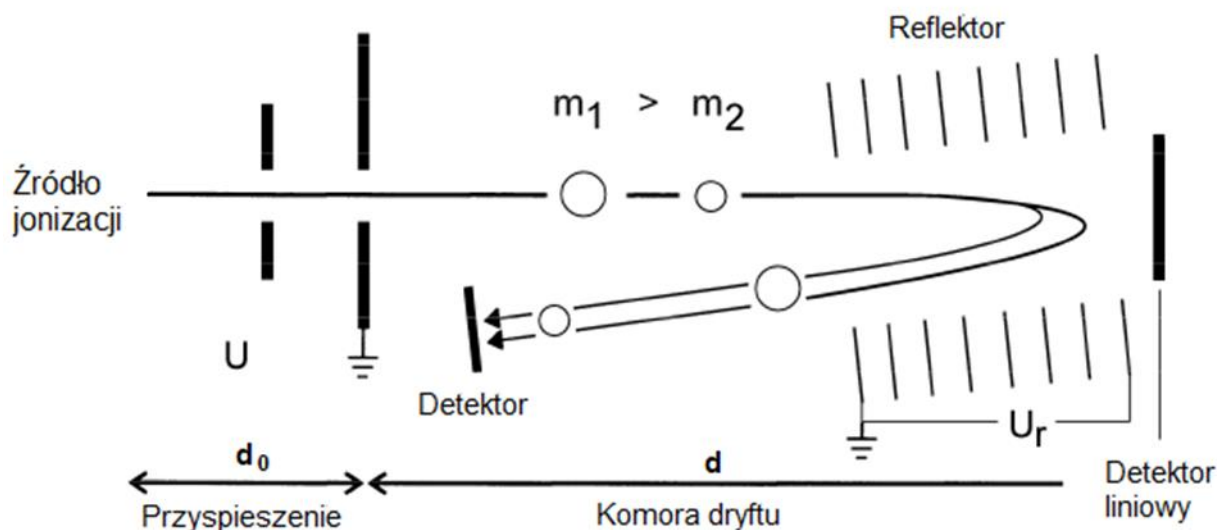
$$qU = \frac{m}{2} \left(\frac{d}{t}\right)^2 \quad 8)$$

$$t^2 = \frac{m}{q} \left(\frac{d^2}{2U}\right) = \frac{m}{z} \left(\frac{ed^2}{2U}\right) \quad 9)$$

Na podstawie równania (9) można więc obliczyć stosunek m/z , zakładając stałą wartość wyrażenia w nawiasie. To samo równanie, po przekształceniu, można wykorzystać do precyzyjnego wyznaczenia masy określonego jonu, w tym jonu molekularnego [100]:

$$\frac{m}{q} = 2U \left(\frac{t}{d}\right)^2 \quad 10)$$

Jeśli komora lotu jest wystarczająco długa, wszystkie jony, gdy dotrą do detektora zostaną ułożone zgodnie z masą – od najmniejszej do największej. Analizatory TOF produkowane są głównie w dwóch typach - przyrządy liniowe i przyrządy wykorzystujące reflektor [132].



Rys. 16. Podstawy pracy analizatora czasu przelotu z zastosowaniem reflektora [126].

Konstrukcja z zastosowaniem reflektora, przedstawiona na rysunku 16, wykorzystuje fakt, że im dłuższy czas dryftu, tym większa odległość między jonami o małej różnicy mas. Większe odległości pozwalają na poprawę rozdzielczości, przy której jony o podobnym m/z mogą być zróżnicowane.

Pułapka jonowa to analizator mas, w którym wykorzystuje się oscylujące pole elektryczne do zatrzymywania jonów. Istnieje kilka typowych pułapek jonowych takich jak: kwadropolowa pułapka jonowa (Quadrupole ion trap - QIT), liniowa pułapka jonowa (Linear ion trap - LIT), spektrometria cyklotronowego rezonansu jonowego z fourierowską transformacją wyników (Fourier transform ion cyclotron resonance – FT-ICR) oraz Orbitrap, czyli analizator mas typu orbitrap z detekcją fourierowską.

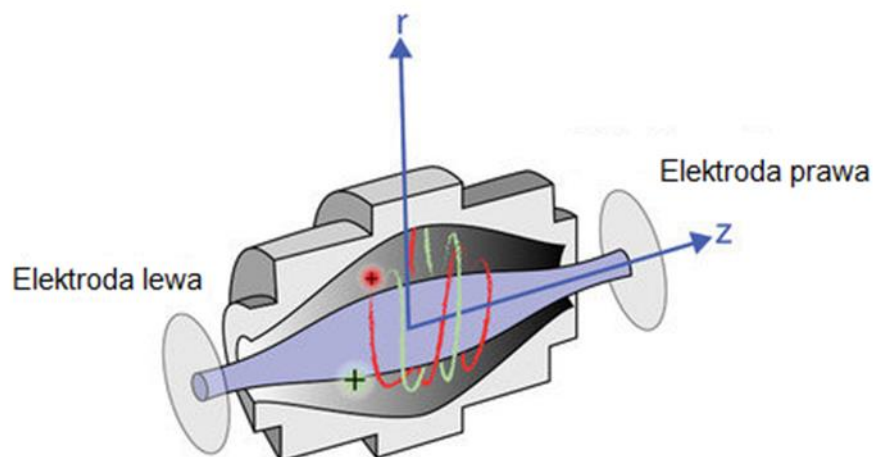
Kwadropolowa pułapka jonowa nazywana jest również pułapką jonową o trzech wymiarach. Spektrometr mas z analizatorem QIT wykorzystuje trzy elektrody do wychwytywania jonów w małej objętości. Składa się z cylindrycznej elektrody pierścieniowej i dwóch elektrod końcowych (zaślepek). Ten analizator wykorzystuje podobne zasady jak wspomniany wcześniej analizator kwadropolowy. Widmo mas uzyskuje się przez zwiększenie potencjału pomiędzy elektrodami. Zmiana ta prowadzi do powstania niestabilnych trajektorii

jonów, które gwałtownie odchylają się w kierunku wychodzącej elektrody, wskutek czego następuje ich wykrywanie w rosnącej kolejności stosunku m/z [133].

LIT jest pułapką jonów kwadrupolowych 2D. Posiada również cztery równoległe pręty jak analizator Q, ale działa jak QIT z selektywnym wyrzutem masy. Cztery równoległe pręty można podzielić na trzy części osiowe – środkową, trzy razy dłuższą niż dwie końcowe. Uwięzienie w płaszczyźnie xy osiąga się przez zastosowanie potencjału RF na elektrodach x i y . W przypadku płaszczyzny yz uzyskuje się przez zastosowanie trzech różnych wartości DC do trzech sekcji prętów. Elektroda X w środkowym segmencie ma szczelinę, umożliwiającą wyrzucanie jonów po przyłożeniu napięcia do elektrody x . Gdy potencjały RF na elektrodach x i y rosną, jony o wzrastającej masie stają się kolejno niestabilne w kierunku promieniowym, a tym samym wyrzucane są przez szczeliny na elektrodzie [134-135].

Podsumowując powyższe - zarówno QIT, jak i LIT używają kwadrupolowego pola do manipulowania ruchem jonów. W QIT jony o stabilnych trajektoriach dotrą do detektora, z kolei w LIT, jony są najpierw przechowywane lub uwięzione w przestrzeni, a ich ruchy (stabilne lub nie) są następnie zmieniane w czasie.

Zasada działania analizatora FT-ICR i Orbitrap opiera się na pomiarach zmian częstotliwości okrążeń jonów po okręgu, a nie na ugięciu trajektorii lotu jonów (sektory elektryczne/magnetyczne), ich stabilności (Q i IT), jak i pomiarze czasu przelotu (TOF). W analizatorze FT-ICR jony wpadające do analizatora zostają „złapane w pułpkę” na torze kołowym w polu magnetycznym. Jony wzbudzone przez pole elektryczne o częstotliwości radiowej (RF) generują zależny od czasu prąd. Jest on przekształcany przez transformację Fouriera w częstotliwości orbitalne jonów, które odpowiadają ich stosunkom masy do ładunku. Mają także szeroki zakres mas i doskonałą rozdzielczość (obecnie do 350 000 przy stosunku masy do ładunku 524 Th). Jednakże, są to jedne z najdroższych analizatorów mas [136-137]. Jeżeli chodzi o analizator Orbitrap, w przeciwieństwie do konwencjonalnych pułapek jonowych, które do wyłapywania jonów wykorzystują pole elektryczne o częstotliwości radiowej, poruszające się jony w Orbitrapie przechowywane są na orbicie wokół elektrody o kształcie wrzeciona przez pole elektrostatyczne (rys.17).



Rys. 17. Schemat analizatora typu Orpitrapp [138].

Elektroda ogranicza jony, które krążą wokół centralnej części i oscylują tam i z powrotem wzdłuż długiej osi elektrody. Podobnie jak w przypadku ICR, transformacja Fouriera jest wykorzystywana do uzyskania częstotliwości oscylacji dla jonów różniących się stosunkiem m/z . Analiza z wykorzystaniem Orbitrapa pozwala na uzyskanie wysokiej rozdzielczości, dokładności oraz dużego zakresu mas [139-140]. Zarówno analizator ICR, jak i Orpitrapp, są specjalnym przypadkiem analizatorów mas. Pozwalają one na rozdział jonów i bezpośredni pomiar ich mas, bez zastosowania ostatniego elementu spektrometru, którym jest detektor.

Analizatory mas omówione we wcześniejszej części niniejszego rozdziału mają różne właściwości, które czynią je bardziej lub mniej odpowiednimi do niektórych zastosowań. Hybrydowe przyrządy MS składają się z dwóch szeregowo połączonych analizatorów, rozdzielonych za pomocą komory jonizującej. W większości hybrydowych instrumentów MS procesy selekcji jonu prekursora, fragmentacji i analizy jonów produktów odbywają się kolejno w przestrzeni. Różne kombinacje analizatorów masy mają również różne cechy, które czynią je bardziej lub mniej odpowiednimi do odpowiednich zastosowań. Możliwe jest łączenie większości typów analizatorów w niemal każdej sekwencji. MS/MS stała się preferowaną techniką analizy dla wielu związków chemicznych. Czynnikiem, z powodu którego do tego doszło jest to, iż MS/MS pozwala na selekcję i jednoczesną izolację określonych związków będących przedmiotem zainteresowania, a następnie na ich późniejszą identyfikację. Po drugie, większa selektywność, którą można uzyskać po zastosowaniu tego typu analizatora, umożliwia wykorzystanie tej technologii do oznaczenia związków docelowych, nawet w obecności złożonych matryc.

4.3.1.4. Detektory w spektroskopii mas – systemy zliczania jonów

System zbierania jonów jest miarą względnej intensywności fragmentów jonów każdej masy. Detektor powinien charakteryzować się wysokim wzmocnieniem, szybką odpowiedzią czasową, niskim poziomem szumów, wysoką wydajnością, niskim kosztem, wąskim rozkładem odpowiedzi, dużym zakresem dynamicznym i długoterminową stabilnością. Dostępnych jest kilka typów detektorów do spektrometrów mas. Najczęściej detektory te to powielacz elektronów lub płytki mikrokanalikowe, które emitują kaskadę elektronów, gdy jon uderza w płytkę detektora. Ta kaskada skutkuje wzmocnieniem sygnału, co powoduje wzrost czułości metody analitycznej. Cały ten proces jest przeprowadzany pod wysoką próżnią (10^{-6} do 10^{-8} tora) w celu usunięcia cząsteczek gazu oraz jonów zanieczyszczeń, które mogą zderzać się z jonami próbki i zmieniać ich ścieżki przelotu lub wytwarzać niespecyficzne produkty reakcji [141].

4.3.2. Detektor spektrofotometryczny absorpcji promieniowania UV-Vis

Wiele analitów absorbuje promieniowanie elektromagnetyczne z zakresu nadfioletu i światła widzialnego (UV-VIS), zazwyczaj w zakresie 200-800 nm. Detektor UV-VIS jest szeroko stosowany, ponieważ może wykrywać związki, które zawierają sprzężone lub wyizolowane wiązania podwójne, tj. związki z wolnymi lub sprzężonymi parami elektronów. Detektor UV-VIS przede wszystkim dedykowany jest do LC [142]. Nie został on powszechnie przyjęty w GC ze względu na brak absorpcji dla analitów w fazie gazowej w tym zakresie promieniowania. Ponadto, technika ta jest niedestrukcyjna i umożliwia szeregowe połączenie z innymi detektorami. Detektor UV-VIS mierzy zdolność substancji rozpuszczonych do pochłaniania światła w określonym zakresie długości fali. Uzyskana absorbancja opisana jest przez Prawo Lamberta-Beera.

$$A = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) = \epsilon cd \quad 11)$$

gdzie: A – wartość absorbancji, I_0 - natężenie światła padającego, I - intensywność transmitowanego światła, ϵ - molowy współczynnik absorpcji substancji rozpuszczonej, d – grubość warstwy absorbującej, c – stężenie roztworu [143].

W praktyce, należy liczyć się z odstępstwami od takiej zależności. Spotykamy się zarówno z ujemnymi, jak i z dodatnimi odchyleniami od przebiegu prostoliniowego. Jedną z przyczyn takich odstępstw jest to, że prawo Lamberta-Beera odnosi się do roztworów rozcieńczonych ($c < 10^{-2}$ M), bowiem przy większych stężeniach wartość współczynnika

absorpcji zależy zwykle od stężenia oznaczanej substancji, ponieważ w bardziej stężonych roztworach prawo L-B jest spełniane dla ściśle określonych warunków. Gdy warunki te nie są spełnione, obserwujemy nieliniowe zależności pomiędzy absorbancją a stężeniem. Przyczyny tego zjawiska mogą mieć charakter zarówno chemiczny, jak i fizyczny.

Detektory UV-VIS można stosować z elucją gradientową, pod warunkiem, że rozpuszczalniki nie pochłaniają znacząco promieniowania w zakresie długości fal absorbowanych przez substancje analizowane. W chromatografii z odwróconym układem faz zwykle stosowanymi rozpuszczalnikami są woda, metanol, acetonitryl i tetrahydrofuran, ponieważ wszystkie są transparentne dla promieniowania UV w całym zakresie długości fali, stosowanym przez detektory UV-VIS [144-145].

W trybie normalnego układu faz konieczne jest zachowanie większej staranności przy doborze rozpuszczalnika, ponieważ wiele z nich, które mogą być odpowiednie jako fazy ruchome dla procesu chromatograficznego, prawdopodobnie bardzo silnie pochłaniają promieniowanie z zakresu fal UV. Należy więc poszukiwać takiego rozpuszczalnika, który jest przezroczysty dla promieniowania UV, a jednocześnie pozwala prowadzić sprawny rozdział chromatograficzny. N-heksan, dichlorek metylenu i alkohole alifatyczne są najczęściej używanymi rozpuszczalnikami, które są transparentne dla promieniowania UV i mogą być stosowane z polarną fazą stacjonarną, taką jak np. żel krzemionkowy [146-148].

Istnieje kilka rodzajów detektorów UV. Jednym z nich jest detektor o ustalonej długości fali, gdzie przez system monitorowana jest absorbancja tylko przy jednej długości fali przez cały czas trwania analizy. Długość fali wynosi zwykle 254 nm. Detektor ten jest najprostszym i najtańszym typem detektora, ale jest ograniczony pod względem elastyczności i rodzajów związków, do których monitorowania można go użyć. Kolejny detektor ma możliwość regulowania długości fali, aczkolwiek w trakcie jednego pomiaru monitoruje w dalszym ciągu tylko jedną wybraną długość promieniowania. Dzięki temu operator dobiera odpowiednio długość fali w taki sposób, aby uzyskać maksimum absorbancji dla określonego analitu lub zwiększyć jego selektywność. Trzecim rozwiązaniem jest detektor, który ma możliwość zmiany długości monitorowanej fali w trakcie trwania analizy chromatograficznej. W detektorze o zmiennej długości fali światło z szerokiego spektrum jest kierowane przez szczelinę do siatki dyfrakcyjnej, która w wyniku zjawisk dyfrakcji i interferencji rozdziela światło niemonochromatyczne na składowe długości fal. Siatka jest następnie obracana w taki sposób, aby skierować pojedynczą długość fali światła przez szczelinę i komorę przepływową do fotodiody, gdzie sygnał optyczny przetwarzany jest na elektryczny.

Następnym typem detektora UV-Vis jest matryca fotodiodowa, w literaturze często nazywana w skrócie DAD. Czujnik ten pozwala na monitorowanie absorbancji substancji w szerokim zakresie długości fal. W rezultacie całe spektrum związków rozpuszczonych może być zanalizowana w bardzo krótkim czasie [142].

W czujniku tym światło z lampy deuterowej skupiane jest poprzez układ optyczny w komorze przepływowej, w której następuje częściowa absorpcja przez związki wychodzące wraz z fazą ruchomą po rozdzieleniu chromatograficznym. Następnie promieniowanie, które przenika przez kuwetę przepływową, jest rozszczepiane na siatce dyfrakcyjnej. Promieniowanie, po rozdzieleniu na pojedyncze pasma, pada na matrycę fotodiodową, gdzie poszczególne fotodiody - w przypadku ich oświetlenia - wytwarzają prąd elektryczny. Następnie jest on zamieniany w przetworniku na sygnał cyfrowy [149-150].

4.3.3. Detektor wychwyty elektronów

Detektor wychwyty elektronów dedykowany jest do chromatografii gazowej i działa na zasadzie spadku natężenia prądu w komorze jonizacyjnej wskutek wprowadzenia do niej związków o dużym powinowactwie elektronowym. W ECD radioaktywny izotop (folia z ^{63}Ni) jest wykorzystywany jako źródło elektronów beta, które bombardują cząsteczki gazu nośnego (azot lub argon), tworząc plazmę dodatnich jonów, rodników i elektronów termicznych poprzez serię sprężystych i niesprężystych zderzeń według równania:



Powstałe jony i elektrony przyciągane są przez elektrody pod wpływem przyłożonego pola elektrycznego. W wyniku tego powstaje prąd tła, który utrzymywany jest na stałym poziomie w wyniku ciągłego przepływu gazu nośnego. Gdy związki z dużym powinowactwem elektronowym wymywane są z kolumny chromatograficznej, następuje wychwyty wolnych elektronów zgodnie z równaniem:



Jony te mają większą masę niż oryginalny elektron, mniejszą prędkość dryfu i znacznie większą szybkość rekombinacji z jonami dodatnimi N_2^+ . Zmniejszenie prądu detektora z powodu utraty elektronów termicznych w wyniku przyłączenia do cząsteczek analitów stanowi podstawę pomiaru ilościowego. Detektor ten jest selektywny i silnie reaguje na halogenozwiązki. Znalazł on szerokie zastosowanie w analizie zanieczyszczeń środowiska do oznaczania chlorowcopestycydów [151].

4.4. Analiza chromatograficzna materiałów wybuchowych przedstawiona w literaturze

Jedną z metod wykrywania i/lub oznaczania śladowych ilości substancji wybuchowych są metody chromatograficzne. W zależności od stabilności termicznej badanych związków stosujemy chromatografię cieczową bądź gazową. Na przykład dla związków takich jak RDX, HMX, a także tetraazotan pentaerytrytu (PETN) – preferowaną techniką jest LC [152], ponieważ w dozowniku chromatografu gazowego dochodzi do ich częściowej, bądź całkowitej dekompozycji [153]. Z kolei TNT i niepolarne produkty jego rozkładu należy analizować za pomocą GC. Analizy szerokiej grupy związków podjął się Waddel i współpracownicy [154]. Przedstawili oni metodę analizy związków nitroaromatycznych i nitroamin (miedzy innymi RDX, HMX, TNT i inne) ze ściereczki PTFE z wykorzystaniem desorpcji termicznej w połączeniu z GC-ECD. W celu desorpcji analitów ze ściereczki desorber ogrzewany był od temperatury 45°C do 280°C z narostem 40°C/min, utrzymywano tę temperaturę przez 3 minuty, a następnie chłodzono do 80°C. Dozownik ogrzewany był od temperatury 40°C do 260°C z narostem 12°C/s i następnie utrzymywano tę temperaturę przez 4 minuty. Linię przesyłową utrzymywano w temperaturze 280°C, aby zminimalizować stratę analitów przez kondensację. Analizę chromatograficzną prowadzono w następującym programie temperaturowym: początkową temperaturę 40°C utrzymywano przez 3 minuty, następnie kolumnę ogrzewano do temperatury 120°C z narostem 15°C/min, w kolejnym kroku stosowano narost 30°C/min do temperatury końcowej 280°C, która utrzymywana była przez 3 minuty. Detektor ECD pracował w temperaturze 275°C, przy przepływie gazu nośnego na poziomie 60 ml/min. Uzyskano pełny rozdział analitów i wszystkie związki udało się oznaczyć w danym stężeniu, za wyjątkiem HMX. GC-ECD wykorzystano również w analizie TNT i produktów jego rozkładu [8]. Dozownik i detektor pracowały w temperaturze odpowiednio 225 i 300°C. Dozowano próbki roztworu o objętości 2 µL przy podziale strumienia gazu 1:6. Jako gaz nośny zastosowano azot przy stałym natężeniu przepływu 2 mL/min. Analizę chromatograficzną prowadzono w następującym programie temperaturowym: początkową temperaturę 100°C utrzymywano przez 2 minuty, następnie kolumnę ogrzewano do temperatury 200°C z narostem 100°C/min i od razu zastosowano narost do temperatury 280°C z wartością 20°C/min. Końcowa temperatura utrzymywana była przez 5,5 minuty.

Do analizy TNT i produktów jego przemian wykorzystano również GC-MS. W celu osiągnięcia niższych granic oznaczalności i wykrywalności Brust i współpracownicy [9] wykorzystali tryb SIM podczas analizy ilościowej, osiągając wyniki w zakresie od 6 do

43 ng/mL. Próbkę wprowadzano do układu stosując automatyczny system dozowania o objętości 1 μ L przy podziale strumienia gazu nośnego 1:10. Dozownik ogrzewany był do temperatury 250°C. Jako gaz nośny zastosowano hel. Analizę wykonano przy stałym ciśnieniu z zastosowaniem jonizacji elektronami i czasem skanowania 10 ms. Analizę chromatograficzną prowadzono w następującym programie temperaturowym: początkową temperaturę 35°C utrzymywano przez 1 minutę, następnie kolumnę ogrzewano do temperatury 250°C z szybkością 80°C/min i końcową temperaturę utrzymywano przez 1 min. W pracy przedstawiono czasy retencji oraz wybrane jony ilościowe i jakościowe dla każdego z analizowanych związków.

Ostatnio ukazało się wiele prac dotyczących wykorzystania LC-MS do analizy materiałów wybuchowych i polarnych produktów ich degradacji. Między innymi Vigneau i Machuron-Mandard [11] wykorzystali LC-MS z jonizacją ESI do oznaczania HMX i RDX w próbkach wody gruntowej z terenów objętych manewrami wojskowymi. Oznaczenie ilościowe i jakościowe przeprowadzono w trybie SIM. Identyfikacji dokonano na podstawie czasu retencji oraz obecności w widmie jonów charakterystycznych o określonym stosunku m/z. Z kolei Sener i współpracownicy opisują analizę TNT, 2,6-DNT, kwasu pikrynowego, RDX, HMX, PETN i triazotanu trimetyloetenu (TMETN) z gleby pobranej z miejsca wybuchu [10]. W tym przypadku do analizy zastosowano LC sprzężone z tandemowym spektrometrem mas (MS/MS). W tabeli 6 przedstawiono program gradientu wykorzystany do rozdziału analizowanej mieszaniny.

Tabela 6. Program gradientu fazy ruchomej metody chromatograficznej.

Czas [min]	A% [2mM r-r NH ₄ NO ₃ (aq)]	B% [MeOH]	Przepływ [mL/min]
0:00	65	35	0,40
01:30	5	95	0,40
03:00	5	95	0,40
06:20	55	45	0,40
10:00	55	45	0,40
10:01	65	35	0,40
12:30	65	35	0,40

Do jonizacji analitów zastosowano jonizację APCI w trybie jonów ujemnych. Analizy zostały wykonane w trybie monitorowania reakcji następczych. Parametry pracy trybu MRM przedstawiono w tabeli 7.

Tabela 7. Parametry pracy trybu MRM.

Analit	MRM		Napięcie kapilary [V]	Energia celi kolizyjnej [eV]	Czas próbkowania [ms]
	Q1	Q2			
2,6-DNT	181,2	151,3	56,0	6,0	0,1
TNT	226,1	88,2	76,5	11,1	0,2
RDX	283,4	61,7	38,0	8,0	0,35
HMX	357,9	61,8	60,0	6,6	0,1

Opracowana metoda pozwoliła na analizę wybranych związków z granicą oznaczalności z zakresu 13.2–241.5 ng/g (w zależności od rodzaju związku).

Inni autorzy, np. DeTata wraz z współpracownikami [155] do swoich badań wykorzystali sprzężenie chromatografu cieczowego z detektorem pracującym w zakresie nadfioletu (UV). Podczas oznaczania 17 materiałów wybuchowych, ekstrahowanych z trzech różnych rodzajów gleb, zastosowano następującą metodę analizy. Ekstrakty z próbek gleby analizowano przy użyciu układu Agilent 1200 z detektorem UV. Zastosowano kolumnę analityczną Dionex Acclaim E1 (5 mm, 4,6 6 250 mm) z szybkością przepływu fazy ruchomej 1 mL/min. Jako fazę ruchomą zastosowano układ metanol:woda (43:57) przy użyciu izokratycznego przepływu. Temperatura kolumny wynosiła 32°C. Detekcję przeprowadzono przy 254 nm dla wszystkich analitów, oprócz pentrytu i nitrogliceryny, które oznaczono przy długości 210 nm.

II. Założenia, zakres i cel rozprawy doktorskiej

Identyfikacja i oznaczenie materiałów wybuchowych zalegających na dnie Bałtyku jest potrzebna z powodu ogromnego zagrożenia jakie one stwarzają. Jednym z głównych powodów jest toksyczność większości substancji wybuchowych i produktów ich rozkładu. Morze Bałtyckie jest stosunkowo płytkie i posiada ograniczone możliwości wymiany wód z Morzem Północnym. Powoduje to, iż wszystkie obce substancje wprowadzone do tego ekosystemu pozostają w nim przez wiele lat, co może spowodować ogromne zagrożenie ekologiczne. Ponadto, z ostatnio przeprowadzonych badań wynika, że wydobyte z dna morskiego fragmenty materiałów wybuchowych są w bardzo dobrym stanie i w dalszym ciągu mają właściwości wybuchowe. W związku z tym istnieje dodatkowe zagrożenie, że mogą one być wykorzystane do celów przestępczych lub terrorystycznych.

Jednakże w dostępnych opracowaniach oraz publikacjach naukowych nie ma kompleksowych metod analizy tych związków. Mowa tutaj o najczęściej stosowanych materiałach wybuchowych stosowanych podczas drugiej wojny światowej (RDX i TNT), które po okresie wojennym zostały zatopione między innymi w Morzu Bałtyckim. Należy podkreślić, iż nie tylko te związki stwarzają zagrożenie dla ekosystemu morskiego ale także produkty ich degradacji, jak na przykład: 2,4-DNT; 2,6-DNT; 4-NT; TNBA; TNB; 2,4-DNA; 1,3-DNB. Wymienione związki powstają pod wpływem flory bakteryjnej środowiska morskiego oraz panujących tam warunków beztlenowych.

Wyselekcjonowane przeze mnie związki charakteryzują się słabą rozpuszczalnością w wodzie. Z tego względu osiadają one na dnie morskim i przykrywane mogą być kolejnymi warstwami osadu dennego. Dlatego też tę właśnie matrycę należy analizować celem ich oznaczenia.

Głównym celem badań prowadzonych w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej była optymalizacja metody przygotowania próbki osadu dennego Morza Bałtyckiego, opracowanie metod analizy materiałów wybuchowych i produktów ich degradacji, ich walidacja i porównanie oraz zastosowanie w analizie próbek środowiskowych. Ze względu na to, że syntezę RDX można przeprowadzić dwoma metodami, przy czym pierwsza z tych metod pozwala uzyskać czysty związek, a w drugiej jako zanieczyszczenie produktu głównego powstaje HMX, postanowiono do grupy badanych analitów dodać HMX, który nie był stosowany podczas drugiej wojny światowej. Jeżeli w próbkach środowiskowych potwierdzi się obecność RDX, możliwe będzie określenie metody jego syntezy na podstawie obecności (lub braku) HMX.

Realizacja celu niniejszej pracy wymagała zastosowania odpowiednio przygotowanej metodyki badań, obejmującej siedem głównych etapów.

1. Opracowania metody skażania osadu dennego, pobranego z miejsca nienarażonego na kontaminację materiałami wybuchowymi, wybranymi do analizy związkami z grupy materiałów wybuchowych i produktami ich rozkładu.
2. Opracowania metody analizy jakościowej i ilościowej wyselekcjonowanych analitów za pomocą chromatografii gazowej z tandemową spektrometrią mas:
 - a) opracowania przejść jonowych w trybie monitorowania reakcji następczych,
 - b) optymalizacji temperatury dozownika,
 - c) określenia programu temperaturowego odpowiedniego do rozdziału chromatograficznego analizowanych związków.
3. Opracowania metody analizy jakościowej i ilościowej wybranych analitów za pomocą chromatografii ciekowej z tandemową spektrometrią mas, w tym m. in.:
 - a) przejść jonowych w trybie monitorowania reakcji następczych,
 - b) programu elucji gradientowej,
 - c) parametrów źródła jonów.
4. Opracowania i porównania kilku metod przygotowania próbki, uwzględniając między innymi, takie parametry jak:
 - a) optymalizacja sposobu przygotowania próbki do analizy,
 - b) dobór odpowiedniego rozpuszczalnika do ekstrakcji,
 - c) określenie czasu i krotności ekstrakcji,
 - d) optymalizacja temperatury ekstrakcji,
 - e) dobór metody osuszania ekstraktu i innych parametrów.
5. Wyznaczenia parametrów walidacyjnych opracowanych metod analitycznych:
 - a) granica oznaczalności,
 - b) granica wykrywalności,
 - c) precyzja wyrażona wartością współczynnika zmienności CV,
 - d) dokładność,
 - e) zakres liniowości,
 - f) współczynnik determinacji r^2 ,
 - g) czułość metody analitycznej.
6. Zastosowania opracowanych metod analizy materiałów wybuchowych i produktów ich przemian do analizy próbek środowiskowych.
7. Zebrania i opracowania wyników badań doświadczalnych oraz literaturowych w postaci rozprawy doktorskiej.

III. Część doświadczalna

5. Materiały i procedury wykorzystywane w procesie badawczym

5.1. Aparatura

Analizę ilościową jak i jakościową wykonano za pomocą chromatografu gazowego 7890A sprzężonego z tandemowym detektorem mas typu triple quad 7000 oraz chromatografu cieczowego 1260 Infinity również z tandemowym detektorem mas typu triple quad 6460 firmy Agilent, które sterowane były za pomocą programu komputerowego Mass Hunter.

Analizy wykonano stosując następujące parametry pracy chromatografu gazowego, które w trakcie prowadzenia badań nie ulegały zmianie:

- Temperatura linii przesyłowej: 250°C
- Temperatura Q1: 150°C
- Temperatura Q2: 150°C
- Gaz nośny: Hel
- Sposób dozowania: Bez podziału strumienia (splitless)

Podczas analizy za pomocą GC-MS/MS stosowano kolumnę kapilarną ZB-5 firmy Zebron, natomiast w przypadku analizy za pomocą LC-MS/MS kolumnę pakowaną Poroshell 120 EC-C18 firmy Agilent. W tabeli 8 przedstawiono charakterystykę obu wymienionych wcześniej kolumn.

Tabela 8. Charakterystyka kolumn chromatograficznych

	ZB-5 firmy Zebron	Poroshell 120 EC-C18
Długość kolumny	30 m	100 mm
Średnica wewnętrzna	0,25 mm	3 mm
Grubość filmu fazy stacjonarnej	0,25 µm	---
Wielkość ziaren	---	2,7 µm
Polarność	niepolarna	niepolarna
Faza stacjonarna	5% Difenyl- 95% dimetylopolisiloksan	Żel krzemionkowy z chemicznie związaną fazą oktadecylową [C18]
Zakres temperaturowy pracy kolumny	-60°C do 330°C	Do 60°C

Podczas prowadzenia badań wykorzystywano następującą aparaturę dodatkową:

- a) Półautomatyczny przyrząd do przyspieszonej ekstrakcji próbek stałych i półstałych za pomocą rozpuszczalników (ASE 350) w warunkach podwyższonej temperatury i ciśnienia firmy Thermo Scientific,
- b) Samodzielnie zmodyfikowany aparat do ekstrakcji wspomaganej mikrofalami IGNIS AKL 576/IG/WH,



Rys. 18. Własnoręcznie zmodyfikowany aparat do ekstrakcji wspomaganej mikrofalami IGNIS AKL 576/IG/WH

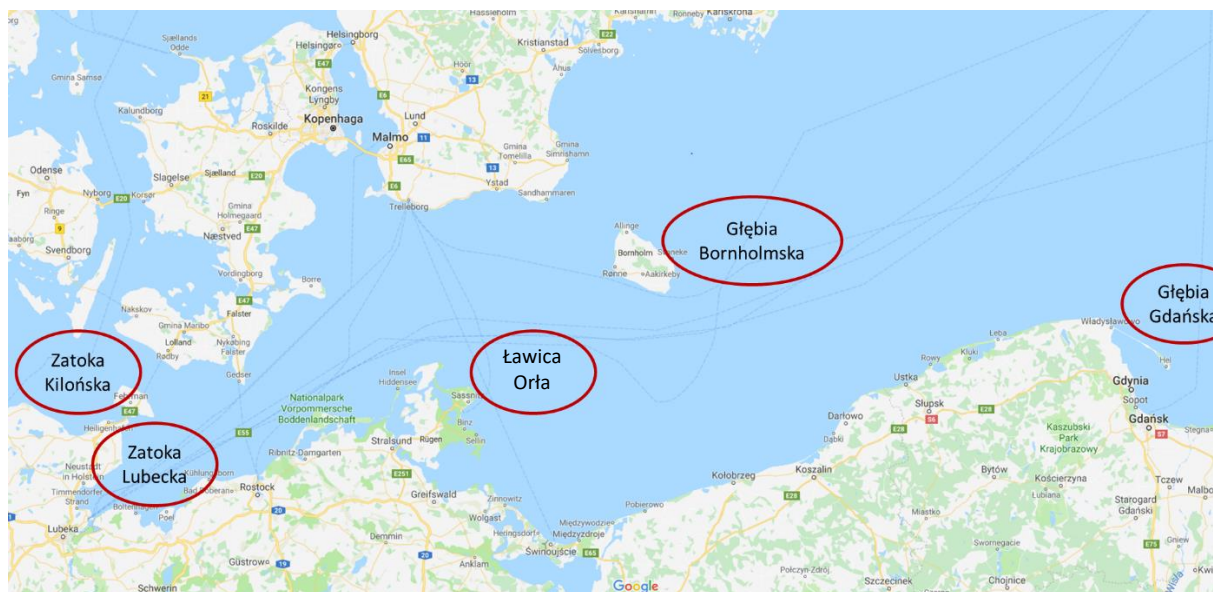
- c) Wytrząsarkę Heidolph model Multi Relax,
- d) Mieszadło magnetyczne z możliwością grzania MR Hei-Standard, kolby kulistej oraz nasadki do aparatu Soxhleta,
- e) Elektroniczną wagę laboratoryjną firmy Radwag model PS 1000.R2 o dokładności odczytu 0,0001 g,
- f) Elektroniczną wagę laboratoryjną firmy Radwag model XA 60/220/X o dokładności odczytu 0,00001 g,
- g) Wirówkę MPW-251,
- h) Suszarkę laboratoryjną SLW 32 STD INOX/G,
- i) Pipety automatyczne firmy ROTH dla zakresu objętości od 0,1-10 μL , 10-100 μL oraz 100-1000 μL ,
- j) Planetarny młynek mikro typu „pulverisette 7 premium line”,
- k) Demineralizator HYDROLAB HLP5UV.

5.2. Odczynniki i materiały

Następujące związki chemiczne, o czystości 97-99,8%, były substancjami wzorcowymi wykorzystanymi w badaniach: TNT; 2,4-DNT; 2,6-DNT; 4-NT; TNBA; 1,3,5-TNB; 2,4-DNA; 1,3-DNB; RDX i HMX. Wymienione związki zsyntezowano w Zakładzie Materiałów Wybuchowych WAT, a ich czystość określono za pomocą GC-MS. Związki te przechowywano w przystosowanym do tego celu magazynie.

Pozostałe odczynniki i materiały:

- metanol 99,8%, chloroform 98,5%, heksan 99%, dichlorometan 99,8%, aceton 99,5% firmy POCH (Gliwice, Polska),
- acetonitryl do LC-MS firmy S.WITKO (Łódź, Polska),
- kwas mrówkowy 98-100% firmy Chem-Lab (Zedelgem, Belgia),
- octan etylu 99,5%, siarczan magnezu 94,5% firmy Chempur (Piekary Śląskie, Polska),
- metylofosfonian dimetylu 97% (DMMP), dodekan 99% (C12), trimetylofosforan 99%, 2,6-dimetylofenol 99,5%, 5-chloro-2-metyloanilina 98%, fosforan tri-n-butyłu 99%, dibenzotiofen 98%, malation, stearynian metylu 96%, n-alkaniny od C8 do C24, kwas metylofosfonowy 99-101%, N-metylodietanoloamina 99%, metylofosfonian etylu 98%, tiodiglikol 99%, metylofosfonian pinakolilu 97%, bibuły filtracyjnej Whatman nr 5 firmy Sigma-Aldrich (Milwaukee, USA),
- woda destylowana otrzymana z systemu oczyszczania wody HYDROLAB HLP5UV w naszym laboratorium,
- azot analizowany czysty minimum 99,999% obj. do procesu zatężania zakupiony w firmie MULTAX S.C. (Stare Babice, Polska),
- próbki osadów dennych z Morza Bałtyckiego podejrzane o skażenie materiałami wybuchowymi pobrane w ramach projektu # R013 DAIMON [156], zostały zamrożone bezpośrednio po wydobyciu i w takiej postaci dostarczone do laboratorium. Próbki pochodziły między innymi z takich miejsc jak: Głębia Gdańska, Głębia Bornholmska, Zatoka Kilońska, Zatoka Lubecka, czy Ławica Orła (rys.19).



Rys. 19. Mapa lokalizacji punktów poboru próbek w ramach projektu # R013 DAIMON.

5.3. Zasady bezpieczeństwa pracy z materiałami wybuchowymi

Materiały wybuchowe przechowywane były w odpowiednim do tego magazynie z ograniczonym dostępem dla osób trzecich. W trakcie pracy z tymi materiałami odważano minimalne ich ilości potrzebne do analizy, a nadmiar odstawiano do magazynu. Badania wykonywane były w odpowiednim ubiorze ochronnym (rękawice, okulary ochronne, fartuch, itp.) pod dygestorium, bądź w odpowiednio wentylowanym pomieszczeniu.

5.4. Metodyka badań

Badania prowadzono według następującego schematu:

- Opracowanie warunków analizy chromatograficznej za pomocą GC-MS/MS i LC-MS/MS,
- Opracowania metody skażania osadu dennego, pobranego z miejsca nienarażonego na kontaminację materiałami wybuchowymi, określonymi stężeniami wzorców analizowanych związków.
- Optymalizacja procesu przygotowania próbek do analizy,
- Walidacja opracowanych metod analizy materiałów wybuchowych,
- Analiza chromatograficzna przygotowanych próbek rzeczywistych.

5.4.1. Opracowanie warunków analizy chromatograficznej

W celu opracowania warunków analizy chromatograficznej niezbędne było przygotowanie roztworów wzorcowych.

5.4.1.1. Roztwory wzorcowe

Roztwory wzorcowe do etapu skażania

Roztwór skażający otrzymano przez rozpuszczenie badanych związków jako wzorców w acetonie o stężeniu 6 mg/mL dla każdego potencjalnego analitu.

Próbki wzorcowe do opracowania metody analizy chromatograficznej

Do opracowania programu temperaturowego, wyznaczenia optymalnej temperatury dozownika, przy której otrzymywana jest najwyższa odpowiedź detektora oraz przejść jonowych do analizy w trybie MRM za pomocą GC-MS/MS przygotowano roztwory wzorcowe: RDX; HMX; TNT; 1,3-DNB; 1,3,5-TNB; 2,4-DNT; 2,6-DNT; 4-NT; 2,4-DNA i TNBA w chloroformie o stężeniu 100 µg/mL.

Do opracowania programu gradientu fazy ruchomej, wyznaczenia najbardziej wydajnych parametrów źródła jonów (APCI i ESI) oraz wyznaczenia przejść jonowych do analizy w trybie MRM za pomocą LC-MS/MS przygotowano roztwory wzorcowe: RDX; HMX; TNT; 1,3-DNB; 1,3,5-TNB; 2,4-DNT; 2,6-DNT; 4-NT; 2,4-DNA i TNBA w acetonitrylu o stężeniu 100 µg/mL.

Próbki wzorcowe do procesu weryfikacji przydatności opracowanej metody analizy chromatograficznej do oznaczania śladowych ilości wytypowanych analitów

Podczas weryfikacji przydatności opracowanej metody analizy chromatograficznej za pomocą GC-MS/MS, jak i analizy za pomocą LC-MS/MS przygotowano roztwory wzorcowe o najwyższym stężeniu kalibracyjnym, a mianowicie 1000 ng/mL.

Roztwór wzorca wewnętrznego

Do zatężonego ekstraktu po etapie przygotowania próbki, w celu poprawienia precyzji oznaczeń, dodano w roli wzorców wewnętrznych 20 µL: dodekanu (C12) w chloroformie do analiz wykonywanych za pomocą chromatografii gazowej i metylofosfonianu dimetylu (DMMP) w acetonitrylu w przypadku analiz za pomocą chromatografii cieczowej. Oba wzorce były o stężeniu 76 µg/mL.

5.4.1.2. Analiza za pomocą GC-MS/MS

W pierwszym etapie badań zbadano wpływ temperatury dozownika na wielkość sygnału analitycznego. W tym celu wykonano analizy wszystkich wzorców zmieniając temperaturę dozownika w zakresie od 210 do 310°C ze skokiem co 20°C.

Kolejnym krokiem było opracowanie parametrów pracy detektora w trybie MRM:

- ✓ Z widma otrzymanego w trybie pełnego skanowania dla każdego z wyselekcjonowanych analitów wybrano jon prekursora o możliwie największej masie i intensywności.
- ✓ W następnym kroku przeprowadzono analizę w trybie monitorowania jonów fragmentacyjnych pochodzących od wybranego jonu prekursora pojedynczo dla każdego z analitów przy zmienianych skokowo energiach celi kolizyjnej, od 0 do 25 eV co 1 eV i dodatkowo 30 eV. Zakres skanowanych mas dla odpowiednich związków rozciągał się od 30 aż do [masa jonu prekursora + 2] Th, a czas skanowania wynosił 240 ms. Do trybu MRM każdego z oznaczanych związków wybrano po 3 najbardziej intensywne przejścia (jedno przejście ilościowe i dwa jakościowe) i odpowiadające im energie.
- ✓ Dla wyznaczonych przejść jonowych: jon prekursora – jon produktu dobrano odpowiedni czas skanowania.

Po opracowaniu trybu MRM każdy związek poddano analizie w najwyższym stężeniu kalibracyjnym (1000 ng/mL) w celu sprawdzenia czy opracowane metody nadają się do analizy śladowych ilości badanych związków. W przypadku nie spełnienia tego kryterium dany związek nie był brany pod uwagę w dalszych pracach badawczych.

W celu dobrania odpowiedniego programu temperaturowego przeprowadzono analizę mieszaniny wszystkich analitów w trybie pełnego skanowania pracy detektora (zakres skanowania mas od 40 do 500 Th, czas skanowania 180 ms). Program dobierany był doświadczalnie tak, aby uzyskać możliwie najlepszy rozdział przy jak najkrótszym czasie analizy. Ponadto oszacowano czas opóźnienia, po jakim należy włączyć detektor, aby nie uszkodzić go użytym do przygotowania próbki rozpuszczalnikiem.

5.4.1.3. Analiza za pomocą LC-MS/MS

W celu dobrania odpowiednich parametrów pracy detektora w trybie MRM:

- ✓ Każdy analit z osobna został poddany analizie w trybie pełnego skanowania zarówno w trybie jonów dodatnich jak i ujemnych w celu określenia sposobu jonizacji poszczególnych analitów.

- ✓ Dla każdego z analitów wyznaczano takie napięcie fragmentora w zakresie od 40 do 120 V ze skokiem co 5 V, któremu odpowiada największa intensywność widma mas. Z otrzymanego widma wybierano jon prekursora, który charakteryzował się możliwie największą masą i intensywnością. W LC-MS/MS jon prekursora jest najczęściej jonem molekularnym lub pseudomolekularnym.
- ✓ W następnym kroku przeprowadzano analizę w trybie monitorowania jonów fragmentacyjnych pochodzących od wybranego jonu prekursora pojedynczo dla każdego z analitów przy zmienianych skokowo energiach celi kolizyjnej, od 0 do 40 eV co 1 eV. W przypadku gdy w zadanym zakresie nie zaobserwowano maksimum intensywności jonu produktu - badania kontynuowano wybierając wyższe energie celi kolizyjnej. Zakres skanowanych mas dla odpowiednich związków był od 30 i rozciągał się aż do [masy jonu prekursora + 2] Th, a czas skanowania wynosił 220 ms. Do trybu MRM każdego z oznaczanych związków wybrano po 3 najbardziej intensywne przejścia (jedno przejście ilościowe i dwa jakościowe) i odpowiadające im energie.

Każdą z czynności przeprowadzono osobno dla każdego ze źródeł jonizacji ze względu na możliwość powstawania innych jonów prekursorów i produktów.

Po opracowaniu powyższych parametrów, przystąpiono do opracowania programu gradientu fazy ruchomej. Proces rozdziału mieszaniny związków chemicznych na poszczególne indywidua prowadzono przy zachowaniu stałego natężenia przepływu fazy ruchomej (1 mL/min). Zmianie ulegał jedynie skład tej fazy, a mianowicie stosunek acetonitryl - woda. Obie fazy domieszkowane były 0,1% kwasem mrówkowym.

Podczas optymalizacji parametrów pracy źródła jonów wyznaczono:

a) Dla jonizacji ESI:

- Temperatura gazu w rozpylaczu w zakresie 230 do 350°C ze zmianą skokową co 30°C,
- Natężenie przepływu gazu w rozpylaczu w zakresie od 4 do 12 L/min ze zmianą skokową co 2 L/min,
- Temperatura gazu osłonowego w zakresie 200 do 400°C ze zmianą skokową co 50°C,
- Natężenie przepływu gazu osłonowego w zakresie od 4 do 12 L/min ze zmianą skokową co 2 L/min,
- Ciśnienie w rozpylaczu w zakresie od 10 do 60 psi ze zmianą skokową co 10 psi,
- Napięcie na układzie elektrooptycznym w zakresie od 0 do 2000 V ze zmianą skokową co 500 V,

- Napięcie na kapilarze w zakresie od 500 do 5500 V ze zmianą skokową co 500 V,

b) Dla jonizacji APCI:

- Temperatura gazu w rozpylaczu w zakresie od 200 do 350°C ze zmianą skokową co 50°C,
- Temperatura odparownika w zakresie od 200 do 450°C ze zmianą skokową co 50°C,
- Przepływ gazu w rozpylaczu w zakresie od 4 do 12 L/min ze zmianą skokową co 2 L/min,
- Ciśnienie w rozpylaczu w zakresie od 10 do 60 psi ze zmianą skokową co 10 psi,
- Natężenie wyładowania koronowego w zakresie od 1 do 10 μA ze zmianą skokową co 1 μA ,
- Napięcie na kapilarze w zakresie od 500 do 5500 V ze zmianą skokową co 500 V.

Dobór parametrów prowadzono poprzez wielokrotną analizę badanych związków w zmienianych skokowo parametrach pracy źródła jonów. Stosowano przy tym regułę, że podczas optymalizacji jednego z parametrów zachowywano niezmiennosc pozostałych parametrów pracy źródła jonów.

Po opracowaniu metody analizy chromatograficznej każdy związek poddano analizie w najwyższym stężeniu kalibracyjnym (1000 ppb) w celu sprawdzenia czy opracowane metody nadają się do analizy śladowych ilości badanych związków. W przypadku nie spełnienia tego kryterium dany związek nie był brany pod uwagę w dalszych pracach badawczych.

5.4.2. Opracowanie metody skażenia osadu dennego

W celu skażenia próbki osadu dennego pobranego z miejsca nienarażonego na kontaminację materiałami wybuchowymi niewielką ilością badanych analitów i utrzymania wysokiej powtarzalności procesu analitycznego konieczne było wysuszenie matrycy do stałej masy w temperaturze 70°C. Suszenie osadu uznano za zakończone w momencie gdy w trzech kolejnych pomiarach nie zarejestrowano ubytku masy, a czas między pomiarami nie był krótszy niż 8 godzin. Po procesie suszenia pozostawało zwykle około 50% masy początkowej. W wyniku wysuszenia osad stawał się bardzo zbrylony i twardy, a powstająca bryła była trudna do kruszenia. Odpowiednie rozdrobnienie uzyskiwano przez mielenie w młynie kulowym.

Objętość 50 μL roztworu wzorcowego przeniesiono do 5 g suchego, rozdrobnionego osadu i pozostawiono do swobodnego odparowania rozpuszczalnika w temperaturze pokojowej. W końcowym etapie, w celu odtworzenia naturalnego składu matrycy - do skażonej i pozbawionej acetonu próbki osadu dennego, dodano 5 mL wody destylowanej i wstawiono do mieszania na Vortex'ie na 30 min.

W następnym etapie zbadano stabilność próbki w zależności od czasu jaki musi upłynąć od momentu skażenia do momentu rozpoczęcia analizy. W tym celu cztery jednakowe próbki przygotowane zgodnie z procedurą opisaną we wcześniejszym akapicie poddano podwójnej ekstrakcji 10 mL porcjami rozpuszczalnika, każda po upływie określonego czasu od skażenia (bezpośrednio po skażeniu, po upływie 1, 2 i 3 dób). Do ekstrakcji stosowano chloroform, gdy otrzymane ekstrakty poddawano analizie za pomocą GC-MS/MS lub acetonitryl w przypadku analizy za pomocą LC-MS/MS. Każdorazowo warstwę organiczną oddzielano od mokrego osadu. W przypadku analizy za pomocą chromatografii gazowej ekstrakt suszono stosując bezwodny siarczan magnezu. Wszystkie eksperymenty przeprowadzono pięciokrotnie, a otrzymane wyniki uśredniono. Poza wpływem czasu zbadano również, czy obecność matrycy (suchy osad) ma wpływ na wartość odzysku. W tym celu całą procedurę przeprowadzono również dla próbek bez obecności suchego osadu dennego, tzn. do pustego falkonu dodano odpowiednią objętość roztworu skażającego, odczekano do momentu odparowania rozpuszczalnika i dodano 5 mL wody destylowanej.

5.4.3. Wybór najlepszej metody przygotowania próbek do analizy

Przygotowanie próbek do analizy chromatograficznej opiera się na izolacji analitów za pomocą rozpuszczalników organicznych. Etap ten wymagał przeniesienia analitów z masy półpłynnej do rozpuszczalnika organicznego oraz usunięcia wody z otrzymanego ekstraktu w przypadku GC. W celu wyboru najlepszego rozpuszczalnika do ekstrakcji zbadano następujące rozpuszczalniki: chloroform, chlorek metylenu, octan etylu i heksan w przypadku analizy za pomocą GC oraz aceton, acetonitryl i metanol w przypadku analizy za pomocą LC. Do osuszenia ekstraktu wytypowano dwie metody: osuszanie za pomocą bezwodnego siarczanu magnezu oraz zmiana matrycy przez odparowanie do sucha w strumieniu gazu obojętnego – azotu. Podczas osuszania azotem 5 cm³ ekstraktu odparowywano do sucha, po czym pozostałość rozpuszczano w 5 cm³ odpowiedniego rozpuszczalnika. Na podstawie uzyskanych wyników wybrano najlepszy rozpuszczalnik i metodę osuszania, które stosowano w dalszych badaniach.

5.4.3.1. Ekstrakcja za pomocą rozpuszczalnika organicznego w aparacie Soxhleta

Do ekstrakcji zastosowano konwencjonalny aparat Soxhleta składający się z chłodnicy zwrotnej, nasadki Soxhleta i kulistej kolby. Stosując ten typ ekstrakcji można osiągnąć bardzo wysoki odzysk analitów (prawie 100%), ale czas wymagany do przygotowania próbki jest bardzo długi i może wynosić nawet kilkadziesiąt godzin. Analizowane materiały wybuchowe i ich produkty degradacji ekstrahowano odpowiednio dobranym rozpuszczalnikiem przy zastosowaniu następujących czasów procesu: 2, 4, 7, 16, 24, 30 i 48 godzin w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika.

5.4.3.2. Ekstrakcja rozpuszczalnikiem przez wytrząsanie

Ekstrakcję rozpuszczalnikiem przez wytrząsanie przeprowadzono w jałowej polipropylenowej probówce typu Falcon. Optymalizacja procesu obejmowała parametry takie jak: czas, krotność ekstrakcji i ilość dodatku ziemi okrzemkowej. Każda ekstrakcja, zarówno gdy prowadzono ekstrakcję pojedynczą jak i wielokrotną trwały one po: 2,5; 5 i 10 minut w obecności ziemi okrzemkowej i bez niej. Niezależnie od krotności ekstrakcji, całkowita ilość użytego rozpuszczalnika wynosiła 20 mL. Po każdej ekstrakcji próbkę wirowano przez 5 minut z prędkością 2000 obr/min, a podpróbki pochodzące z ekstrakcji wielokrotnych łączono.

5.4.3.3. Ekstrakcja za pomocą rozpuszczalnika wspomagana mikrofalami

W celu wyznaczenia najlepszych parametrów ekstrakcji wspomaganej mikrofalami przeprowadzano badania z zakresu krotności i czasu ekstrakcji. W tym celu przeprowadzono pojedynczą i podwójną ekstrakcję. Każda ekstrakcja, zarówno pojedyncza jak i dwukrotna trwały odpowiednio: 1; 2,5; 5; 10; 20 i 30 minut. Używane w badaniach urządzenie nie miało możliwości regulacji mocy i pozwalało jedynie pracować przy zastosowaniu maksymalnej mocy 750 W z odpowiednio dobranymi przerwami czasowymi. Z tego względu nie przeprowadzono optymalizacji tego parametru i stosowano przez cały etap ekstrakcji maksymalną jego wartość.

5.4.3.4. Przyspieszona ekstrakcja za pomocą rozpuszczalnika

W celu dobrania najlepszych parametrów ekstrakcji ASE zostały zbadane takie parametry jak: temperatura pieca, czas statycznego ogrzewania, ilości rozpuszczalnika przepuszczanego przez komorę ekstrakcyjną po etapie statycznego ogrzewania i liczba cykli. Ekstrakcje przeprowadzono w różnych temperaturach (80, 100, 120, 140, 160, 180 i 200°C) i czasach (1, 2, 5, 10, 15 i 20 minut). Przed załadowaniem każdej próbki komórkę ekstrakcyjną

ogrzewano przez określony czas do osiągnięcia docelowej temperatury. 5-minutowe ogrzewanie zastosowano, gdy temperaturę ekstrakcji ustawiono w zakresie 80-100°C, 6-minutowe gdy T=120°C, 7-minutowe gdy T=140°C, 8-minutowe gdy T=160°C i 9-minutowe dla zakresu T=180-200°C. Sprawdzono wpływ ilości rozpuszczalnika przepuszczanego przez komorę ekstrakcyjną po etapie statycznego ogrzewania (0, 10, 20, 60 i 80% obj. komory ekstrakcyjnej) i liczbę cykli (1, 2 lub 1 + 2). Ciśnienie ekstrakcji było stałe i wynosiło 1500 psi. Wszystkie ekstrakcje przeprowadzono w celkach ekstrakcyjnych o pojemności 22 mL.

5.4.3.5. Przygotowanie ekstraktu do analizy

Warstwę organiczną oddzielano od osadu przez sączenie przy użyciu bibuły filtracyjnej Whatman nr 5 i suszono bezwodnym siarczanem magnezu (w przypadku analizy GC). W celu obniżenia granicy wykrywalności i oznaczalności ekstrakt zatężano 7,5-krotnie z objętości 15 mL do 2 mL. Następnie 1,5 mL roztworu organicznego przenoszono do fiolki o pojemności 2 mL i dodawano 20 µL roztworu standardu wewnętrznego (dodekanu w chloroformie - GC lub DMMP w acetonitrylu – LC).

5.4.4. Sporządzenie wykresów kalibracyjnych

Do wyznaczenia wykresów kalibracyjnych zastosowano wzorcowe roztwory analitów w acetonie. Roztwory otrzymano w wyniku serii rozcieńczeń wyjściowego roztworu o stężeniu 1 mg/mL. Wszystkie operacje przeprowadzono zgodnie z zasadami chemii analitycznej [157]. Stężenia roztworów wzorcowych znajdowały się w zakresie od 5 do 1000 ng/mL. W wyniku przeprowadzenia serii analiz ilościowych próbek o wzorcowych stężeniach poszczególnych analitów, na podstawie otrzymanych wartości powierzchni pików sporządzono wykresy ich zależności od stężenia poszczególnych substancji.

5.4.5. Walidacja opracowanych metod analizy materiałów wybuchowych

Według normy ISO 17025 walidacja to zbiór wymagań, które laboratorium musi spełnić w celu udowodnienia swych kompetencji [158]. Sprawdzanie metody analitycznej jest ważnym czynnikiem, aby zapewnić, że metodologia analityczna jest poprawna. Walidacja metody pozwala sprawdzić poprawne jej działanie i jest czasami określana, jako proces dostarczania udokumentowanych dowodów, że metoda działa zgodnie z przeznaczeniem.

Podstawowymi parametrami, które podlegają walidacji według Międzynarodowej Rady Harmonizacji Wymagań Technicznych dla Rejestracji Produktów Leczniczych Stosowanych u Ludzi (*International Conference on Harmonisation - ICH*) są [159]:

- Dokładność,
- Precyzja,
- Powtarzalność,
- Specyficzność,
- Granica wykrywalności,
- Granica oznaczalności,
- Liniowość i jej zakres,
- Czułość.

5.4.5.1. Dokładność

Dokładność procedury analitycznej wyraża się, jako zgodność między wartością rzeczywistą, a wartością będącą wynikiem analizy. Parametr został wyznaczony na podstawie 9 oznaczeń dla trzech różnych poziomów stężeń. Do obliczeń wykorzystano równanie:

$$D = \frac{x}{\mu} \times 100\% \quad 14)$$

gdzie: x - oznaczone stężenie analitu, μ - rzeczywiste stężenie analitu, D - dokładność.

Aby uznać, że metoda jest dokładna wyznaczona wartość musi mieścić się w zakresie od 80-120%.

5.4.5.2. Precyzja

Precyzja aparatu pomiarowego wyraża stopień rozproszenia między serią oznaczeń uzyskanych z wielokrotnego oznaczania analitu tej samej próbki w określonych warunkach. Parametr został wyznaczony na podstawie 3 oznaczeń dla trzech różnych poziomów stężeń. Można ją wyrazić za pomocą współczynnika zmienności (CV), odchylenia standardowego (SD), bądź względnego odchylenia standardowego (RSD) opisanych następującymi wzorami

$$CV = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100\% \quad 15)$$

gdzie: SD - odchylenie standardowe, \bar{x} - wartość średnia, CV - precyzja wyrażona, jako współczynnik zmienności.

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x - \bar{x})^2}{N - 1}} \quad 16)$$

gdzie: SD - odchylenie standardowe, \bar{x} - wartość średnia, x – kolejny wynik próby, liczba powtórzeń prób.

$$RSD = \frac{SD}{\bar{x}} \quad 17)$$

gdzie: SD - odchylenie standardowe, \bar{x} - wartość średnia.

Do celów wyznaczenia precyzji wykorzystano wartość CV. Aby uznać, że metoda jest precyzyjna – współczynnik zmienności oznaczania składników na poziomie śladowym nie powinno być większe niż 15%.

5.4.5.3. Powtarzalność metody badawczej

Powtarzalność metody wyraża precyzję oznaczeń na tym samym materiale badawczym wykonanych w krótkim odstępie czasu, przez tego samego analityka, w tym samym laboratorium, tą samą metodą. Można ją wyrazić za pomocą tych samych wzorów co precyzje aparatury badawczej, tzn. wzoru 19, 20 i 21.

Parametr został wyznaczony na podstawie 6 niezależnych pomiarów analitów na najwyższym stężeniu z zakresu krzywej kalibracyjnej – 1000 ng/mL – za pomocą trzech metod. Jednakże do kryterium akceptowalności wykorzystano współczynnik zmienności, który nie powinien być większy niż 15%.

Ponadto wyznaczono granice powtarzalności. Jest to wartość, której z prawdopodobieństwem 85% nie przekracza wartości bezwzględnej różnicy między dwoma skrajnymi wynikami badania otrzymanymi w spełnionych warunkach powtarzalności [160]. Granicę powtarzalności oznacza się zwykle przez „ r ”:

$$r = 2 \sqrt{2} \times SD \quad 18)$$

5.4.5.4. Selektywność i specyficzność

Terminy „selektywność” i „specyficzność” są często używane zamiennie. Dodatkowo różne organizacje inaczej definiują jedno i drugie pojęcie. Według ISO/IEC selektywność to zdolność do oznaczenia i rozróżnienia składników (lub grupy składników) bez interferencji ze

strony pozostałych substancji obecnych w mieszaninie. Do najpopularniejszych substancji przeszkadzających w oznaczeniu możemy zaliczyć między innymi zanieczyszczenia, produkty degradacji, czy matrycę. Specyficzność oznacza, że metoda jest selektywna dla oznaczanego analitu. Termin specyficzność odnosi się do metod, które można stosować tylko do pojedynczej substancji, a selektywność odnosi się do metod, które pozwalają analizować kilka substancji i zapewniają rozróżnienie sygnałów pochodzących od poszczególnych składników. Metody bardziej specyficzne są mniej precyzyjne, natomiast mniej specyficzne są bardziej precyzyjne [161].

5.4.5.5. Granica wykrywalności i oznaczalności

Granica wykrywalności (LOD) i oznaczalności (LOQ) przedstawiają najmniejszą zawartość lub stężenie analitu, które można odpowiednio oznaczyć ilościowo i jakościowo z określonym poziomem prawdopodobieństwa. W celu wyznaczenia LOD i LOQ wykorzystano wyznaczone wykresy kalibracyjne oraz zastosowano następujące równania (19) i (20).

$$LOD = \frac{3,3 \times SD}{a} \quad 19)$$

$$LOQ = \frac{10 \times SD}{a} \quad 20)$$

gdzie: a - współczynnik nachylenia wykresu kalibracyjnego, SD - odchylenie standardowe ślepej próby.

5.4.5.6. Liniowość i jej zakres

Zakres liniowości to zakres stężeń, w których sygnał analityczny jest wprost proporcjonalny do stężenia analitu w próbce. Liniowość można określić za pomocą współczynnika determinacji R^2 dla danego zakresu stężeń. Parametr ten został wyznaczony w zakresie od 1 do 1000 ng/mL. Aby warunek liniowości był spełniony wartość R^2 powinna być równa, bądź większa od 0,995.

5.4.5.7. Czulość

Czulość metody analitycznej jest mierzona stosunkiem zmiany wartości sygnału analitycznego do odpowiadającej jej zmiany stężenia lub masy oznaczanego składnika. W przypadku zależności liniowej sygnały analitycznego od stężenia oznaczanej substancji miarą czulości jest współczynnik kierunkowy prostej „ a ”:

$$Y = ac + b \quad 21)$$

5.4.6. Przygotowanie próbek rzeczywistych do analizy chromatograficznej

Próbki osadów dennych po wyjęciu z zamrażarki pozostawiono w temperaturze pokojowej do rozmrożenia. Rozmrożone próbki wirowano dwukrotnie z prędkością 2000 obr/min przez 10 minut za każdym razem oddzielając wodę porową od osadu. Próbkę osadu homogenizowano za pomocą szpatułki laboratoryjnej i porcję 10 g umieszczano w sterylnym falkonie. Próbkę do analizy ekstrahowano wykorzystując technikę wybraną na podstawie przeprowadzonych badań. Warstwę organiczną oddzielano od osadu przez sączenie przy użyciu bibuły filtracyjnej Whatman nr 5 i suszono bezwodnym siarczanem magnezu (w przypadku analizy GC). W celu obniżenia granicy wykrywalności i oznaczalności ekstrakt zatężano 7,5-krotnie z objętości 15 mL do 2 mL. Następnie 1,5 mL roztworu organicznego przenoszono do fiolki o pojemności 2 mL i dodawano 20 μ L roztworu standardu wewnętrznego (dodekanu w chloroformie - GC lub DMMP w acetonitrylu – LC). Tak przygotowaną próbkę umieszczono w automatycznym podajniku próbek i poddano analizie za pomocą chromatografu sprzężonego z tandemowym spektrometrem mas. Wszystkie eksperymenty przeprowadzono trzykrotnie (przygotowując trzy jednakowe próbki) w celu dokonania poprawnej oceny statystycznej.

5.4.7. Wyznaczenie suchej masy próbki

Aby wyznaczyć zawartość suchej masy odmierzano do zlewki porcję 10 g zhomogenizowanego osadu dennego. Próbkę umieszczano w suszarce w temp. 70°C i dokonywano pomiaru kontrolnego masy co 24 godziny. Po uzyskaniu jednakowej wartości dla dwóch kolejnych pomiarów, obliczono zawartość wody w próbce.

5.4.8. Kontrola jakości

Ponadto przed analizą próbek rzeczywistych i kilkakrotnie w trakcie całej sekwencji przeprowadzono kontrolę jakości (Quality Control, QC) w celu sprawdzenia poprawności działania całego układu analitycznego [162]. Próbki QC są niezbędne do oceny czułości urządzenia, rozdziału chromatograficznego, stanu kolumny i kalibracji masy w celu wiarygodnej identyfikacji związków. W przypadku analizy za pomocą chromatografii gazowej, kontrolę jakości przeprowadzono przy użyciu dichlorometanowego roztworu zawierającego następujące substancje: fosforan trimetylu, 2,6-dimetylofenol, 5-chloro-2-metyloanilina, fosforan tri-n-butylu, dibenzotiofen, malation, stearynian metylu i n-alkanu od C8 do C24. Wszystkie standardy miały to samo stężenie, 10 μ g/mL. Natomiast w przypadku analizy za pomocą chromatografii cieczowej, test QC przeprowadzono przy użyciu wodnego roztworu zawierającego następujące substancje: kwas metylofosfonowy, N-metylodietanolamina,

metylofosfonian etylu, tioglikol, metylofosfonian pinakolilu o stężeniu 10 µg/mL. Test QC przeprowadzano w odpowiedniej kolejności: najpierw rozpuszczalnik, potem testująca próbka standardowa QC, następnie próbka ślepa, a w końcu próbki środowiskowe.

5.5. Standaryzacja i błędy pomiarowe

Wszystkie czynności związane z przygotowaniem próbek i ich analizą zostały powtórzone od trzech do pięciu razy. Uzyskane wyniki poddano standaryzacji z zastosowaniem testu statystycznego Q-Dixona [163]. Wykonanie testu sprowadza się do obliczenia dwóch parametrów Q_1 i każdego Q_n z niemalejącego ciągu, oraz ich porównania z wartością krytyczną (Q_{kr}) odczytaną z tablicy statystycznej testu Q-Dixona. Aby poprawnie wykonać obliczenia w pierwszej kolejności należy uszeregować wyniki pomiarów w ciąg niemalejący (każdy kolejny wyraz ciągu ma być większy lub równy wyrazowi poprzedniemu). Test jest przeprowadzany dla wartości skrajnej o wartości niepewnej. Według założeń rezultat pomiaru uznaje się za miarodajny, jeżeli wartość ilorazu Q_1/Q_n wyrażonej równaniem (22) i (23) jest mniejsza od wartości Q_{kr} (tab. 9).

$$Q_1 = \frac{x_2 - x_1}{R} \quad (22)$$

$$Q_n = \frac{x_n - x_{n-1}}{R} \quad (23)$$

gdzie: x_1 – najmniejsza wartość pomiaru, x_2 – wartość pomiaru następująca po x_1 według wielkości rosnących, x_n – największa wartość pomiaru, x_{n-1} – wartość pomiaru poprzedzająca x_n według wartości rosnących, a R – wartość rozstępu, czyli różnica między x_n i x_1 . Jest to różnica pomiędzy wynikiem najwyższym (ostatni wyraz ciągu) a wynikiem najniższym (pierwszy wyraz ciągu).

Tabela 9. Wartości krytyczne parametru Q dla testu Dixona.

N	90%	95%	99%
3	0,941	0,97	0,994
4	0,765	0,829	0,926
5	0,642	0,710	0,821
6	0,560	0,625	0,740
7	0,507	0,568	0,680
8	0,468	0,526	0,634
9	0,437	0,493	0,598
10	0,412	0,466	0,568

Dla każdego przeprowadzonego eksperymentu wyznaczany był błąd pomiarowy zgodnie z równaniem (24).

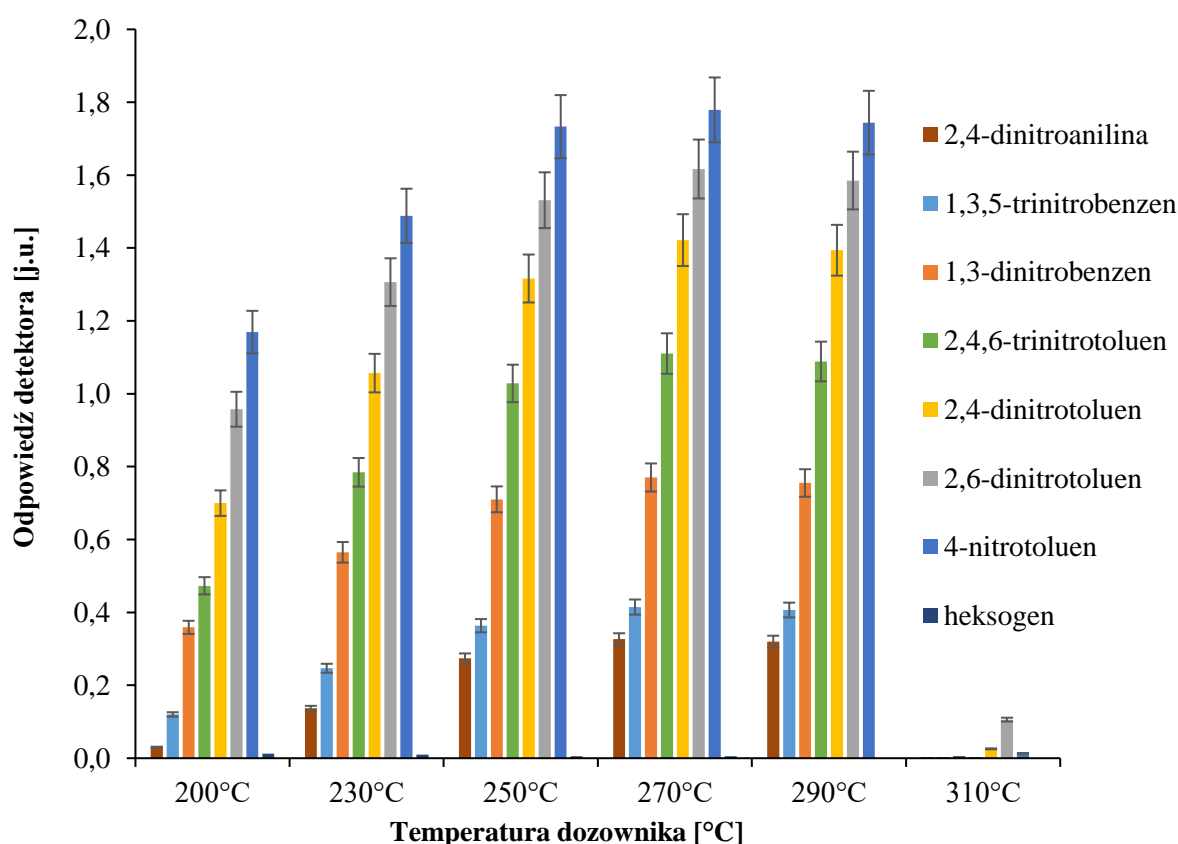
$$\varepsilon = \frac{SD}{\mu} \times 100\% \quad (24)$$

gdzie: ε – błąd pomiarowy, μ – średnia wyników pomiarowych, SD – odchylenie standardowe.

6. Otrzymane wyniki i ich dyskusja

6.1. Warunki analizy za pomocą GC-MS/MS

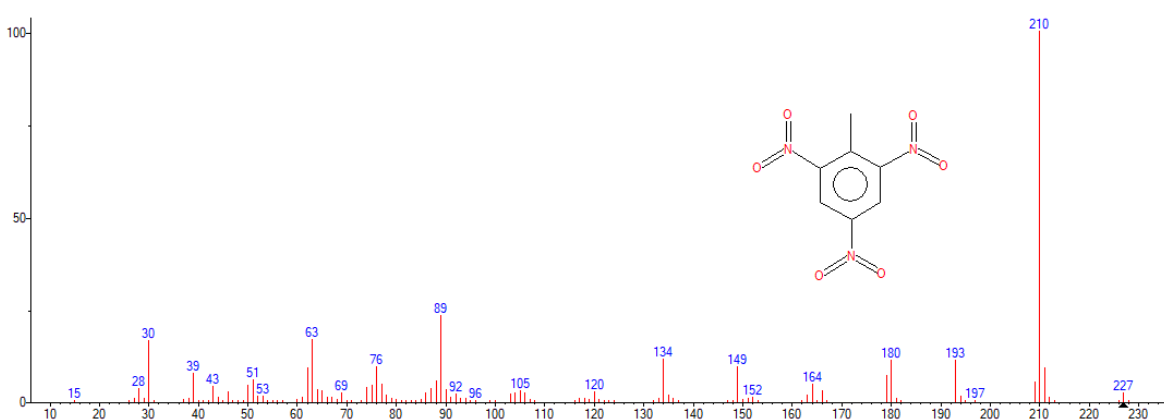
Pierwszym krokiem w ustaleniu programu analizy chromatograficznej było dobranie temperatury dozownika przy której uzyskiwany jest najwyższy sygnał odpowiedzi detektora. W wyniku przeprowadzonych badań nie zarejestrowano sygnału analitycznego pochodzącego od HMX i TNBA, a sygnał pochodzący od RDX był na granicy szumów i zanikł wraz ze wzrostem temperatury od 200 do 310°C. Na podstawie rysunku 20 dla pozostałych związków stwierdzono, że wzrost intensywności sygnału analitycznego rośnie wraz ze wzrostem temperatury dozownika do osiągnięcia temperatury 270°C.



Rys. 20. Wykres zależności intensywności sygnału analitycznego od temperatury dozownika GC-MS/MS dla badanych związków.

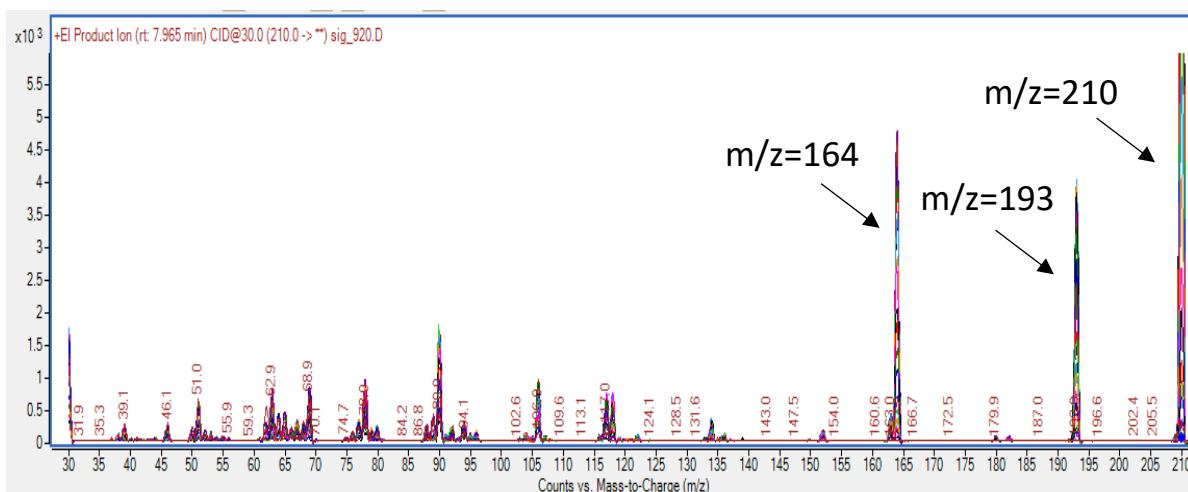
Do dalszych analiz jako temperaturę optymalną wybrano 270°C, ponieważ po jej przekroczeniu następuje spadek intensywności sygnałów analitycznych, a gdy temperatura dozownika wynosiła 310°C - niemal całkowity ich zanik, co spowodowane jest rozkładem termicznym tych związków.

Kolejnym etapem w ustaleniu metody analizy było opracowanie trybu pracy MRM spektrometru. W tym celu wyznaczono widma mas dla wszystkich badanych analitów. Na podstawie uzyskanych widm wybrano jon prekursora o możliwie największej wartości m/z oraz wykazujący stosunkowo największą intensywność. W przypadku TNT (widmo mas - rys. 21) jako jon prekursora wybrano jon o $m/z = 210$.



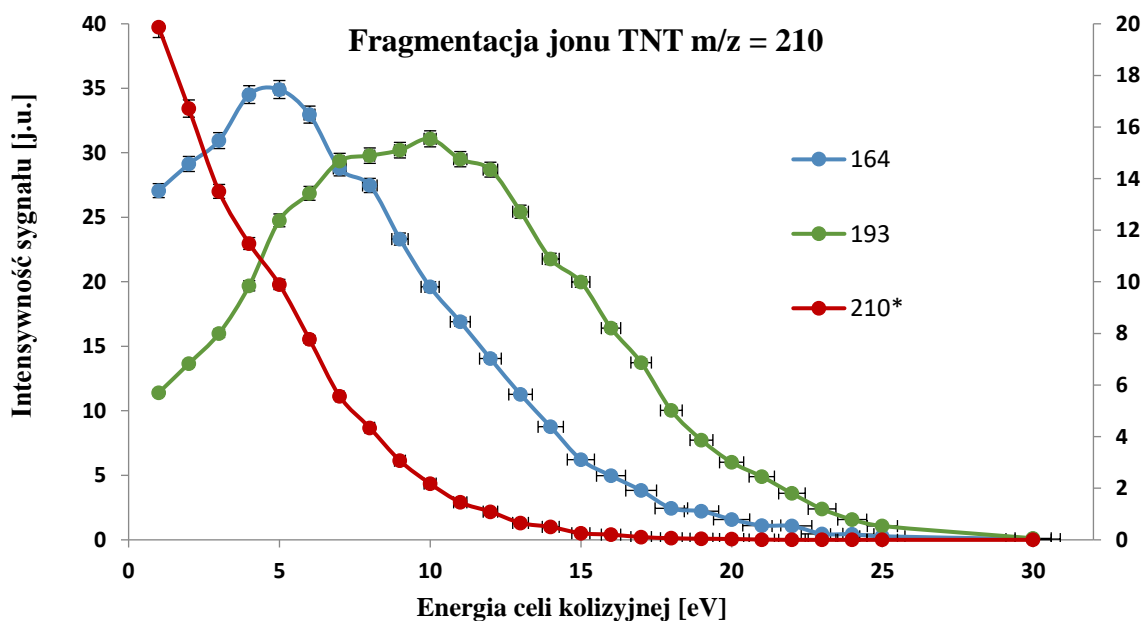
Rys. 21. Widmo mas TNT.

Po wybraniu jonu prekursora dla każdego ze związków wykonano analizy w trybie monitorowania jonów fragmentacyjnych pochodzących od tego jonu przy energiach kolizyjnych z przedziału 0-30 eV. Na podstawie uzyskanych widm mas jonu prekursora w zależności od wartości energii kolizyjnej wybrano trzy najbardziej intensywne jony produktów. Dla TNT są to jony o następujących masach (m/z): 164, 193 i 210 (rys. 22).



Rys. 22. Zestawienie widm masowych TNT w trybie Pro-IS przy zastosowaniu wybranych zmienianych skokowo wartości energii celi kolizyjnej.

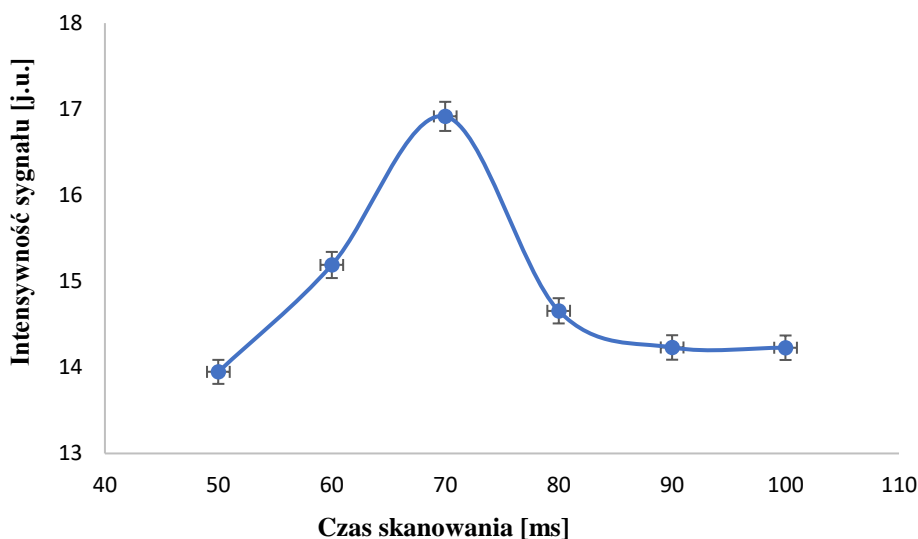
Dla wytypowanych jonów produktów sporządzono wykres zależności intensywności sygnału analitycznego od wartości energii kolizyjnej. Następnie na podstawie otrzymanych zależności wybrano energie kolizyjne dla których wybrane jony produktów miały największą intensywność. Na podstawie wyników przedstawionych na rysunku 23 można stwierdzić, że dla TNT największą intensywność wybranych jonów produktów uzyskano dla następujących energii kolizyjnych: 5 eV, 10 eV, 0 eV, odpowiednio dla jonów o m/z : 164, 193 i 210.



Rys. 23. Wykres zależności intensywności sygnału analitycznego od energii celi kolizyjnej dla wybranych jonów produktów uzyskanych dla jonu prekursora TNT – 210.

Po wyznaczeniu odpowiednich przejść jonowych: jon prekursora – jon produktu dla badanych związków wyznaczono czas skanowania, przy którym wartość sygnału analitycznego jest największa. Jest to czas potrzebny do wykonania skanów (zliczeń) dla każdego jonu

z zadanego zakresu m/z. Na podstawie wyników przedstawionych na rysunku 24 (zależność intensywności sygnału analitycznego od czasu skanowania) wynika, że w przypadku TNT maksimum sygnału uzyskujemy przy czasie skanowania równym 70 ms.



Rys. 24. Wykres zależności intensywności sygnału analitycznego w trybie pracy MRM od czasu skanowania dla TNT.

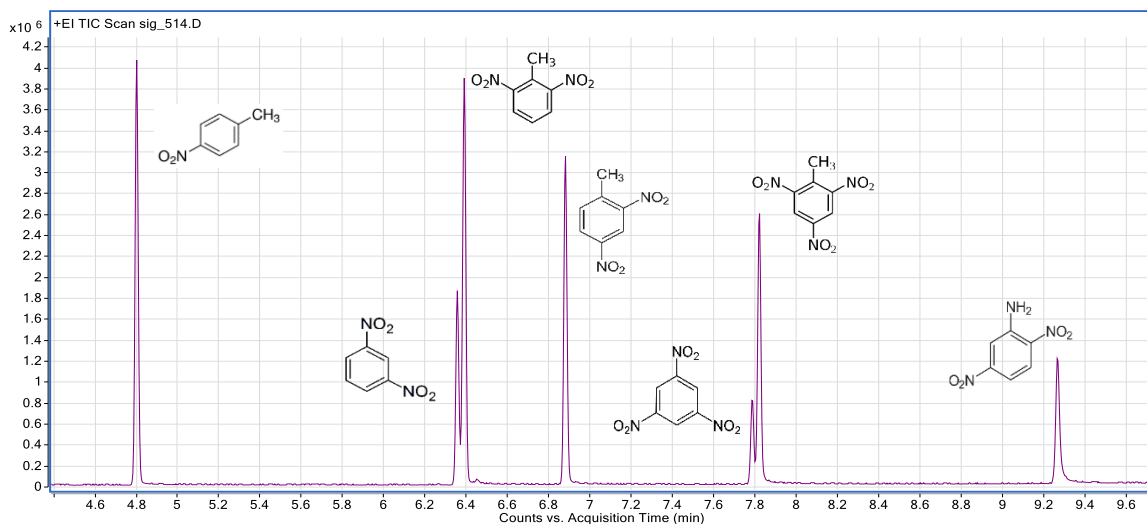
W tabeli 10 przedstawiono wyznaczone parametry trybu MRM dla wszystkich badanych związków. W przypadku TNBA i HMX analiza na poziomie stężeń $\mu\text{g/mL}$ jest niemożliwa z wykorzystaniem GC-MS/MS. Związki te rozkładają się pod wpływem temperatury w dozowniku chromatografu. Ponadto sygnał analityczny otrzymany dla 1,3,5-TNB w obecności TNBA będzie pochodził od sumy ilości tego związku i TNBA. Czas skanowania odpowiadający największej intensywności sygnałów dla wszystkich analitów poza heksogenem był taki sam i wynosił 70 ms.

Tabela 10. Parametry pracy tandemowego detektora mas w trybie MRM dla badanych analitów.

<i>Analit</i>	Przejścia jonowe	Energia celi kolizyjnej [eV]	Czas skanowania [ms]	Rodzaj przejścia
<i>TNT</i>	210 → 210	0	70	ilościowe
	210 → 193	10		jakościowe
	210 → 164	5		
<i>1,3,5-TNB</i>	213 → 213	0	70	ilościowe
	213 → 167	10		jakościowe
	213 → 120	21		
<i>1,3-DNB</i>	168 → 75	24	70	ilościowe
	168 → 122	8		jakościowe
	168 → 92	13		

<i>2,4-DNT</i>	165 → 165	0	70	ilościowe
	165 → 119	5		jakościowe
	165 → 118	9		
<i>2,6-DNT</i>	165 → 165	0	70	ilościowe
	165 → 148	9		jakościowe
	165 → 90	15		
<i>4-NT</i>	137 → 107	4	70	ilościowe
	137 → 91	17		jakościowe
	137 → 79	12		
<i>2,4-DNA</i>	183 → 183	0	70	ilościowe
	183 → 153	10		jakościowe
	183 → 107	16		
<i>RDX</i>	128 → 71	6	50	ilościowe
	128 → 46	15		jakościowe
	120 → 46	10		
<i>HMX</i>	---	---	---	---
<i>TNBA</i>	---	---	---	---

Po opracowaniu trybu MRM, każdy badany związek poddano analizie celem sprawdzenia czy opracowana metod analityczna nadaje się do analizy ich śladowych ilości poniżej 1 µg/mL. Na tej podstawie odrzucono RDX z dalszych badań, gdyż analiza stężenia odpowiadającego najwyższemu stężeniu wykorzystanemu do sporządzenia wykresu kalibracyjnego nie wykazała obecności piku tego związku na chromatogramie. Najwyższe stężenie na krzywej było 100 krotnie mniejsze od stężenia roztworów używanych do opracowania przejść jon prekursora – jon produktu. Dla związków: TNT; 1,3,5-TNB; 1,3-DNB; 2,4-DNT; 2,6-DNT; 4-NT i 2,4-DNA opracowano następujący program temperaturowy: kolumnę ogrzewano od 70 do 250°C z szybkością 20°C/min, a końcową temperaturę utrzymywano przez 15 minut dla próbek środowiskowych i przez 2 minuty dla próbek zawierających wzorce analitów w czystym rozpuszczalniku. Czas usuwania rozpuszczalnika z detektora wyznaczono na 3 minuty.

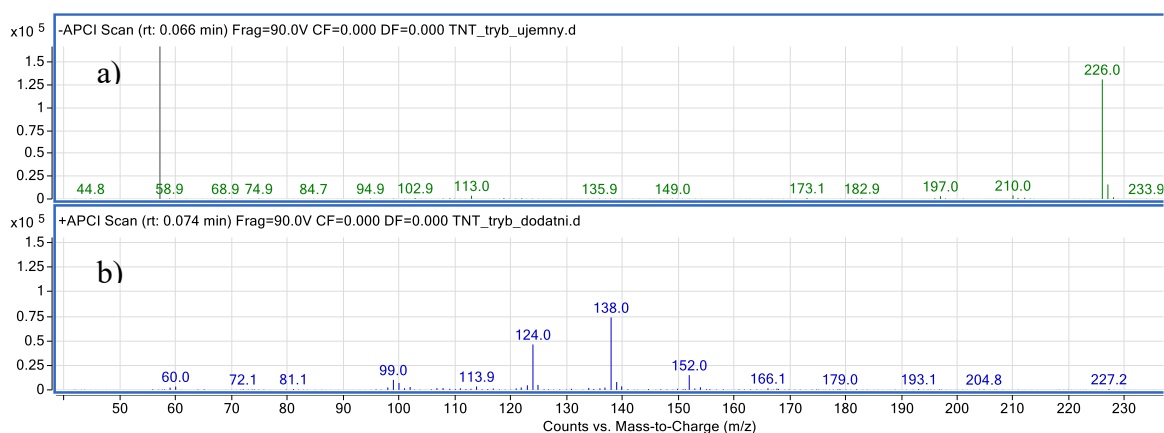


Rys. 25. Chromatogram otrzymany podczas analizy mieszaniny analitów za pomocą GC-MS/MS zawierającej: a) 4-NT, 1,3-DNB, 2,6-DNT, 2,4-DNT, 1,3,5-TNB, TNT i 2,4-DNA.

Ponieważ niektóre anality miały podobne czasy retencji (co jest widoczne na rys. 25), konieczne było wykonanie dwóch kolejnych analiz: jedna prowadzona była dla mieszaniny składającej się z 2,6-DNT i 1,3,5-TNB, a druga – dla mieszaniny: 4-NT; 1,3-DNB; 2,4-DNT; TNT i 2,4-DNA.

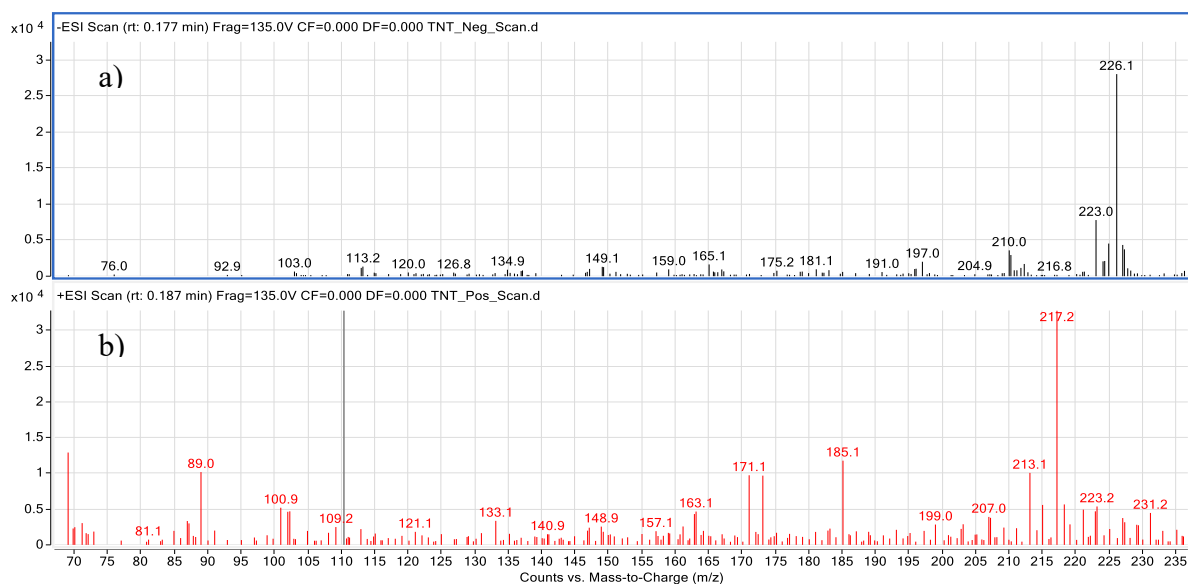
6.2. Warunki analizy za pomocą LC-MS/MS

Pierwszym etapem opracowania metody analizy MW i produktów ich rozkładu za pomocą LC-MS/MS jest dobór źródła jonów i rodzaju polaryzacji. W przypadku jonizacji APCI prawie wszystkie związki uległy jonizacji w trybie ujemnym. Wyjątkiem był 4-NT, który nie ulegał jonizacji w żadnych warunkach. Natomiast, podczas zastosowania jonizacji ESI 1,3-DNB i 4-NT ulegały jonizacji przy polaryzacji dodatniej, a wszystkie pozostałe badane związki – przy polaryzacji ujemnej.



Rys. 26. Widma mas TNT otrzymane podczas jonizacji APCI w trybie polaryzacji: a) ujemnej i b) dodatniej.

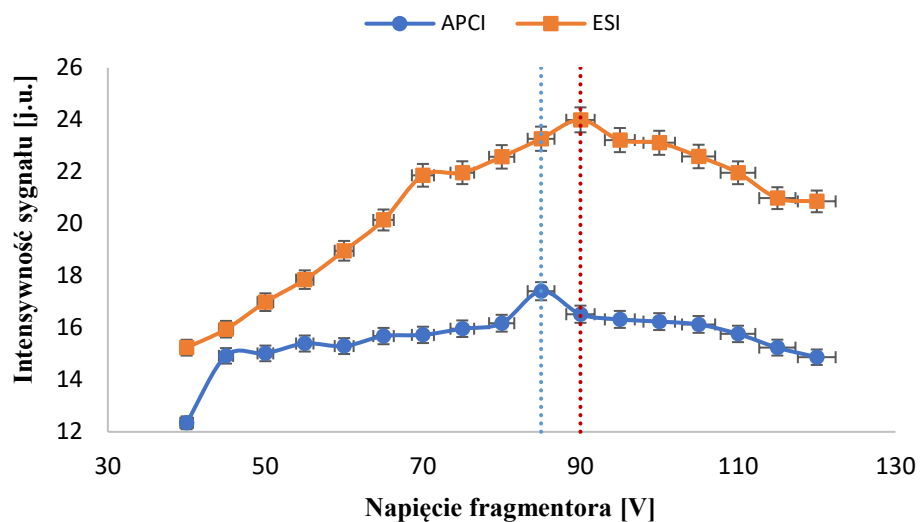
Na rysunku 26 przedstawiono widma mas TNT otrzymane podczas analizy za pomocą LC-APCI-MS/MS z zastosowaniem polaryzacji ujemnej i dodatniej. W trybie jonizacji ujemnej obserwujemy charakterystyczny jon 226, który powstał wskutek odłączenia się protonu (H^+) od cząsteczki trotylu. Z kolei na widmie uzyskanym w trybie jonów dodatnich widzimy jon 227, który powstał w skutek odłączenia się elektronu (e^-). Jednak występuje on w bardzo małych ilościach, co uniemożliwia jego zastosowanie w analizie TNT. Na rysunku 27 przedstawiono widma mas TNT uzyskane przy zastosowaniu jonizacji ESI. Jon charakterystyczny powstały podczas zastosowania polaryzacji ujemnej jest taki sam jak w przypadku APCI - 226.



Rys. 27. Widma mas TNT otrzymane podczas jonizacji ESI w trybie polaryzacji: a) ujemnej i b) dodatniej.

Podczas powstawania jonów charakterystycznych oprócz przyłączenia/odłączenia protonu lub przyłączenia elektronu do cząsteczki analitu miało miejsce również przyłączenie anionu mrówczanowego i chlorkowego. Anion mrówczanowy był dodatkiem do fazy ruchomej, a jon chlorkowy pochodzi prawdopodobnie ze szkła naczynia, w którym przygotowywane były roztwory analitów.

Kolejnym etapem badań było wyznaczenie takiego napięcia fragmentora, dla którego sygnał analityczny będzie największy. Dla TNT są to napięcia odpowiednio: 85V dla jonizacji APCI i 90V dla jonizacji ESI (rys. 28). Parametry jonizacji dla pozostałych związków przedstawiono w tabeli 11.



Rys. 28. Wykres zależności intensywności sygnału analitycznego TNT od napięcia fragmentatora dla źródeł jonizacji APCI i ESI.

Kolejnym etapem było wyznaczenie przejść jonowych (jon prekursora – jon produktu) i takiej energii kolizyjnej, przy której wartość sygnału analitycznego jest największa. Procedura ta przebiegała analogicznie do procedury wyznaczania przejść jonowych w GC-MS/MS i została opisana w punkcie 5.4.1.3. Wyznaczone parametry trybu MRM dla wszystkich analizowanych w pracy związków przedstawiono w tabeli 11.

Tabela 11. Parametry pracy spektrometru mas w trybie MRM przy zastosowaniu jonizacji ESI i APCI.

Analit	Jonizacja ESI					Jonizacja APCI						
	Jon prekursora	Jon produktu	Napięcie fragmentora [V]	Energia celi kolizyjnej [eV]	Polaryzacja	Jon prekursora	Jon produktu	Napięcie fragmentora [V]	Energia celi kolizyjnej [eV]	Polaryzacja		
TNT	226	46	90	31	ujemna	226	42	85	20	ujemna		
		76		20			50		100			
		196		7			196		4			
RDX	257	46	60	4	ujemna	267	45	45	5	ujemna		
		82		0			46		5			
		93		0			92		1			
HMX	331	46	80	20	ujemna	341	45	70	28	ujemna		
		109		8			46		28			
		183		4			73		5			
4-NT	138	65	70	33	dodatnia	---	---	---	---	---		
		91		15							---	---
		92		7								
TNBA	212	63	75	12	ujemna	214	46	80	120	ujemna		
		64		7			138		8			
		92		5			184		4			
2,4-DNA	182	46	90	21	ujemna	182	46	100	0	ujemna		
		122		17			122		16			
		152		12			182		23			
1,3-DNB	169	57	65	13	dodatnia	168	46	95	20	ujemna		
		71		8			108		15			
		137		3			138		5			
2,6-DNT	181	93	60	12	ujemna	181	89	90	10	ujemna		
		113		0			123		10			
		137		3			151		5			
2,4-DNT	181	46	80	32	ujemna	181	46	115	60	ujemna		
		116		10			116		8			
		135		18			135		20			
1,3,5-TNB	212	46	115	16	ujemna	213	46	100	36	ujemna		
		63		12			63		28			
		64		7			183		8			

Po wyznaczeniu parametrów potrzebnych do prowadzenia analizy badanych związków w trybie MRM, przystąpiono do ustalenia wartości parametrów pracy źródła jonizacji, takich jak: temperatura gazu w rozpylaczu, natężenie przepływu gazu w rozpylaczu, temperatura gazu osłonowego, natężenie przepływu gazu osłonowego, ciśnienie w rozpylaczu, napięcie na układzie elektrooptycznym, napięcie na kapilarze, temperatura odparownika oraz natężenie wyładowania koronowego. W tabeli 12 i 13 przedstawiono wyniki badań uzyskane dla TNT przy użyciu odpowiednio źródła ESI i APCI. Czerwonym kolorem zaznaczono wartości, przy których wartość sygnału analitycznego była największa. Analogicznie wyznaczono parametry pracy źródła jonów dla wszystkich badanych związków.

Tabela 12. Zestawienie parametrów pracy źródła jonów ESI dla TNT.

Temp. gazu w rozpylaczu [°C]	Pow. piku [j.u.]	Przepływ gazu w rozpylaczu [L/min]	Pow. piku [j.u.]	Temp. gazu osłonowego [°C]	Pow. piku [j.u.]	Przepływ gazu osłonowego [L/min]	Pow. piku [j.u.]	Ciśnienie w rozpylaczu [psi]	Pow. piku [j.u.]	Napięcie na układzie elektrooptycznym [V]	Pow. piku [j.u.]	Napięcie na kapilarze [V]	Pow. piku [j.u.]
230	1149	4	1569	200	330	4	380	10	835	0	2310	500	158
260	1666	6	2064	225	425	6	653	15	1571	500	1437	1000	277
290	1702	8	2273	250	586	8	1141	20	2082	1000	974	1500	1540
320	1766	10	2274	275	681	10	1666	25	2196	1500	938	2000	2037
350	1775	12	2298	300	902	12	2310	30	2263	2000	793	2500	2381
				325	1030			35	2271			3000	2388
				350	1123			40	2415			3500	2307
				375	1213			45	2309			4000	2251
				400	1601			50	2194			4500	2106
								55	2117			5000	1941
								60	1789			5500	1856

Tabela 13. Zestawienie parametrów pracy źródła jonów APCI dla TNT.

Temp. gazu w rozpylaczu [°C]	Pow. piku [j.u.]	Temp. odparownika [°C]	Pow. piku [j.u.]	Przepływ gazu w rozpylaczu [L/min]	Pow. piku [j.u.]	Ciśnienie w rozpylaczu [psi]	Pow. piku [j.u.]	Natężenie wyładowania koronowego [µA]	Pow. piku [j.u.]	Napięcie na kapilarze [V]	Pow. piku [j.u.]
200	78	200	78	4	2652	10	149	1	22	500	549
250	755	250	755	6	5322	20	698	2	469	1000	664
300	922	300	922	8	8339	30	961	3	1028	1500	1832
350	2483	350	2483	10	2913	40	763	4	1218	2000	1919
		400	2264	12	1155	50	563	5	1399	2500	2002
		450	1896			60	598	6	1748	3000	2189
								7	1788	3500	1849
								8	1382	4000	1311
								9	1341	4500	1029
								10	1330	5000	605
										5500	328

W celu opracowania metody analizy mieszaniny wcześniej wytypowanych związków niezbędne było dobranie wspólnych parametrów źródła jonów. Aby wszystkie anality mogły być analizowane podczas jednego przebiegu procesu chromatograficznego należało dobrać kompromisowe parametry tak, aby uzyskać zadawalające wyniki dla wszystkich analitów bez znaczącej utraty intensywności sygnału żadnego z nich. Odpowiednio dobrane parametry obu stosowanych źródeł tandemowego spektrometru mas przedstawiono w tabeli 14.

Wykorzystując wyznaczone parametry pracy spektrometru mas zarówno dla jonizacji ESI, jak i APCI przeprowadzono analizę każdego związku o stężeniu 1000 µg/mL. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że zarówno LC-ESI-MS/MS jak i LC-APCI-MS/MS nadaje się do analizy śladowych ilości: RDX; HMX; TNT; 2,4-DNA i TNBA. Podczas analizy 1,3-DNB; 1,3,5-TNB; 2,4-DNT; 2,6-DNT i 4-NT nie zarejestrowano sygnału analitycznego na żądanym poziomie stężeń, co dyskwalifikuje te związki w analizie śladowej za pomocą LC-MS/MS niezależnie od rodzaju zastosowanej jonizacji.

Tabela 14. Zestawienie parametrów pracy źródła jonów APCI i ESI dla mieszaniny badanych związków.

ESI		APCI		
Parametr źródła jonów	2,4-DNA, TNT, TNBA, HMX, RDX	Parametr źródła jonów	2,4-DNA, TNT, TNBA	RDX, HMX
Temp. gazu w rozpylaczu [°C]	260	Temp. gazu w rozpylaczu [°C]	350	250
Natężenie przepływu gazu w rozpylaczu [mL/min]	8	Temp. odparownika [°C]	350	250
Temp. gazu osłonowego [°C]	400	Natężenie przepływu [mL/min]	8	8
Natężenie przepływu gazu osłonowego [mL/min]	12	Ciśnienie w rozpylaczu [psi]	30	30
Ciśnienie w rozpylaczu [psi]	40	Natężenie wyładowania koronowego [µA]	6	4
Napięcie na układzie elektrooptycznym [V]	0	Napięcie na kapilarze [V]	3000	2500
Napięcie na kapilarze [V]	2800			

W przypadku analizy z wykorzystaniem jonizacji APCI niezbędne było podzielenie procedury na dwie oddzielne analizy chromatograficzne. W pierwszej monitorowano: 2,4-DNA, TNT i TNBA, a w drugiej – RDX i HMX. Spowodowane to było dużym wpływem temperatury gazu w rozpylaczu i temperatury odparownika na sygnał analityczny pochodzący od RDX i HMX. Stosując ESI jako źródło jonów, możliwe było dobranie wspólnych parametrów dla wszystkich analizowanych substancji.

W ciekowym chromatografii z tandemowym detektorem mas oprogramowanie MassHunter pozwala użytkownikowi wybrać konwencjonalny tryb MRM lub dynamiczny MRM. W konwencjonalnym trybie MRM na jedno okno czasowe przypadała analiza jednego analitu, z kolei w dynamicznym MRM okna czasowe analitów mogą na siebie zachodzić, co pozwala na skrócenie czasu analizy. Nieuchronność wielu pików koelucyjnych jest mniej istotna w przypadku dynamicznego MRM o ile poszczególne przejścia jonowe są specyficzne, czyli charakterystyczne dla określonego związku. Ze względu na możliwość zastosowania trybu dynamicznego MRM w trakcie badań nie było konieczności uzyskania całkowitego rozdzielenia analitów co pozwoliło skrócić czas analizy. Jednakże, równie istotnym elementem jest usunięcie wszystkich składników matrycy z układu chromatograficznego, co zapewnia jego

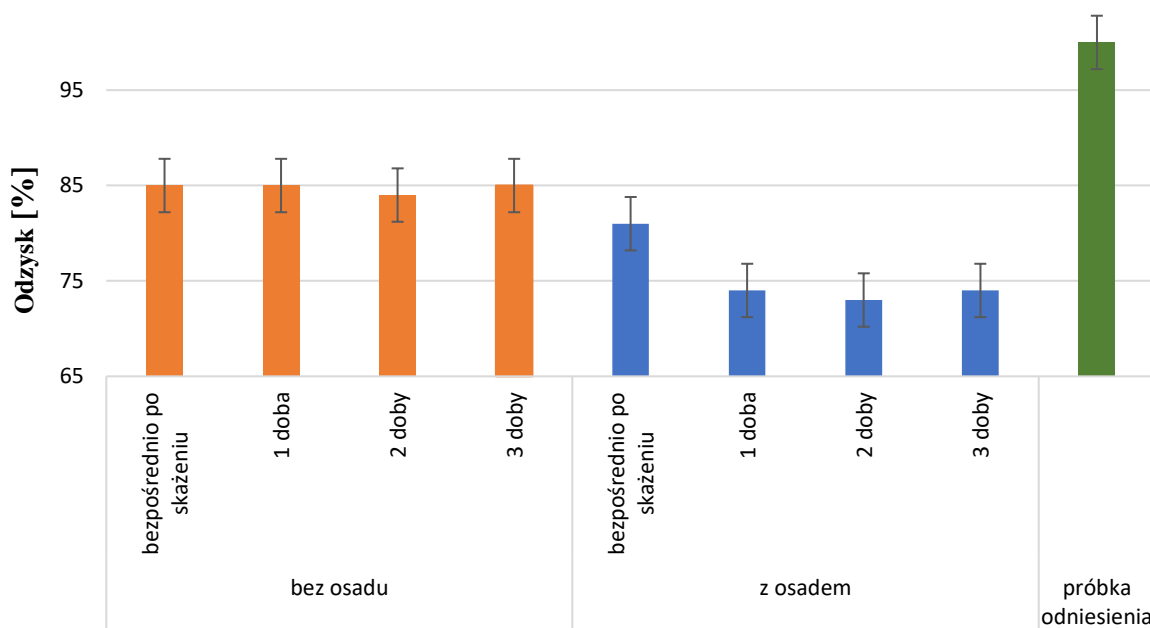
poprawne działa, nie doprowadza do przytkania kolumny lub kapilar oraz zapobiega transferowi substancji z analiz poprzednich. Opracowany program gradientu obejmował dwie fazy: A – 0,1% roztwór kwasu mrówkowego w wodzie oraz B – 0,1% roztwór kwasu mrówkowego w acetonitrylu, a program elucji gradientowej zarówno w przypadku jonizacji za pomocą ESI jak i APCI był następujący:

Tabela 15. Gradientowy program elucji.

Czas [min]	A [%]	B [%]	Natężenie przepływu [mL/min]	Maksymalne ciśnienie [bar]
0,00	90,0	10,0	0,5	600,00
1,00	90,0	10,0	0,5	600,00
5,00	0,0	100,0	0,5	600,00
7,00	0,0	100,0	0,5	600,00
7,50	90,0	10,0	0,5	600,00
9,00	90,0	10,0	0,5	600,00

6.3. Metoda skażenia próbek osadów dennych

Matryca ma znaczący wpływ na izolację analitów, a w konsekwencji na uzyskane wyniki. Jak przedstawiono na rysunku 29, gdy ekstrakcję TNT przeprowadza się z próbki bez dodatku osuszonego osadu dennego (zachowując pozostałe etapy skażenia próbki), poziomy odzysku uzyskane natychmiast po przygotowaniu próbki, a także poziomy odzysku po 1, 2 i 3 dobach są podobne. Na podstawie otrzymanych wyników można, więc stwierdzić, że czas między skażeniem, a ekstrakcją próbki nie wpływa na wartość odzysku analitu w przypadku próbki bez matrycy. Sytuacja zmienia się, gdy prowadzimy ekstrakcję próbki z dodatkiem suchego osadu dennego. Sygnał analityczny uzyskany w wyniku analizy próbki bezpośrednio po skażeniu jest porównywalny z wynikiem uzyskanym dla próbki bez obecności matrycy. Z drugiej strony próbki analizowane po upływie 1 doby od skażenia osadu dennego wykazywały o około 10% mniejszy odzysk analitu w porównaniu do próbek analizowanych bezpośrednio po skażeniu. Późniejsza analiza po skażeniu próbek osadu (2 i 3 doby) nie wpływała na odzysk analizowanego związku w porównaniu do analizy po 1 dobie.



Rys. 29. Odzyski TNT uzyskane w zależności od czasu, jaki upłynął od skażenia osadu do jego analizy.

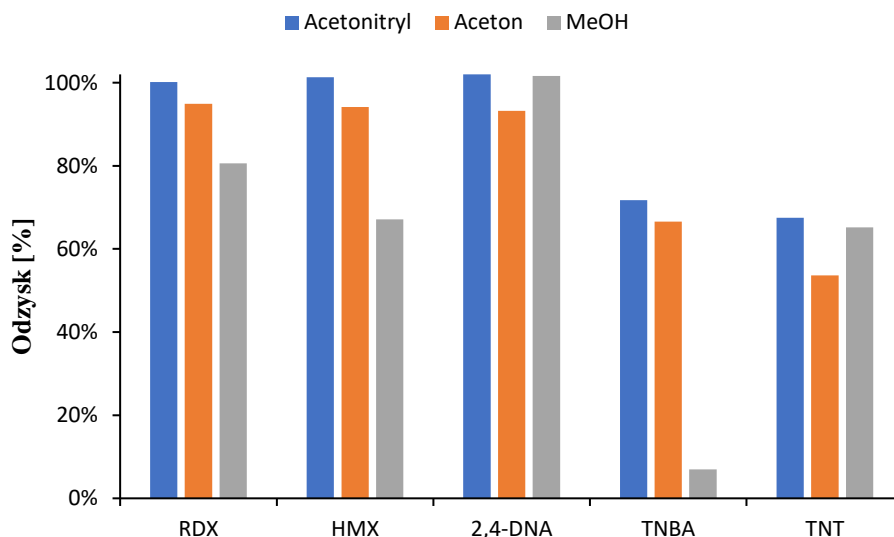
Prawdopodobnie w miarę upływu czasu TNT, ale także inne badane materiały wybuchowe i produkty ich degradacji przenikają w głąb porów, wnikając w strukturę osadu dennego, co skutkuje trudniejszym ich wydobyciem podczas ekstrakcji. Tak więc, w celu symulacji warunków w jakich znajdują się badane związki w próbkach wzorcowych do warunków panujących w środowisku naturalnym konieczne stało się pozostawienie przygotowanej próbki wzorcowej, przez co najmniej jedną dobę przed przystąpieniem do badań. Tak opracowana metoda skażenia próbek pozwala na uzyskanie powtarzalnych i stabilnych wyników analiz.

6.4. Przygotowanie próbek do analizy chromatograficznej

Przed przystąpieniem do opracowania metod ekstrakcyjnych dobrano odpowiedni rozpuszczalnik do analizy za pomocą chromatografii cieczowej i chromatografii gazowej oraz sposób suszenia próbek do analizy za pomocą GC.

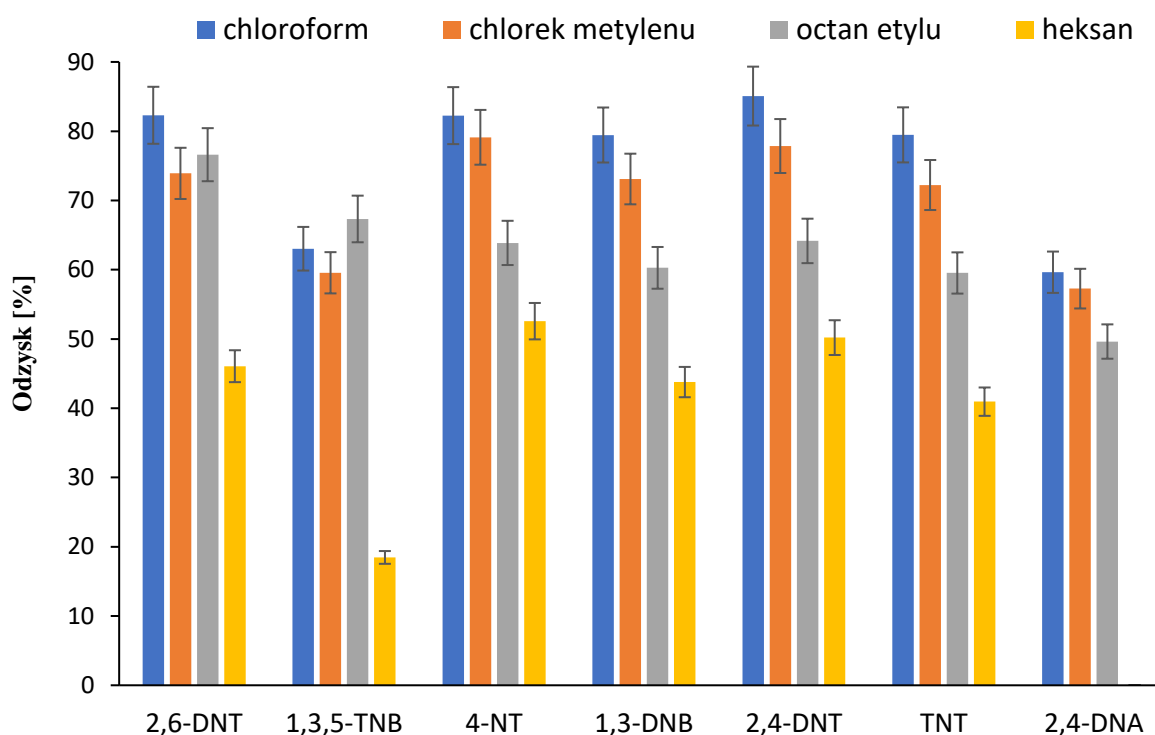
Rodzaj rozpuszczalnika odgrywa kluczową rolę w wydajności ekstrakcji. Na podstawie wyników przedstawionych na rysunku 30 można stwierdzić, że najlepszym rozpuszczalnikiem pozwalającym na uzyskanie największych wartości odzysków analizowanych związków jest acetonitryl w przypadku analizy LC-MS/MS. Niewiele mniejsze wartości odzysków otrzymano podczas zastosowania acetonu jako rozpuszczalnika ekstrahującego badane anality. Z kolei metanol okazał się najgorszym rozpuszczalnikiem do ekstrakcji, gdyż otrzymano przy jego użyciu stosunkowo niskie wartości odzysków dla RDX, HMX i TNBA. W przypadku TNBA

uzyskano odzysk na poziomie 10% co całkowicie eliminuje metanol jak czynnik ekstrahujący materiały wybuchowe i produkty ich rozkładu z osadów dennych. Do dalszych badań podczas ekstrakcji analitów z osadów dennych przed analizą za pomocą LC-MS/MS wybrano acetonitryl.



Rys. 30. Zależność odzysku od rodzaju rozpuszczalnika stosowanego do ekstrakcji analitów analizowanych za pomocą LC.

Z kolei do ekstrakcji analitów z osadów dennych przed analizą GC-MS/MS przetestowano możliwość użycia chloroformu, chlorku metylenu, octanu etylu i heksanu. Na podstawie otrzymanych wyników przedstawionych na rysunku 31 można stwierdzić, że chloroform jest najlepszym rozpuszczalnikiem do ekstrakcji materiałów wybuchowych i produktów ich rozkładu z wykorzystaniem chromatografii gazowej. W związku z tym chloroform został wybrany do dalszych badań.



Rys. 31. Zależność odzysku od rodzaju rozpuszczalnika stosowanego do ekstrakcji analitów analizowanych za pomocą GC.

Do ekstrakcji materiałów wybuchowych i produktów ich degradacji z powodzeniem można również zastosować chlorek metylenu lub octanu etylu, ponieważ wartości odzysków dla badanych związków są niewiele niższe, niż w przypadku wartości odzysków uzyskanych dla chloroformu. Najmniejsze wartości odzysków dla badanych związków otrzymano dla heksanu. Dodatkowo w przypadku stosowania tego rozpuszczalnika można stracić jeden z analitów, którym jest 2,4-DNA.

Zastosowana technika usuwania wody z ekstraktów organicznych nie miała wpływu na wielkość sygnału analitycznego podczas analizy materiałów wybuchowych i produktów ich degradacji. Obie techniki usuwania wody (suszenie za pomocą bezwodnego siarczanu magnezu i suszenie strumieniem gazu obojętnego) dawały zbliżone rezultaty. Różnica między wielkością uzyskiwanych sygnałów analitycznych mieściła się w granicy błędów, i była mniejsza niż 1%. Ponieważ stosowanie bezwodnego siarczanu magnezu jest szybsze i bardziej ekonomiczne do dalszych badań wybrano tę metodę usuwania wody z ekstraktów.

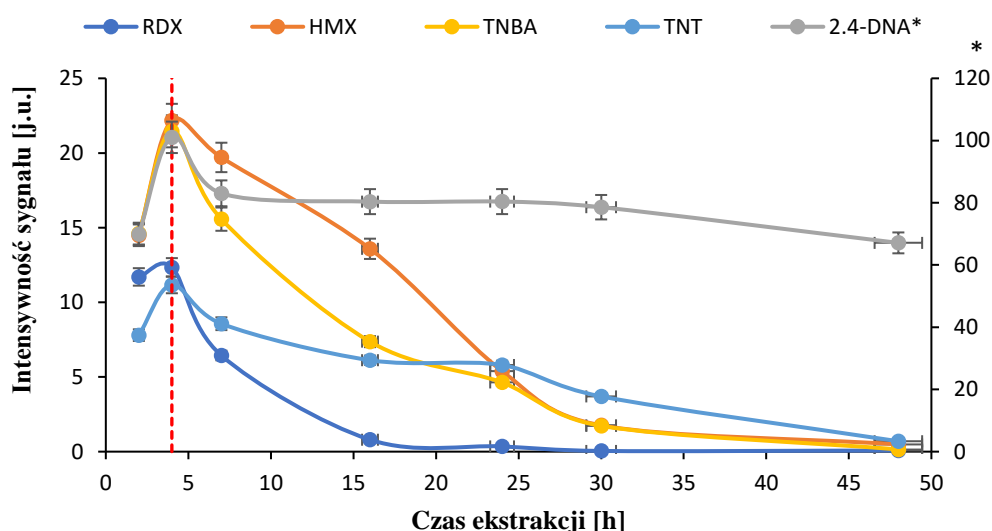
Po eksperymentalnym wyselekcjonowaniu rozpuszczalnika ekstrahującego oraz metody osuszania ekstraktu w przypadku GC-MS/MS przystąpiono do zoptymalizowania parametrów ekstrakcyjnych.

6.4.1. Ekstrakcja za pomocą rozpuszczalnika organicznego w aparacie Soxhleta

W aparacie Soxhleta, gdzie nie stosuje się wytrząsania, ultradźwięków, ciśnienia czy mikrofal, kluczowym czynnikiem wpływającym na efektywność ekstrakcji jest czas ekstrakcji. Odpowiednia wartość tego parametru wpływa bezpośrednio na wydajność ekstrakcji ze względu na maksymalną interakcję między cząsteczkami rozpuszczalnika i cząsteczkami badanych związków. Czas kontaktu i czas przebywania osadu w rozpuszczalniku podczas ekstrakcji musi być optymalny tzn. nie może być zbyt krótki ze względu na niecałkowitą ekstrakcję, ale także nie może być zbyt długi ze względu na możliwość rozkładu analitów.

Przygotowanie próbki osadu do analizy za pomocą LC-MS/MS

W przypadku ekstrakcji acetonitrylem z wykorzystaniem aparatu Soxhleta najwyższe wartości odzysków materiałów wybuchowych i produktów ich degradacji uzyskano dla 4 godzin ekstrakcji (rys. 32). Po przekroczeniu tego czasu obserwujemy wyraźny spadek intensywności sygnałów analitycznych pochodzących od badanych analitów.



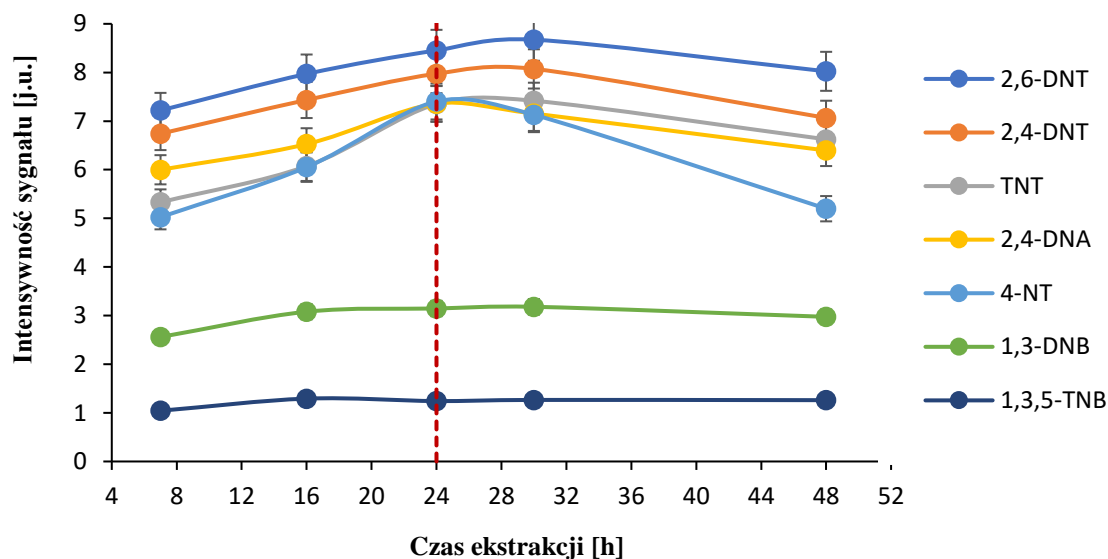
Rys. 32. Wpływ czasu ekstrakcji próbek osadów dennych za pomocą aparatu Soxhleta na wielkość sygnału analitycznego poszczególnych analitów. Ekstrakcję prowadzono acetonitrylem, a analizę uzyskanych ekstraktów przeprowadzono za pomocą LC.

Spadek wartości odzysku analitów po przekroczeniu granicy 4 godzin procesu ekstrakcji można wytłumaczyć rozkładem analitów, bądź ich reakcją z acetonitrylem w temperaturze prowadzenia procesu.

Przygotowanie próbki osadu do analizy za pomocą GC-MS/MS

Na podstawie wyników przedstawionych na rysunku 33 można stwierdzić, że sygnał analityczny wzrasta do maksimum wraz z wydłużeniem czasu ekstrakcji do 24 godzin

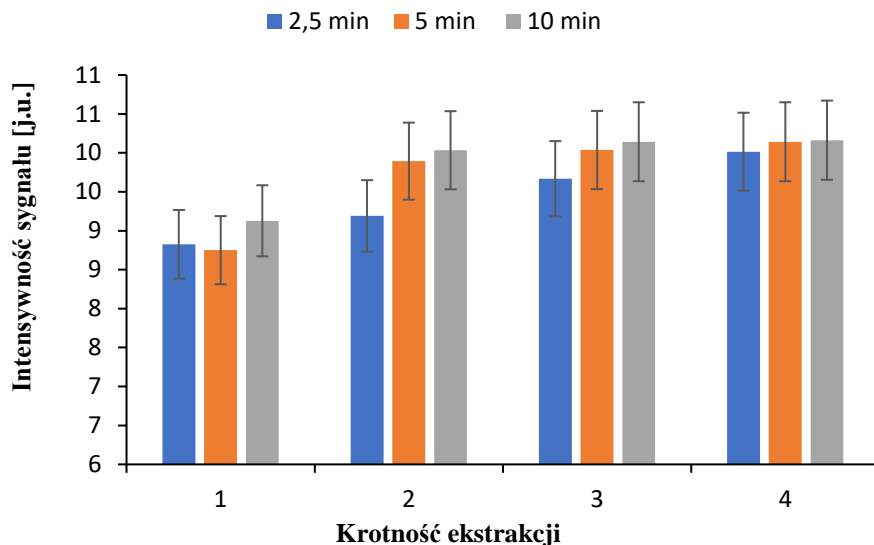
w przypadku ekstrakcji z wykorzystaniem chloroformu. Następnie stabilizuje się na krótki czas po którym ulega powolnemu spadkowi. Na tej podstawie stwierdzono, że ekstrakcję materiałów wybuchowych i produktów ich degradacji w aparacie Soxhleta z wykorzystaniem chloroformu należy prowadzić przez 24 godziny co gwarantuje maksymalny sygnał analityczny podczas analizy za pomocą aparatu GC.



Rys. 33. Wpływ czasu ekstrakcji próbek osadów dennych za pomocą aparatu Soxhleta na sygnał analityczny poszczególnych związków. Ekstrakcję prowadzono chloroformem, a analizę uzyskanych ekstraktów przeprowadzono za pomocą GC.

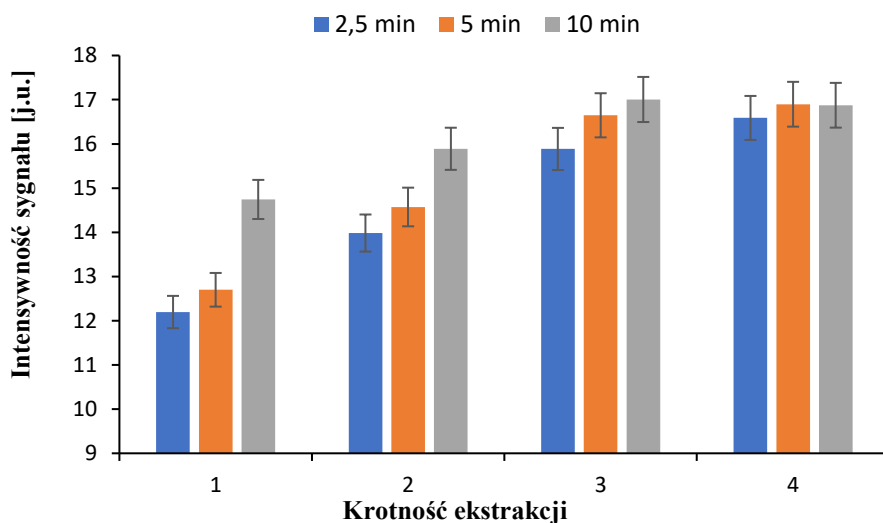
6.4.2. Ekstrakcja rozpuszczalnikiem przez wytrząsanie z osadem

Podczas ekstrakcji ciało stałe-ciecz w wyniku wytrząsania osadu dennego, zarówno z chloroformem, jak i acetonitrylem, wraz ze wzrostem czasu ekstrakcji, a także krotności ekstrakcji obserwowano wzrost wartości odzysku poszczególnych analitów. Przykładowe zależności sygnału analitycznego dla TNT od czasu ekstrakcyjnego wytrząsania i od liczby powtórzeń ekstrakcji przedstawiono na rysunku 34 dla analizy za pomocą LC oraz na rysunku 35 dla analizy za pomocą GC. Podczas zwiększania krotności ekstrakcji do 3 widoczny był wzrost wartości sygnału analitycznego pochodzącego od poszczególnych związków, natomiast po przekroczeniu tej liczby nie obserwowano ani spadku wartości sygnału analitycznego ani jego wzrostu.



Rys. 34. Wpływ czasu i liczby ekstrakcji ciała stałe-ciecz acetonitrylem na odpowiedź detektora w stosunku do TNT podczas analizy za pomocą LC.

Analogiczne zależności i rezultaty otrzymano dla pozostałych analitów. Trzykrotna ekstrakcja 10 minutowa zapewnia maksymalne odzyski i taką właśnie procedurę przyjęto do stosowania w dalszych badaniach.



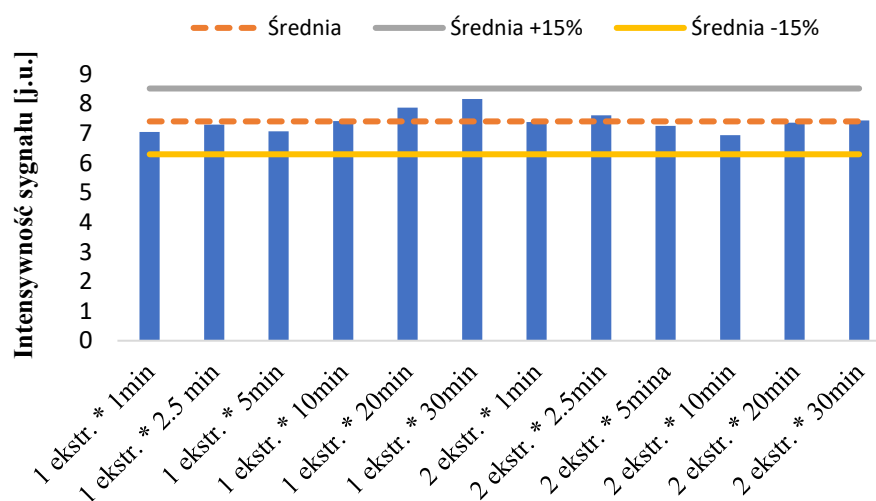
Rys. 35. Wpływ czasu i liczby ekstrakcji ciała stałe-ciecz chloroformem na odpowiedź detektora w stosunku do TNT podczas analizy za pomocą GC.

Główną zaletą tej metody jest prostota i brak potrzeby użycia dodatkowego, złożonego i kosztownego sprzętu. Zwykle dwukrotna ekstrakcja tą metodą daje satysfakcjonujące odzyski.

6.4.3. Ekstrakcja za pomocą rozpuszczalnika wspomagana mikrofalami

Przygotowanie próbki osadu do analizy za pomocą LC-MS/MS

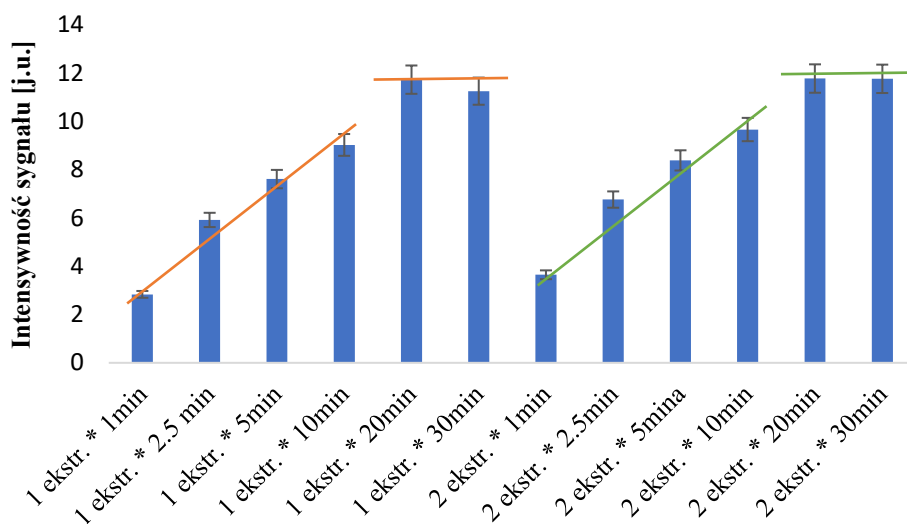
Podczas ekstrakcji MAE z zastosowaniem acetonitrylu nie zarejestrowano wpływu ani krotności ekstrakcji, ani też jej czasu trwania. Na podstawie wyników przedstawionych na rysunku 36 można stwierdzić, że niezależnie od tego czy ekstrakcja trwała 1 minutę, czy 30 minut wartość sygnału analitycznego pochodząca od TNT była praktycznie taka sama i mieściła się w granicy błędu. Z powodów ekonomicznych, do dalszych badań przyjęto jednokrotną ekstrakcję trwającą 1 minutę. W przypadku ekstrakcji analitów wspomaganej mikrofalami wartości odzysków podczas zastosowania metody analizy na LC mieściły się w zakresie od 76,5 – 86,9%.



Rys. 36. Wpływ czasu i liczby ekstrakcji wspomaganej mikrofalami z zastosowaniem acetonitrylu jako czynnika ekstrahującego na odpowiedź detektora w stosunku do TNT podczas analizy za pomocą LC.

Przygotowanie próbki osadu do analizy za pomocą GC-MS/MS

Zasadniczo inna jest sytuacja w przypadku zastosowania chloroformu do ekstrakcji wspomaganej mikrofalami osadu dennego zawierającego TNT, którą przedstawiono na rysunku 37. Tutaj wyraźnie zarysowuje się zależność intensywności sygnału analitycznego od czasu ekstrakcji. Wraz z wydłużaniem czasu ekstrakcji do 20 minut zarówno w jednokrotnej jak i dwukrotnej ekstrakcji następuje wzrost sygnału analitycznego. Gdy czas ekstrakcji wspomaganej mikrofalami przekroczy 20 minut, następuje zatrzymanie się dalszego wzrostu wydajności ekstrakcji.



Rys. 37. Wpływ czasu i liczby ekstrakcji wspomagannej mikrofalami z zastosowaniem chloroformu jako czynnika ekstrahującego na odpowiedź detektora w stosunku do TNT podczas analizy za pomocą GC.

Analogiczne rezultaty dla ekstrakcji wspomagannej mikrofalami otrzymano dla następujących związków: 4-NT, 2,4-DNT, 2,6-DNT. Podczas ekstrakcji 1,3-DNB i 2,4-DNA największą wartość odzysku otrzymujemy po 10 minutach, a w przypadku 1,3,5-TNB dopiero po 30 minutach. Biorąc pod uwagę zróżnicowane zachowanie poszczególnych związków podczas ich ekstrakcji chloroformem wspomaganym mikrofalami, jako kompromisowe i jednocześnie optymalne warunki do dalszych badań z zastosowaniem chromatografii gazowej wybrano jednokrotną ekstrakcję 30 minutową. Ta metoda ekstrakcji ma jednak poważną wadę. W wyniku procesu oddziaływania promieniowania mikrofalowego niektóre związki ulegają degradacji wskutek czego powstaje np. 2,6-DNT. W rezultacie tego zjawiska, odzysk otrzymany dla tego związku wynosi 224,5%, a dla pozostałych związków mieści się w zakresie od 39,9 do 107,4%. Z tego względu przygotowanie próbek za pomocą MAE z zastosowaniem chloroformu jako czynnika ekstrahującego nie nadaje się do analizy mieszaniny takich związków jak: TNT, 4-NT, 2,4-DNT, 2,6-DNT, 1,3-DNB, 1,3,5-TNB i 2,4-DNA.

Z innym stwierdzeniem możemy się spotkać w pracy Kjellström i współp. z 2008 roku [75]. W podsumowaniu swoich badań stwierdzają, że ekstrakcja wspomaganą mikrofalami nadaje się do analizy TNT i produktów jego degradacji. Jednakże należy zauważyć, iż badania prowadzone przez tych autorów różnią się w kilku aspektach od badań prowadzonych w niniejszej rozprawie. W przedstawionej publikacji badania opierają oni na próbkach suchej gleby, a sam proces ekstrakcji prowadzą z wykorzystaniem wodnego buforu fosforanu sodu. Ponadto mają oni możliwość pracy z bardziej zaawansowanym aparatem do ekstrakcji wspomaganym mikrofalami, który umożliwia mieszanie próbki, kontrolę temperatury, a także

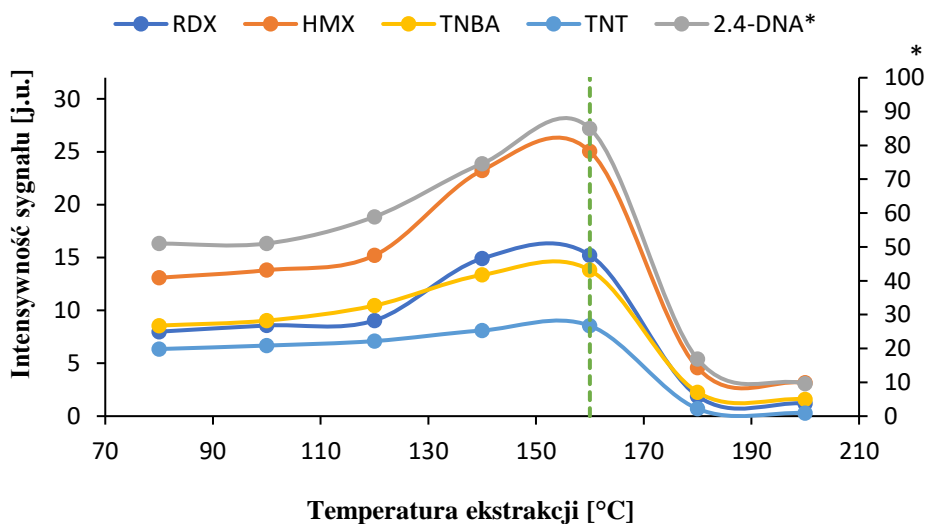
mocy pracy źródła mikrofal. Wszystkie te czynniki wpływają na rozbieżności w podsumowanych badaniach i uniemożliwiają bezpośrednie porównanie wyników.

6.4.4. Przyspieszona ekstrakcja za pomocą rozpuszczalnika

Przyspieszona ekstrakcja za pomocą rozpuszczalnika jest najbardziej złożoną metodą przygotowania próbek osadów dennych do analizy chromatograficznej omawianych w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej. W celu przygotowania próbek z wykorzystaniem ASE należy wyznaczyć cztery parametry: temperaturę pieca, czas statycznego ogrzewania, ilość rozpuszczalnika przepuszczanego przez komorę ekstrakcyjną po etapie statycznego ogrzewania oraz liczbę cykli.

Przygotowanie próbki osadu do analizy za pomocą LC-MS/MS

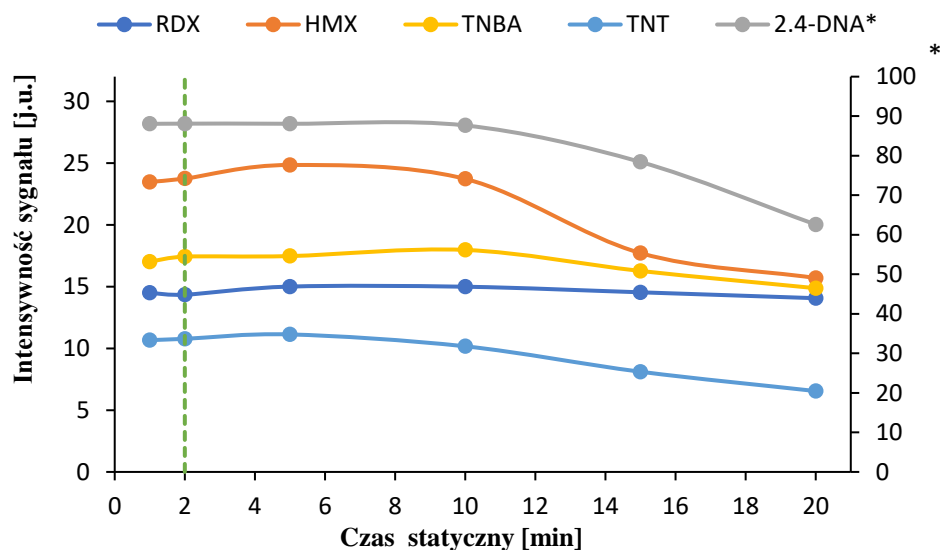
W pierwszym etapie zbadano wpływ temperatury na wydajność ekstrakcji osadów dennych acetonitrylem z zakresu od 80 do 200°C. Z danych przedstawionych na rysunku 38 wynika, że rosnąca temperatura ekstrakcji wpływa na wzrost sygnału analitycznego wszystkich badanych związków i osiąga swoje maksimum w pobliżu temperatury 160°C. Po przekroczeniu tej wartości intensywność sygnału analitycznego dramatycznie spada dla wszystkich badanych związków. Na tej podstawie jako temperaturę ekstrakcji, stosowaną podczas optymalizacji pozostałych parametrów przyjęto temperaturę 160°C.



Rys. 38. Wpływ temperatury przyspieszonej ekstrakcji acetonitrylem na odpowiedź detektora dla wybranych MW i produktów ich degradacji podczas analizy za pomocą LC.

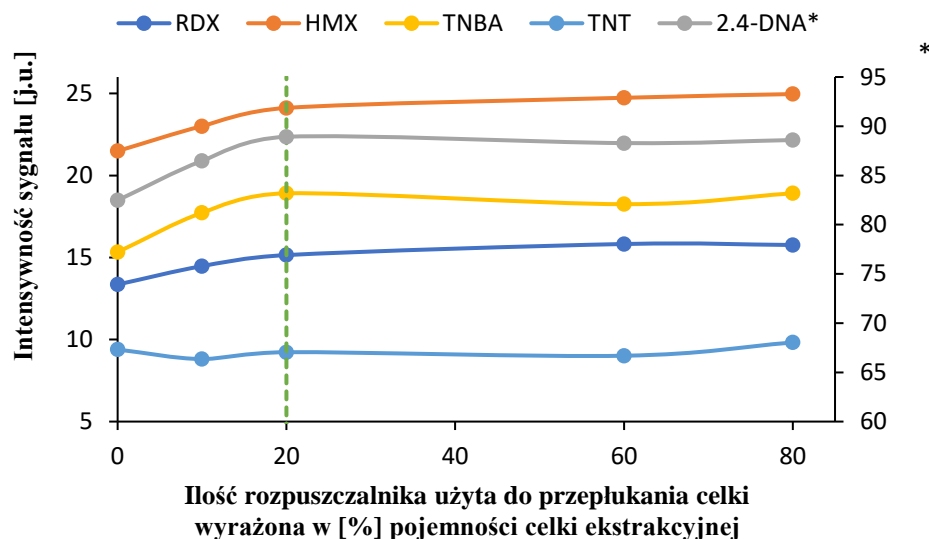
Kolejnym optymalizowanym parametrem był czas statyczny ekstrakcji. Z wyników przedstawionych na rysunku 39 wynika, że efektywność ekstrakcji nie zmienia się w przedziale od 1 do 10 minut, ponieważ sygnał analityczny wykazywał stabilność w stosunku do wszystkich związków. Nieznaczny spadek odpowiedzi detektora dla analizowanych związków

zaobserwowano, gdy czas statyczny ekstrakcji przekroczył 10 minut, co może być spowodowane częściowym rozkładem analitów w wyniku oddziaływania podwyższonej temperatury i ciśnienia. Biorąc pod uwagę czas przygotowania próbek i zużycie aparatury do wszystkich dalszych badań wybrano 2 minuty, jako czas statyczny ekstrakcji.



Rys. 39. Wpływ czasu statycznego przyspieszonej ekstrakcji acetonitrylem na odpowiedź detektora dla wybranych MW i produktów ich degradacji podczas analizy za pomocą LC.

W kolejnym etapie zbadano wpływ objętości acetonitrylu stosowanego do przepłukania komory ekstrakcyjnej po upływie czasu statycznego ogrzewania w celu sprawdzenia jego wpływu na wydajność ekstrakcji analizowanych związków. Przetestowano przypadek bez przepłukiwania komory ekstrakcyjnej oraz z przepłukaniem taką ilością rozpuszczalnika, która zajmowała: 10, 20, 60 i 80% pojemności komory. Na podstawie wyników przedstawionych na rysunku 40 można stwierdzić, że wraz ze wzrostem ilości użytego rozpuszczalnika wzrasta wartość sygnału analitycznego dla wszystkich badanych związków. Jednakże, po osiągnięciu objętości rozpuszczalnika odpowiadającej 20% objętości komory ekstrakcyjnej sygnał analityczny przyrasta bardzo wolno, bądź w niektórych przypadkach ulega stabilizacji. Ze względu na potrzebę oszczędności i minimalizowania zużycia rozpuszczalników z jednej strony oraz ze względu na niewielki wpływ zwiększenia objętości rozpuszczalnika na wzrost sygnału analitycznego z drugiej strony, przyjęto 20% objętości komory jako optymalną objętość rozpuszczalnika wmywającego resztki wyekstrahowanych analitów.



Rys. 40. Wpływ ilości acetonitrylu użytego do przemywania komory ekstrakcyjnej po czasie statycznego ogrzewania na odpowiedź detektora dla wybranych MW i produktów ich degradacji podczas analizy za pomocą LC.

Liczbę cykli ekstrakcji ASE określono, jako ostatni parametr, wykonując kolejno trzy ekstrakcje acetonitrylem dla tej samej próbki. Na podstawie otrzymanych wyników można stwierdzić, że jednorazowa ekstrakcja był wystarczająca, aby wyodrębnić niemal całkowite ilości poszczególnych analitów. Wyznaczone doświadczalnie odzyski mieściły się między: 76,9% – 92,2% w pierwszej ekstrakcji, 0,4% – 1,8% w drugiej i były mniejsze niż 0,1% w trzeciej ekstrakcji. Po analizie otrzymanych wyników postanowiono w dalszych badaniach stosować ekstrakcję w jednym cyklu. Pozwoli to na znaczne zaoszczędzenie czasu i energii, bez uszczerbku dla poprawności dalszych wyników.

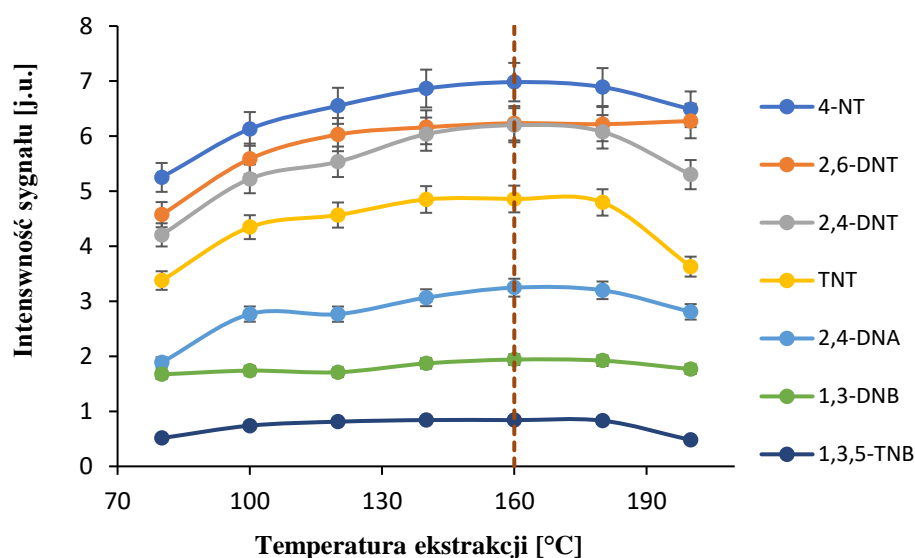
Optymalne warunki ekstrakcji z zastosowaniem acetonitrylu przedstawiają się następująco:

- Temperatura ekstrakcji: 160°C
- Czas statycznego ogrzewania: 5 min
- Ilość rozpuszczalnika przemywającego komorę po statycznym ogrzewaniu: 20% objętości komory ekstrakcyjnej
- Liczba cykli: 1

Przygotowanie próbki osadu do analizy za pomocą GC-MS/MS

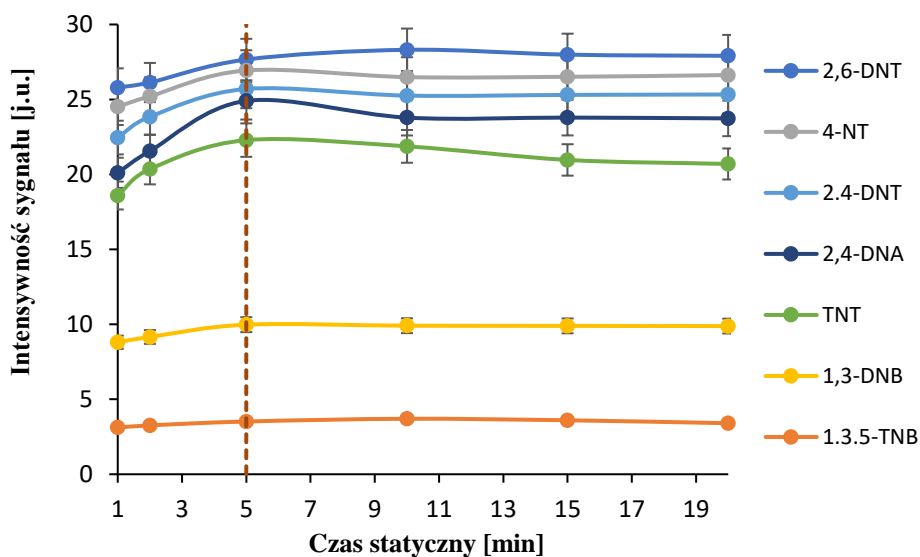
W analogiczny sposób dobrano parametry ekstrakcji ASE przy wykorzystaniu chloroformu jako rozpuszczalnika. Podczas optymalizacji temperatury ekstrakcji zaobserwowano podobną zależność, jak w przypadku ekstrakcji acetonitrylem. Z danych

przedstawionych na rysunku 41 wynika, że rosnąca temperatura ekstrakcji wpływa na wzrost sygnału analitycznego wszystkich badanych związków i osiąga swoje maksimum w pobliżu temperatury 160°C. Po przekroczeniu tej temperatury, w odróżnieniu od ekstrakcji acetonitrylem, następuje bardzo wolny spadek intensywności sygnału. Na tej podstawie przyjęto temperaturę 160°C do ekstrakcji z zastosowaniem chloroformu jako substancji ekstrahującej.



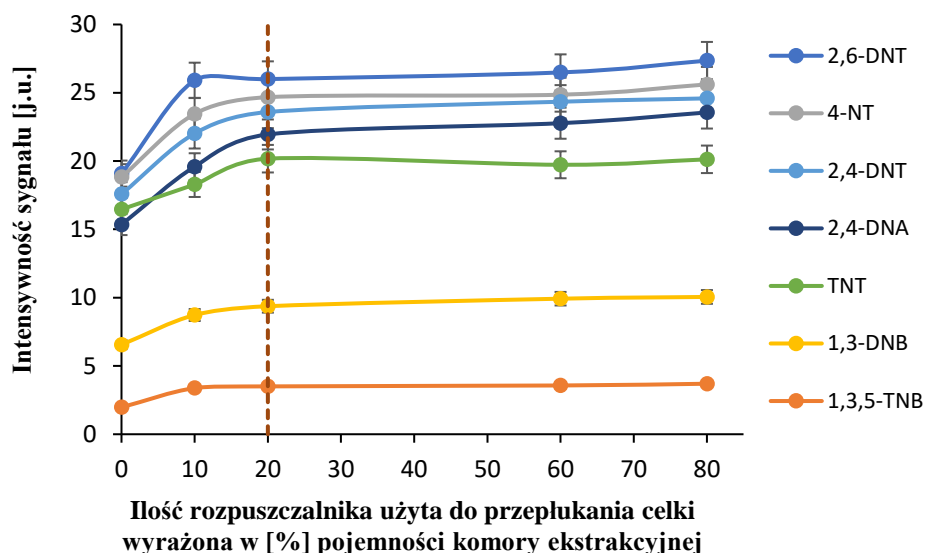
Rys. 41. Wpływ temperatury przyspieszonej ekstrakcji chloroformem na odpowiedź detektora dla wybranych MW i produktów ich degradacji podczas analizy za pomocą GC.

Kolejnym optymalizowanym parametrem był czas statyczny ekstrakcji chloroformem. Na podstawie wyników przedstawionych na rysunku 42, można stwierdzić że wraz ze wzrostem czasu statycznej ekstrakcji do 5 minut następuje dla wszystkich ekstrahowanych analitów wzrost sygnału analitycznego. Po osiągnięciu tego czasu sygnał analityczny stabilizuje się osiągając plateau. Z tego też powodu jako optymalną wartość tego parametru dla wszystkich dalszych badań przyjęto 5 minut.



Rys. 42. Wpływ czasu statycznego przyspieszonej ekstrakcji chloroformem na odpowiedź detektora dla wybranych MW i produktów ich degradacji podczas analizy za pomocą GC.

W kolejnym etapie zbadano wpływ objętości rozpuszczalnika stosowanego do przepłukania komory ekstrakcyjnej po upływie czasu statycznego ogrzewania w celu sprawdzenia jego wpływu na wydajność ekstrakcji analizowanych związków z zastosowaniem chloroformu. Przetestowano przypadek bez przepłukiwania komory ekstrakcyjnej oraz z przepłukaniem taką ilością rozpuszczalnika, która zajmowała: 10, 20, 60 i 80% pojemności komory. Na podstawie wyników przedstawionych na rysunku 43 można stwierdzić, że wraz ze wzrostem ilości użytego rozpuszczalnika do 20% objętości komory ekstrakcyjnej wzrasta wartość sygnału analitycznego dla wszystkich badanych związków. Po osiągnięciu tej objętości, sygnał analityczny ulega stabilizacji. Ze względu na potrzebę oszczędności i minimalizowania zużycia rozpuszczalników przyjęto 20% objętości komory jako optymalną objętość rozpuszczalnika wmywającego resztki analitów.



Rys. 43. Wpływ ilości chloroformu użytego do przepłukania komory ekstrakcyjnej po czasie statycznego ogrzewania na odpowiedź detektora dla wybranych MW i produktów ich degradacji podczas analizy za pomocą GC.

Jako ostatni parametr określono liczbę cykli ekstrakcji ASE, wykonując trzykrotną ekstrakcję tej samej próbki podzielonymi porcjami chloroformu. Na podstawie otrzymanych wyników można stwierdzić, że jednorazowy cykl ekstrakcji był wystarczający, aby wyodrębnić niemal całkowite ilości poszczególnych analitów. Wyznaczone doświadczalnie odzyski mieściły się w przedziale: 65,1% – 93,1% w pierwszej ekstrakcji, 0,7% – 4,3% w drugiej i były mniejsze niż 0,1% w trzeciej ekstrakcji. Po analizie otrzymanych wyników postanowiono w dalszych badaniach stosować ekstrakcję w jednym cyklu. Pozwoli to na znaczne zaoszczędzenie czasu i energii, bez uszczerbku dla poprawności dalszych wyników.

Optymalne warunki ekstrakcji z zastosowaniem chloroformu przedstawiają się następująco:

- Temperatura ekstrakcji: 160°C
- Czas statycznego ogrzewania: 5 min
- Ilość rozpuszczalnika przemywającego komorę po statycznym ogrzewaniu: 20% objętości komory ekstrakcyjnej
- Liczba cykli: 1

6.5. Walidacja opracowanych metod analizy materiałów wybuchowych

Walidacji poddano wszystkie opracowane metody analizy materiałów wybuchowych i produktów ich degradacji. Metody te obejmują analizę za pomocą: GC-EI-MS/MS, LC-APCI-MS/MS i LC-ESI-MS/MS oraz cztery metody przygotowania próbki - ekstrakcję za pomocą aparatu Soxhleta, ekstrakcję przez wytrząsanie osadu z rozpuszczalnikiem, ekstrakcję za pomocą rozpuszczalnika wspomaganą mikrofalami i przyspieszoną ekstrakcję rozpuszczalnikami.

6.5.1. Walidacja zoptymalizowanej metody analizy za pomocą chromatografii gazowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas

Pierwszym etapem procesu walidacyjnego było wyznaczenie krzywych kalibracyjnych. Badania przeprowadzono w zakresie stężenia od 1 do 1000 ng/mL dla 4-NT, 2,4-DNT, 2,6-DNT, 1,3-DNB, 1,3,5-TNB, TNT oraz 2,4-DNA trzykrotnie dozując próbki o każdym stężeniu dla każdego spośród badanych związków (tab.16). Do sprawdzenia otrzymanych wyników zastosowano test Q-Dixona z 90% poziomem ufności i Q_{kr} równym 0,941. Wszystkie otrzymane wyniki analizy spełniały warunki akceptacji.

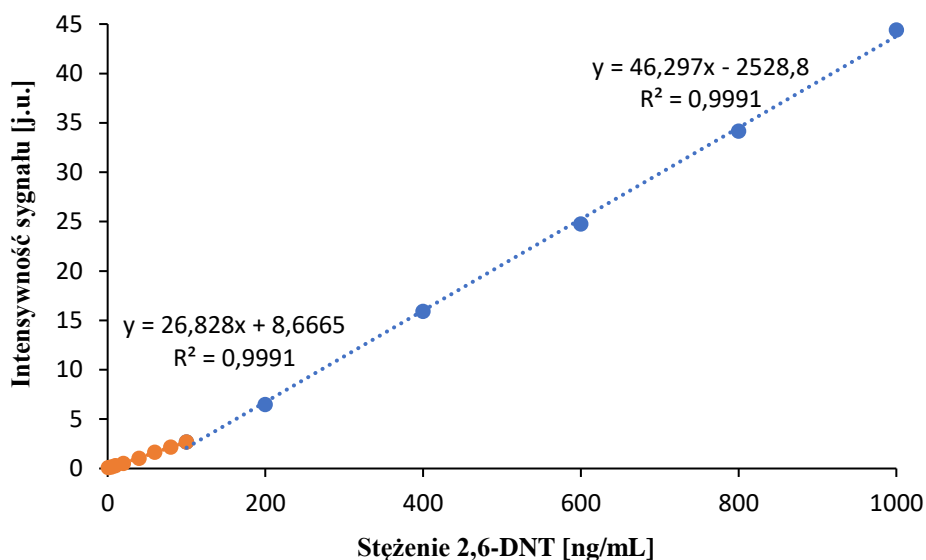
Tabela 16. Pola powierzchni pików uzyskane podczas wyznaczania wykresów kalibracyjnych dla TNT i produktów jego rozkładu za pomocą GC-EI-MS/MS w zależności od ich stężenia.

Stężenie [ng/mL]	Pole powierzchni pików odpowiadające określonemu stężeniu						
	4-NT	2,4-DNT	2,6-DNT	1,3-DNB	1,3,5-TNB	TNT	2,4-DNA
1000	91884	18358	44370	42372	345	10041	1546
	90877	18762	43992	41983	354	10909	1522
	91127	18652	44798	41622	351	10568	1501
800	75717	14719	34459	32764	277	8365	1290
	77262	14674	33098	32574	265	8426	1160
	76599	15002	34876	32176	263	8372	1099
600	53554	10936	24363	23238	207	6122	823
	53452	10638	24697	24356	216	6472	814
	54453	10735	25173	23334	205	6217	831
400	37302	8036	15757	15416	148	3757	587
	36703	8023	16081	15762	139	3871	565
	37266	8115	15906	14999	135	3812	589
200	19563	2926	6441	6583	76	1804	285

	20209	2977	6559	6570	71	1821	294
	19990	3053	6427	6438	82	1811	281
100	9149	1343	2700	2708	42	956	159
	9197	1364	2658	2784	40	966	163
	9071	1326	2693	2694	41	974	162
80	7349	932	2176	2182	32	614	134
	7354	943	2165	2176	34	623	126
	7275	951	2171	2214	35	632	122
60	5279	647	1652	1458	22	515	89
	5301	666	1708	1509	23	504	92
	5312	659	1598	1522	25	498	85
40	3757	459	1024	951	16	305	46
	3569	474	1032	945	13	311	50
	3654	462	1043	962	15	316	48
20	1954	185	503	357	0	71	27
	1987	184	513	347	0	73	24
	2006	179	511	349	0	77	26
10	1186	72	285	152	0	25	9
	1097	75	282	160	0	26	8
	1153	77	296	157	0	23	11
5	606	12	143	15	0	4	0
	613	15	148	16	0	5	0
	604	14	136	13	0	3	0
1	239	0	43	0	0	0	0
	232	0	76	0	0	0	0
	245	0	85	0	0	0	0
Próbka ślepa	21	12	10	7	2	5	1
	23	14	16	5	5	0	2
	25	17	15	8	3	2	0

6.5.1.1. Liniowość i jej zakres w opracowanych metodach analizy za pomocą GC-MS/MS

Zakres liniowości wyznaczany był w oparciu o opracowany wykres kalibracyjny. W przypadku 2,4-DNT, 2,6-DNT i 1,3-DNB wyznaczono dwa przedziały liniowości w badanym zakresie stężeń. Na rysunku 44 przedstawiono przykładowy wykres kalibracyjny dla 2,6-DNT z dwoma zakresami liniowości.



Rys. 44. Wykres kalibracyjny wraz z równaniami prostymi i współczynnikami determinacji dla 2,6-DNT otrzymanych w wyniku analizy za pomocą GC-EI-MS/MS.

Zakres liniowości metody w oparciu o detekcję za pomocą spektrometru mas zależy od rodzaju źródła jonów, ścieżki jaką pokonują jony i wydajności transmisji [164]. Wraz ze wzrostem stężenia badanych związków wytwarzanych jest więcej jonów, a ilościowo straty jonów są takie same zarówno dla niskich, jak i wysokich stężeń. Zatem wpływ strat jonów dla niskich stężeń jest większy (w wyniku czego uzyskujemy mniejszą czułość) niż dla wysokich stężeń.

Tabela 17. Zakresy liniowości, równania prostych i współczynniki determinacji (R²) dla wszystkich wykresów kalibracyjnych wyznaczonych dla opracowywanej metody analitycznej na GC-EI-MS/MS.

Analit	Zakres liniowości [ng/mL]	Równanie prostej	Współczynnik determinacji (R ²)
4-NT	0,18 - 1000	$y = 92,33x + 145,13$	0,9989
2,4-DNT	80 - 1000	$y = 19,18x - 502,05$	0,9965
	1,68 - 80	$y = 12,26x - 49,98$	0,9975
2,6-DNT	100 - 1000	$y = 46,30x - 2528,79$	0,9991
	0,98 - 100	$y = 26,83x + 8,67$	0,9991

1,3-DNB	100 - 1000	$y = 43,52x - 2020,89$	0,9994
	0,44 - 100	$y = 28,31x - 131,84$	0,9962
1,3,5-TNB	36,11 - 1000	$y = 0,35x + 0,92$	0,9983
TNT	1,94 - 1000	$y = 10,61x - 155,98$	0,9990
2,4-DNA	5,48 - 1000	$y = 1,49x - 6,67$	0,9978

Kryterium liniowości metody, wyrażone jako współczynnik determinacji R^2 , powinno być równe bądź większe od wartości 0,995. Kryterium akceptowalności zostało spełnione dla wszystkich analitów badanych za pomocą GC-EI-MS/MS (tab. 17).

6.5.1.2. Granica wykrywalności i oznaczalności opracowanych metod analizy za pomocą GC-MS/MS

Granice wykrywalności i oznaczalności obliczono na podstawie nachylenia prostej wykresu kalibracyjnego oraz odchylenia standardowego próbki ślepej opisanych wzorem (19) i (20). Otrzymane wyniki przedstawiono w tabeli 18.

Tabela 18. Granica wykrywalności i oznaczalności oraz parametry niezbędne do ich wyznaczenia dla związków badanych za pomocą GC-EI-MS/MS.

	4-NT	2,4-DNT	2,6-DNT	1,3-DNB	1,3,5-TNB	TNT	2,4-DNA
SD dla ślepej próbki	1,6	2,1	2,6	1,2	1,2	2,1	0,8
Współczynnik kierunkowy prostej wykresu kalibracyjnego "a"	92,33	12,26	26,83	28,31	0,35	10,61	1,49
LOD [ng/mL]	0,06	0,55	0,32	0,15	11,92	0,64	1,81
LOQ [ng/mL]	0,18	1,68	0,98	0,44	36,11	1,94	5,48

LOQ i LOD wyznaczone podczas analizy GC-EI-MS/MS dla 4-NT, 2,4-DNT, 2,6-DNT, 1,3-DNB, 1,3,5-TNB, TNT oraz 2,4-DNA mieści się w zakresie odpowiednio od 0,18 do 36,11 ng/mL oraz od 0,06 do 11,92 ng/mL.

6.5.1.3. Dokładność opracowanych metod analizy za pomocą GC-MS/MS

Dokładność wyznaczono dla trzech stężeń z każdego zakresu liniowości według wzoru (14). Dla analitów o jednym zakresie zbadano dokładność dla stężeń: 40, 400, 1000 ng/mL. Z kolei dla analitów wykazujących dwa zakresy liniowości zbadano dokładność dla stężeń: 200, 600, 1000 ng/mL i w niższym zakresie dla: 10, 40 i 80 ng/mL. Otrzymane wyniki przedstawiono w tabeli 19.

Tabela 19. Zestawienie wyznaczonych dokładności metody analizy GC-EI-MS/MS dla poszczególnych analitów i zakresów ich liniowości.

4-NT		2,4-DNT				2,6-DNT			
Stężenie [ng/mL]	D [%]	Stężenie [ng/mL]	D [%]	Stężenie [ng/mL]	D [%]	Stężenie [ng/mL]	D [%]	Stężenie [ng/mL]	D [%]
1000	98,7	1 000	99,5	80	101,2	1 000	101,3	80	100,7
400	100,0	600	97,9	40	105,0	600	98,2	40	95,5
40	95,2	200	90,9	10	101,7	200	97,2	10	104,0
1,3-DNB				1,3,5-TNB		TNT		2,4-DNA	
Stężenie [ng/mL]	D [%]	Stężenie [ng/mL]	D [%]	Stężenie [ng/mL]	D [%]	Stężenie [ng/mL]	D [%]	Stężenie [ng/mL]	D [%]
1 000	101,1	80	102,6	1000	101,1	1000	100,5	1000	102,7
600	98,3	40	95,8	400	101,1	400	93,5	400	98,6
200	98,2	10	101,8	40	99,5	40	110,0	40	91,8

Wyznaczona dokładność metody dla poszczególnych analitów mieści się w zakresie od 80 do 120%, więc spełnione jest kryterium akceptowalności dla analizy śladowej.

6.5.1.4. Precyzja opracowanych metod analizy za pomocą GC-MS/MS

Precyzję wyznaczono jako współczynnik zmienności (CV) na podstawie wzoru (15) dla trzech stężeń z każdego zakresu liniowości. Dla analitów o jednym zakresie zbadano dokładność dla stężeń: 40, 400, 1000 ng/mL. Z kolei dla analitów wykazujących dwa zakresy liniowości zbadano dokładność dla stężeń: 200, 600, 1000 ng/mL i w niższym zakresie dla: 10, 40 i 80 ng/mL. Otrzymane wyniki przedstawiono w tabeli 20.

Tabela 20. Zestawienie wyników precyzji metody analizy GC-EI-MS/MS dla poszczególnych analitów i zakresów ich liniowości, przedstawionych jako współczynnik zmienności CV.

4-NT		2,4-DNT				2,6-DNT			
Stężenie [ng/mL]	CV [%]	Stężenie [ng/mL]	CV [%]	Stężenie [ng/mL]	CV [%]	Stężenie [ng/mL]	CV [%]	Stężenie [ng/mL]	CV [%]
1000	0,6	1 000	1,1	80	1,0	1 000	0,9	80	0,3
400	0,9	600	1,4	40	1,7	600	1,6	40	0,9
40	2,6	200	2,1	10	3,4	200	1,1	10	2,6
1,3-DNB				1,3,5-TNB		TNT		2,4-DNA	
Stężenie [ng/mL]	CV [%]	Stężenie [ng/mL]	CV [%]	Stężenie [ng/mL]	CV [%]	Stężenie [ng/mL]	CV [%]	Stężenie [ng/mL]	CV [%]
1 000	0,9	80	0,9	1000	1,3	1000	4,2	1000	1,5
600	2,6	40	0,9	400	4,7	400	1,5	400	2,3
200	1,2	10	2,6	40	10,4	40	1,8	40	4,2

Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że metoda zastosowana do oznaczenia TNT i produktów jego degradacji za pomocą GC-EI-MS/MS jest precyzyjna, ponieważ otrzymane wartości współczynnika zmienności wynoszą od 0,3% dla 2,6-DNT do 10,4% dla 1,3,5-TNB, co spełnia kryterium akceptowalności. Wartość tego parametru według kryterium dla analiz śladowych nie powinna przekraczać 15%.

6.5.1.5. Powtarzalność opracowanych metod analizy za pomocą GC-MS/MS

W celu wyznaczenia powtarzalności opracowanej metody analizy za pomocą GC-EI-MS/MS przeprowadzono po 6 niezależnych pomiarów analitów na najwyższym stężeniu z zakresu krzywej kalibracyjnej – 1000 ng/mL. Parametr przedstawiono za pomocą trzech wartości: SD, RSD i CV, opisanych wzorami (15), (16), (17). Ponadto wyznaczono granicę powtarzalności według wzoru (18). Następujące zestawienie przedstawione zostało w tabeli 21.

Tabela 21. Zestawienie wybranych parametrów określających powtarzalność metody analizy GC-EI-MS/MS przy zastosowaniu poszczególnych metod przygotowania próbki.

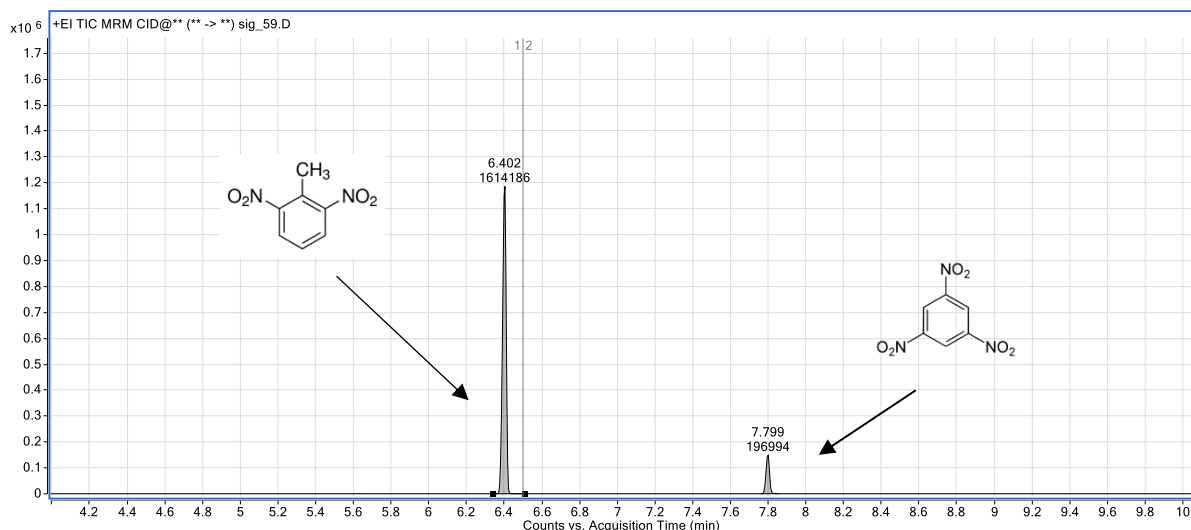
	SE						
	4-NT	2.4-DNT	2,6-DNT	1,3-DNB	1.3.5-TNB	TNT	2,4-DNA
\bar{x} [j.u.]	89454	14997	39946	40631	343	8718	1349
x_{min} [j.u.]	80203	14828	35229	39574	315	8183	1214
x_{max} [j.u.]	103145	15176	43932	41872	362	9376	1445
SD	8598,062	137,750	3671,140	1021,927	17,119	513,845	83,270
RSD	0,0961	0,0092	0,0919	0,0252	0,0500	0,0589	0,0617
CV [%]	9,6	0,9	9,2	2,5	5,0	5,9	6,2
Rozstęp [j.u.]	22942	348	8703	2298	47	1193	231
r [j.u.]	24319	390	10384	2890	48	1453	236
	ASE						
	4-NT	2.4-DNT	2,6-DNT	1,3-DNB	1.3.5-TNB	TNT	2,4-DNA
\bar{x} [j.u.]	77499	12101	41317	35402	312	8138	1329
x_{min} [j.u.]	76029	11463	37796	33954	293	7837	1208
x_{max} [j.u.]	78923	13023	43576	37296	331	8471	1428
SD	1187,090	606,230	2292,473	1230,046	15,832	231,263	99,348
RSD	0,0153	0,0501	0,0555	0,0347	0,0507	0,0284	0,0748
CV [%]	1,5	5,0	5,5	3,5	5,1	2,8	7,5
Rozstęp [j.u.]	2894	1560	5780	3342	38	634	220
r [j.u.]	3358	1715	6484	3479	45	654	281

	AE						
	4-NT	2,4-DNT	2,6-DNT	1,3-DNB	1,3,5-TNB	TNT	2,4-DNA
\bar{x} [j.u.]	79498	12045	32129	34776	296	8099	1393
x_{min} [j.u.]	76534	11683	29187	33452	287	7708	1259
x_{max} [j.u.]	83198	12435	35540	36428	310	8489	1468
SD	2599,621	305,222	2278,868	1117,276	8,825	305,799	75,503
RSD	0,0327	0,0253	0,0709	0,0321	0,0298	0,0378	0,0542
CV [%]	3,3	2,5	7,1	3,2	3,0	3,8	5,4
Rozstęp [j.u.]	6664	752	6353	2976	23	781	209
r [j.u.]	7353	863	6446	3160	25	865	214
	MAE						
	4-NT	2,4-DNT	2,6-DNT	1,3-DNB	1,3,5-TNB	TNT	2,4-DNA
\bar{x} [j.u.]	204935	20001	28222	27126	200	4199	1136
x_{min} [j.u.]	204127	19586	27053	26823	194	4074	1128
x_{max} [j.u.]	205666	20365	29813	27339	208	4258	1146
SD	550,282	314,277	1009,052	194,093	5,468	70,668	7,179
RSD	0,0027	0,0157	0,0358	0,0072	0,0273	0,0168	0,0063
CV [%]	0,3	1,6	3,6	0,7	2,7	1,7	0,6
Rozstęp [j.u.]	1539	779	2760	516	14	184	18
r [j.u.]	1556	889	2854	549	15	200	20

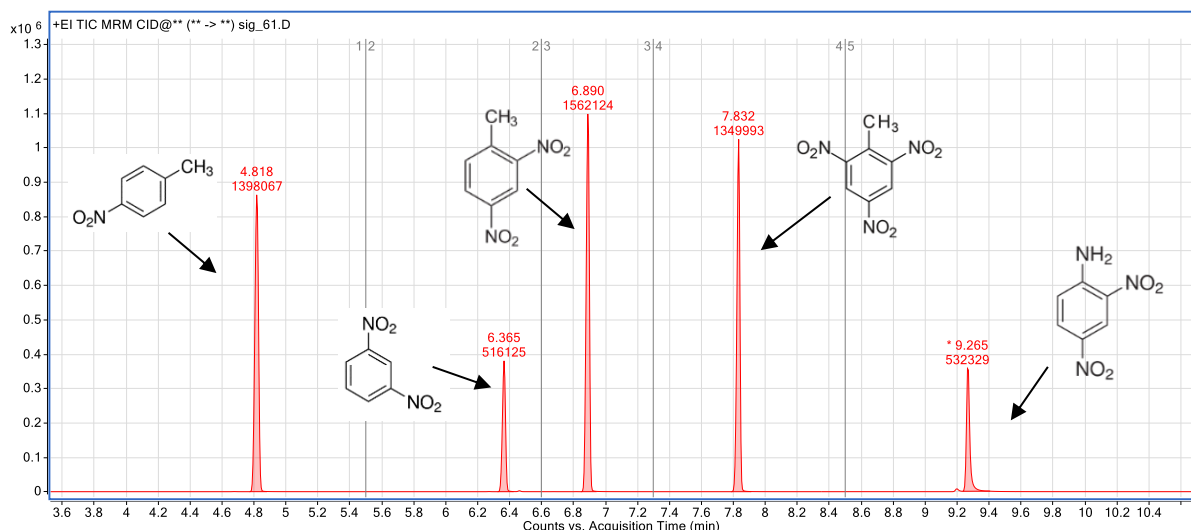
Na podstawie otrzymanych wyników należy stwierdzić, że wszystkie opracowane metody analiz za pomocą GC-EI-MS/MS są powtarzalne, a ich rozstęp mieści się w granicy powtarzalności.

6.5.1.6. Selektywność i specyficzność opracowanych metod analizy za pomocą GC-MS/MS

Na podstawie otrzymanych wyników przedstawionych na rys. 45 i 46 można stwierdzić, że opracowane metody analityczne, w których stosowano ekstrakcję chloroformem do analizy TNT, 4-NT, 2,4-DNT, 2,6-DNT, 2,4-DNA, 1,3-DNB i 1,3,5-TNB za pomocą GC/MS/MS są specyficzne. Cel ten został osiągnięty dzięki zastosowaniu analizy w trybie MRM pracy spektrometru. Ponadto nie zaobserwowano żadnych pików pochodzących z matrycy środowiskowej lub innych zanieczyszczeń interferujących z analitami.



Rys. 45. Chromatogram uzyskany podczas analizy próbki otrzymanej w wyniku ekstrakcji osadu dennego chloroformem. Osad skażony wzorcowymi następujących związków chemicznych: 2,6-DNT i 1,3,5-TNB. GC-MS/MS pracował w trybie reakcji następczych we wcześniej zoptymalizowanych warunkach.



Rys. 46. Chromatogram uzyskany podczas analizy próbki otrzymanej w wyniku ekstrakcji osadu dennego chloroformem. Osad skażony wzorcowymi następujących związków chemicznych: 4-NT, 1,3-DNB, 2,4-DNT, TNT i 2,4-DNA. GC-MS/MS pracował w trybie reakcji następczych we wcześniej zoptymalizowanych warunkach.

6.5.1.7. Czulość opracowanych metod analizy za pomocą GC-MS/MS

Czulość metody analitycznej jest mierzona stosunkiem zmiany wartości sygnału analitycznego do odpowiadającej jej zmiany stężenia lub masy oznaczanego składnika. Matematycznie parametr ten jest wyrażany współczynnikiem kierunkowym wykresu kalibracji (wzór (21)). Im większy jest kąt nachylenia do osi odciętych tym czulość jest większa. W tabeli 18 przedstawiono wartość tego parametru dla badanych analitów.

Czułość oznaczania poszczególnych analitów maleje od największej czułości dla 4-NT z wartością współczynnika 92,33, poprzez czułość dla TNT wynoszącą 10,61, aż do najmniejszej czułości dla 1,3,5-TNB z współczynnikiem 0,35.

6.5.2. Walidacja zoptymalizowanej metody analizy za pomocą chromatografii cieczerwnej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas

Pierwszym etapem procesu walidacyjnego było wyznaczenie krzywych kalibracyjnych dla wyselekcjonowanych związków chemicznych z zastosowaniem APCI, jako źródła jonizacji w jednym wariancie oraz ESI w innym wariancie. Badania przeprowadzono w zakresie stężeń od 1 do 1000 ng/mL dla TNT, 2,4-DNA, TNBA, RDX i HMX z trzykrotnym dozowaniem próbek o każdym stężeniu. Na podstawie otrzymanych wyników, które przedstawiono w tabeli 22 stwierdzono, że podczas analizy mieszaniny związków za pomocą LC-ESI-MS/MS dochodzi do pewnych zaburzeń. A mianowicie – na chromatogramie brak było pików odpowiadających TNT, a piki odpowiadające TNBA były nieregularne i nie miały przedziałów, w których można byłoby wyznaczyć liniową zależność sygnału analitycznego od stężenia.

Tabela 22. Pola powierzchni pików w funkcji stężenia uzyskane podczas wyznaczania wykresów kalibracyjnych dla analitów analizowanych za pomocą LC-APCI-MS/MS i LC-ESI-MS/MS.

Stężenie [ng/mL]	APCI					ESI				
	2,4-DNA	HMX	RDX	TNBA	TNT	2,4-DNA	HMX	RDX	TNBA	TNT
1000	420840	150665	107149	21107	7221	260208	622444	261525	181647	0
	407301	144838	107818	20755	7466	268354	641457	266288	181828	0
	422139	151677	102648	20839	7908	270557	671197	268796	187637	0
800	330282	116766	84429	15389	5875	226571	561837	215087	122767	0
	333933	114403	87842	15957	5628	216924	531413	215415	122202	0
	342759	113215	84818	14904	6169	225104	559239	219937	125935	0
600	268775	79617	61093	12468	4557	182100	404532	180727	131028	0
	260536	82790	63523	12397	4346	177398	418354	177151	133109	0
	255212	81727	62810	11831	4227	182450	420404	179624	131384	0
400	175459	49791	39427	8153	2964	135909	305028	126111	138572	0
	167044	48635	38098	7993	2739	133528	303697	128711	136571	0
	168831	51005	41630	8062	2848	130040	298385	123699	133109	0
200	84503	23838	20292	4119	1672	81657	167157	82021	88131	0
	80303	24315	20712	3881	1644	79637	157940	77891	83464	0
	83092	23980	21168	4211	1658	79182	170144	79432	88863	0

100	42754	11584	11104	2039	781	53284	93225	48774	52239	0
	43994	10842	9771	1971	840	51953	93388	49703	52727	0
	41436	11169	10089	1713	831	52787	94568	49778	53776	0
80	34107	9727	8561	1528	742	38080	70469	36767	18022	0
	31680	9432	8424	1515	740	38471	75341	37421	18303	0
	31453	8868	8234	1606	735	39779	73255	36535	18294	0
60	24816	7106	6452	1179	577	28810	55288	28678	3497	0
	25460	6986	6491	1284	632	28378	56851	29401	3321	0
	26205	6777	6492	1190	624	27624	56608	27203	3288	0
40	16299	4413	4197	771	449	19929	39687	20167	23248	0
	17054	4335	4028	831	401	19236	39052	19770	22684	0
	17295	4228	3930	679	376	19153	38395	20014	22261	0
20	9129	2369	2109	373	285	9326	19141	9735	1817	0
	8550	2208	2039	364	276	9741	19679	10375	1944	0
	8412	2250	2173	353	273	9974	19335	9924	2000	0
10	4828	976	967	187	188	5292	10574	5491	5664	0
	4917	899	965	169	171	5492	10128	5222	5599	0
	4620	982	936	150	175	5141	10084	5136	5556	0
5	2627	387	339	54	145	2567	5135	2606	3010	0
	2419	394	398	48	148	2435	5567	2913	2931	0
	2296	400	323	43	137	2508	5382	2852	3036	0
1	910	85	54	0	38	456	1609	885	1040	0
	1009	65	45	0	40	489	1598	909	997	0
	976	76	62	0	45	501	1687	865	1151	0
Próbka ślepa	27	11	11	9	30	306	182	154	9	0
	25	13	14	6	25	288	187	164	13	0
	28	10	13	12	26	332	171	163	7	0

Z tego względu dla TNT i TNBA wyznaczono wykres kalibracyjny za pomocą LC-ESI-MS/MS bez pozostałych związków mieszaniny. W tym przypadku obie substancje dawały sygnały analityczne, które w sposób liniowy zależały od stężenia tych związków. W dalszych etapach przeprowadzania walidacji parametry wyznaczane przy zastosowaniu jonizacji ESI wyznaczane były oddzielnie dla próbek skażonych RDX, HMX i 2,4-DNA oraz próbek skażonych TNBA i TNT.

Do sprawdzenia otrzymanych wyników zastosowano test Q-Dixona z 90% poziomem ufności i Q_{kr} równym 0,941. Wszystkie otrzymane wyniki analizy spełniały warunek akceptacji.

6.5.2.1. Liniowość i jej zakres w opracowanych metodach analizy za pomocą LC-MS/MS

Zakres liniowości wyznaczany był w oparciu o opracowane wykresy kalibracyjne. Przy zastosowaniu APCI wystąpiły dwa zakresy liniowości dla RDX, jak i dla HMX. Z kolei, gdy zastosowano jako źródło jonizacji ESI wszystkie badane związki poza TNT wykazywały dwa zakresy liniowości. Pamiętać jednak trzeba, że przedziały liniowości wyznaczone za pomocą LC-ESI-MS/MS dla TNT i TNBA dotyczą próbek skażonych tylko tymi analitami, z pominięciem 2,4-DNA, RDX i HMX, a w próbkach środowiskowych nie można wykluczyć obecności tych ostatnich.

Tabela 23. Zakresy liniowości, równania prostych i współczynniki determinacji (R^2) dla wszystkich wykresów kalibracyjnych wyznaczonych podczas opracowywania metody analitycznej na LC-MS/MS z wyszczególnieniem źródeł jonizacji.

Analit	APCI			ESI		
	Zakres liniowości [ng/mL]	Równanie prostej	R^2	Zakres liniowości [ng/mL]	Równanie prostej	R^2
RDX	80 - 1000	$y = 106,61x - 828,38$	0,9992	100 - 1000	$y = 236,92x + 30404,75$	0,9976
	0,12 - 80	$y = 107,20x - 106,95$	0,9991	0,09 - 100	$y = 476,55x + 389,72$	0,9977
HMX	400 - 1000	$y = 165,58x - 17147,23$	0,9997	100 - 1000	$y = 617,70x + 42768,59$	0,9970
	0,10 - 400	$y = 124,65x - 480,45$	0,9994	0,07 - 100	$y = 919,95x + 997,30$	0,9994
2,4-DNA	0,03 - 1000	$y = 420,50x + 541,30$	0,9996	100 - 1000	$y = 236,84x + 33610,89$	0,9975
				0,36 - 100	$y = 507,70x - 412,22$	0,9954
TNBA	1,20 - 1000	$y = 20,37x - 69,48$	0,9981	80 - 1000	$y = 3,55x - 39,81$	0,9969
				2,33 - 80	$y = 3,50x - 5,54$	0,9969
TNT	2,97 - 1000	$y = 7,28x + 113,73$	0,9989	13,57 - 1000	$y = 0,60x - 2,71$	0,9995

Na podstawie uzyskanych współczynników determinacji R^2 przedstawionych w tabeli 23 należy stwierdzić, że opracowane metody analizy osiągają kryterium liniowości, ponieważ spełnione jest wymaganie, aby współczynnik ten był nie mniejszy niż 0,995.

6.5.2.2. Granica wykrywalności i oznaczalności w opracowanych metodach analizy za pomocą LC-MS/MS

Wyznaczone LOD i LOQ według wzorów (19) i (20) dla analizy LC-MS/MS z zastosowaniem obu źródeł jonizacji przedstawiono w tabeli 24. Analizując otrzymane wyniki można stwierdzić, że granice wykrywalności i oznaczalności dla RDX i HMX są podobne przy zastosowaniu obu źródeł jonizacji.

Tabela 24. Granica wykrywalności i oznaczalności oraz parametry niezbędne do ich wyznaczenia dla wybranych związków oznaczanych ilościowo za pomocą LC-MS/MS z jonizacją APCI i ESI.

		RDX	HMX	2,4-DNA	TNBA	TNT
APCI	SD dla ślepej próbki	1,2	1,2	1,2	2,4	2,2
	Współczynnik kierunkowy prostej wykresu kalibracyjnego "a"	107,20	124,65	420,50	20,37	7,28
	LOD [ng/mL]	0,04	0,03	0,01	0,40	0,98
	LOQ [ng/mL]	0,12	0,10	0,03	1,20	2,97
ESI	SD dla ślepej próbki	4,5	6,7	18,1	0,8	0,8
	Współczynnik kierunkowy prostej wykresu kalibracyjnego "a"	476,55	919,95	507,70	3,50	0,60
	LOD [ng/mL]	0,03	0,02	0,12	0,77	4,48
	LOQ [ng/mL]	0,09	0,07	0,36	2,33	13,57

Większe natomiast różnice można zauważyć w przypadku pozostałych analitów. Przy zastosowaniu APCI jako źródła jonizacji otrzymano nawet 4,5-krotnie niższe granice dla TNT, niż w przypadku gdy stosowano ESI. Z tego względu należy stwierdzić, że APCI jako źródło jonizacji w LC-MS/MS wykazuje większą przydatność do analizy tego zestawu badanych analitów.

6.5.2.3. Dokładność opracowanych metod analizy za pomocą LC-MS/MS

Dokładność, również tak jak w przypadku walidacji metody analizy na GC, przedstawiono jako procent odzysku dla trzech stężeń z każdego zakresu liniowości (wzór (14)). Oceniając dane zawarte w tabeli 25, w której przedstawiono dokładność dla poszczególnych analitów i zakresów ich liniowości należy stwierdzić, iż większą dokładnością charakteryzuje się metoda analizy LC-MS/MS z zastosowaniem APCI. Gdy stosowano ten rodzaj jonizacji dokładność mieściła się w przedziale od 94,0% do 102,9%, w zależności od rodzaju analizowanego związku i od jego stężenia.

Tabela 25. Dokładności metody analizy LC-MS/MS przy użyciu APCI i ESI jako źródeł jonizacji dla poszczególnych analitów i zakresów ich liniowości.

APCI	RDX				HMX			
	Stężenie [ng/mL]	D [%]	Stężenie [ng/mL]	D [%]	Stężenie [ng/mL]	D [%]	Stężenie [ng/mL]	D [%]
	1000	100,1	80	99,3	1000	100,4	200	98,4
	600	99,0	40	97,0	600	99,2	80	98,5
	200	101,1	10	99,2	400	101,1	40	96,4
	2,4-DNA		TNBA		TNT			
	Stężenie [ng/mL]	D [%]	Stężenie [ng/mL]	D [%]	Stężenie [ng/mL]	D [%]		
	1000	99,0	1000	102,9	1000	102,0		
	400	101,0	400	99,9	400	94,0		
	40	97,2	40	101,8	40	101,3		
ESI	RDX				HMX			
	Stężenie [ng/mL]	D [%]	Stężenie [ng/mL]	D [%]	Stężenie [ng/mL]	D [%]	Stężenie [ng/mL]	D [%]
	1000	99,2	80	95,8	1000	97,5	80	97,9
	600	104,6	40	102,8	600	100,3	40	103,4
	200	104,2	10	102,7	200	99,0	10	100,7
	2,4-DNA		TNBA		TNT			
	Stężenie [ng/mL]	D [%]	Stężenie [ng/mL]	D [%]	Stężenie [ng/mL]	D [%]	Stężenie [ng/mL]	D [%]
	1000	98,3	80	96,5	1000	103,2	80	102,8
	600	103,5	40	97,8	600	99,2	40	95,5
	200	98,3	10	112,7	200	100,3	10	107,3
	TNT							
	Stężenie [ng/mL]	D [%]						
	1000	101,1						
400	96,2							
40	106,8							

Z kolei zakres ten w przypadku jonizacji ESI jest znacznie większy i mieści się między 95,5%, a 112,7%. Jednakże należy podkreślić, że w obu rodzajach jonizacji parametr dokładności mieści się w wymaganym zakresie kryterium akceptacji, a mianowicie między 80%, a 120%.

6.5.2.4. Precyzja opracowanych metod analizy za pomocą LC-MS/MS

Precyzja wyznaczana była dla trzech stężeń z każdego zakresu liniowości według wzoru (15). Stężenia, dla których przeprowadzono obliczenia były analogiczne do stężeń wybranych podczas obliczania dokładności. Precyzje wyników szeregu niezależnych oznaczeń tych samych składników w tej samej próbce analitycznej dla trzech wybranych stężeń i dwóch

rodzajów źródeł jonizacji przedstawiono w tabeli 26. Wyniki zapisano w postaci współczynnika zmienności CV wyrażonego w %.

Tabela 26. Zestawienie wyników precyzji metody analizy LC-MS/MS przy użyciu APCI i ESI jako źródeł jonizacji dla poszczególnych analitów i zakresów ich liniowości przedstawionych jako współczynnik zmienności CV.

	RDX				HMX				
	Stężenie [ng/mL]	CV [%]	Stężenie [ng/mL]	CV [%]	Stężenie [ng/mL]	CV [%]	Stężenie [ng/mL]	CV [%]	
APCI	1000	2,7	80	2,0	1000	2,7	200	2,0	
	600	2,0	40	3,3	600	2,0	80	3,3	
	200	2,1	10	1,8	400	2,1	40	1,8	
	2,4-DNA		TNBA		TNT				
	Stężenie [ng/mL]	CV [%]	Stężenie [ng/mL]	CV [%]	Stężenie [ng/mL]	CV [%]			
	1000	2,0	1000	0,9	1000	4,6			
	400	2,6	400	1,0	400	3,9			
	40	3,1	40	10,1	40	9,1			
	ESI	RDX				HMX			
		Stężenie [ng/mL]	CV [%]	Stężenie [ng/mL]	CV [%]	Stężenie [ng/mL]	CV [%]	Stężenie [ng/mL]	CV [%]
1000		1,4	80	1,2	1000	3,8	80	3,3	
600		1,0	40	1,0	600	2,1	40	1,7	
200		2,6	10	3,5	200	3,9	10	2,6	
2,4-DNA		TNBA							
Stężenie [ng/mL]		CV [%]	Stężenie [ng/mL]	CV [%]	Stężenie [ng/mL]	CV [%]	Stężenie [ng/mL]	CV [%]	
1000		2,0	80	2,3	1000	0,4	80	2,2	
600		1,6	40	2,2	600	0,6	40	3,4	
200		1,6	10	3,3	200	2,0	10	11,3	
TNT									
Stężenie [ng/mL]		CV [%]							
1000		4,7							
400		3,4							
40	4,3								

Wartości uzyskane podczas analizy z jonizacją APCI i ESI są bardzo zbliżone. W obu przypadkach największy rozrzut wyników precyzji występuje podczas analizy TNBA. Jednakże wszystkie wyznaczone wartości precyzji mieszczą się w kryterium akceptacji, które wynosi 15%.

6.5.2.5. Powtarzalność opracowanych metod analizy za pomocą LC-MS/MS

Powtarzalność procedury analitycznej zbadano poprzez przygotowanie sześciu próbek skażonych mieszaniną analitów o stężeniu 1000 ng/mL i ich analizę w ciągu trwania jednego dnia. Parametr wyznaczono niezależnie dla każdej z opracowanych procedur przygotowania próbki oraz analiz chromatograficznych z wykorzystaniem obu rodzajów jonizacji: LC-APCI-MS/MS oraz LC-ESI-MS/MS. Parametr przedstawiono za pomocą trzech wartości: SD, RSD i CV, opisanych wzorami (15), (16), (17). Ponadto wyznaczono granicę powtarzalności według wzoru (18).

Tabela 27. Zestawienie wybranych parametrów określających powtarzalność metody analizy LC-APCI-MS/MS przy zastosowaniu poszczególnych metod przygotowania próbki.

	SE				
	2,4-DNA	HMX	RDX	TNBA	TNT
\bar{x} [j.u.]	277920	124607	102494	18425	6815
x_{min} [j.u.]	253913	117174	94438	16573	6243
x_{max} [j.u.]	325124	134623	108928	20748	7473
SD	25706,902	6295,585	6519,456	1591,031	536,539
RSD	0,0925	0,0505	0,0636	0,0864	0,0787
CV [%]	9,2	5,1	6,4	8,6	7,9
Rozstęp [j.u.]	71211	17449	14490	4175	1230
r [j.u.]	72710	17807	18440	4500	1518
	ASE				
	2,4-DNA	HMX	RDX	TNBA	TNT
\bar{x} [j.u.]	376546	137103	97644	16079	6259
x_{min} [j.u.]	342903	129003	91823	13328	5383
x_{max} [j.u.]	410727	145858	106123	18484	7027
SD	24922,977	6129,471	5322,956	1862,685	600,905
RSD	0,0662	0,0447	0,0545	0,1158	0,0960
CV [%]	6,6	4,5	5,5	11,6	9,6
Rozstęp [j.u.]	67824	16855	14300	5156	1644
r [j.u.]	70493	17337	15056	5268	1700
	AE				
	2,4-DNA	HMX	RDX	TNBA	TNT
\bar{x} [j.u.]	331982	114454	79971	15373	5083
x_{min} [j.u.]	300407	106753	74932	14039	4670
x_{max} [j.u.]	359465	123857	84948	16337	5473
SD	24098,212	6343,541	4239,535	1087,070	295,759
RSD	0,0726	0,0554	0,0530	0,0707	0,0582
CV [%]	7,3	5,5	5,3	7,1	5,8

Rozstęp [j.u.]	59058	17104	10016	2298	803
r [j.u.]	68160	17942	11991	3075	837
	MAE				
	2,4-DNA	HMX	RDY	TNBA	TNT
\bar{x} [j.u.]	353235	129578	87597	17110	5756
x_{min}[j.u.]	326055	123488	82223	15433	5343
x_{max} [j.u.]	376273	134113	91853	18370	6185
SD	19373,254	4214,471	3642,870	1208,140	349,519
RSD	0,0548	0,0325	0,0416	0,0706	0,0607
CV [%]	5,5	3,3	4,2	7,1	6,1
Rozstęp [j.u.]	50218	10625	9630	2937	842
r [j.u.]	54796	11920	10304	3417	989

Tabela 28. Zestawienie wybranych parametrów określających powtarzalność metody analizy LC-ESI-MS/MS przy zastosowaniu poszczególnych metod przygotowania próbki.

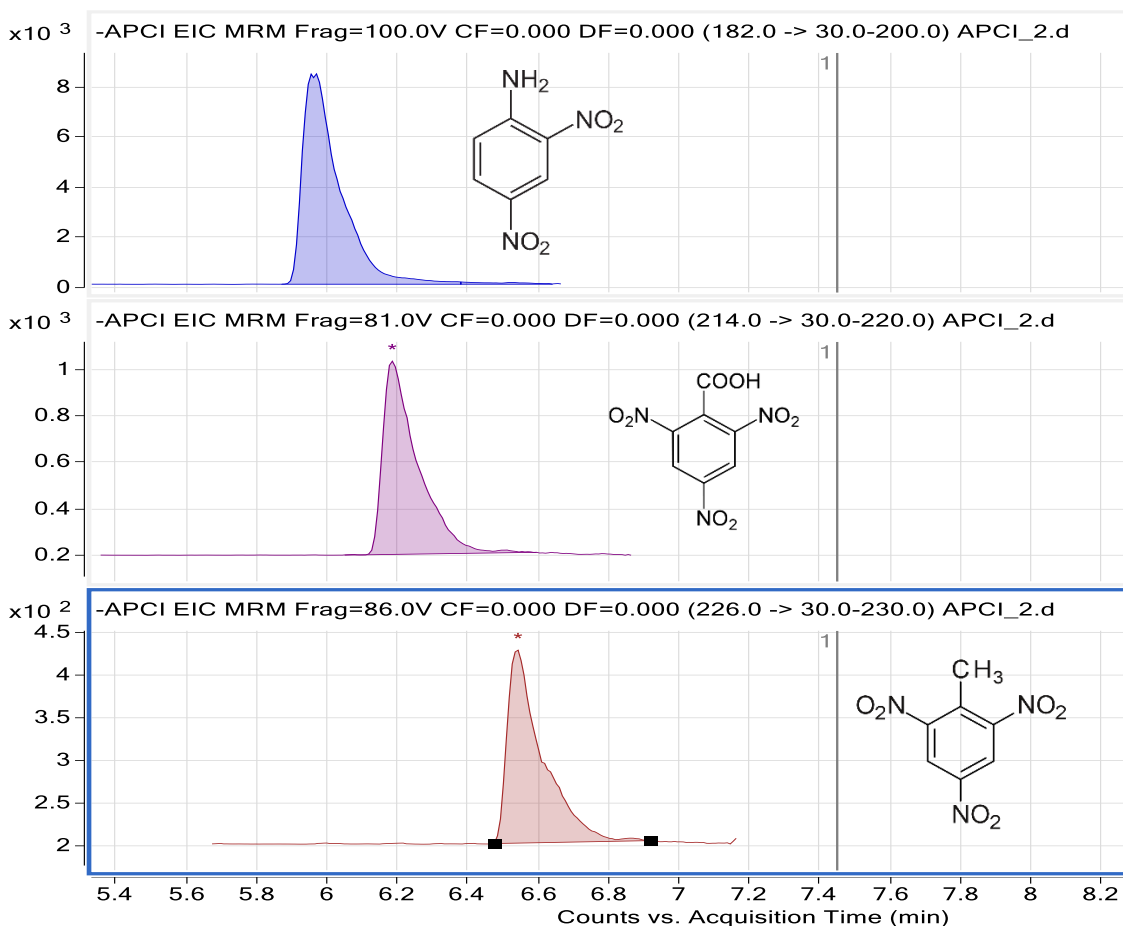
	SE				
	2,4-DNA	HMX	RDY	TNBA	TNT
\bar{x} [j.u.]	177634	539205	257068	3190	549
x_{min}[j.u.]	160853	501505	235739	2818	508
x_{max} [j.u.]	196560	571987	272938	3565	598
SD	14415,422	26683,222	15929,953	292,671	35,169
RSD	0,0812	0,0495	0,0620	0,0918	0,0640
CV [%]	8,1	4,9	6,2	9,2	6,4
Rozstęp [j.u.]	35707	70482	37199	747	90
r [j.u.]	40773	75472	45057	828	99
	ASE				
	2,4-DNA	HMX	RDY	TNBA	TNT
\bar{x} [j.u.]	240670	593289	244901	2786	504
x_{min}[j.u.]	220837	567839	230938	2463	438
x_{max} [j.u.]	258394	630790	257422	3360	547
SD	16081,273	24429,719	11413,435	351,614	43,979
RSD	0,0668	0,0412	0,0466	0,1262	0,0872
CV [%]	6,7	4,1	4,7	12,6	8,7
Rozstęp [j.u.]	37557	62951	26484	897	109
r [j.u.]	45485	69098	32282	995	124
	AE				
	2,4-DNA	HMX	RDY	TNBA	TNT
\bar{x} [j.u.]	212865	495304	200663	2660	406
x_{min}[j.u.]	200237	461262	184405	2453	377
x_{max} [j.u.]	225352	538250	217464	2880	442

SD	8972,695	29407,374	13592,192	167,937	24,834
RSD	0,0422	0,0594	0,0677	0,0631	0,0612
CV [%]	4,2	5,9	6,8	6,3	6,1
Rozstęp [j.u.]	25115	76988	33059	427	65
r [j.u.]	25379	83177	38445	475	70
	MAE				
	2,4-DNA	HMX	RDX	TNBA	TNT
\bar{x} [j.u.]	225747	560718	219710	2965	464
x_{min} [j.u.]	214464	517514	195708	2737	429
x_{max} [j.u.]	241893	602434	247045	3235	508
SD	11137,927	31469,982	20469,941	209,955	29,145
RSD	0,0493	0,0561	0,0932	0,0708	0,0629
CV [%]	4,9	5,6	9,3	7,1	6,3
Rozstęp [j.u.]	27429	84920	51337	498	79
r [j.u.]	31503	89011	57898	594	82

Z analizy tabel 27 i 28 wynika, że opracowane metody analizy bez względu na wybrany rodzaj przygotowania próbki i rodzaj wykorzystanej jonizacji są powtarzalne. Kryterium akceptacji, które przyjęto dla tego parametru wynosi 15% współczynnika CV. Jak wiadomo powtarzalność jest tym większa im wartość liczbowo obliczonego parametru jest mniejsza. Największą powtarzalnością charakteryzowały się wyniki otrzymane podczas ekstrakcji MAE i analizy za pomocą LC-APCI-MS/MS, za wyjątkiem TNT. W przypadku analizy za pomocą LC-ESI-MS/MS, największą dokładność miały wyniki uzyskane podczas AE, za wyjątkiem RDX i HMX – dla których największą dokładność uzyskano stosując ASE. Ponadto obliczony rozstęp wyników dla każdej badanej metody mieścił się w granicy powtarzalności.

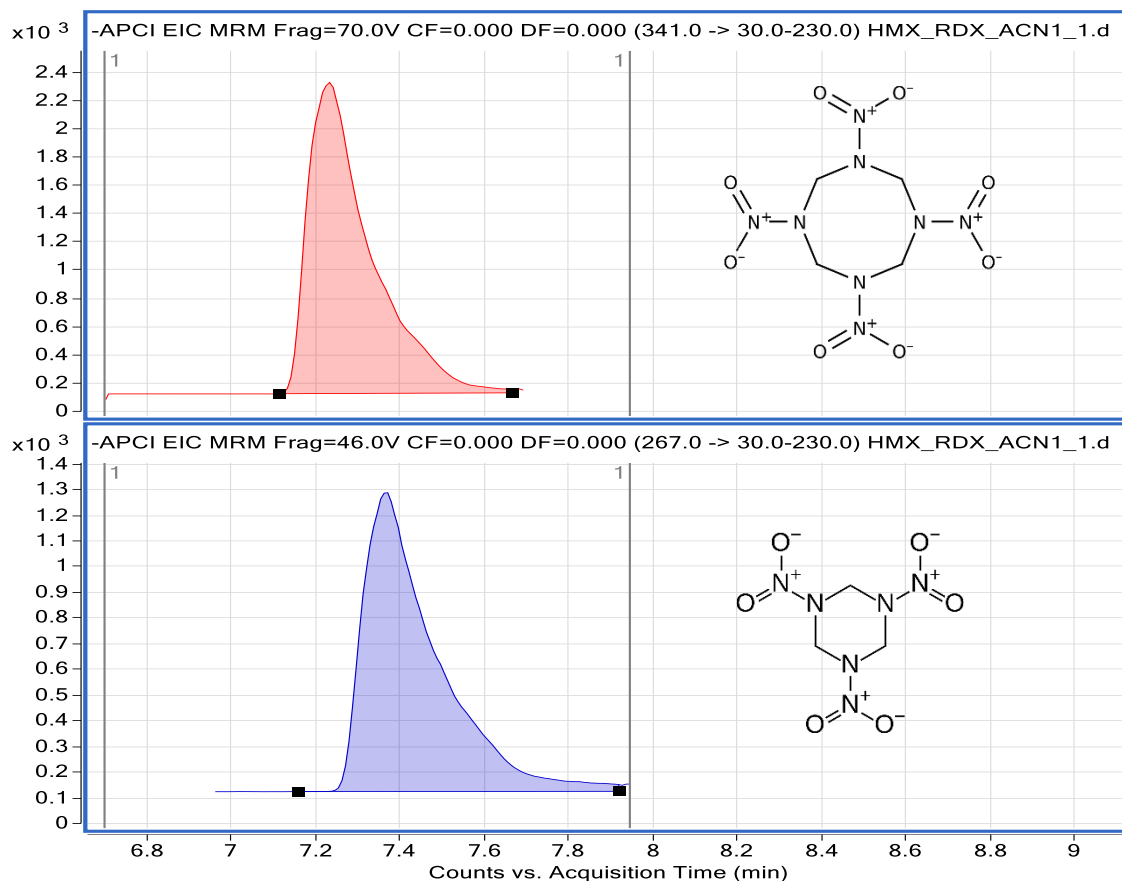
6.5.2.6. Selektywność i specyficzność opracowanych metod analizy za pomocą LC-MS/MS

Specyficzność podczas analizy materiałów wybuchowych i produktów ich przemian została uzyskana zarówno przy zastosowaniu jonizacji APCI, jak i ESI. Jak można zauważyć na rysunku 47 i 48 brak jest nakładania się pików ze strony interferentów, których można oczekiwać w matrycy próbki. Piki pomimo podobnego czasu retencji są dokładnie rozdzielone poprzez zastosowanie komputerowego algorytmu, który pozwala na wyodrębnienie sygnału charakterystycznego dla konkretnych przejść jonowych.



Rys. 47. Chromatogram uzyskany podczas analizy próbki otrzymanej w wyniku ekstrakcji osadu dennego acetonitrylem. Osad skażony wzorcami następujących związków chemicznych: 2,4-DNA, TNBA i TNT. LC-APCI-MS/MS pracował w trybie reakcji następczych we wcześniej zoptymalizowanych warunkach.

Podsumowując należy stwierdzić, że każdy etap fragmentacji w tandemowym detektorze mas zapewnia dodatkowy wymiar specyficzności, tworząc unikalny szlak jonowy, który umożliwia wykrycie i oznaczenie związków o bardzo niskim stężeniu w mieszaninie innych związków w próbce.



Rys. 48. Chromatogram uzyskany podczas analizy próbki otrzymanej w wyniku ekstrakcji osadu dennego acetonitrylem. Osad skażony wzorcami następujących związków chemicznych: HMX i RDX. LC-APCI-MS/MS pracował w trybie reakcji następujących we wcześniej zoptymalizowanych warunkach.

6.5.2.7. Czulość opracowanych metod analizy za pomocą LC-MS/MS

Czulość metody analitycznej dla poszczególnych analitów badanych za pomocą LC-MS/MS z zastosowaniem zarówno APCI jak i ESI jako źródeł jonizacji przedstawiono w tabeli 24. Przy zastosowaniu źródła jonizacji APCI największą czulością analizy charakteryzowało się oznaczenie 2,4- DNA z wartością 420,50, a najmniejszą czulością TNT - 7,28. W przypadku analizy z zastosowaniem jonizacji ESI z największą czulością ok. 920 oznaczano HMX, a najniższą wartość czulości tak jak w przypadku poprzedniego źródła wykazywał TNT - 0,6.

6.6. Podsumowanie uzyskanych wyników badań procesów ekstrakcji i analizy materiałów wybuchowych oraz produktów ich degradacji

Biorąc pod uwagę opracowane procedury analizy materiałów wybuchowych i produktów ich degradacji należy stwierdzić, że wszystkie wyznaczone dla nich parametry walidacyjne spełniają kryteria akceptowalności poprawnej metody analitycznej. Jednakże podczas analizy osadów dennych pochodzących z Morza Bałtyckiego należy przypuszczać, iż

możliwa jest obecność każdego z badanych analitów. Z tego powodu do analizy próbek środowiskowych nie można zastosować analizy z wykorzystaniem LC-ESI-MS/MS ze względu na maskowanie jonów TNT i TNBA przez inne anality występujące w próbce. Stosując tę metodę można, w sposób niezamierzony, uzyskać fałszywie negatywny wynik dla tych związków. Dlatego też podczas analizy RDX, HMX, TNT i produktów ich degradacji należy stosować analizę za pomocą GC-EI-MS/MS oraz równoległe LC-APCI-MS/MS. Niektóre ze związków takie jak TNT i 2,4-DNA można analizować za pomocą obu metod analizy chromatograficznej, czyli GC i LC. Pozostałe związki należy analizować za pomocą jednej bądź drugiej techniki. GC-EI-MS/MS umożliwia analizę 4-NT, 2,4-DNT, 2,6-DNT, 1,3-DNB, 1,3,5-TNB, z kolei LC-APCI-MS/MS pozwala na analizę RDX, HMX i TNBA.

Najlepszą metodę przygotowania próbki osadu dennego wybrano na podstawie porównania parametrów dla wszystkich opracowanych metod. Parametry te zestawiono w tabeli 29 z wyszczególnieniem takich aspektów jak: odzysk metody, czas ekstrakcji jednej próbki oraz czas ekstrakcji pięćdziesięciu próbek, a także ilość zużywanego rozpuszczalnika, całkowite koszty ekstrakcji, koszty używanej aparatury oraz ważne parametry walidacyjne (a zwłaszcza LOD i LOQ) w przeliczeniu na jeden gram suchej masy.

Tabela 29. Porównanie czterech technik ekstrakcyjnych z uwzględnieniem dwóch metod analizy za pomocą GC-EI-MS/MS i LC-APCI-MS/MS do oznaczania materiałów wybuchowych i produktów ich rozkładu w osadach dennych.

Metoda analizy	Parametr	LOQ [ng/g]	LOD [ng/g]	Koszt aparatury [PLN]	Koszt ekstrakcji	Ilość rozpuszczalnika na 1 próbkę [mL]	Czas ekstrakcji 50 próbek [h]	Czas ekstrakcji 1 próbki [min]	Odzysk [%]
GC-EI-MS/MS	AE	0,1 – 18,6	0,0 – 6,2	Ok. 10 000	Niski	25	Ok. 1,5	Ok. 30	64,6 - 91,8
	ASE	0,1 – 37,0	0,0 – 12,2	Ok. 250 000	Średni	50	Ok. 13,5	Ok. 16	65,1 - 93,1
	SE	0,1 – 29,8	0,0 – 9,8	Ok. 1 200	Niski	50	Ok. 408	Ok. 1 440	80,7 - 98,1
	MAE	0,2 – 22,4	0,1 - 7,4	Ok 1000	Niski	25	Ok. 25	Ok. 30	39,9 - 224,5
LC-APCI-MS/MS	AE	0,0 – 1,5	0,0 – 0,5	Ok. 10 000	Niski	25	Ok. 1,5	Ok. 30	67,4 - 79,7
	ASE	0,0 – 2,4	0,0 – 0,8	Ok. 250 000	Średni	50	Ok. 11	Ok. 13	76,9 - 92,2
	SE	0,0 – 2,2	0,0 – 0,7	Ok. 1 200	Niski	50	Ok. 204	Ok. 240	66,7 - 96,8
	MAE	0,0 – 2,6	0,0 – 0,9	Ok 1000	Niski	25	Ok. 1	Ok. 1	76,5 - 86,9

Biorąc pod uwagę wartość odzysku wyznaczoną podczas procedur przygotowania próbek pod kątem analizy za pomocą chromatografii gazowej najlepszym wynikiem charakteryzowała się ekstrakcja w aparacie Soxhleta. Jednakże, ta metoda pomimo wysokiej wartości odzysku została wyeliminowana z dalszych rozważań ze względu na stosunkowo długi czas ekstrakcji (ok. 17 dni) niezbędny do analizy większej liczby próbek. Czas ten obliczony był dla przypadku, gdyby do ekstrakcji jednocześnie użyto trzy aparaty Soxhleta. Taką ilość aparatury posiadało laboratorium, w jakim prowadzone były badania. Jeżeli chodzi o inne rodzaje aparatury to laboratorium posiadało jeden aparat do przyspieszonej ekstrakcji rozpuszczalnikiem, dwie wytrząsarki przeznaczone do ekstrakcji ciała stałe – ciecz oraz jedno urządzenie do ekstrakcji wspomaganej mikrofalami. Z pozostałych trzech metod najmniejszymi wartościami odzysku charakteryzowała się ekstrakcja wspomagana mikrofalowo prawdopodobnie ze względu na brak powinowactwa między rozpuszczalnikiem ekstrahującym, a wodą znajdującą się w porach osadu dennego. Ostateczny wybór techniki przygotowania próbki osadu dennego do analizy chromatograficznej został rozstrzygnięty pomiędzy ekstrakcją prowadzoną z wytrząsaniem osadu z rozpuszczalnikiem (AE), a przyspieszoną ekstrakcją rozpuszczalnikiem (ASE). Odzysk w obu przypadkach był na podobnym poziomie, jednakże biorąc pod uwagę czas przygotowania większej liczby próbek, ilość użytego rozpuszczalnika oraz koszty ekstrakcji i zużycia aparatury, korzystniej wypadła ekstrakcja AE. Jako najlepszą metodę do ekstrakcji próbek środowiskowych przeznaczonych do analizy za pomocą GC-EI-MS/MS wybrano ekstrakcję AE.

Z kolei w przypadku opracowanych metod przygotowania próbek przeznaczonych do analizy za pomocą chromatografii cieczowej najlepszym odzyskiem charakteryzowały się dwie metody: ASE i MAE. Jednakże porównując czas potrzebny na przygotowanie większej liczby próbek, ilość rozpuszczalnika i koszty ekstrakcji – korzystniej wypada ekstrakcja wspomagana mikrofalami niż przyspieszona ekstrakcja rozpuszczalnikiem. Z tego względu ekstrakcja MAE wytypowana została, jako najlepsza metoda do przygotowania próbek osadów dennych przeznaczonych do analizy za pomocą LC-APCI-MS/MS.

6.7. Analiza próbek rzeczywistych pobranych z Morza Bałtyckiego

W celu zbadania próbek rzeczywistych pobranych z Morza Bałtyckiego zastosowano dwie najlepsze metody opracowane w niniejszej rozprawie doktorskiej: AE-GC-EI-MS/MS i MAE-LC-APCI-MS/MS. Każda z próbek przygotowana była do analizy za pomocą chromatografu gazowego i cieczowego sprzężonych z tandemowymi spektrometrami mas. Tok postępowania opisany został krok po kroku w rozdziale „podsumowanie i wnioski”. W celu

dokonania poprawnej oceny statystycznej analizę każdej z próbek przeprowadzono trzykrotnie, a wyniki uśredniono. Badaniu poddano 40 próbek pobranych z terenów takich jak: Bornholm, Zatoka Lubecka, Zatoka Kilońska, Zatoka Gdańska, Mały Bełt, Rozewie, Rugia, czy też próbki pobrane na trasie pomiędzy punktami zrzutów amunicji.

24 próbki z 40 zbadanych zawierały co najmniej jeden z badanych związków. Wyniki stężeń analitów w skażonych próbkach opisanych za pomocą nanogramów na gram suchej masy przedstawiono w tabeli 30. 2,4-DNT i TNBA nie zostały wykryte w żadnej z badanych próbek. Najczęściej w osadzie dennym występuje 4-NT, jednakże jego stężenia są niewielkie. Największymi stężeniami charakteryzował się 2,4-DNA, której stężenie sięgało aż 999,4 ng/g podczas analizy za pomocą GC-EI-MS/MS. Stężenie tego analitu w tej samej próbce uzyskane za pomocą LC-APCI-MS/MS było mniejsze i wynosiło 547,8 ng/g. Rozbieżności w oznaczaniu 2,4-DNA i TNT dwoma technikami analitycznymi wystąpić mogły ze względu na niecałkowitą homogenizację próbki środowiskowej.

Podczas analiz za pomocą chromatografii cieczowej oznaczono w niektórych próbkach obecność HMX. Na tej podstawie można przypuszczać, iż RDX w czasach drugiej wojny światowej syntezowany był poprzez zastosowanie procesu Banchmanna (proces KA), podczas którego HMX powstaje jako produkt uboczny. Podczas przeprowadzonych badań nie we wszystkich próbkach oba te anality występowały obok siebie. Jak wspomniano wcześniej w przypadku 2,4-DNA i TNT może być to również wynik niecałkowitej homogenizacji próbki środowiskowej.

Na podstawie analizy próbek środowiskowych stwierdzono, że największym skażeniem charakteryzuje się Głębia Bornholmska. W tamtejszych osadach dennych wykryto największe stężenie badanymi materiałami wybuchowymi i produktami ich degradacji.

Tabela 30. Wyniki analiz chromatograficznych osadów dennych pobranych z różnych obszarów Morza Bałtyckiego, które wykazały obecność materiałów wybuchowych, bądź któregoś z ich produktów rozkładu. Wartości stężeń przedstawiono w ng na 1 g suchej masy.

Lp.	Lokalizacja	GC-MS/MS [ng/g]							LC-MS/MS [ng/g]				
		2,6-DNT	1,3,5-TNB	4-NT	1,3-DNB	2,4-DNT	TNT	2,4-DNA	RDX	HMX	2,4-DNA	TNBA	TNT
1	Bornholm	0,0	0,0	7,5	101,0	0,0	215,2	280,1	0,0	315,2	186,8	0,0	0,0
2		53,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
3		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	13,6	0,0	0,0	0,0	0,0
4		89,1	385,1	9,7	55,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
5		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	82,4	999,4	0,0	0,0	547,8	0,0	13,7
6		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	13,7
7		0,0	0,0	40,2	261,1	0,0	0,0	0,0	24,7	0,0	0,0	0,0	0,0
8		63,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
9		0,0	0,0	18,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
10		0,0	0,0	20,7	0,0	0,0	51,7	179,8	0,0	0,0	0,0	0,0	38,9
11		0,0	0,0	22,9	0,0	0,0	60,0	35,3	0,0	0,0	222,1	0,0	89,4
12		0,0	0,0	14,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
13		0,0	0,0	31,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
14	Zatoka Lubecka	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	11,1	0,0	0,0	0,0	
15	Zatoka Kilońska	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	6,6	75,1	0,0	0,0	
16		0,0	0,0	1,8	0,0	0,0	0,0	0,0	6,2	0,0	79,5	0,0	
17		0,0	0,0	2,2	0,0	0,0	0,0	0,0	7,2	80,0	0,0	0,0	
18		0,0	0,0	3,3	0,0	0,0	0,0	0,0	8,5	0,0	0,0	0,0	
19		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	4,1	0,0	0,0	0,0	
20		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,5	60,8	0,0	0,0	
21	Zatoka Gdańska	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	7,7	116,3	0,0	63,9	157,9	0,0	
22	Mały Bełt	0,0	0,0	9,4	5,3	0,0	0,0	0,0	11,5	0,0	0,0	0,0	
23		0,0	0,0	8,0	1,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
24	Ławica Orła	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	163,6	0,0	0,0	

III. Podsumowanie i wnioski

Wynikiem przeprowadzonych badań są trzy w pełni opracowane i zwalidowane metody analizy wybranych materiałów wybuchowych i produktów ich degradacji z próbek osadów dennych (tab. 31).

Podczas analizy mieszaniny związków za pomocą LC-MS/MS z jonizacją ESI jony od TNT i TNBA maskowane są przez jony innych badanych związków występujących w mieszaninie. Z tego powodu to źródło jonizacji nie nadaje się do analizy próbek środowiskowych.

Tabela 31. Możliwości wyboru metody analitycznej podczas analizy materiałów wybuchowych i produktów ich rozkładu w osadach dennych.

Nazwa analitu	Metody analizy opracowane w trakcie rozprawy doktorskiej		
	LC-APCI-MS/MS	LC-ESI-MS/MS	GC-EI-MS/MS
RDX	++	++	–
HMX	++	++	–
TNT	++	++/–	++
TNBA	++	++/–	–
4-NT	–	–	++
1,3-DNB	–	–	++
1,3,5-TNB	–	–	++
2,4-DNT	–	–	++
2,6-DNT	–	–	++
2,4-DNA	++	++	+

„–” – analiza śladowa niemożliwa, „++” – bardzo dobra metoda analizy, „+” – dobra metoda analizy, „++/–” – bardzo dobra metoda analizy w przypadku gdy w próbce nieobecne są RDX i HMX

Analiza z wykorzystaniem **chromatografu gazowego sprzężonego z tandemowym spektrometrem mas** pracującym w trybie monitorowania reakcji następczych została z powodzeniem zastosowana do analizy próbek osadu dennego w celu zbadania zawartości takich analitów jak: **TNT; 2,4-DNA; 4-NT; 2,4-DNT; 2,6-DNT; 1,3-DNB; 1,3,5-TNB.**

Opracowana procedura postępowania jest następująca:

- 1) Próbki osadów dennych po pobraniu należy zamrozić i w takiej postaci dostarczyć do laboratorium analitycznego.
- 2) W celu dokonania analizy, próbki po wyjęciu z zamrażarki pozostawić w temperaturze pokojowej do rozmrożenia.
- 3) Rozmrożone próbki należy odwirować dwukrotnie z prędkością 2000 obr/min przez 10 minut, a wodę porową oddzielić przez dekantację z nad osadu.
- 4) Próbkę osadu należy zhomogenizować i następnie przygotować odpowiednią liczbę porcji po 10 g każda. Jedną z nich umieścić należy w szklanej zlewce, a pozostałe, przeznaczone do analizy, w naczyniach ekstrakcyjnych.
- 5) Próbkę przygotowaną do określenia suchej masy należy umieścić w suszarce w temp. 70°C i przeprowadzać pomiar kontrolny masy co 24 godziny. Po uzyskaniu jednakowej wartości dla dwóch kolejnych pomiarów, obliczyć zawartość wody w próbce.
- 6) Do próbki w naczyniu ekstrakcyjnym należy dodać około 6,7 mL chloroformu i poddać wytrząsaniu za pomocą na wytrząsarki przez 10 minut.
- 7) Po wytrząsaniu odwirowujemy próbkę z prędkością 3000 obr/min przez 5 minut.
- 8) Warstwę organiczną oddzielamy od osadu przez sączenie przy użyciu bibuły filtracyjnej Whatman nr 5.
- 9) Osad, który pozostał w naczyniu ekstrakcyjnym należy poddać powtórnie czynnościom opisanym w punktach 6-8.
- 10) Uzyskane ekstrakty należy połączyć i osuszyć bezwodnym siarczanem magnezu przez 30 minut, a następnie odwirować z prędkością 3000 obr/min przez 5 minut.
- 11) Osuszony ekstrakt należy przesączyć przy użyciu bibuły filtracyjnej Whatman nr 5 do kolby miarowej o pojemności 25 mL i uzupełnić chloroformem do kreski.
- 12) W następnym etapie należy pobrać 15 mL ekstraktu i zatężyć go 7,5-krotnie w łagodnym strumieniu azotu do objętości 2 mL.
- 13) 1,5 mL zatężonego ekstraktu organicznego należy przenieść do fiołki o pojemności 2 mL, po czym dodać 20 μ L wcześniej przygotowanego roztworu standardu wewnętrznego (C12).
- 14) Napełnioną fiołkę należy umieścić w automatycznym podajniku próbek GC-EI-MS/MS i poddać analizie z zastosowaniem opracowanego wcześniej trybu MRM.

Analiza z wykorzystaniem **chromatografu cieczowego sprzężonego z tandemowym spektrometrem mas** pracującym w trybie monitorowania reakcji następczych została pomyślnie zastosowana do analizy próbek osadu dennego w celu zbadania zawartości takich analitów jak: **TNT; 2,4-DNA; TNBA; RDX i HMX**. Opracowana procedura postępowania jest następująca:

- 1) Próbki osadów dennych po pobraniu należy zamrozić i w takiej postaci dostarczyć do laboratorium analitycznego.
- 2) W celu dokonania analizy, próbki po wyjęciu z zamrażarki pozostawić w temperaturze pokojowej do rozmrożenia.
- 3) Rozmrożone próbki należy odwirować dwukrotnie z prędkością 2000 obr/min przez 10 minut, a wodę porową oddzielić przez dekantację z nad osadu.
- 4) Próbkę osadu należy zhomogenizować i następnie przygotować odpowiednią liczbę porcji po 10 g każda. Jedną z nich umieścić należy w szklanej zlewce, a pozostałe, przeznaczone do analizy, w naczyniach ekstrakcyjnych.
- 5) Próbkę przygotowaną do określenia suchej masy należy umieścić w suszarce w temp. 70°C i przeprowadzać pomiar kontrolny masy co 24 godziny. Po uzyskaniu jednakowej wartości dla dwóch kolejnych pomiarów, obliczyć zawartość wody w próbce.
- 6) Do odważonej próbki w naczyniu ekstrakcyjnym należy dodać około 20 mL acetonitrylu i umieścić ją w aparacie do ekstrakcji wspomaganey mikrofalami na 1 minutę.
- 7) Warstwę organiczną należy oddzielić od osadu przez dekantację i sączenie przy użyciu bibuły filtracyjnej Whatman nr 5.
- 8) Następnie uzyskany ekstrakt należy przenieść do kolby miarowej o pojemności 25 mL i uzupełnić acetonitrylem do kreski.
- 9) W następnym etapie należy pobrać 15 mL ekstraktu i zatężyć go 7,5-krotnie w łagodnym strumieniu azotu do objętości 2 mL.
- 10) 1,5 mL zatężonego ekstraktu organicznego należy przenieść do fiolki o pojemności 2 mL, po czym dodać 20 µL wcześniej przygotowanego roztworu standardu wewnętrznego (DMMP).
- 11) Napelnioną fiolkę należy umieścić w automatycznym podajniku próbek LC-APCI-MS/MS i poddać analizie z zastosowaniem opracowanego wcześniej trybu MRM.

Na podstawie wyników uzyskanych i przedstawionych w części doświadczalnej oraz w podsumowaniu można sformułować następujące wnioski:

- Opracowane metody analizy materiałów wybuchowych i produktów ich degradacji pozwalają na identyfikację i oznaczenie analizowanych związków na bardzo niskich poziomach stężeń (rzędu pojedynczych ng/g suchego osadu) zarówno w próbkach laboratoryjnych, jak i środowiskowych.
- Biorąc pod uwagę takie parametry jak: czas ekstrakcji, koszty aparatury, ilość wykorzystywanych rozpuszczalników, a także granicę oznaczalności i wykrywalności można stwierdzić, że najlepszą metodą przygotowania próbki osadów dennych do analizy za pomocą GC-EI-MS/MS jest ekstrakcja ciałem stałym – cieczą, a za pomocą LC-APCI-MS/MS ekstrakcja polarnym rozpuszczalnikiem wspomagana mikrofalami.
- Stwierdzono, że nie ma możliwości analizy śladowych ilości TNBA, RDX i HMX za pomocą GC-MS/MS z powodu ich rozkładu termicznego w dozwolniku chromatografu. Podczas analizy za pomocą LC-MS/MS związki takie jak 4-NT; 2,4-DNT; 2,6-DNT; 1,3-DNB; 1,3,5-TNB nie tworzyły podczas procesu jonizacji wystarczająco intensywnego sygnału analitycznego, aby oznaczać je na poziomie śladowym.
- W przypadku analizy próbek środowiskowych za pomocą GC-MS/MS, sygnał analityczny otrzymany dla 1,3,5-TNB pochodził z sumy ilości tego związku i TNBA.
- Zastosowanie jonizacji APCI pozwala na osiągnięcie zbliżonych granic wykrywalności i oznaczalności w przypadku analizy RDX i HMX, jak w przypadku analizy z wykorzystaniem jonizacji ESI. Jednakże, podczas analizy TNT i produktów jego degradacji z zastosowaniem LC-APCI-MS/MS granice wykrywalności i oznaczalności są od 1,9 - 12 razy mniejsze niż odpowiednie granice podczas analizy z wykorzystaniem jonizacji ESI.
- Śladowe ilości TNT oraz 2,4-DNA mogą być analizowane zarówno za pomocą chromatografii ciekowej, jak i gazowej. Jednakże, chromatografia ciekowa dla 2,4-DNA pozwala na osiągnięcie LOD i LOQ 181 razy mniejszych wartości w stosunku do chromatografii gazowej.

- W wyniku analizy próbek środowiskowych stwierdzono, że spośród przebadanych obszarów Bałtyku największym skażeniem charakteryzuje się Głębia Bornholmska. W tamtejszych osadach dennych wykryto największe stężenia badanych materiałów wybuchowych i produktów ich degradacji.
- Na podstawie analizy próbek środowiskowych, ze względu na obecność HMX, przypuszczać można, iż podczas drugiej wojny światowej RDX syntezowano poprzez zastosowanie procesu Banchmanna (proces KA).

BIBLIOGRAFIA

- [1] „HELCOM Assessment on maritime activities in the Baltic Sea 2018”, Helsinki Commission, Helsinki 2018.
- [2] J. Wendt, E. Eisbrenner, E. Maser, J. Strehse, U. Wichert, „Ammunition Risk Assessment Study”, EGEOS GmbH, Kiel 2019.
- [3] T. Missiaen, M. Söderström, I. Popescu, P. Vanninen, „Evaluation of a chemical munition dumpsite in the Baltic Sea based on geophysical”, *Science of the Total Environment*, 408 (2010) 3536-3553.
- [4] J. Akhavan, *The Chemistry of Explosives*, Royal Society Of Chemistry, Cambridge 2011.
- [5] P. Cooper, *Explosives Engineering*, Wiley-VCH, New York 1996.
- [6] B. Dobratz, „LLNL explosives handbook: properties of chemical explosives and explosives and explosive simulants”, Lawrence Livermore National Laboratory, Livermore 1981.
- [7] B. Van Aken, J. Yoon, J. Schnoor, „Biodegradation of Nitro-Substituted Explosives 2,4,6-Trinitrotoluene, Hexahydro-1,3,5-Trinitro-1,3,5-Triazine, and Octahydro-1,3,5,7-Tetranitro-1,3,5-Tetrazocine by a Phytosymbiotic Methylobacterium sp. Associated with Poplar Tissues”, *Applied and Environmental Microbiology*, 70 (2003) 508-517.
- [8] M. Hariri, K. Ghani, S. Damiri, „Purification of 2,4,6-trinitrotoluene by digestion with sodium sulfite and determination of its impurities by gas chromatography–electron capture detector (GC-ECD)”, *Journal of the Iranian Chemical Society*, 16 (2019) 2401–2408.
- [9] H. Brust, S. Willemse, T. Zeng, A. Asten, M. Koeberg, A. Heijden, A. Bolck, P. Schoenmakers, „Impurity profiling of trinitrotoluene using vacuum-outlet gaschromatography–mass spectrometry”, *Journal of Chromatography A*, 1374 (2014) 224–230.
- [10] H. Şener, B. Anilanmert, S. Cengiz, „A fast method for monitoring of organic explosives in soil: a gas temperature gradient approach in LC–APCI/MS/MS”, *Chemical Papers*, 71 (2017) 971–979.
- [11] O. Vigneau, X. Machuron-Mandard, „A LC-MS method allowing the analysis of HMX and RDX present at the picogram level in natural aqueous samples without a concentration step”, *Talanta*, 77 (2009) 1609-1613.
- [12] S. Cudziło, A. Maranda, J. Nowaczewski, R. Trębiński, W. Trzciński, *Wojskowe Materiały wybuchowe*, Politechnika Częstochowska, Częstochowa 2000.
- [13] R. Meyer, J. Köhler, A. Homburg, *Explosives*, Wiley-VCH, Weinheim 2007.
- [14] N. Mehta, K. Oyler, G. Cheng, A. Shah, J. Marin, K. Yee, „Primary Explosives”, *Zeitschrift für anorganische und allgemeine Chemie*, 640 (2014) 1309–1313.
- [15] [Online]. Available: <https://www.osha.gov/chemicaldata>.
- [16] T. Klapötke, *Chemistry of High-Energy Materials*, Walter de Gruyter GmbH, Berlin, Boston 2017.
- [17] H. Turhan, T. Atalar, N. Erdem, C. Özden, B. Din, N. Gül, E. Yildiz, L. Türker, „Hexamethylenetetramine Dinitrate (HDN): The Precursor for RDX Production by Bachmann Process”, *Propellants, Explosives, Pyrotechnics*, 38 (2013) 651-657.
- [18] F. Brockman, D. Downing, G. Wright, „Nitrolysis of hexamethylenetetramine: preparation of pure cyclonite”, *Canadian Journal of Research*, 27b (1949) 469-474.

- [19] D. Deeter, J. Gaydos (ed.), Occupational health: the soldier and the industrial base, U. S. Army, Office of the Surgeon General, Washington 1993.
- [20] J. Strehse, D. Appel, C. Geist, H. Martin, E. Maser, „Biomonitoring of 2,4,6-trinitrotoluene and degradation products in the marine environment with transplanted blue mussels (*M. edulis*)”, *Toxicology*, 390 (2017) 117-123.
- [21] A. Juhasz, R. Naidu, „Explosives: Fate, Dynamics, and Ecological Impact in Terrestrial and Marine Environments”, *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 191 (2007) 163-215.
- [22] W. Jurczak, J. Fabisiak, „Corrosion of ammunition dumped in the Baltic Sea”, *Journal of KONBiN*, 41 (2017) 227-246.
- [23] M. Hastings, *I rozpętało się piekło. Świat na wojnie 1939-1945*, Wydawnictwo Literackie, Kraków 2013.
- [24] D. Gordon, J. Nawała, M. Szala, D. Dziedzic, B. Dawidziuk, S. Popiel, „Development of analytical methods used for the study of 2,4,6-trinitrotoluene degradation kinetics in simulated sediment samples from the Baltic Sea”, *Marine Pollution Bulletin*, 135 (2018) 397-410.
- [25] J.-S. Zhao, A. Halasz, L. Paquet, C. Beaulieu, J. Hawari, „Biodegradation of Hexahydro-1,3,5-Trinitro-1,3,5-Triazine and Its Mononitroso Derivative Hexahydro-1-Nitroso-3,5-Dinitro-1,3,5-Triazine by *Klebsiella pneumoniae* Strain SCZ-1 Isolated from an Anaerobic Sludge”, *Applied and Environmental Microbiology*, 68 (2002) 5336-5341.
- [26] A. Bernstein, Z. Ronen, „Biodegradation of the Explosives TNT, RDX and HMX”, *Microbial Degradation of Xenobiotics*, Springer, Berlin, Heidelberg 2011.
- [27] G. Sunahara, G. Lotufo, R. Kuperman, J. Hawari, *Ecotoxicology of Explosives*, CRC Press, Boca Raton 2009.
- [28] N. Coleman, D. Nelson, T. Duxbury, „Aerobic biodegradation of hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine (RDX) as a nitrogen source by a *Rhodococcus* sp., strain DN22”, *Soil Biology and Biochemistry*, 30 (1998) 1159-1167.
- [29] R. Majors, „Trends in Sample Preparation,” *LCGC North America*, 31 (2013) 190-202.
- [30] J. Thornton, *Extraction, Liquid-Liquid*, Thermopedia.
- [31] W. Riemon, H. Walton, *Ion Exchange in Analytical Chemistry*, Pergamon Press, Oxford 1970.
- [32] L. Calderón (ed.), *Chromatography - the Most Versatile Method of Chemical Analysis*, Intech, 2012.
- [33] D. Florez, R. Teixeira, R. Silva, B. Pires, F. Dutra, K. Borges, „Pipette-tip solid-phase extraction using polypyrrole as efficient adsorbent for extraction of avermectins and milbemycins in milk”, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 410 (2018) 3361-3374.
- [34] N. Wang, X. Huang, X. Wang, Y. Zhang, R. Wu, D. Shou, „Pipette tip solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography for the determination of flavonoids from *Epimedium herba* in rat serum and application of the technique to pharmacokinetic studies”, *Journal of Chromatography B*, 990 (2015) 64-72.
- [35] E. Cudjoe, J. Pawliszyn, „A new approach to the application of solid phase extraction disks with LC-MS/MS for the analysis of drugs on a 96-well plate format”, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 50 (2009) 556-562.

- [36] H. Bagheri, A. Es'haghi, A. Es-haghi, E. Mohammadkhani, „High-throughput micro-solid phase extraction on 96-well plate using dodecyl methacrylate-ethylen glycol dimethacrylate monolithic copolymer”, *Analytica Chimica Acta*, 792 (2013) 59-65.
- [37] J. Pawliszyn (ed.), *Comprehensive Sampling and Sample Preparation*, Academic Press, 2012.
- [38] L. Mondello, A. Lewis, K. Bartle (ed.), *Multidimensional Chromatography*, John Wiley & Sons Ltd., Chichester 2002.
- [39] C. Arthur, J. Pawliszyn, „Solid Phase Microextraction with Thermal Desorption Using Fused Silica Optical Fibers”, *Analytical Chemistry*, 62 (1990) 2145-2148.
- [40] J. Aulakh, A. Malik, V. Kaur, P. Schmitt-Kopplin, „A Review on solid phase micro extraction high performance liquid chromatography (SPME-HPLC) analysis of pesticides”, *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 35 (2005) 71-85.
- [41] G. Dhingra, P. Bansal, N. Dhingra, S. Rani, A. Malik, „Development of a microextraction by packed sorbent with gas chromatography-mass spectrometry method for quantification of nitroexplosives in aqueous and fluidic biological samples”, *Journal of Separation Science*, 41 (2018) 639-647.
- [42] P. Fernández, M. González, M. Regenjo, A. Ares, A. Fernández, R. Lorenzo, A. Carro, „Analysis of drugs of abuse in human plasma using microextraction by packed sorbents and ultra-high-performance liquid chromatography”, *Journal of Chromatography A*, 1485 (2017) 8-19.
- [43] E. Baltussen, P. Sandra, F. David, C. Cramers, „Stir bar sorptive extraction (SBSE), a novel extraction technique for aqueous samples: Theory and principles”, *Journal of Microcolumn Separations*, 11 (1999) 737-747.
- [44] F. David, N. Ochiai, P. Sandra, „Two decades of stir bar sorptive extraction: A retrospective and future outlook”, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 112 (2019) 102-111.
- [45] S. Liu, P. Dasgupta, „Liquid Droplet. A Renewable Gas Sampling Interface”, *Analytical Chemistry*, 67 (1995) 2042-2049.
- [46] S. Tang, T. Qi, P. Ansah, J. Nalouzebi Fouemina, W. Shen, C. Basheer, H. Lee, „Single-drop microextraction”, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 108 (2018) 36-313.
- [47] D. Alvarez, J. Petty, J. Huckins, T. Jones-Lepp, D. Getting, J. Goddard, S. Manahan, „Development of a passive, in situ, integrative sampler for hydrophilic organic contaminants in aquatic environments”, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23 (2004) 1640-1648.
- [48] F. Soxhlet, „Die gewichtsanalytische Bestimmung des Milchfettes,” *Polytechnisches Journal (Dingler's)*, 232 (1879) 461-465.
- [49] J. Martín, A. Zafra-Gómez, F. Hidalgo, A. Ibáñez-Yuste, E. Alonso, J. Vilchez, „Multi-residue analysis of 36 priority and emerging pollutants in marine echinoderms (*Holothuria tubulosa*) and marine sediments by solid-liquid extraction followed by dispersive solid phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry anal”, *Talanta*, 166 (2017) 336-348.
- [50] B. Dawidziuk, J. Nawala, D. Dzedzic, D. Gordon, S. Popiel, „Development, validation and comparison of three methods of sample preparation used for identification and quantification of 2,4,6-trinitrotoluene and products of its degradation in sediments by GC-MS/MS”, *Analytical Methods*, 10 (2018) 5188-5196.
- [51] W. Tchabo, Y. Ma, E. Kwaw, L. Xiao, M. Wu, M. Apaliya, „Impact of extraction parameters and their optimization on the nutraceuticals and antioxidant properties of

- aqueous extract mulberry leaf”, *International Journal of Food Properties*, 21 (2018) 717-732.
- [52] B. Baghdikian, A. Filly, A.-S. Fabiano-Tixier, E. Petitcolas, F. Mabrouki, F. Chemat, E. Ollivier, „Extraction by solvent using microwave and ultrasound-assisted techniques followed by HPLC analysis of Harpagoside from *Harpagophytum procumbens* and comparison with conventional solvent extraction methods”, *Comptes Rendus Chimie*, 119 (2016) 692-698.
- [53] P. Tatke, M. Rajan, „Comparison of Conventional and Novel Extraction Techniques for the Extraction of Scopoletin from *Convolvulus Pluricaulis*”, *Indian journal of pharmaceutical education*, 48 (2014) 27-31.
- [54] A. Abu-Samra, J. Morris, S. Koirtyohann, „Wet Ashing of Some Biological Samples in a Microwave Oven”, *Analytical Chemistry*, 47 (1975) 1475-1477.
- [55] J. Jocelyn Paré, „Microwave-assisted extraction from materials containing organic matter”, U.S. Patent 5458897, 17 Październik 1995.
- [56] M. Nakamura, T. Itoh, „Extraction, partial purification, and properties of a mycoplasmal growth inhibitor extracted from cells of *Mycoplasma* by ultrasonication”, *Current Microbiology*, 9 (1983) 177-185.
- [57] J. Ezzell, B. Richter, W. Felix, S. Black, J. Meikle, „A Comparison of Accelerated Solvent Extraction with Conventional Solvent Extraction for Organophosphorus Pesticides and Herbicides”, *LC-GC*, 13 (1995) 390-398.
- [58] R. Ahmad, N. Ahmad, A. Shehzad, „Solvent and temperature effects of accelerated solvent extraction (ASE) with Ultra-high pressure liquid chromatography (UHPLC-PDA) technique for determination of Piperine and its ICP-MS analysis”, *Industrial Crops and Products*, 136 (2019) 37-49.
- [59] L. Suo, W. Huang, Q. Zhu, L. Ma, M. Hu, „Accelerated solvent extraction coupled to high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry for simultaneous determination of 11 organophosphorus flame retardants in aquatic products”, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98 (2018) 5287-5293.
- [60] H. Giergielewicz-Możajska, Ł. Dąbrowski, J. Namieśnik, „Accelerated Solvent Extraction (ASE) in the Analysis of Environmental Solid Samples — Some Aspects of Theory and Practice”, *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 31 (2010) 149-165.
- [61] U.S. EPA., *Method 8330B (SW-846): Nitroaromatics, Nitramines, and Nitrate Esters by High Performance Liquid Chromatography (HPLC)*, Washington, DC., 2006.
- [62] T. Jenkins, P. Miyares, K. Myers, E. McCormick, A. Strong, „Comparison of solid phase extraction with salting-out solvent extraction for preconcentration of nitroaromatic and nitramine explosives from water”, *Analytica Chimica Acta*, 289 (1994) 69-78.
- [63] M. Smith, G. Collins, J. Wang, „Microscale solid-phase extraction system for explosives”, *Journal of Chromatography A*, 991 (2003) 159-167.
- [64] D. Cassada, S. Monson, D. Snow, R. Spalding, „Sensitive determination of RDX, nitroso-RDX metabolites, and other munitions in ground water by solid-phase extraction and isotope dilution liquid chromatography–atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry”, *Journal of Chromatography A*, 844 (1999) 87-95.
- [65] F. Monteil-Rivera, C. Beaulieu, J. Hawari, „Use of solid-phase microextraction/gas chromatography-electron capture detection for the determination of energetic chemicals in marine samples”, *Journal of Chromatography A*, 1066 (2005) 177-187.

- [66] E. Psillakis, N. Kalogerakis, „Solid-phase microextraction versus single-drop microextraction for the analysis of nitroaromatic explosives in water samples”, *Journal of Chromatography A*, 938 (2001) 113-120.
- [67] F. Monteil-Rivera, C. Beaulieu, S. Deschamps, L. Paquet, J. Hawari, „Determination of explosives in environmental water samples by solid-phase microextraction–liquid chromatography”, *Journal of Chromatography A*, 1048 (2004) 213-221.
- [68] T. Ariyaratna, P. Vlahos, C. Tobias, R. Smith, „Sorption kinetics of TNT and RDX in anaerobic freshwater and marine sediments: Batch studies”, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 35 (2016) 47-55.
- [69] T. Ariyaratna, P. Vlahos, R. Smith, S. Fallis, T. Groshens, C. Tobias, „Biodegradation and mineralization of isotopically labeled TNT and RDX in anaerobic marine sediments”, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 36 (2016) 1170-1180.
- [70] G. Rosen, G. Lotufo, R. George, B. Wild, L. Rabalais, S. Morrison, J. Belden, „Field validation of POCIS for monitoring at underwater munitions sites,” *Environmental Toxicology and Chemistry*, 37 (2018) 2257-2267.
- [71] G. Sunahara, S. Dodard, M. Sarrazin, L. Paquet, G. Ampleman, S. Thiboutot, J. Hawari, A. Renoux, „Development of a Soil Extraction Procedure for Ecotoxicity Characterization of Energetic Compounds”, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 39 (1998) 185-194.
- [72] M.-O. Turcotte-Savard, S. Brochu, „Degradation of RDX, TNT, and HMX during EPA 8330B Sample Processing and Analysis of Soils under Hydrated Lime or Dithionite-Based Chemical Remediation”, *Soil and Sediment Contamination: An International Journal*, 28 (2019) 245-257.
- [73] H. Mayfield, E. Burr, M. Cantrell, „Analysis of Explosives in Soil Using Solid Phase Microextraction and Gas Chromatography”, *Analytical Letters*, 39 (2006) 1463-1474.
- [74] X. Pan, B. Zhang, S. Cox, T. Anderson, G. Cobb, „Determination of N-nitroso derivatives of hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine (RDX) in soils by pressurized liquid extraction and liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry”, *Journal of Chromatography A*, 1107 (2006) 2-8.
- [75] A. Kjellström, M. Brantlind, C. Eldsäter, „Optimized microwave extraction for trace detection of 2,4,6-trinitrotoluene in soil samples”, *Chemosphere*, 71 (2008) 1701-1708.
- [76] T. Bausinger, U. Dehner, J. Preuss, „Determination of mono-, di- and trinitronaphthalenes in soil samples contaminated by explosives”, *Chemosphere*, 57 (2004) 821-829.
- [77] M. Chappell, B. Porter, C. Price, B. Pettway, R. George, „Differential kinetics and temperature dependence of abiotic and biotic processes controlling the environmental fate of TNT in simulated marine systems”, *Marine Pollution Bulletin*, 62 (2011) 1736-1743.
- [78] H. Ek, G. Dave, E. Nilsson, J. Sturve, G. Birgersson, „Fate and Effects of 2,4,6-Trinitrotoluene (TNT) from Dumped Ammunition in a Field Study with Fish and Invertebrates”, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 51 (2006) 244-252.
- [79] E. Decarlo, E. Cox, M. Overfield, „Ordnance Reef Wai'anae, Hawai'i: Remote Sensing Survey and Sampling at a Discarded Military Munitions Sea Disposal Site”, Silver Spring, Maryland 2007.
- [80] G. Machlis, T. Hanson, Z. Špirić, J. McKendry (ed.), *Warfare Ecology, A New Synthesis for Peace and Security*, Springer, Dordrecht 2011.

- [81] G. Pascoe, K. Kroeger, D. Leisle, R. Feldpausch, „Munition constituents: Preliminary sediment screening criteria for the protection of marine benthic invertebrates”, *Chemosphere*, 81 (2010) 807-816.
- [82] J. Pennington, G. Lotufo, C. Hayes, B. Porter, R. George, „TNT, RDX, and HMX Association with Organic Fractions of Marine Sediments and Bioavailability Implications”, *Environmental Chemistry of Explosives and Propellant Compounds in Soils and Marine Systems: Distributed Source Characterization and Remedial Technologies*, American Chemical Society, Washington DC 2011.
- [83] F. Wilson, A. Cupples, „Microbial community characterization and functional gene quantification in RDX-degrading microcosms derived from sediment and groundwater at two naval sites”, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100 (2016) 7297-7309.
- [84] F. Onuska, A. El-Shaarawi, K. Terry, E. Vieira, „Optimization of Accelerated Solvent Extraction for the Analysis of Munitions Residues in Sediment Samples”, *Journal of Microcolumn Separations*, 13 (2001) 54-61.
- [85] U. EPA, *Method 3540C (SW-846): Soxhlet Extraction*, 1996.
- [86] M. Ballentine, C. Tobias, P. Vlahos, R. Smith, C. Cooper, „Bioconcentration of TNT and RDX in Coastal Marine Biota”, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 68 (2015) 718-728.
- [87] K. Brezinski, B. Gorczyca, „An overview of the uses of high performance size exclusion chromatography (HPSEC) in the characterization of natural organic matter (NOM) in potable water, and ion-exchange applications” *Chemosphere*, 217 (2019) 122-139.
- [88] K. Racine, A. Lee, A. Stewart, K. Blakeslee, A. Neilson, „Development of a rapid ultra performance hydrophilic interaction liquid chromatography tandem mass spectrometry method for procyanidins with enhanced ionization efficiency”, *Journal of Chromatography A*, 1594 (2019) 64-64.
- [89] A. Oztekin, Z. Almaz, S. Gerni, D. Erel, S. Kocak, M. Sengül, H. Ozdemir, „Purification of peroxidase enzyme from radish species in fast and high yield with affinity chromatography technique”, *Journal of Chromatography B*, 1114-1115 (2019) 86-92.
- [90] X. Ren, K. Zhang, D. Gao, Q. Fu, J. Zeng, D. Zhou, L. Wang, Z. Xia, „Mixed-mode liquid chromatography with a stationary phase co-functionalized with ionic liquid embedded C18 and an aryl sulfonate group”, *Journal of Chromatography A*, 1564 (2018) 137-144.
- [91] Z. Witkiewicz, J. Kałużna-Czaplińska, *Podstawy chromatografii i technik elektromigracyjnych*, PWN, Warszawa 2017.
- [92] C. Black, O. Chevallier, K. Cooper, S. Haughey, J. Balog, Z. Takats, C. Elliott, C. Cavin, „Rapid detection and specific identification of offals within minced beef samples utilising ambient mass spectrometry”, *Scientific Reports*, 9 (2019) 6295.
- [93] V. Pauk, K. Lemr, „Forensic applications of supercritical fluid chromatography – mass spectrometry”, *Journal of Chromatography B*, 1086 (2018) 184-196.
- [94] H. Akshatha, B. Gurupadayya, „Application of liquid chromatography coupled with mass spectrometry in the impurity profiling of drug substances and products”, *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 11 (2018) 30-37.
- [95] X.-B. Wei, R.-Q. Li, H. Yu, R.-Q. Wang, „Fast and sensitive determination of 10 forbidden phthalates in perfumes by ultra-high performance liquid chromatography–electrospray ionization–tandem mass spectrometry”, *Journal of Chromatography A*, 1578 (2018) 45-52.

- [96] S. Fakayode, B. Mitchell, D. Pollard, „Determination of boiling point of petrochemicals by gas chromatography-mass spectrometry and multivariate regression analysis of structural activity relationship”, *Talanta*, 126 (2014) 151-156.
- [97] M. Putz, T. Piper, A. Casilli, F. Radler de Aquino Neto, F. Pigozzo, M. Thevis, „Development and validation of a multidimensional gas chromatography/combustion/isotope ratio mass spectrometry-based test method for analyzing urinary steroids in doping controls”, *Analytica Chimica Acta*, 1030 (2018) 105-114.
- [98] F. Pu, S. Chiang, W. Zhang, Z. Ouyang, „Direct sampling mass spectrometry for clinical analysis”, *Analyst*, 144 (2019) 1034-1051.
- [99] P. Suder (red.), A. Bodzoń-Kułakowska (red.) i J. Silberring (red.), *Spektrometria mas*, AGH, Kraków 2016.
- [100] E. de Hoffmann, V. Stroobant, *Mass Spectrometry: Principles and Applications*, Chichester: John Wiley & Sons Ltd., 2007.
- [101] G. Zschornack, V. Ovsyannikov, F. Grossmann, O. Koulthachev, „Electron impact ion source”, USA Patent 6717155B1, 2004.
- [102] A. Harrison, *Chemical ionization mass spectrometry*, CRC Press, Boca Raton 1992.
- [103] R. Flanagan, *Fundamentals of analytical toxicology*, John Wiley & Sons Ltd., Chichester 2007.
- [104] A. Ranney, P. Ziemann, „Identification and quantification of oxidized organic aerosol compounds using derivatization, liquid chromatography, and chemical ionization mass spectrometry”, *Aerosol Science and Technology*, 51 (2017) 342-353.
- [105] S. Banerjee, S. Mazumdar, „Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte”, *International Journal of Analytical Chemistry*, 2012 (2011) 1-40.
- [106] J. Rivera-Austrui, K. Martinez, M. Abalos, C. Sales, T. Portoles, J. Beltran, J. Saulo, B. Aristizabal, E. Abad, „Analysis of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans in stack gas emissions by gas chromatography - atmospheric pressure chemical ionization – triple – quadrupole mass spectrometry”, *Journal of Chromatography A*, 1513 (2017) 245-249.
- [107] A. Rösch, B. Beck, J. Hollender, H. Singer, „Picogram per liter quantification of pyrethroid and organophosphate insecticides in surface waters: a result of large enrichment with LLE and gas chromatography coupled to mass spectrometry using atmospheric pressure chemical ionization,” *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 411 (2019) 3151-3164.
- [108] J. Prasain (ed.), *Tandem Mass Spectrometry: Applications and Principles*, IntechOpen, Londyn 2012.
- [109] Z. Jauković, S. Grujić, I. Bujagić, M. Laušević, „Determination of sterols and steroid hormones in surface water and wastewater using liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry”, *Microchemical Journal*, 135 (2017) 39-47.
- [110] D. Cole, Y. Lee, „Effective evaluation of catalytic deoxygenation for in situ catalytic fast pyrolysis using gas chromatography–high resolution mass spectrometry”, *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 112 (2015) 129-134.
- [111] J. Tuñón-López, M. Beneito-Cambra, J. Robles-Molina, D. Parras-Guijarro, A. Molina-Díaz, A. Sánchez-Vizcaíno, J. García-Reyes, „Multiclass profiling of lipids of archaeological interest by ultrahigh pressure liquid chromatography-atmospheric

- pressure chemical ionization-high resolution mass spectrometry”, *Microchemical Journal*, 132 (2017) 49-58.
- [112] F. Gosetti, E. Mazzucco, D. Zampieri M. Gennaro, „Signal suppression/enhancement in high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry”, *Journal of Chromatography A*, 1217 (2010) 3929-3937.
- [113] C. Wang, „The Ionization Technology of LC-MS, Advantages of APPI on Detection of PPCPs and Hormones”, *Austin Chromatography*, 2 (2015) 1032-10-34.
- [114] R. Allabashi, W. Stach, A. de la Escosura-Muniz, L. Liste-Calleja, A. Merkoçi, „ICP-MS: a powerful technique for quantitative determination of gold nanoparticles without previous dissolving”, *Journal of Nanoparticle Research*, 11 (2009) 2003-2011.
- [115] Y.-Y. Zhao, L.-M. Chen, H.-Z. Guo, Y.-G. Chen, X.-T. Fu, „Research and evaluation of inorganic elements in tradition Chinese medicine based on ICP-MS”, *Chinese Journal of New Drugs*, 28 (2019) 54-59.
- [116] P. Solomon, J. Nelson, „Profiling extractable and leachable inorganic impurities in ophthalmic drug containers by ICP-MS”, *Pharmaceutical Development and Technology*, 23 (2018) 247-254.
- [117] H. Gramowska, I. Krzyzaniak, D. Baralkiewicz, R. Goldyn, „Environmental applications of ICP-MS for simultaneous determination of trace elements and statistical data analysis”, *Environmental Monitoring and Assessment*, 160 (2010) 479-490.
- [118] W. Castro, T. Trejos, B. Naes, J. Almirall, „Comparison of high-resolution and dynamic reaction cell ICP-MS capabilities for forensic analysis of iron in glass”, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 392 (2008) 663-672.
- [119] C. Dalpé, P. Hudon, D. Ballantyne, D. Williams, D. Marcotte, „Trace Element Analysis of Rough Diamond by LA-ICP-MS: A Case of Source Discrimination?”, *Journal of forensic sciences*, 55 (2010) 1443-1456.
- [120] R. Jagtap, W. Maher, „Determination of selenium species in biota with an emphasis on animal tissues by HPLC–ICP-MS”, *Microchemical Journal*, 124 (2016) 422-529.
- [121] J.-P. Goullé, E. Saussereau, L. Mahieu, M. Guerbet, „Current role of ICP-MS in clinical toxicology and forensic toxicology: A metallic profile”, *Bioanalysis*, 6 (2014) 2245-2259.
- [122] B. Kim, H. Chang, M. Hackett, J. Park, P. Seo, T. Hyeon, „Size characterization of ultrasmall silver nanoparticles using MALDI-TOF mass spectrometry”, *Bulletin of The Korean Chemical Society*, 35 (2014) 961-964.
- [123] Y.-P. Kim, H. Shon, S. Shin, T. Lee, „Probing nanoparticles and nanoparticle-conjugated biomolecules using time-of-flight secondary ion mass spectrometry”, *Mass Spectrometry*, 34 (2015) 237-247.
- [124] J. Drzeżdżon, D. Jacewicz, A. Sielicka, L. Chmurzyński, „MALDI-MS for polymer characterization – Recent developments and future prospects”, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 115 (2019) 121-128.
- [125] A. Kicman, M. Parkin, R. Iles, „An introduction to mass spectrometry based proteomics—Detection and characterization of gonadotropins and related molecules”, *Molecular and Cellular Endocrinology*, 260-262 (2007) 212-227.
- [126] K. Wu, R. Odom, „Peer Reviewed: Characterizing Synthetic Polymers by MALDI MS”, *Analytical Chemistry*, 70 (1998) 456-461.
- [127] C. Barner-Kowollik, T. Gruending, J. Falkenhagen, S. Weidner (Eds.), *Mass Spectrometry in Polymer Chemistry*, John Wiley & Sons, Weinheim 2012.

- [128] LCGC Editors, „Quadrupole Mass Analysers: An Introduction”, *LCGC Europe*, 25 (2012) 640.
- [129] M. Locatelli, D. Melucci, G. Carlucci, C. Locatelli, „Recent HPLC strategies to improve sensitivity and selectivity for the analysis of complex matrices”, *Instrumentation Science and Technology*, 40 (2012) 112-137.
- [130] J. Faktor, M. Dvorakova, J. Maryas, I. Struharova, P. Bouchal, „Identification and characterisation of pro-metastatic targets, pathways and molecular complexes using a toolbox of proteomic technologies”, *Klinicka Onkologie*, 25(SUPPL.2) (2012) 2S70-2S77.
- [131] E. de Graaf, A. Altelaar, B. van Breukelen, S. Mohammed, A. Heck, „Improving SRM Assay Development: A Global Comparison between Triple Quadrupole, Ion Trap, and Higher Energy CID Peptide Fragmentation Spectra”, *Journal of Proteome Research*, 10 (2011) 4334-4341.
- [132] U. Boesl, „Time-of-flight mass spectrometry: introduction to the basics”, *Mass Spectrometry Reviews*, 36 (2017) 86-109.
- [133] S. Otlés, *Handbook of Food Analysis Instruments*, CRC Press, Boca Raton 2008.
- [134] J. Schwartz, M. Senko, J. Syka, „A two-dimensional quadrupole ion trap mass spectrometer”, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 13 (2002) 659-669.
- [135] K. Wanner, G. Höfner, *Mass Spectrometry in Medicinal Chemistry: Applications in Drug Discovery*, WILEY-VCH, Weinheim 2007.
- [136] A. Makarov, E. Denisov, O. Lange, „Performance evaluation of a high-field Orbitrap mass analyzer”, *Journal of The American Society for Mass Spectrometry*, 20 (2009) 1391–1396.
- [137] A. Marshall, C. Hendrickson, „High-Resolution Mass Spectrometers”, *Annual Review of Analytical Chemistry*, 1 (2008) 579-599.
- [138] J. Savaryn, T. Toby, N. Kelleher, „A Researcher's Guide to Mass Spectrometry-Based Proteomics”, *Proteomics*, 16 (2016) 2435-2443.
- [139] M. Scigelova, A. Makarov, „Orbitrap mass analyzer—overview and applications in proteomics”, *Proteomics*, 6 (2006) 16-21.
- [140] Q. Hu, R. Noll, H. Li, A. Makarov, M. Hardman, R. Cooks, „The Orbitrap: A new mass spectrometer”, *Journal of mass spectrometry*, 40 (2005) 430-443.
- [141] S. Medhe, „Mass Spectrometry: Detectors Review”, *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering*, 3 (2018) 51-58.
- [142] M. Swartz, „HPLC detectors: a brief review”, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 33 (2010) 1130-1150.
- [143] W. Szczepaniak, *Metody instrumentalne w analizie chemicznej*, PWN, Warszawa 2008.
- [144] F. Rocha, A. Gomes, C. Lunardi, S. Kaliaguine, G. Patience, „Experimental Methods in Chemical Engineering: Ultraviolet Visible Spectroscopy—UV-Vis”, *Canadian Journal of Chemical Engineering*, 96 (2018) 2512-2517.
- [145] Q. Ma, H. Bai, Q. Zhang, W. Ma, H. Xi, X. Zhou, C. Wang, „Determination of Carcinogenic and Allergenic Dyestuffs in Toys by LC Coupled to UV/Vis Spectrometry and Tandem Mass Spectrometry”, *Chromatographia*, 72 (2010) 85-93.
- [146] T. Reis, A. Jaculi, R. Alves, T. Gratieri, R. Azevedo, G. Joanitti, G. Gelfuso, M. Cunha-Filho, „Simple and Selective HPLC-UV/Vis Bioanalytical Method to Determine

- Aluminum Phthalocyanine Chloride in Skin Permeation Studies”, *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2018 (2018) 1-7.
- [147] P. Manzi, A. Durazzo, „Rapid determination of coenzyme Q10 in cheese using high-performance liquid chromatography”, *Dairy Science & Technology*, 95 (2015) 533-539.
- [148] J. Schabron, V. Smith, J. Ware, „Determination of UV Absorbing Polyolefin Additives by Gradient and Isocratic Normal-Phase High Performance Liquid Chromatography”, *Journal of Liquid Chromatography*, 5 (1982) 613-624.
- [149] S. Bonan, G. Fedrizzi, S. Menotta, C. Elisabetta, „Simultaneous determination of synthetic dyes in foodstuffs and beverages by high-performance liquid chromatography coupled with diode-array detector”, *Dyes and Pigments*, 99 (2013) 36-40.
- [150] P. Qi, Z.-H. Lin, G.-Y. Chen, J. Xiao, Z.-A. Liang, L.-N. Lou, J. Zhou, X.-W. Zhang, „Fast and simultaneous determination of eleven synthetic color additives in flour and meat products by liquid chromatography coupled with diode-array detector and tandem mass spectrometry”, *Food Chemistry*, 181 (2015) 101-110.
- [151] C. Poole, „The Electron-Capture Detector in Capillary Column Gas Chromatography”, *Journal of High Resolution Chromatography & Chromatography Communications*, 5 (1982) 454-471.
- [152] B. Gilbert-López, F. Lara-Ortega, J. Robles-Molina, S. Brandt, A. Schütz, D. Moreno-González, J. García-Reyes, A. Molina-Díaz, J. Franzke, „Detection of multiclass explosives and related compounds in soil and water by liquid chromatography-dielectric barrier discharge ionization-mass spectrometry”, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 411 (2019) 4785–4796.
- [153] B. Anilanmert, M. Aydin, R. Apak, G. Avci, S. Cengiz, „A Fast Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometric Analysis of PETN, RDX and HMX in Soil, Utilizing a Simple Ultrasonic-Assisted Extraction with Minimum Solvent”, *Analytical Sciences*, 32 (2016) 611-616.
- [154] R. Waddell, D. Dale, M. Monagle, S. Smith, „Determination of nitroaromatic and nitramine explosives from a PTFE wipe using thermal desorption-gas chromatography with electron-capture detection”, *Journal of Chromatography A*, 1062 (2005) 125–131.
- [155] D. DeTata, P. Collins, A. McKinley, „A comparison of common swabbing materials for the recovery of organic and inorganic explosive residues”, *Journal of Forensic Sciences*, 58 (2013) 757–763.
- [156] [Online]. Available: <https://www.daimonproject.com>.
- [157] M. Valcarcel, *Principles of Analytical Chemistry: A Textbook*, Berlin, Springer-Verlag, Heidelberg 2000.
- [158] PN-EN ISO/IEC 17025:2017, Ogólne wymagania dotyczące kompetencji laboratoriów badawczych i wzorcujących.
- [159] „ICH. Validation of Analytical Procedures: Text And Methodology,” 2005.
- [160] PN-ISO 5725-1:2002 - wersja polska: Dokładność (poprawność i precyzja) metod pomiarowych i wyników pomiarów - Część 1: Ogólne zasady i definicje.
- [161] L. Huber, *Validation and Qualification In Analytical Laboratories - 2nd ed.*, Informa Healthcare, New York 2007.
- [162] P. Vanninen, *Principles of Analytical Chemistry: A Textbook*, University of Helsinki, Helsinki 2017.

- [163] D. Rorabacher, „Statistical Treatment for Rejection of Deviant Values: Critical Values of Dixon’s “Q” Parameter and Related Subrange Ratios at the 95% Confidence Level”, *Analytical Chemistry*, 63 (1991) 139-146.
- [164] K. Busch, „Electro Ionization Sources: The Basics”, *Spectroscopy*, 27 (2006) 14-18.

DOROBEK NAUKOWY

Wykaz publikacji:

1. J. Nawała, M. Szala, D. Dziedzic, D. Gordon, **B. Dawidziuk**, J. Fabisiak, S. Popiel, *Analysis of samples of explosives excavated from the Baltic Sea floor*, Science of the Total Environment, 2020, **708**, 135198.
2. **B. Dawidziuk**, J. Nawała, D. Dziedzic, D. Gordon, S. Popiel, *Development, validation and comparison of three methods of sample preparation used for identification and quantification of 2,4,6-trinitrotoluene and products of its degradation in sediments by GC-MS/MS*, Analytical Methods, 2018, **10**, 5188-5196.
3. J. Nawała, **B. Dawidziuk**, D. Dziedzic, D. Gordon, S. Popiel, *Applications of ionic liquids in analytical chemistry with a particular emphasis on their use in solid-phase microextraction*, Trends in Analytical Chemistry, 2018, **105**, 18-36.
4. D. Gordon, J. Nawała, M. Szala, D. Dziedzic, **B. Dawidziuk**, S. Popiel, *Development of analytical methods used for the study of 2,4,6-trinitrotoluene degradation kinetics in simulated sediment samples from the Baltic Sea*, Marine Pollution Bulletin, 2018, **135**, 397-410.
5. S. Popiel, J. Nawała, D. Dziedzic, D. Gordon, **B. Dawidziuk**, *Study on the Kinetics and Transformation Products of Sulfur Mustard Sulfoxide and Sulfur Mustard Sulfone in Various Reaction Media*, International Journal of Chemical Kinetics, 2018, **50**, 75-89.

Projekty:

1. Kierowanie projektem **RMN 08-681/2017** pn.: „Opracowanie metody analizy 2,4,6-trinitrotoluenu i produktów jego degradacji w próbkach środowiskowych z wykorzystaniem technik chromatograficznych”.
2. Udział w międzynarodowym projekcie **#R013 DAIMON** pn.: „Decision Aid for Marine Munitions”.
3. Udział w Grancie Badawczym **MON 13 994/2018** pn.: „Eliminacja współczesnych zagrożeń związanych z niebezpiecznymi substancjami o potencjale militarnym”.
4. Udział w projekcie **UDA-POWER.04.03.00-00-0054/18** pn.: „Choroby genetycznie uwarunkowane - edukacja i diagnostyka”.
5. Udział w projekcie **RPMA.01.01.00-14-8445/17-00** pn.: „Mazowieckie Centrum Badawczo-Rozwojowe Diagnostyki Matki i Dziecka”
6. Udział w projekcie **W70/INTERREG BSR/2016**.
7. Udział w projekcie **RMN 08-793/2016** pn.: „Otrzymywanie nowych materiałów sorpcyjnych i ich zastosowanie w analizie chemicznej”.
8. Udział w projekcie **RMN 08-682/2017** pn.: „Badanie przemian iperytu siarkowego przebiegających w warunkach środowiska morskiego”.

9. Udział w projekcie **PBS3/A5/50/2015** pn.: „Rozwój innowacyjnej technologii cienkich taśm ze stopów na osnowie fazy międzymetalicznej Ni_3Al o wysokiej aktywności termokatalitycznej w zakresie oczyszczania powietrza z substancji szkodliwych lub kontrolowanego rozkładu węglowodorów”.
10. Udział w projekcie **PBS/23-656/2017** pn.: „Implementacja zaawansowanych metod analitycznych do wojskowego systemu rozpoznania skażeń chemicznych, biologicznych i radiologicznych (CBR) w WAT”.
11. Udział w projekcie w ramach programu **PROM** – Międzynarodowa wymiana studencka doktorantów i kadry akademickiej.

Wykaz komunikatów konferencyjnych:

1. **B. Dawidziuk**, D. Dziedzic, D. Gordon, J. Nawała, S. Popiel, *Opracowanie i porównanie metod przygotowania próbek osadów dennych w analizie 2,4,6-trinitrotoluenu i produktów jego degradacji*, 61. Naukowy Zjazd PTChem, Kraków, 17-21.09.2018.
2. S. Popiel, J. Nawała, D. Dziedzic, D. Gordon, **B. Dawidziuk**, *Czwarta generacja bojowych środków trujących, czyli mity i fakty na temat związków chemicznych z rodziny Novichok*, 61. Naukowy Zjazd PTChem, Kraków, 17-21.09.2018.
3. J. Nawała, D. Dziedzic, D. Gordon, **B. Dawidziuk**, S. Popiel, *Wykorzystanie spektrometrii mas w analizie materiałów wybuchowych i produktów ich rozkładu w próbkach z Morza Bałtyckiego*, 61. Naukowy Zjazd PTChem, Kraków, 17-21.09.2018.
4. D. Dziedzic, J. Nawała, D. Gordon, **B. Dawidziuk**, S. Popiel, *Wykorzystanie polianiliny jako warstwy sorpcyjnej w technice mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej podczas analizy bojowych środków trujących i ich związków pokrewnych*, 61. Naukowy Zjazd PTChem, Kraków, 17-21.09.2018.
5. D. Gordon, J. Nawała, D. Dziedzic, **B. Dawidziuk**, S. Popiel, *Badanie przemian trotylu w osadach dennych pochodzących z Morza Bałtyckiego*, 61. Naukowy Zjazd PTChem, Kraków, 17-21.09.2018.
6. T. Brzeziński, P. Maszczyk, M. Czub, **B. Dawidziuk**, D. Dziedzic, D. Gordon, J. Nawała, S. Popiel, *The effects of chemical warfare agent Clark I on life histories of Daphnia magna*, 34th Congress of the International Society of Limnology, Nanjing, China, 19-24.08.2018.
7. S. Popiel, J. Nawała, M. Szala, D. Gordon, **B. Dawidziuk**, D. Dziedzic, *MUT activities during the 4th period of DAIMON Project*, Helsinki, Finland, 13-15.03.2018.
8. S. Popiel, D. Gordon, **B. Dawidziuk**, J. Nawała, D. Dziedzic, *Chromatograficzne metody analizy związków arsenu uwolnionych z zatopionej amunicji chemicznej w Morzu Bałtyckim*, 60. Naukowy Zjazd PTChem, Wrocław, 17-21.09.2017.
9. S. Popiel, D. Gordon, **B. Dawidziuk**, J. Nawała, D. Dziedzic, *Metal-Organic Frameworks – nowa grupa porowatych, krystalicznych polimerów koordynacyjnych i ich zastosowanie w mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej*, 59. Naukowy Zjazd PTChem, Poznań, 19-23.09.2016.

Postery:

1. **B. Dawidziuk**, D. Dziedzic, D. Gordon, J. Nawała, S. Popiel, *Opracowanie metody analizy 2,4,6-trinitrotoluenu i produktów jego degradacji z wykorzystaniem chromatografii cieczowej*, 61. Naukowy Zjazd PTChem, Kraków, 17-21.09.2018
2. D. Gordon, J. Nawała, D. Dziedzic, **B. Dawidziuk**, S. Popiel, *Wpływ wybranych czynników środowiskowych na kinetykę przemian iperytu siarkowego w Morzu Bałtyckim*, 61. Naukowy Zjazd PTChem, Kraków, 17-21.09.2018
3. J. Nawała, D. Dziedzic, D. Gordon, **B. Dawidziuk**, S. Popiel, *Wykorzystanie wysokorozdzielczej spektrometrii mas typu Orbitrap w analizie substancji niebezpiecznych*, 61. Naukowy Zjazd PTChem, Kraków, 17-21.09.2018
4. D. Gordon, S. Popiel, J. Nawała, D. Dziedzic, **B. Dawidziuk**, P. Rodziewicz, *Kinetic study on Clark I degradation in water*, 24th International Symposium on Separation Sciences, Jasna, 17-20.06.2018
5. D. Gordon, J. Nawała, D. Dziedzic, **B. Dawidziuk**, S. Popiel, *The application of liquid chromatography for the analysis of explosives and their degradation products in sediment samples from the Baltic Sea*, 17-20.06.2018
6. D. Gordon, J. Nawała, D. Dziedzic, **B. Dawidziuk**, P. Arciszewski, S. Popiel, *Wpływ zawartości tlenu na degradację iperytu siarkowego w środowisku morskim*, XV Warszawskie Seminarium Doktorantów Chemików ChemSession'18, Warszawa, 8.06.2018
7. **B. Dawidziuk**, D. Gordon, D. Dziedzic, J. Nawała, S. Popiel, *Zastosowanie cieczy jonowych w technikach przygotowania próbek do analizy*, XV Warszawskie Seminarium Doktorantów Chemików ChemSession'18, Warszawa, 8.06.2018
8. S. Popiel, J. Nawała, D. Gordon, **B. Dawidziuk**, D. Dziedzic, *The application of gas and liquid chromatography to the analysis of chemical warfare agents and their degradation products in sediment samples from the baltic sea*, 42nd International Symposium on Capillary Chromatography and 15th GCxGC Symposium, Riva del Garda, Italy, 13-18.05.2018
9. S. Popiel, J. Nawała, D. Gordon, **B. Dawidziuk**, D. Dziedzic, *Application of mass spectrometry in analysis of chemical warfare agents, explosives and their degradation products in sediment samples from the Baltic Sea*, 6th Conference of Polish Mass Spectrometry Society, 22-26.04.2018 Miedzeszyn
10. D. Gordon, **B. Dawidziuk**, D. Dziedzic, J. Nawała, M. Okuljar, S. Popiel, *Badanie produktów przemian trotylu w symulowanych warunkach Morza Bałtyckiego*, 60. Zjazd Naukowy PTChem, Wrocław, 17-21.09.2017
11. D. Gordon, **B. Dawidziuk**, D. Dziedzic, J. Nawała, S. Popiel, *Badanie przemian iperytu siarkowego w środowisku Morza Bałtyckiego*, 60. Zjazd Naukowy PTChem, Wrocław, 17-21.09.2017

12. J. Nawała, B. Grzankowski, D. Dziedzic, D. Gordon, **B. Dawidziuk**, S. Popiel, *Wpływ dodatków do fazy ruchomej na analizę materiałów wybuchowych*, 60. Zjazd Naukowy PTChem, Wrocław, 17-21.09.2017
13. J. Nawała, D. Dziedzic, D. Gordon, **B. Dawidziuk**, S. Popiel, *Badanie przemian heksogenu w środowisku morskim*, 60. Zjazd Naukowy PTChem, Wrocław, 17-21.09.2017
14. D. Dziedzic, D. Gordon, **B. Dawidziuk**, J. Nawała, S. Popiel, *Optymalizacja elektrochemicznej metody wytwarzania nowych włókien do SPME na bazie polianiliny*, 60. Zjazd Naukowy PTChem, Wrocław, 17-21.09.2017
15. D. Dziedzic, D. Gordon, **B. Dawidziuk**, J. Nawała, S. Popiel, *Zastosowanie polianiliny jako fazy stacjonarnej do SPME podczas oznaczania związków fosforoorganicznych*, 60. Zjazd Naukowy PTChem, Wrocław, 17-21.09.2017
16. **B. Dawidziuk**, D. Gordon, D. Dziedzic, J. Nawała, S. Popiel, *Porównanie możliwości analitycznych chromatografii gazowej i cieczowej podczas oznaczania 2,4,6-trinitrotoluenu*, 60. Zjazd Naukowy PTChem, Wrocław, 17-21.09.2017
17. **B. Dawidziuk**, J. Nawała, D. Gordon, D. Dziedzic, S. Popiel, *Porównanie wydajności ekstrakcyjnych metod przygotowania próbki podczas analizy 2,4,6-trinitrotoluenu z próbek środowiskowych*, 60. Zjazd Naukowy PTChem, Wrocław, 17-21.09.2017
18. D. Gordon, J. Nawała, D. Dziedzic, B. Dawidziuk, *Opracowanie metody analizy trotylu i kwasu 2,4,6-trinitrobenzoesowego z wykorzystaniem LC-MS/MS*, X Międzyuczelniane Seminarium Kół Naukowych, Warszawa, 18-19.05.2017
19. **B. Dawidziuk**, D. Gordon, D. Dziedzic, J. Nawała, *Opracowanie metody analizy 2,4,6-trinitrotoluenu i produktów jego degradacji z wykorzystaniem chromatografii gazowej*, X Międzyuczelniane Seminarium Kół Naukowych, Warszawa, 18-19.05.2017
20. **B. Dawidziuk**, D. Gordon, D. Dziedzic, J. Nawała, S. Popiel, *Synteza, badanie i ocena możliwości zastosowania imidazolowych cieczy jonowych jako faz stacjonarnych do SPME*, 59. Naukowy Zjazd PTChem, Poznań, 19-23.09.2016
21. **B. Dawidziuk**, J. Nawała, D. Gordon, D. Dziedzic, S. Popiel, *Zastosowanie derywatywacji na włóknie SPME podczas analizy wybranych produktów rozkładu iperytu siarkowego*, 59. Naukowy Zjazd PTChem, Poznań, 19-23.09.2016
22. S. Popiel, M. Szala, J. Nawała, D. Gordon, **B. Dawidziuk**, D. Dziedzic, J. Choma, *Zastosowanie wybranych polimerów koordynacyjnych o strukturze metaloorganicznej (MOF) jako faz stacjonarnych w SPME do oznaczania związków arseno- i siarkoorganicznych*, 59. Naukowy Zjazd PTChem, Poznań, 19-23.09.2016
23. D. Gordon, **B. Dawidziuk**, D. Dziedzic, J. Nawała, M. Okuljar, S. Popiel, *Opracowanie metody analizy polarnych produktów degradacji BST z wykorzystaniem LC-MS/MS*, 59. Naukowy Zjazd PTChem, Poznań, 19-23.09.2016

24. D. Gordon, **B. Dawidziuk**, D. Dziedzic, J. Nawała, S. Popiel, *Opracowanie metody syntezy i analizy 1,1'-sulfonylobis[2-(metylotio)etanu] jako prekursora do otrzymywania metabolitów iperytu siarkowego*, 59. Naukowy Zjazd PTChem, Poznań, 19-23.09.2016
25. D. Dziedzic, D. Gordon, **B. Dawidziuk**, J. Nawała, S. Popiel, *Nowe włókna do SPME otrzymywane metodami elektrochemicznymi i ich zastosowanie w analizie bojowych środków trujących i produktów ich degradacji*, 59. Naukowy Zjazd PTChem, Poznań, 19-23.09.2016
26. D. Dziedzic, D. Gordon, **B. Dawidziuk**, J. Nawała, S. Popiel, *Zastosowanie polianiliny jako fazy stacjonarnej do SPME podczas oznaczania trójfenyloarsyny w osadach dennych pobranych z Morza Bałtyckiego*, 59. Naukowy Zjazd PTChem, Poznań, 19-23.09.2016
27. J. Nawała, B. Grzankowski, D. Dziedzic, D. Gordon, **B. Dawidziuk**, S. Popiel, *Porównanie technik przygotowania próbek osadów dennych do analizy chromatograficznej*, 59. Naukowy Zjazd PTChem, Poznań, 19-23.09.2016
28. J. Nawała, D. Dziedzic, D. Gordon, **B. Dawidziuk**, S. Popiel, *Opracowanie i walidacja metody analitycznej do oznaczania formaldehydu w próbkach antybiotyków*, 59. Naukowy Zjazd PTChem, Poznań, 19-23.09.2016
29. **B. Dawidziuk**, D. Gordon, D. Dziedzic, J. Nawała, *Otrzymywanie i zastosowanie nowych pokryć włókien SPME do analizy wybranych związków siarkoorganicznych*, IX Międzyuczelniane Seminarium Kół Naukowych, Warszawa, 19-20.05.2016
30. D. Dziedzic, D. Gordon, **B. Dawidziuk**, J. Nawała, *Wykorzystanie polianiliny jako nowej fazy stacjonarnej do SPME podczas analizy bojowych środków trujących i produktów ich degradacji*, IX Międzyuczelniane Seminarium Kół Naukowych, Warszawa, 19-20.05.2016
31. D. Gordon, J. Nawała, D. Dziedzic, **B. Dawidziuk**, *Wykorzystanie 5-tlenku tiantrenu do oceny charakteru wybranych utleniaczy oraz mechanizmu utleniania tioglikolu i 1,4-ditianu*, IX Międzyuczelniane Seminarium Kół Naukowych, Warszawa, 19-20.05.2016

STRESZCZENIE

Głównym celem pracy było opracowanie, walidacja i porównanie metod analitycznych wykorzystywanych do analizy materiałów wybuchowych i produktów ich przemian w osadach dennych.

W pierwszym etapie badań opracowano i zoptymalizowano warunki analizy chromatograficznej związków z grupy materiałów wysokoenergetycznych. Ponadto opracowano parametry analizy w trybie monitorowania reakcji następczych, który pozwala na selektywne i specyficzne oznaczanie materiałów wybuchowych i produktów ich degradacji nawet w tak skomplikowanej matrycy jak osady denne.

W drugim etapie badań dobrano odpowiednie parametry prowadzenia ekstrakcji wybranych analitów dla czterech różnych metod przygotowania próbek. Następnie porównano opracowane metody ze sobą na podstawie takich parametrów jak: odzysk analitów, czas ekstrakcji 1 próbki oraz czas ekstrakcji 50 próbek, a także ilość zużywanego rozpuszczalnika, koszty ekstrakcji i aparatury oraz granice wykrywalności i oznaczalności w przeliczeniu na 1 gram suchej masy. W wyniku realizacji tego etapu badań zaproponowano najlepsze metody przygotowania próbek osadów dennych zawierających wybrane materiały wybuchowe i produkty ich degradacji.

W trzecim etapie przeprowadzono walidację opracowanych metod analizy materiałów wybuchowych i produktów ich degradacji uwzględniając takie parametry jak: dokładność, precyzja, powtarzalność, specyficzność, granica wykrywalności, granica oznaczalności, liniowość i jej zakres oraz czułość stwierdzając poprawność opracowanych metod.

Ostatnim etapem badań była weryfikacja przydatności opracowanych procedur analitycznych poprzez zastosowanie ich do analizy wybranych związków wysokoenergetycznych z próbek osadów dennych pochodzących z Morza Bałtyckiego.

W wyniku analizy próbek środowiskowych stwierdzono, że spośród przebadanych obszarów Bałtyku największym skażeniem związkami wysokoenergetycznymi i ich pochodnymi charakteryzuje się Głębia Bornholmska. W tamtejszych osadach dennych wykryto największe stężenia badanych materiałów wybuchowych i produktów ich degradacji.

ABSTRACT

The main aims of this research were determination, validation and comparison of analytical methods used for analysis of explosives and their degradation products in sediment samples.

In the first stage, analysis conditions were developed for liquid and gas chromatography. In addition, analysis parameters were developed for multiple reaction monitoring, which allows for the selective and specific determination of explosives and their degradation products in complex matrix such as bottom sediments.

In the second stage of research, parameters of extraction for all analytes and for four different methods of sample preparation were determined. Then the developed methods were compared with each other on the basis of parameters such as: recovery, extraction times for 1 and 50 samples, amount of used solvents, general costs of extraction and instruments, limit of detection and quantification. As a result of this stage, the best methods for preparation of sediment samples containing explosives and their degradation products were proposed.

In the third stage, the developed methods were validated taking into account parameters such as: accuracy, precision, repeatability, specificity, limits of detection and quantification, linearity, range and sensitivity.

The last stage of the research was verification of the developed methods by applying them to the analysis of selected high-energy compounds from sediment samples fished out from the Baltic Sea.

As a result of the analysis of environmental samples, it was found that the Bornholm Basin is characterized by the biggest pollution with high-energy compounds and their derivatives. The highest concentrations of explosives and their degradation products were detected in the sediments from this area.