

ANALÝZA ORGANOFOSFOREČNÝCH OTRAVNÝCH LÁTEK (OL), JEJICH PREKURZORŮ A DEGRADAČNÍCH PRODUKTŮ

ZORA NÝVLTOVÁ^a, JANA PARÝZKOVÁ^a,
JIŘÍ ČERMÁK^a a JAROSLAV CHURÁČEK^b

^aVýzkumný ústav organických syntéz, a.s., 532 18 Pardubice-Rybitví, ^bKatedra analytické chemie, Univerzita Pardubice, nám. Čs. Legií 565, 532 10 Pardubice

Došlo dne 30.VI.1998

Tento rok spadá do období našeho vstupu do NATO. Řada odvětví, bezprostředně propojená s prioritami NATO, se již na tento náš vstup připravuje. Rovněž chemie je jedním z odvětví, o něž bude v této organizaci vždy zájem, zejména po aktivní a velmi úspěšné činnosti naší protichemické jednotky ve válce v Perském zálivu. Jednou složkou, které se dostává i v současné době prioritě, je v současné době sledování potenciálního nebezpečí, jež se týká napadení bojovými chemickými látkami. Mezi širší chemickou veřejností není jistě nic známo o tom, že jedno z našich vybraných pracovišť je zapojeno do evropských struktur, které i v současné době vyhodnocují stav potenciálního nebezpečí výroby OL, a to nejen v Evropě. V tomto článku se dozvíte řadu podrobností, které ukazují, že Česká republika a její obranyschopnost je v evropských zemích uznávána a zcela vážně se s ní počítá i v budoucnu. Tato práce přispívá ke zvýšení prestiže nejen české chemie, ale i celé České republiky mezi členskými státy NATO a ukazuje současně, že i my máme čím přispět do tohoto obranného svazku.

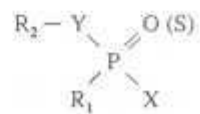
Výzkumný ústav organických syntéz (VÚOS) v Pardubicích-Rybitví za podpory Úřadu pro kontrolu zákazu chemických zbraní při Ministerstvu průmyslu a obchodu České republiky je již několik let zapojen do širší mezinárodní spolupráce, jež se týká kontroly životního prostředí z hlediska výroby a případného použití bojových chemických látek, ať již ve válečných konfliktech (válka v Perském zálivu), nebo při teroristických akcích (Japonsko). Vychází se přitom z Úmluvy o zákazu vývoje, výroby, hromadění zásob a použití chemických zbraní a jejich zničení. Tato Úmluva vstoupila v platnost v dubnu 1997. K ní se připojila i Česká republika ratifikací na základě souhlasu Parlamentu a prezidenta republiky. Řada států světa se zavázala, že tyto látky nikdy nepoužije, že přízná, které bojové látky skla-

duje a jak je bude likvidovat¹. Kontrola bude prováděna formou inspekci odebráním vzorků v chemických závodech, u nichž je předpoklad, že mohou syntézu OL realizovat. Úmluva současně předpokládá vytváření sítě kontrolních laboratoří schopných prokázat přítomnost či nepřítomnost otravných látek, jejich prekurzorů a degradačních produktů v jakékoliv matici (vodě, půdě, ovzduší a pod.). O zařazení mezi vybraná pracoviště se uchází kolem 25 laboratoří z celého světa. Tyto laboratoře se pravidelně účastní okružních analytických testů organizovaných technickým sekretariátem Organizace pro zákaz chemických zbraní v Haagu. Testy jsou pořádány od roku 1990 a úkolem každé ze zúčastněných laboratoří je do 15 dnů identifikovat, event. stanovit látky specifikované v Úmluvě. VÚOS se účastní mezinárodních okružních testů již od roku 1991. Paralelně s testy probíhá na analytickém oddělení VÚOS výzkum, který si klade následující cíle:

- provedení průzkumu možností využití superkritické fluidní extrakce v oblasti degradačních produktů OL,
- prověření retenčních indexů RI řady analogů nervově paralytických látek typu Sarinu a jejich methylovaných degradačních produktů,
- ověření některých zjevných úskalí předúpravy vzorků vody, jako je nutnost odstraňování iontů před derivatizací kyselých degradačních produktů, možnost vazby fosfoniových iontů na sklo a pod.,
- upravení a zejména optimalizace dosud doporučeného postupu analýzy zeminy.

Hlavní pozornost byla věnována nervově paralytickým látkám, které působí inhibicí cholinesteras, jež následně nejsou schopny štěpit acetylcholin na cholin a kyselinu octovou. Acetylcholin se pak hromadí v organismu a je příčinou nervových poruch.

Mezi nervově paralytické látky patří organofosforečné sloučeniny obecného strukturního vzorce:



kde Y = O (ev. S), X = F, CN, N₃, SCH₂CH₂SR₃, S(CH₂)_n(R₃)₂, kde R₃ = alkyl, R = alkyl, R₂ = alkyl, dialkylamoniová skupina.

V souladu s poznatky², že s narůstající délkou alkylových substituentů klesá toxicita látek a tedy i jejich význam jako bojových prostředků, Úmluva zužuje množství možných kombinací těchto látek na:

R₁ = tj. alkyl přímo vázaný na fosfor na methyl, ethyl, n- a iso- propyl

R₂ = alkyl < C10 (včetně cykloalkylů)

X = F, CN, SCH₂CH₂N(R₃)₂ a R₃ = methyl, ethyl, iso-propyl.

Nejnámější jsou sarin, soman, tabun, tzn. látky řady G a látky řady V. Obecně jde o látky, které se vyznačují přímou vazbou uhlíku na fosfor. Tato vazba je pevná³ a tedy odolná degradaci. V přírodě se běžně nevyskytuje, což je pro prokázání užití inkriminovaných látek výhodou.

Pro analýzu těchto látek v životním prostředí je nutná znalost jejich degradačních mechanismů. Díky ní lze určit zdroj i dobu zamoření. Hlavní rozkladnou reakcí je z tohoto hlediska hydrolyza, při které vznikají *o*-alkyl alkylfosfonáty. Názna rozkladné reakce sarinu, somanu a látky VX ve vodě možno popsat (schéma 1).

O-Alkyl methylfosfonáty jsou látky polární a kyselé povazy. Jsou stabilnější než vlastní bojové látky, ale časem se rozkládají až na příslušnou fosfonovou kyselinu.

Rychlost hydrolyzy závisí na teplotě a hodnotě pH vodného roztoku. Pro hydrolyzu 99 % sarinu při 25°C v závislosti na pH vody byly uveřejněny⁴ následující údaje:

pH	1	3	5-6	9,5	11,5
čas, min	100	6 000	100 000	66	1,3

Na rozdíl od fluorofosfonátů se fosfonothioláty hydrolyzují mnohem pomaleji. Poločas rozpadu látky VX při pH 8 a teplotě 25 °C je 184 hodin. Látka VX může hydrolyzovat současně třemi způsoby za vzniku řady látek, a to cestou rozbití vazby P-S, C-S a P-O, jak je vidět na schématu 2 (cit.⁵).

Analýza OL

K analýze bojových chemických látek se využívají hlavně instrumentální techniky, z nichž především plynová chromatografie spojená s hmotnostní detekcí je nejčastější a nejuniverzálnější. Přehled všech instrumentálních technik využitých⁶ v 3. oficiálním okružním testu v roce 1997, je uveden v tabulce I.

Analýze na instrumentálním zařízení ovšem předchází izolace látky z matrice. Původní OL se izolují většinou bez větších obtíží⁷ prostou rozpouštědlovou extrakcí nebo zachytem na sorbentu⁸ s následným vymytím vhodným rozpouštědlem.

Vzhledem k nestálosti těchto látek v životním prostředí má větší význam sledování jejich rozkladných produktů.

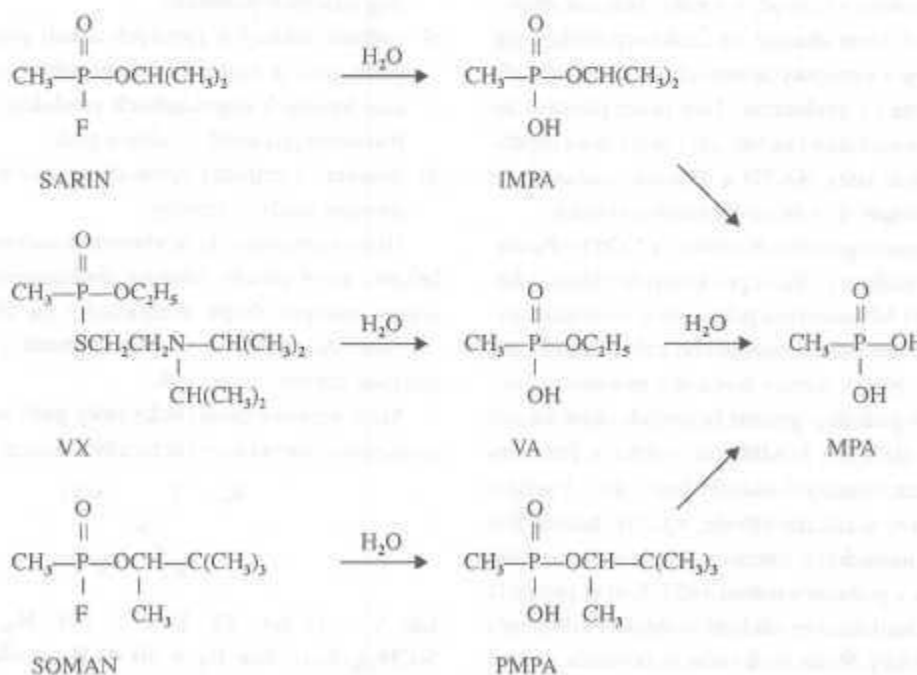


Schéma 1

Tabulka I
Přehled instrumentálních technik

Analytická technika	Počet laboratoří
GC/MS-EI	25
GC/MS/MS-EI	1
GC/MS-CI	23
GC/MS/MS-CI	1
GC-FTIR	8
GC-FPD	11
GC-NPD	12
GC-AED	6
GC-FID	2
LC/ES-MS	4
LC/ES-MS/MS	2
LC/APCI-MS	1
LC/APCI-MS/MS	1
CE	1
¹ H NMR	8
³¹ P NMR	10
¹⁹ F NMR	5
<i>Celkový počet laboratoří</i>	25

Analýza vody

Postup pro analýzu vodných vzorků⁹ doporučený pro účely kontroly plnění Úmluvy je univerzální pro různé typy OL i jejich degradačních produktů. Vychází z extrakce kapaliny kapalinou. Vzorek je extrahován dichlormethanem postupně ve třech krocích: jako neutrální, po okyselení (0,1M-HCl) a po zalkalizování (pomocí NaOH nebo KOH). Všechny extrakty jsou poté zakoncentrovány a analyzovány jako takové nebo po derivatizaci. Konečná vodná fáze je zbavena iontů pomocí katexu, rozdělena na dvě části a odpařena k suchu. Jedna část se *methyluje diazomethanem*, druhá se po vyjmutí vhodným rozpouštědlem *silyluje*.

Analytické metody pro degradační produkty nervově paralytických látek

Běžné plynově chromatografické metody vzhledem k povaze O-alkyl alkylfosfonátů vyžadují předběžnou derivatizaci. Ta však vzhledem k snadné hydrolyze užívaných činidel (silylační činidla, diazoalkany, alkylhalidy) může proběhnout až po odpaření kontaminované vody do sucha.

Často používanou derivatizační metodou je methylace diazomethanem^{10,11}. Jde o postup vhodný pro reakce dostatečně kyselých vodíků (H⁺). Diazomethan je generován

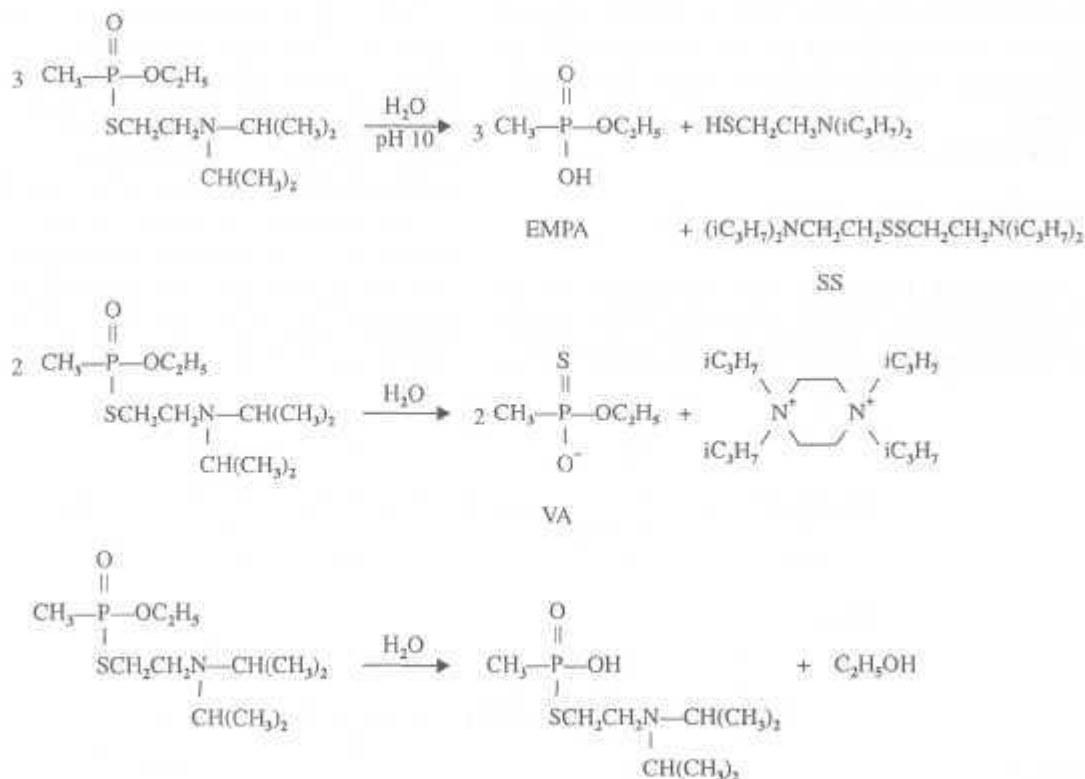


Schéma 2

např. z N-methyl-N-nitrosomočoviny a je sorbován do chlazeného etheru. Výhodou této metody je, že analyzovaný roztok neobsahuje žádné interferující složky činidla. Ovšem diazomethan je látka nebezpečná, co se týče kancerogenity i možné výbušnosti.

Další metodou derivatizace fosfonových kyselin a solí je silylace. Trimethylsilyl deriváty jsou dostatečně stabilní, těkavé, málo polární. K dnes běžným činidlům jako je N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid (BSTFA)¹² se v poslední době přidávají i další činidla (např. N-methyl-terc. butyldimethylsilyl)trifluoroacetamid (MTBSTFA) tvořící terc. butyldimethylsilyl (TBDMS) deriváty, které jsou hydrolyticky stabilnější a citlivější pro MS detekci¹³.

Další používaná derivatizační metoda je založena na tvorbě iontového páru fosfonové kyseliny s kvartérní amoniovou solí (např. trimethylfenyl amonium hydroxidem)¹⁴ a následné methylaci v injektoru ($t = 300\text{ }^{\circ}\text{C}$) plynového chromatografu. Jedná se o tzv. „flash alkylation“. Reakční schéma tvorby iontového páru a jeho pyrolytický rozklad na koncový methylderivát je na schématu 3. K reakci lze použít různé kvartérní soli např. tetramethyl-, tetraethyl-, tetrabutylamonium hydroxid. Výběr činidla závisí na analytu, a to z důvodu možné interference se vzniklým aminem.

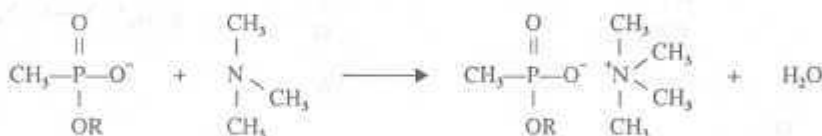
Kvartérní amoniové soli lze využít i k tzv. „fázovým transferům“¹⁵. Anion kyseliny je extrahován v podobě iontového páru z vody do aprotického polárního rozpouštědla, které nesolvatuje anionty, a ty jsou tudíž schopné snadno a rychle za pokojové teploty reagovat s alkylačním činidlem.

Schéma reakce je následující:



Tento způsob derivatizace se nazývá alkylační extrakce¹⁶. Činidlem je alkylhalid (např. metyljodid) a organickou fází dichlormethan (ev. ve směsi s benzenem). Derivát

Krok 1



Krok 2

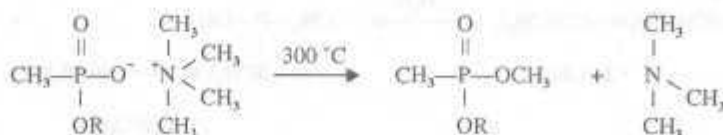


Schéma 3

se doporučuje izolovat např. odpařením organického rozpouštědla a odparek vyjmout do hexanu, kde je alkylamonium halid téměř nerozpustný, a proto neruší vlastní analýzu¹⁷.

Další možností, jak izolovat bojové chemické látky s obsahem fosforu a jejich hydrolyzáty z vody, je zachytit je na vhodném sorbentu a následně z něho vymýt vhodným rozpouštědlem (SPE). Tornes¹⁸ se spolupracovníky rozpracovali použití této extrakce pro analýzu tabunu, sarinu, somanu, yperitu i látky VX z hlediska výběru vhodného sorbentu, optimalizace jeho množství vzhledem k množství vzorku, optimalizace kondicionace kolonek a výběru a množství použitého elučního činidla.

Předností SPE je snadná a rychlá manipulace s kolonkou. Navíc může kolonka posloužit k transportu vodného vzorku z místa zamoření do laboratoře, a to při správném uložení bez většího rizika možné degradace. Vliv doby, teploty skladování a zbylého obsahu vody na sorbentu na rychlost rozkladu otravných látek byl zkoumán pro případ tabunu, sarinu, somanu, yperitu a látky VX a typ sorbentu silikagel s navázaným alkylovým řetězcem C18. Z výzkumu vyplynulo, že v případě labilnějších látek, jako je např. tabun, se částečné degradaci vyhnout nelze a že je potřeba skladovat kolonky při nízké teplotě a analýzu provádět nejlépe do tří dnů od doby odběrů⁸.

Pro záchyt hydrolyzátní nervových látek¹⁴ bylo vyzkoušeno také několik druhů iontoměníčů. Disociované alkylmethylfosfonáty lze zachytit na anexu již protažením neutrální vody kolonkou, neboť disociační konstanta pK_a monoesterů je asi 2,5. Tetramethylfenylamonium hydroxid použitý k eluci slouží zároveň jako methylací činidlo.

Pro stanovení sarinu a somanu společně s methylfosfonovou kyselinou v téže vzorku byly spojeny na sebe dva typy kolonek: anex s vázaným aminopropylem a silikagel s navázaným alkylem C18. Rozkladné kyseliny byly zadrženy na horní kolonce tj. iontoměníči s aminoskupinou

NH₂ a eluovány roztokem tetramethylamonium hydroxidu v methanolu. Zatímco bojové chemické látky jako takové prošly až na spodní kolonku, z které byly eluovány chloroformem.

Extrakce na tuhé fázi je také často vhodným prostředkem pro obohacení vzorku před dávkováním na kolonu (např. v kapalinové chromatografii) a slouží tak ke snížení detekčního limitu analýzy.

Při analýze na plynovém chromatografu jsou degradační produkty obsahující fosfor nebo síru citlivě snímány hlavně na selektivních detektorech jako je plamenofotometrický (FPD), dusík fosforový (NPD) a atomově emisní detektor (AED). Tyto detektory mohou posloužit k vyhledání podezřelé látky, eventuálně lze na základě porovnání s databankou retenčních indexů provést i předběžnou identifikaci. Pro konečnou identifikaci je nutné spojení s některou spektrometrickou technikou, jako je např. GC-MS nebo GC-FTIR.

Hydrofilní charakter by degradační produkty nervových látek předurčoval k analýzám vysoceúčinnou kapalinovou chromatografií. Vzhledem k nedostatku chromoforů v molekule těchto látek však nelze bez další derivatizace použít běžný UV detektor. Bossle¹⁹ proto esterifikoval alkyfosfonáty *p*-bromfenacyl bromidem, aby docílil absorpce v oblasti UV záření. Estery pak úspěšně separoval na reverzní fázi. Jiným použitým derivatizačním činidlem byl např. pentafluorobenzyl bromid⁷. Enzymatická detekce²⁰, založená na principu post-kolonové reakce cholinesterasy s nervově paralytickou látkou, neodhalí již případné hydrolytické deriváty, které enzym neinhibují.

Slibnou techniku v oblasti analýzy stopových množství nervových látek představuje mikrokolonová kapalinová chromatografie s plamenofotometrickou detekcí²¹. Vodný vzorek je možno analyzovat bez předběžné úpravy či derivatizace. Nízkou citlivostí detekce způsobenou malým požadovaným objemem nástřiku (pouze 60 nl) lze vyvážit zkoncentrováním vzorku na předkolonce umístěné uvnitř šesticestného dávkovacího ventilu²².

Laserem indukovanou fluorescenční detekci alkyfosfonových kyselin - po derivatizaci *p*-(9-anthroyloxy)fenacyl bromidem, také ve spojení s mikrokolonou využili Roach a kol.²³ Předností metody je velká citlivost detekce. Nevýhodou je nízká rozpustnost derivátů ve většině rozpouštědel, užívaných v HPLC, a citlivost derivatizačního činidla na obsah vody.

Bossle a kol.²⁴ vypracovali metodu stanovení čtyř monoesterů methylfosfonové kyseliny, která je založena na iontově párové kapalinové chromatografii na reverzní fázi

za použití vodivostního detektoru. Podstatou iontově-párové kapalinové chromatografie v systému obrácených fází je separace analytů iontové povahy na hydrofobní stacionární fázi iontově selektivním činidlem. Dominantní faktory selektivity pak jsou velikost a hydrofobicita iontového páru, nikoliv disociační konstanta analytu, jak je tomu v případě klasické iontové chromatografie. Hydrolyzáty nervových látek jsou ve vodě ionizovány. Rozdíly hodnot jejich disociačních konstant jsou však velmi malé, a proto jsou vhodnými objekty pro tento typ separace.

Vyřešením spojení kapalinové chromatografie s hmotnostním detektorem se rozšířily možnosti analýzy bez derivatizace i pro degradační produkty nervově paralytických látek. Kombinací iontově párové LC na reverzní fázi s termosprayem a hmotnostní detekcí bylo analyzováno 13 organofosfátových kyselin²⁵. Jako iontově párové činidlo byl použit octan amonný nebo kvartérní amonné soli. Všechny kyseliny byly úspěšně eluovány pomocí vody či směsi vody s methanolem.

Stejného systému využili Wils a kol.²⁶ ke studiu chování látky VX ve vodě.

Ionizace tepelným rozprášením (tzv. termospray)²⁷ stejně jako elektropray či ionspray²⁸ jsou šetrné (soft) ionizační techniky. Ve spektrech získaných těmito ionizačními mechanismy většinou dominuje molekulární pík a podíl iontových fragmentů je poměrně malý. Proto z hlediska identifikace nemají takto získaná spektra stejnou vypovídací schopnost jako klasická spektra (např. EI), a vyžadují porovnání se standardem.

Další metodu vhodnou pro rutinní analýzy nervových látek ve vzorcích životního prostředí (jako jsou povrchová a podzemní voda a zemina) aplikovali Kingery a Allen²⁹. K záchytu monoesterů na koloně využívají iontové výměny, ale separace probíhá za využití určitých modifikátorů mechanismem charakteristickým pro reverzní fáze. V případě analýz přírodních vod bylo nutné (vzhledem k vodivostní detekci) snížit koncentrace některých aniontů (např. chloridů pomocí Ag-SPE) ev. interferujících kationtů (např. Fe přidavkem komplexotvorného činidla EDTA). Bylo dosaženo detekčního limitu 0,5 ppb.

Možnosti použití kapilární zónové elektroforézy (CZE) zhodnotil Pianetti³⁰ na řadě homologů alkyfosfonových kyselin. Metoda nevyžaduje žádnou předběžnou derivatizaci, neboť bylo použito nepřímé UV detekce. Jako elektrolýt absorbující UV pro tvorbu pozadí byla vybrána fenylfosfonová kyselina, která má mobilitu blízkou analyzovaným látkám.

CZE může být také spojena přes ionspray s hmotnostní

detekci³¹. Toto spojení kombinuje výbornou separační účinnost kapilární elektroforézy s vysokou citlivostí detekce.

Analýza zemin

Bojové chemické látky nemají na zemině velkou stabilitu, zejména je-li zemina vystavena přírodním vlivům jako je déšť a střídání teplot. Např. čtyři roky po válečném konfliktu v Birjinni zde byly odebrány vzorky zeminy, a to přímo z kráterů po bombách. V zeminách bylo nalezeno 0,6–10 ppm yperitu, okolo 100 ppb thiodiglykolu a hydrolytické produkty sarinu: 6–200 ppb isopropylmethylfosfonátu a 7–40 ppm kyseliny methylfosfonové. Nerozložený sarin na zemině nebyl detegován. V jiné práci²⁶ byl zase sledován časový vývoj chování izotopicky značené látky VX na několika typech zemin. Jílovitá zemina byla ohodnocena jako nejhůře extrahovatelná. 90 % látky VX se v ní rozložilo během dvou dnů.

Vedle již zmiňovaných způsobů izolace jako je technika headspace³² nebo tepelná desorpce, vhodných pro izolaci těkavějších látek ze zeminy, je nejužívanější rozpouštědlová extrakce³³. Na ní je také založen doporučený postup pro analýzu vzorku zeminy, který byl vypracován pro účely kontroly plnění Úmluvy na základě výsledků okružních testů⁹. Tento postup se chápe jako univerzální pro předběžné kompletní vyšetření úplně neznámého vzorku zeminy na všechny typy bojových chemických látek a jejich degradačních produktů. Nemusí být tedy optimální pro všechny v úvahu připadající složky. Je prováděn s cílem odhalit co nejvíce možných látek.

Důležitým faktorem předúpravy vzorku zeminy je jednak použité množství vzorku a volba prvního extrakčního rozpouštědla. V prvním kroku je třeba vyextrahovat co nejvíce možných látek. Navržený postup⁹ doporučuje zpracovat 10 g zeminy a extrahovat 2 x 10 ml dichlormethanu v ultrazvukové lázni 10 minut. Dříve používaný Soxhlet nebo vytřepávání není tak účinné a bývá zdouhavější. Potom je extrakt nutné rychle odstředit, aby nedocházelo k readsorpci, zfiltrovat, vysušit bezvodým síranem sodným a dle potřeby zakonzentrovat.

Protože většina bojových chemických látek se na zemině dosti rychle rozkládá, je v druhém kroku nutné vyextrahovat tyto většinou kyselé polární látky. Proto je zvolena jako druhé extrakční činidlo voda. Tentýž vzorek je smočen 10 ml deionizované vody a ponechán opět 10 minut v ultrazvukové lázni. Další postup je stejný jako v případě

extrakce dichlormethanem. Extrakt je však před zakonzentrováním zbaven kationtů protažením přes katex, aby se zamezilo tvorbě solí organických bází i kyselin. Potom je vzorek odpařen k suchu a derivatizován. Část extraktu se namethyluje, část nasilyluje.

Mnoho bojových chemických látek obsahujících dusík se rozkládá za tvorby bazických degradačních produktů. Proto je ke třetí extrakci vzorku zeminy též doporučen bazický methanol (o pH 11). Jinak se extrakce provede stejně jako v předešlém kroku. K suchu odpařený vzorek se silyluje. Všechny extrakty jsou analyzovány plynovou chromatografií.

Extrakce rozkladných produktů ze zeminy vodou je vhodná i pro analýzu kapalinovou chromatografií^{26,29} nebo i elektroforézou. Další z možností je po extrakci vodou použít techniku záchytu na pevném sorbentu^{8,14,34}.

Předúprava vzorku textilu pro analýzu se neliší od zpracování vzorku zeminy. Ovšem z textilu jsou degradační produkty izolovány většinou velmi obtížně. Svědčí o tom např. nízké výtěžky získané při testování účinnosti extrakce poloesterů methylfosfonových kyselin z bavlněné látky³⁴ i negativní výsledky analýz zbytků OL ve vzorcích oděvů odebraných z pohřebiště v místě prokázaného použití OL v Iráku³³.

Superkritická fluidní extrakce

Vedle výše uvedených klasických metod přípravy vzorku zeminy k analýze se dnes využívá i superkritická fluidní extrakce (SFE)³⁵⁻³⁹. Její předností je nízká spotřeba drahých rozpouštědel s nepříznivými vlastnostmi pro životní prostředí, která jsou nahrazena oxidem uhličitým v nadkritickém stavu. Ten se vyznačuje na jedné straně schopností dobře solvatovat zejména nepolární látky a na straně druhé vysokou permeabilitou blízkou plynům. Extrakce tak mohou proběhnout s vysokou výtěžností v mnohonásobně kratším čase než klasickými postupy. Tato výhoda vyvažuje poměrně vysoké náklady na přístrojové zařízení, které pracuje s vysokými tlaky. Některá zařízení je možno spojit on-line s plynovým chromatografem.

Praktické využití SFE pro analytické účely bylo zpočátku založeno pouze na empirických zkušenostech, získaných při technologických aplikacích nebo analytických extrakcích objemných analytů. Tyto zkušenosti často nevedly k cíli při extrakcích stopových analytů. Teprve v posledních letech se experimentátoři věnují této oblasti. Jsou zkoumány a řešeny vlivy matrice a interakcí matrice-analyt

na úspěšnost extrakce. Byly zpracovány studie aplikující matematické modely na SFE a vypracována teorie SFE^{40,42}.

Jak již bylo řečeno, SFE oxidem uhličitým je velice úspěšná v případě objemných nepolárních analytů. Problémy nastávají tehdy, je-li analyt přítomen ve stopových koncentracích, což je častý případ vzorků životního prostředí, nebo je-li analyt polární. Solvatace objemných polárních analytů se výrazně zlepšuje užitím polárnější superkritické tekutiny, např. oxidu dusného (což je ovšem spojeno s nebezpečím nekontrolovatelné prudké oxidace) nebo užitím polárních modifikátorů CO₂. Obecně se používá hlavně methanol v koncentracích do 10 % obj.

Jak bylo teoreticky zdůvodněno a experimentálně potvrzeno, stopové analyty sorbované na matici jsou rozhodujícím způsobem extrahovány nikoliv dynamicky, ale ve statickém stupni, kde rychlost desorpce a difuze rozhoduje o úspěšnosti extrakce⁴³. Vliv délky obou stupňů je možno prakticky zjistit porovnáním výtěžku dvou stejných vzorků, z nichž jeden je extrahován polovinu extrakční doby staticky a druhou polovinu dynamicky. Druhý vzorek se extrahuje stejnou celkovou dobu jen dynamicky. Má-li kombinovaná extrakce lepší výtěžek než dynamická, rozhodují o výsledku extrakce desorpční a difuzní pochody. Pokud je tomu naopak, rozhoduje o výtěžku solvatační rovnováha.

V oblasti kyselých látek je nejlépe zpracována superkritická fluidní extrakce anionaktivních sulfokyselin, dále karboxylových kyselin a herbicidů. Extrakce je podpořena vytěsněním kyselinou (kyselina mravenčí, kyselina fosforečná)^{44,45}, tvorbou iontového páru (tetraalkylamoniové soli)⁴⁶⁻⁴⁹. Iontové páry jsou výhodné z toho důvodu, že v injektoru chromatografu dochází k převedení kyseliny na alkylester. Je však nutné počítat s tím, že přebytek činidla postupně ničí kolonu. Koncentrace komodifikátoru musí být dosti vysoká, protože je vázán do značné míry i volnými aktivními centry matrice.

Pokud se týká bazických látek, je údajů o něco méně^{50,51}. Obecně nejlépejsou bazické aminy extrahovány za přítomnosti modifikujících aminů s vyšší bazicitou⁵¹. Stejnou funkci mohou mít kvartérní amoniové soli. Naopak extrakce kvartérních amoniových solí je usnadněna tvorbou iontového páru se sulfokyselinami⁵².

Další možností SFE polárních látek je simultánní superkritická derivatizace a extrakce. Derivatizační činidlo je přidáno přímo do patrony. Ve statickém modu dojde k reakci a v dynamickém stupni je vypláchnut méně polární derivát. Takovéto derivatizace byly popsány zejména pro některé karboxylové kyseliny, které byly silylovány^{45,53}, methylovány (methanol-BF₃)^{45,46}, alkylovány me-

thyljodidem^{49,54,55}. Je popsána i extraktivní acethylace fenolů⁵⁶.

Superkritická extrakce chemických zbraní a jejich degradačních produktů nebyla zatím příliš mnoho publikována. První orientační práce pochází z Funska a je z roku 1991. Kuitunen se spolupracovnicí⁵⁷ extrahovala ze zeminy sarin, soman, tabun, yperit a látku CR při 20 MPa a dvou teplotách, 35 a 45 °C. Výsledky porovnávala s ultrazvukovou rozpouštědlovou extrakcí. Hodnoty výtěžnosti obou způsobů byly srovnatelné. Látku VX se nepodařilo žádným ze způsobů extrahovat. Zkoušeny byly též hydrolytické produkty derivátů kyseliny methylfosfonové. Průměrný výtěžek byl pouze 10 %.

Další práce se týká extrakce látek analogických bojovým chemickým látkám⁵⁸. Mezi simulujícími látkami byl chlorethylethylsulfid, diisopropylfluorofosfát, dimethyl methylfosfonát, diisopropyl methylfosfonát a hydrochlorid diethylaminoethanthiolu (DEAT) v koncentracích 2 resp. 12 ppm. Bez modifikátoru byl dobře extrahován při 60 °C a 30 MPa pouze 2-chlorethylethylsulfid (CEES), estery bylo nutno extrahovat CO₂ modifikovaným 5 % methanolem. Diethylaminoethanthiol (DEAT) se jako báze neextrahuje vůbec, jako hydrochlorid pouze v nízkých podílech.

Výsledky, závěry a naše zkušenosti

Ověřili jsme, že doporučená metodika⁹, kterou jsme pro konkrétní vzorky příslušně modifikovali, je dobře využitelná a dává spolehlivé výsledky. Podařilo se nám optimalizovat postupy analýzy od koncentračních technik až po určení retenčních indexů s požadovanou přesností.

Při analýze degradačních produktů jsme postup upravili tak, aby výtěžky kyselých i bazických degradačních produktů byly co nejvyšší. Proto je voda nakonec upravována čpavkem na pH 10–11 a kyselé poloestery methylfosfonové kyseliny jsou po odpaření a iontové výměně methylovány nebo silylovány. Polární látky bazického charakteru jako je např. thiodiglykol a triethanolamin jsou zachyceny na styrendivinybenzenovém sorbentu LiChrolut EN a po vymytí methanolem derivatizovány silylací. Tímto postupem je z vodovodní neupravené vody uvolněno asi 70 % poloesterů methylfosfonové kyseliny při derivatizaci diazomethanem a 60 % silylací, o 20 % méně fosfonových kyselin a 85 % thiodiglykolu.

Tuhé matrice jsou po výtěpu neutrálních látek dichlor-methanem také extrahovány čpavkovou vodou a její další zpracování už je stejné jako u vzorku vody. Polární roz-

kladné produkty nervově paralytických látek jsou izolovány s účinností vyšší než 40 % ze všech tří druhů matrice: mořského a kopaného písku i zahradní zeminy. Diethyl methylfosfonát se z komplikovanější matrice uvolní asi jen z 30 %. Na izolaci neutrálního, ale i silně sorbovatelného bis(2-diisopropylaminoethyl) disulfidu ze zahradní zeminy upravený postup nestačí. Vzorek je doextrahován 0,5 M roztokem methanolického KOH. A i tak je výtěžek jen 20 %.

Možnosti SFE v oblasti polárních-degradačních produktů jsou omezeny vlastním superkritickým extraktorem. Konstrukcí přístroje je dána maximální extrakční teplota, v našem případě 120 °C. Použitý extraktor také není vybaven další pumpou pro kontinuální vhánění modifikátoru do extrakčního oxidu uhličitého. Proto je modifikátor aplikován jednorázově přímo na vzorek. Nejúčinněji působí při izolaci monoesterů methylfosfonové kyseliny triethylamin spolu s methanolem. Při extrakční teplotě 120 °C a teplotě 5 °C na zachytném sorbentu se vyextrahuje z mořského písku 60-70 % O-alkyl methylfosfonátů, z kopaného písku a zeminy už jen v průměru maximálně 20 %. Bis(2-diisopropylaminoethyl)disulfid, který se dobře sorbuje na matici, zejména obsahuje-li organický uhlík, se superkriticky extrahuje s vyššími výtěžky než klasicky.

Lze tedy říci, že pokud je látka neutrální a na matici je vázána prostřednictvím elektronových párů, je SFE účinnější než klasická rozpouštědlová extrakce. Polární sloučeniny, tvořící iontové vazby s kationty obsaženými v matici, superkritický oxid uhličitý, byť s přídavkem polárního modifikátoru, dostatečně nevyextrahuje. Proto výtěžky poloesterů methylfosfonové kyseliny při SFE klesají směrem ke komplikovanější matici obsahující komplexotvorné ionty nebo organický uhlík.

Vhodnou úpravou experimentálních podmínek SFE se nám podařilo účinně izolovat i nepolární degradační produkty yperitu a látky VX. Při dostatečném chlazení zachytného sorbentu a kratší době dynamické extrakce, při které může docházet ke ztrátám vymýváním, je dosaženo účinnosti v průměru nad 90 % při použití zahradní zeminy a kolem 60-70 % u mořského písku. Je-li vzorkovou maticí mořský písek, je nutno počítat s problémy s odtěkáváním při dávkování sledovaných relativně těkavějších látek na matici. U reálné matrice se dá přítomnost těkavých látek očekávat jen v malé míře.

Součástí naší práce byla i tvorba databáze retenčních indexů (RI) OL. Jednou z podmínek kladného hodnocení v mezinárodním okružním testu je nepochybná identifikace látky založená na dvou různých spektrometrických tech-

nikách, přičemž dvěma různými technikami jsou chápány i dva různé způsoby ionizace u hmotnostní spektrometrie tzn. EI-MS a CI-MS. Pokud je identifikace prováděna na základě interpretace hmotnostního spektra, tj. není-li k dispozici standardní sloučenina, má své opodstatnění upřesnit prokázanou totožnost látky informací o retenčním chování, tedy proměřit RI. Např. existuje celá řada analogů sarinu. Některé z nich se liší pouze typem alkyly nebo alkoxyly vázaného na fosfor. EI-hmotnostní spektra těchto látek se významně neliší. CI-spektrum napomůže přes zjištěné molekulové hmotnosti blíže specifikovat O-alkylový řetězec, ale neupřesní už typ vázaného izomeru.

S budováním databanky retenčních indexů bylo započato od látek uvedených v seznamu Úmluvy hned pod bodem 1A1 a od jejich methylovaných degradačních produktů. Postupně byly v mikroměřítku připravovány O-alkyl-alkylfosfonofluoridáty a O-alkyl -O-methylalkylfosfonáty a byly proměřeny jejich retenční indexy.

Retenční indexy (RI) byly naměřeny s přesností 0,1-0,6 jednotek indexu. Výsledná data byla porovnána s RI z finské knihovny⁵⁹, protože tyto indexy byly měřeny za obdobných chromatografických podmínek a na obdobné koloně, ovšem s plamenoionizačním detektorem. Největší rozdíly jsou u látek elujících relativně blízko za rozpouštědlem. Vyšší hodnoty indexů jsou zřejmě ovlivněny způsobem měření na atomově emisním detektoru. U látek s celkovým počtem uhlíků v molekule C6 a C7 je dosaženo shody a hodnoty RI vyšších homologů jsou o několik jednotek nižší než finské.

Tolerance, povolovaná v rámci okružních testů, tj. ± 10 jednotek RI, byla překročena jen v jednom případě.

Upravené postupy izolace i naměřené indexy byly úspěšně využity v mezinárodních okružních testech. Zavedením modifikovaných postupů, zvládnutím mikropreparace analogů OL a jejich degradačních produktů a podpůrná identifikace pomocí retenčních indexů vedla k tomu, že v třetím mezinárodním oficiálním okružním testu (MOOT) se analytická laboratoř VUOS umístila mezi 11 laboratořemi (z celkového počtu 27), které splnily beze zbytku všechna předepsaná kritéria a ve čtvrtém MOOT dokonce byla mezi čtyřmi laboratořemi z celkového počtu 21.

LITERATURA

1. Lisý V.: Chem. Prum. 3, 10 (1997).
2. Söderström M. T., Ketola R. A.: Fresenius Z. Anal. Chem. 350, 162(1994).

3. Kientz Ch. E., Verweij A., de Jong G. J., Brinkman U. A. T.: *J. Microcol. Sep.* 4, *MI* (1992).
4. Franke S.: *Lehrbuch der Militärchemie*. Band I. Militärverlag der DDR, Berlin 1997.
5. Yang Y., Szafraniec L. L., Beaudry W. T., Rohrbaugh D. K.: *J. Am. Chem. Soc.* 112, 6621 (1990).
6. Preliminary Evaluation of Results, Third Official Proficiency Test, OPCW Haag 1997.
7. Witkiewicz Z., Mazurek M., Szulc J.: *J. Chromatogr.* 503, 293 (1990).
8. Tornes J. A., Opstad A. M., Johnsen B. A.: *Inter. J. Environ. Anal. Chem.* 44, 227 (1991).
9. Rautio M: *Recommended Operating Procedures for Sampling and Analysis in the Verification of Chemical Disarmament*. The Ministry for Foreign Affairs of Finland, Helsinki 1993.
10. Verweij A., Degenhardt C. E. A. M., Boter H. L.: *Chemosphere* 3, 115(1979).
11. Verweij A., Boter H. L., Degenhardt C. E. A. M.: *Science* 204,616 (1979).
12. Harvey D. J., Horning M. G.: *J. Chromatogr.* 79, 65 (1973).
13. Field J. A.: *Natl. Meet. Amer. Chem. Soc.* 33, 300 (1993).
14. Tornes J. A., Johnsen B. A.: *J. Chromatogr.* 467, 129 (1989).
15. Lisi A. M., Trout G. J., Kazlauskas R.: *J. Chromatogr.* 563, 257 (1991).
16. Lisi A. M., Kazlauskas R., Trout G. J.: *J. Chromatogr.* 581, 57 (1992).
17. Nicholson J. D.: *Analyst* 103, 1 (1978).
18. Tornes J. A., Opstad A. M., Johnsen B. A.: *Inter. J. Environ. Anal. Chem.* 44, 209 (1991).
19. Bossle P. C, Martin J. J., Sarver E. W., Sommer H. Z.: *J. Chromatogr.* 267, 209 (1983).
20. Sipponen K. B.: *J. Chromatogr.* 389, 87 (1987).
21. Kientz Ch. E., Verweij A., Boter H. L., Poppema A., Frei R. W., de Jong G. J., Brinkman U. A. T.: *J. Chromatogr.* 467, 385 (1989).
22. Kientz Ch. E., Verweij A., de Jong G. J., Brinkman U. A. T.: *J. Microcol. Sep.* 4, 465 (1992).
23. Roach M. C, Ungar L. W., Zare R. N., Reimer L. M., Pompliano D. L., Frost J. W.: *Anal. Chem.* 59, 1056 (1987).
24. Bossle P. C, Reutter D. J., Sarver E. W.: *J. Chromatogr.* 407, 399 (1987).
25. Wils K. R. J., Hulst A. G.: *J. Chromatogr.* 454, 261 (1988).
26. Wils K. R. J., Hulst A. G.: *J. Chromatogr.* 523, 151 (1990).
27. Wils K. R. J., Hulst A. G.: *Fresenius Z. Anal. Chem.* 321, 47 (1985).
28. Bruins A. P., Covey T. R., Henion J. D.: *Anal. Chem.* 59, 2642 (1987).
29. Kingery A. F., Allen H. E.: *Anal. Chem.* 66, 155 (1994).
30. Pianetti G. A., Taverna M., Baillet A., Mahuzier G., Baylocq-Ferrier D.: *J. Chromatogr.* 630, 371 (1993).
31. Kostiainen R., Bruins A. P., Hakkinen V. M. A.: *J. Chromatogr.* 634, 113 (1993).
32. Black O. R. M., Clarke R. J., Cooper D. B., Read R. W., Utley D.: *J. Chromatogr.* 637, 71 (1993).
33. Black R. M., Clarke R. J., Read R. W., Reid M. T. J.: *J. Chromatogr.* 662, 301 (1994).
34. Creasy W. R., Rodriguez A. A., Stuff J. R., Warren R. W.: *J. Chromatogr. A* 709, 333 (1995).
35. Hawthorne S. B.: *Anal. Chem.* 62, 633A (1990).
36. Chester T. L., Pinkston J. D., Raynie D. E.: *Anal. Chem.* 64, 153R (1992).
37. Chester L., Pinkston J. D., Raynie D. E.: *Anal. Chem.* 66, 106R (1994).
38. McNally M. E. P.: *Anal. Chem.* 67, 308A (1995).
39. Taylor L. T.: *Anal. Chem.* 67, 364A (1995).
40. King J. W.: *J. Chromatogr. Sci.* 27, 355 (1989).
41. Pawliszyn J.: *J. Chromatogr. Sci.* 31, 31 (1993).
42. Langenfeld J. J., Hawthorne S. B., Miller D. J., Pawliszyn J.: *Anal. Chem.* 67, 1727 (1995).
43. Yang Y., Gharabeh A., Hawthorne S. B., Miller D. J.: *Anal. Chem.* 67, 641 (1995).
44. Lee H. B., Peart T. E.: *J. Chromatogr.* 594, 303 (1992).
45. Rochette E. A., Harsch J. B., Hill H. H., Jr.: *Talanta* 40, 147(1993).
46. Hawthorne S. B., Miller D. J., Nivens D. E., White D. C.: *Anal. Chem.* 64, 405 (1992).
47. Field J. A., Miller D. J., Field T. M., Hawthorne S. B., Giger W.: *Anal. Chem.* 64, 3161 (1992).
48. Field J. A.: *Natl. Meet.-Amer. Chem. Soc., Div. Envir. Chem. Ji*, 320(1993).
49. Lopez-Avila V., Benedicto J.: *Natl. Meet.- Amer. Chem. Soc, Div. Envir. Chem.* 33, 320 (1993).
50. Ashraf-Khorassani M., Taylor L. T., Zimmerman P.: *Anal. Chem.* 62, 1177 (1990).
51. Oostdyk T. S., Grob R. L., Snyder J. L., McNally M. E.: *Anal. Chem.* 65, 596 (1993).
52. Fernandez P., Alder A. C, Giger W.: *Natl. Meet.- Amer. Chem. Soc, Div. Envir. Chem.* 33, 303 (1993).
53. Hills J. W., Hill H. H. Jr., Maeda T.: *Anal. Chem.* 63, 2152(1991).

54. Croft M. Y., Murby E. J., Wells R. J.: *Anal. Chem.* 66, 4459(1994).
55. Chatfield S. N., Croft M. Y., Dang T., Murby E. J., Yu G. Y. F., Wells R. J.: *Anal. Chem.* 67, 945 (1995).
56. Lee H. B., Peart T. E., Hong-You R. L.: *J. Chromatogr.* 605, 109(1992).
57. Kuitunen M. L., Hartonen K., Riekkola M. L.: *J. Microcol. Sep.* 3, 505(1991).
58. Griest W. H., Ramsey R. S., Ho S. H., Caldwell W. M.: *J. Chromatogr.* 600, 273 (1992).
59. Finnish Retention Index Libraries, Finland, Non Paper, 17. April 96.

Z. Nývltová^a, J. Parýzková^a, J. Čermák^a, and J. Churáček^b (^a*Research Institute of Organic Synthesis, Pardubice-Rybitví*, ^b*The University, Pardubice*): **Analysis of Organophosphorus Chemical Warfare Agents (CWA), their Precursors and Degradation Products**

A review is given concerning the isolation of the degradation products of CWA from water and from the soil. The possibilities of the use of supercritical fluid extraction of CWA are discussed. The practical experience of the authors in analysis of the CWA acquired in international comparison tests is mentioned.

Ústav makromolekulární chemie AV ČR

vyhlašuje konkurs

na postgraduální studium v oborech

makromolekulární chemie a fyzika polymerů.

Ústav makromolekulární chemie AV ČR nabízí postgraduální studium polymerů všem zájemcům, kteří nejpozději v letošním roce ukončí vysokou školu. Uplatnění naleznou nejen absolventi chemických a matematicko-fyzikálních fakult, ale také biologických, technických a dalších oborů.

Postgraduální studium bude probíhat formou doktorského studia ve spolupráci s některou vysokou školou. V roce 1999 prosím zasílejte písemné přihlášky spolu s krátkým životopisem nejpozději do **30. dubna 1999** na níže uvedenou adresu. K přijímacímu pohovoru, který se bude konat v polovině května budete písemně pozváni. Pro mimopražské zájemce, kteří se přihlásí včas, bude možno zajistit i přiměřené ubytování. Další informace o ústavu, včetně finančních podmínek i sportovních a rekreačních možností, získáte při osobní návštěvě po předchozí telefonické domluvě nebo také na internetu:

<http://www.imc.cas.cz/>

Těšíme se na vaši zprávu.

RNDr. Petr Štěpánek, CSc. - tajemník pro vědeckou výchovu

Ústav makromolekulární chemie AV ČR, Heyrovského nám. 2 162 06 Praha 6

tel.: (02) 2040 3211, 2040 3316, fax: (02) 367 981, e-mail: stepan@imc.cas.cz

Ústav **makromolekulární chemie AV ČR** je jednou z největších organizací polymerního výzkumu v celosvětovém měřítku. Už od svého založení profesorem *Ottou Wichterlem* na počátku šedesátých let pokrývá prakticky všechny směry polymerní vědy. Postupně si vybudoval významné mezinárodní postavení díky svým vědeckým výsledkům i organizací mnoha mezinárodních konferencí. Řada jeho někdejších spolupracovníků nyní úspěšně působí na známých univerzitách a ve výzkumných laboratořích po celém světě. Ústav nyní aktualizuje své vědecké projekty, buduje nový přístrojový park a omlazuje pracovní týmy. K řešení nových výzkumných programů hledá perspektivní pracovníky, kteří by postupně přebírali štafetu jeho mezinárodní prestiže. Téma disertační práce může být zvoleno z celé řady oblastí: organická syntéza, syntéza polymerů, biopolymery, lékařské aplikace polymerů, analytika, membrány, sorbenty, separační metody, polymerní sítě, fyzikální chemie, spektroskopie, mikroskopie, reologie, zpracování plastů, matematické modelování, materiálová věda, fyzikální elektronika, fyzikální optika, mechanické vlastnosti, rentgenová strukturní analýza, nebo jiné téma podle představ zájemce.