

PROCEDIMIENTOS DE OPERACION RECOMENDADOS PARA LA APLICACION DE LA CONVENCION DE ARMAS QUIMICAS

Miguel Angel Chong C.*

INTRODUCCION

Cuando en Marzo de 1995 se produjo el atentado en el metro de Tokio el cual causó 10 muertos y más de 200 personas intoxicadas; el mundo entero vio con estupor y pánico este hecho, considerando la necesidad de un control más efectivo no sólo para una eventual guerra externa sino como salvaguarda de la seguridad ciudadana interna.

Sin embargo, este control, que hoy se ve como una urgencia, ya había sido considerado desde años atrás en el marco de las negociaciones para la adopción de un tratado sobre la eliminación de Armas Químicas. Previa a la apertura para la suscripción de la llamada Convención** sobre la Prohibición, Producción, Almacenamiento y Uso de las Armas Químicas y sobre su Destrucción, cuyo texto fue aprobado por las Naciones Unidas en 1992, un grupo de laboratorios representantes de 15 países: Alemania, Australia, Canadá, China, Estados Unidos, Finlandia, Francia, Gran Bretaña, Holanda, India, Noruega, República Checa, Rusia, Suecia y Suiza, empezaron a trabajar al respecto.

* Pontificia Universidad Católica del Perú, Departamento de Ciencias, Sección Química.

** El Congreso Peruano aprobó la Convención mediante Resolución Legislativa Nº 26465 el 19 de mayo de 1995 y luego de ser ratificada por el Presidente de la República, el Representante Permanente del Perú ante la ONU hizo el depósito del instrumento de ratificación correspondiente el 20 de julio ante el Secretario General de Naciones Unidas.

Bajo la coordinación de Finlandia, entre 1989 y 1993, se llevaron a cabo 4 rondas de pruebas. Las muestras preparadas por Francia, Australia, Holanda y los Estados Unidos incluían aire, tierra, agua, gomas, pinturas y concreto, en adición a muestras secas, líquidos recolectados en reactores, tuberías, tanques de almacenamiento, residuos acuosos y orgánicos.

Muestras similares fueron enviadas a todos los laboratorios, dándoseles un mes para realizar sus análisis o pruebas antes de entregar sus resultados preliminares. Adicionalmente se dio un plazo de dos semanas para el reporte de los métodos usados en preparación y análisis de muestra y para el envío de la documentación de espectros y cromatogramas de los compuestos reportados.

Luego de cada ronda de pruebas, el coordinador preparó y envió una visión resumida de los resultados a los laboratorios participantes para informar a los científicos y expertos para su posterior discusión y consecuentes recomendaciones. Estas fueron reunidas bajo el nombre de Procedimientos de Operación Recomendados (ROP) cuyo texto fue aprobado por todos los laboratorios participantes. Estos procedimientos incluyen no solo la preparación y análisis de las muestras sino también sus requerimientos para el embalaje, codificación, manipuleo y control de modo de garantizar su integridad.

PROCEDIMIENTOS DE OPERACION RECOMENDADOS (ROP)[1]

La búsqueda de métodos analíticos, rápidos y seguros, cuya validación estará a cargo del Director-General de la Secretaría Técnica de la Convención de Armas Químicas, dio como resultado un conjunto de técnicas recomendadas.

A continuación se presenta una visión general de algunos procedimientos analíticos:

1. *Cromatografía de Gases (GC).*[2][3]

Esta técnica puede ayudar a una estrategia analítica para el trabajo con este tipo de muestras ya que también se usa comunmente junto a la espectrometría de masas (MS) y a la espectrometría infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR)

Los parámetros que deben considerarse son los siguientes:

a. Técnicas de inyección

Juegan un papel muy importante en la separación cromatográfica. Tanto la inyección directa como los inyector-divisores son de utilidad. La primera permite una inyección de volúmenes relativamente grandes (>50 μ L) reduciendo los límites de detección pero puede conducir a una rápida contaminación de la columna, no pudiéndose además utilizar un automostrador.

b. Columnas

Para una buena resolución, inercia del soporte, reproductibilidad de la retención y estabilidad térmica es necesario escoger una columna capilar de características apropiadas a la aplicación particular:

i. Fase estacionaria

La Tabla 1 enlista las fases estacionarias más apropiadas:

Polaridad	Nombre	Estructura
baja	OV-1, SE-30 SE-54	100% Polimetilsiloxano polidifenilvinildimetilsiloxano 5%, 1%, 94%
intermedia	OV-1701	polidifenildimetilcianopropilsiloxano 7%, 7%, 86%
alta	CW-20M	polietilenglicol

Las fases no polares tienden a tener mejores características en términos de resistencia al oxígeno, mayores eficiencias y máximos de temperaturas más elevados. Cada laboratorio debe contar con por lo menos 2 columnas de diferente polaridad.

La fase SE-54 se puede considerar como mejor elección que la OV-1 para fase no polar porque provee de mejores picos para compuestos medianamente polares como tioglicol y los dialquilsulfonatos. La OV-1701 y la SE-54 constituyen un buen par de fases lo suficientemente diferentes en polaridad. Una columna OV-1701 es recomendada para usar con detector selectivo de

azufre porque las mostazas y sus productos de degradación primaria eluyen muy cerca en la columna SE-54 siendo difícil su identificación.

ii. Diámetro de columna. El diámetro interior tiene influencia directa sobre la retención, eficiencia y capacidad de la columna. Las columnas de 0,2 - 0,3 mm pueden ser las más apropiadas. Las de 0,53 mm se usan para muestras de un limitado número de compuestos.

iii. Espesor de la película. No se usan películas de espesor menor de 0,20 μm , aunque la película estándar (0,25 -0,33 μm) ofrece una buena relación entre resolución y capacidad de muestra sobretodo en compuestos de alto peso molecular. Para compuestos volátiles como HCN, Cl_2CO y ClCN se requieren películas de mayor grosor.

iv. Longitud de la columna. Su selección dependerá del tipo de análisis. Las más cortas (10-15m) son útiles si se tienen pocos compuestos o para análisis cualitativo. Las intermedias (25-30 m) son recomendables para una separación aceptable simultáneamente con un tiempo de análisis razonable. Las más largas (50 m) se utilizan en separaciones muy complejas con máxima resolución.

c. Detectores

Considerando que esta técnica se utiliza conjuntamente con la espectrometría de masas y la FT-IR no es posible tener recomendaciones precisas, sin embargo se pueden utilizar los siguientes:

i. Detector de ionización de flama (FID). Es el más ampliamente usado pero tiene pobre sensibilidad para compuestos como fosgeno o HCN.

ii. Detector de fotoionización (PID) es también universal pero es más útil en compuestos que contienen azufre como las mostazas y sus homólogos así como para tabún y compuestos con doble enlace como las lewisitas.

Los detectores selectivos de fósforo son de importancia para análisis y verificación.

iii. Detector de nitrógeno-fósforo (NPD) es muy sensible y selectivo hacia compuestos que contienen fósforo y/o nitrógeno alcanzando límites de detección de 0,5-5 pg y 10-100 pg, respectivamente. Compuestos que contienen arsénico también son detectables con NPD pero con una sensibilidad menor que con el FID.

iv. Detector fotométrico de flama (FPD). Es más ampliamente usado para compuestos de azufre. Dado que el azufre es selectivo con fósforo, este detector es aplicable tanto para agentes neurotóxicos y mostazas conteniendo azufre. Sin embargo, este detector no tiene comportamiento lineal con azufre y sufre distorsión por elución con hidrocarburos. Los límites de detección son de alrededor de los 5-50 pg/s de fósforo y de 50-500 pg/s de azufre. Los detectores de doble canal operando simultáneamente en los modos S- y P- son también comercialmente útiles.

Una alternativa a FPD en el modo de azufre es el detector de quimiluminiscencia de azufre (SCD) en una llama reductora. El monóxido es detectado por reacción quimiluminiscente con ozono. La SCD es por lo menos en un orden de magnitud más sensible que la mayoría de la FPD. Provee de una respuesta lineal con alta selectividad y no sufre distorsión apreciable.

v. Detector de captura de electrones (ECD) responde a compuestos capaces de reaccionar con electrones térmicos para formar aniones. Muchos compuestos que contienen átomos de cloro, p.e. vesicantes, son detectables con ECD pero no sus productos de degradación.

Actualmente uno de los detectores más atractivos es el detector de emisión atómica (AED) que es capaz de detectar selectivamente cualquier elemento debajo del nivel del nanogramo.

Análisis de muestras

Condiciones estándar

Dependen de los parámetros de la columna y los requerimientos del análisis. Si se usan columnas SE-54 y OV-1701 (25m x 0,32 mm id, 0,25 μ m) se recomiendan las siguientes condiciones:

Temperatura de inyección:	250°C
Temperatura del detector:	280°C
Programa de temperaturas:	
inicial	40°C por 1 minuto
velocidad programada	10°C/min hasta 280°C para 10 min

Recomendaciones precisas para el detector no se pueden tener dado que depende mucho de los requerimientos del análisis. Los más confiables en operar

son FID, NPD y FPD, se adecúan fácilmente y son útiles tanto para análisis in situ como a posteriori.

Todos los compuestos dados en las listas 1 y 2 de la Convención[4], que eluyen en columnas GC pueden ser detectados por estos detectores. Mediante el uso de dos detectores en paralelo es posible incrementar la información obtenida de un corrida simple GC. Se recomienda usar la misma fase estacionaria con ambos detectores selectivos.

Identificación tentativa

Aunque los límites de retención absolutos son más útiles para la identificación, sólo unos cuantos compuestos se podrían usar. Por ello se usan también los llamados tiempos de retención relativos y los índices de retención lineal (obtenidos por el método de monitoreo de índices de retención RIM). Estos últimos son particularmente ventajosos cuando se tiene un gran número de muestras. Mediante el método del polígono lineal se calculan los índices de retención para los compuestos de prueba y se comparan con los valores presentados en la Tabla 2.

Tabla 2. Valores de índices de retención de compuestos de prueba para columnas de 25mx0,32mmx0,25µm. Gas de arrastre He 1,5 mL/min, programa de temperatura: 40°C (min), velocidad de calentamiento 10°C/min hasta 280°C por 10 min.

Compuestos	serie M		serie C	
	SE-54	OV-1701	SE-54	OV-1701
d ₅ -dimetil metil fosfonato	400,0	488,8	876,9	1044,4
2,6 dimetil fenol	644,7	748,4	1111,8	1288,8
5-Cl-2-metil anilina	850,3	974,5	1308,2	1508,0
tri-n-butil fosfonato	1213,3	1301,5	1659,3	1824,9
dibenzotiofeno	1330,9	1426,3	1772,9	1951,1
malation	1551,1	1722,5	1988,3	2241,7
metilestearato	1696,5	1689,3	2132,3	2207,5

Mediante estos valores se ajustan (hacia arriba o hacia abajo) los índices de retención de los compuestos en las muestras y se comparan con un biblioteca o base de datos correspondiente. La confiabilidad de la identificación se

incrementa si el análisis es realizado con dos columnas de diferente polaridad. Para identificación poco ambigua se debe confirmar este resultado tentativo con un método más sofisticado como MS, NMR o FT-IR.

2. *Cromatografía de Gases/Espectrometría de masas (GC/MS)[5][6]*

Se utilizan dos (2) procedimientos generales para diferentes niveles de concentración y tipos de muestra. El primero, usado para compuestos presentes a concentraciones mayores a 1 µg/mL en muestras que están resueltas completamente por GC, es llevado a cabo por métodos de búsqueda a baja resolución usando ionización electrónica EI y química CI. El segundo, cuando los compuestos presentes están a niveles de trazas (0,01 - 1 µg/mL) o en matrices complejas, se requiere monitoreo de ion selectivo (SIM), espectrometría de masas de alta resolución (HRMS) y espectrometría de masas en tándem (MS/MS)

Para establecer una correcta identificación se requieren por lo menos dos diferentes métodos espectrométricos de masas; cada uno incluyendo la determinación de datos de retención.

Condiciones recomendadas GC/MS

Las condiciones GC se vieron en la parte previa. Los parámetros de operación y las condiciones para el espectrómetro de masas son recomendadas por el fabricante del equipo.

Condiciones típicas para la fuente EI son: energía 70 eV, emisión 200 µA y una temperatura de fuente de 150-200°C. Los valores de búsqueda recomendados (rango de scan/velocidad de scan) en este tipo de compuestos son de 40-600 uma/0,5-1,0 s en el modo EI excepto en el monitoreo de compuestos con bajo peso molecular como HCN y fosgeno. En estos casos es recomendable empezar con la búsqueda desde 10 uma.

Para controlar el funcionamiento de instrumentos de GC/MS en sus aspectos relevantes: sensibilidad de los métodos, reproductibilidad y calidad de los datos obtenidos y de los datos de retención, se recomiendan 3 pasos:

- a. Afinamiento y calibración del instrumento usando un gas de calibración.
- b. Control del instrumento con una solución de prueba (ver Tabla 3) a nivel de concentración 10 veces tan alta como el límite del método MS a ser usado.

En un tercer paso, el blanco es chequeado con el solvente usado para preparar las soluciones.

Existen criterios para seleccionar compuestos de prueba así como para aceptar un buen comportamiento de los datos obtenidos en los diversos modos de obtención de los espectros.

Tabla 3. Compuestos de prueba recomendados para el control de funcionamiento de un instrumento GC/MS en diferentes métodos MS

Compuestos de prueba	métodos MS					
	EI	CI/CH ₄	CI/C ₅ H ₁₀	CI/NH ₃	MS/MS	HRMS
d ₅ -dimetil metilfosfonato				+	+	
2,6 -dimetil fenol						
5-Cl -2-metil anilina	+	+	+	+		+
tri -n-butil fosfato					+	
dibenzotiofeno	+	+	+			
malation						+
metilestearato						

3. *Termospray- cromatografía líquida- espectrometría de masas (LC/TS-MS)[7]*

En esta sección se describe el tratamiento de compuestos y productos o precursores de degradación en muestras acuosas por termospray- cromatografía líquida- espectrometría de masas (LC/TS-MS). Compuestos como las mostazas de azufre y lewisitas, las cuales se hidrolizan relativamente rápido no pueden ser analizados por este método.

En general, los compuestos son separados sobre LC en fase reversa donde el buffer acetato de amonio, metal/agua o solución acetonitrilo/agua provee de fase móvil. La mayoría de compuestos de interés como arma química pueden ser detectados en el modo de ion positivo. Los ácidos organofosforados pueden también ser detectados con sensibilidad comparable en el modo de ion negativo. Los productos de degradación de las lewisitas pueden ser detectados solamente en el modo de ion negativo.

En el análisis de una muestra de origen desconocido se recomienda el siguiente esquema general:

- Empiece con la inyección de flujo directo usando una solución 0,1 M de acetato de amonio: metano (1:1) como eluyente. Esto dará una indicación de todos los compuestos detectables así como la cantidad de analitos.
- Si es apropiado, diluya la muestra con agua desmineralizada antes del análisis LC-MS.
- Seleccione la columna y el sistema eluyente sobre la base de inyección de flujo directo y /o de otros resultados analíticos.
- Se observará un monitoreo durante el análisis de las masas en la fase del flujo de inyección.
- Compruebe la identificación del compuesto a través de comparación con el compuesto auténtico.

Aparato

Un instrumento LC/TS-MS comprende las siguientes partes:

- Un sistema LC
- Una interfase TS (tubo vaporizador)
- Un espectrómetro de masas equipado con fuente de iones TS
- Un delicado sistema de vacío (bombas de aceite rotatorias, trampas de frío, etc.)

Metodología

En el método debe considerarse los siguiente parámetros:

- Columna recomendada: columna de fase reversa llena con material C18 (p.ej. LiChrosorb) de partículas con 5 a 7 mm; de longitud 20-25cm y 4-5 mm i.d.
- Solventes: mezclas frescas de agua desmineralizadas con solventes orgánicos como metanol o acetonitrilo (de calidad analítica)
- Buffers: sólo de carácter volátil, p.e. solución de acetato de amonio 0,1 M.
- Gradiente de elución: Depende de la polaridad del analito. Para un amplio rango de compuestos se puede empezar con acetato de amonio 0,1 M hasta una mezcla de metanol (o acetonitrilo) y acetato de amonio 0,1M (8:2).

4. *Espectrometría de Resonancia Magnético Nuclear (NMR)[8]*

El método, como es sabido, es aplicable a todos los compuestos disueltos en suficiente cantidad de solventes deuterados. Cuando se encuentran presen-

tes compuestos desconocidos (no incluidos en una base de datos) la espectrometría puede ser la mejor fuente de información estructural.

La principal ventaja de este método es que el espectro es específico para la mayoría de los casos y no degrada la muestra. Las mayores desventajas son, especialmente en ^1H y ^{13}C , el solapamiento de señales y la pobre sensibilidad comparada con GS/MS.

Con el uso de un cabezal polinuclear ^1H , ^{13}C - $\{^1\text{H}\}$, ^{19}F , ^{31}P - $\{^1\text{H}\}$ y ^{31}P , los experimentos pueden ser desarrollados en una sola muestra, de manera secuencial sin retirar la muestra del magneto, sin ningún orden específico y no todos son necesarios. El tiempo es variable, de unos cuantos minutos a toda una noche o todo un día o más.

La identificación de un compuesto es hecho mediante referencias a espectros incluidos en una base de datos o biblioteca de espectros o a través de comparación con espectros de compuestos auténticos. Los parámetros espectrales obtenidos en el análisis de un espectro son los desplazamientos químicos de los núcleos y las constantes de acoplamiento entre ellos.

El límite de detección para un compuesto dependerá de la fuerza del campo magnético del espectrómetro, del número de pulsos, el núcleo observado y su relajación, del diámetro del tubo, la matriz de la muestra y del afinamiento del campo magnético.

Experimentos de NMR ^{19}F y ^{31}P - $\{^1\text{H}\}$ pueden ser utilizados para la búsqueda o análisis de compuestos orgánicos que contengan flúor y fósforo. Estos son también útiles (al igual que ^{13}C - $\{^1\text{H}\}$) en el caso de tener muestras donde las señales de los protones son complejas debido al solvente o a la matriz de la muestra. Sin embargo, aunque la espectrometría NMR de ^1H y ^{13}C - $\{^1\text{H}\}$ son de gran utilidad para evidenciar la presencia de un determinado compuesto, los experimentos con ^{19}F y ^{31}P - $\{^1\text{H}\}$ sólo evidencian la presencia de un tipo de compuesto químico.

Instrumentación

Los requerimientos para espectrómetros aplicables para el análisis de compuestos relacionados al Convenio son:

1. capacidad para obtener espectros NMR de ^1H , ^{13}C - $\{^1\text{H}\}$, ^{19}F , ^{31}P - $\{^1\text{H}\}$ y/o ^{31}P

2. capacidad para controlar la temperatura con aproximación de $\pm 0,5$ °C
3. frecuencia de resonancia del protón preferentemente de 200 MHz o más, y
4. un sistema adecuado de adquisición, manipulación y almacenaje de todos los datos necesarios.

Para un buen desarrollo de un experimento de NMR deben verificarse el comportamiento del aparato, tanto en su resolución y sensibilidad que dependen del cabezal utilizado como de la temperatura de calibración.

La Tabla 4 proporciona una guía para la selección de parámetros experimentales de NMR

Tabla 4. Guía para la selección de parámetros para experimentos NMR

Parámetro	¹ H	¹³ C- ¹ H	¹⁹ F	³¹ P- ¹ H	³¹ P
frec. de operación (MHz)	≥ 200	≥ 50	≥ 188	≥ 80	≥ 80
ángulo de flip (°)	45	30-60	45	45-90	45-90
secuencia de pulso	¹ H: secuencia de un pulso p una secuencia con supresión simultánea de solvente/agua ¹³ C- ¹ H): secuencia de un pulso con banda ancha o desacoplamiento de protón ¹⁹ F: secuencia de un pulso ³¹ P- ¹ H):secuencia de un pulso con banda ancha o pulso compuesto con desacoplamiento de protones (identificación cualitativa) o una secuencia con desacoplamiento invertido de protón (análisis cuantitativo) ³¹ P:secuencia de un pulso o un secuencia con desacoplamiento de protón.				
duración del pulso (μs)	depende del cabezal y del sistema electrónico				
ancho espectral (Hz)	lo suficiente para excitar las resonancias de interés				
puntos de datos (FID)	los suficientes para tener un tiempo de adquisición que revele los acoplamientos mínimos (buena resolución)				
resolución digital sobre el espectro	suficiente para dar 2-3 puntos de datos por cada medio ancho de línea				
tiempo de repetición (s)	suficiente largo para permitir la relajación completa (cuantitativo) o más corto comprometiendo la sensibilidad óptima con el tiempo total del experimento.				
número de pulsos	el suficiente para tener buena relación señal/ruido				
temperatura (°C)	en un valor conocido entre 20° y 30°C				

BIBLIOGRAFIA

1. The Ministry for Foreign Affairs of Finland, (1993) Recommended Operating Procedures for Sampling and Analysis in Verification of Chemical Disarmament., Helsinki.
2. Shearer, R.L., O'Neal, D.L., Ríos, R., Baker, D.M. (1990) Analysis of Sulfur Compounds by Capillary Column Gas Chromatography with Sulfur Chemiluminescence Detection, *Chromatogr.Sci.* **28**, 24.
3. Wylie, P.L., Sullivan, J.J., Quimby, B.D. (1990) An Investigation of Gas Chromatography with Atomic Emission Detection for the Determination of Empirical Formulas, *J.High Res. Chromatogr.* **517**, 131.
4. Convención sobre Armas Químicas (1993) París, Francia.
5. Chapman, J.R., (1985) **Practical Organic Mass Spectrometry**, John Wiley & Sons Ltd.,N.Y.
6. Busch, K.L.;Glish, G.L., McLuckey S.A.,(1989) **Mass spectrometry/mass spectrometry: Techniques and Applications of Tandem Mass Spectrometry**, VCH Publishers, New York.
7. Wils, E.R.J., Hulst A.G., (1990), *J Chromatogr.* **523**, 151.
8. Glonck, T., Van Wazer, J.R., (1974) Aqueous Tetrahydroxyphosphonium Perchlorate as a Narrow-Line ^{31}P NMR Reference Substance, *J. Magn. Reson*, **13**, 390.