

## **FFI RAPPORT**

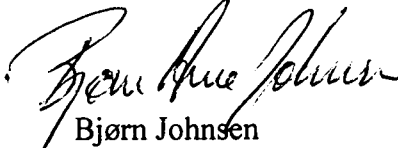
**NEDBRYTNINGSPRODUKTER AV  
NERVEGASSER ANALYSERT MED  
VÆSKEKROMATOGRAF TILKOBLET  
ATMOSPHERIC PRESSURE IONIZATION  
ELEKTROSPRAY MASSESPEKTROMETER  
(HPLC-API-ES-MS)  
Del I - Positiv ion modus**

HUSSAIN Fatima

**FFI/RAPPORT-2002/01698**

FFIBM/826/138

Godkjent  
Kjeller 27 mai 2002



Bjørn Johnsen  
Forskningsjef

**NEDBRYTNINGSPRODUKTER AV  
NERVEGASSER ANALYSERT MED  
VÆSKEKROMATOGRAF TILKOBLET  
ATMOSPHERIC PRESSURE IONIZATION  
ELEKTROSPRAY MASSESPEKTROMETER  
(HPLC-API-ES-MS)  
Del I - Positiv ion modus**

HUSSAIN Fatima

FFI/RAPPORT-2002/01698

**FORSVARETS FORSKNINGSINSTITUTT**  
**Norwegian Defence Research Establishment**  
Postboks 25, 2027 Kjeller, Norge

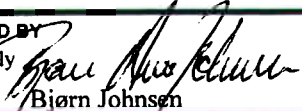
FORSVARETS FORSKNING SINSTITUTT (FFI)  
Norwegian Defence Research Establishment

UNCLASSIFIED

P O BOX 25  
NO-2027 KJELLER, NORWAY

SECURITY CLASSIFICATION OF THIS PAGE  
(when data entered)

REPORT DOCUMENTATION PAGE

1) PUBL/REPORT NUMBER FFI/RAPPORT-2002/01698	2) SECURITY CLASSIFICATION UNCLASSIFIED	3) NUMBER OF PAGES 29
1a) PROJECT REFERENCE FFIBM/826/138	2a) DECLASSIFICATION/DOWNGRADING SCHEDULE -	
4) TITLE NEDBRYTNINGSPRODUKTER AV NERVEGASSER ANALYSERT MED VÆSKEKROMATOGRAF TILKOBLET ATMOSPHERIC PRESSURE IONIZATION ELEKTROSPRAY MASSESPEKTROMETER (HPLC-API-ES-MS) Del I - Positiv ion modus HYDROLYSIS PRODUCTS OF NERVE AGENTS ANALYSED WITH LIQUID CHROMATOGRAPH COUPLED TO AN ATMOSPHERIC PRESSURE IONIZATION ELECTROSPRAY MASS SPECTROMETER (HPLC-API-ES-MS). Part I - Positive ion mode		
5) NAMES OF AUTHOR(S) IN FULL (surname first) HUSSAIN Fatima		
6) DISTRIBUTION STATEMENT Approved for public release. Distribution unlimited. (Offentlig tilgjengelig)		
7) INDEXING TERMS IN ENGLISH:		IN NORWEGIAN:
a) <u>Alkylphosphonic acids</u>		a) <u>Alkylfosfonsyrer</u>
b) <u>HPLC</u>		b) <u>HPLC</u>
c) <u>Electrospray</u>		c) <u>Elektrospray</u>
d) <u>Mass Spectrometry</u>		d) <u>Massespektrometri</u>
e) <u>Detection limits</u>		e) <u>Deteksjonsgrenser</u>
THESAURUS REFERENCE:		
8) ABSTRACT  Hydrolysis products of nerve agents have been analysed by HPLC coupled to an API-ES interface to a MS in SIM mode. Parameters for the instrument were optimised for MPA, EPA, EMPA, IPMPA and PMPA. The instrument's detection limits for pure standards were 0,1 ng for EPA, EMPA and IPMPA and 5 ng for MPA and PMPA, based on the condition that $[M+H]^+$ should be detected with a $S/N > 3$ . The injection volume was 10 $\mu$ l.		
9) DATE 27 May 2002	AUTHORIZED BY This page only  Bjørn Johnsen	POSITION Director of Research

UNCLASSIFIED

ISBN 82-464-0612-4

SECURITY CLASSIFICATION OF THIS PAGE  
(when data entered)

**INNHOOLD**

	<b>Side</b>	
1	INNLEDNING	7
2	TEORI	8
3	EKSPERIMENTELT	10
3.1	Kjemikalier	10
3.2	Instrumenter	10
4	RESULTATER	11
4.1	Fragmentor- og kapillærspenning	11
4.2	Hastighet og temperatur på tørkegassen nitrogen	12
4.3	Nitrogen nebulizertrykk	13
4.4	Bestemmelse av HPLC parametere	14
4.4.1	Mengde trifluoreddiksyre	14
4.4.2	Kolonnetemperatur	15
4.4.3	Injeksjonsvolum	16
4.4.4	Kolonne	18
4.5	Deteksjonsgrenser	19
4.6	Instrumentets linearitetsområde	21
5	DISKUSJON	22
6	KONKLUSJON	23
	Litteratur	25
	Fordelingsliste	29

**NEDBRYTNINGSPRODUKTER AV NERVEGASSER ANALYSERT MED  
VÆSKEKROMATOGRAF TILKOBLET ATMOSPHERIC PRESSURE  
IONIZATION ELEKTROSPRAY MASSESPEKTROMETER (HPLC-API-ES-MS)  
Del I - Positiv ion modus**

## **1 INNLEDNING**

Kjemivåpenkonvensjonen (CWC) trådte i kraft 29 april 1997 og forbyr utvikling, produksjon, lagring og bruk av kjemiske stridsmidler (1). Bruk av giftige gasser ble imidlertid allerede forbudt etter Geneveprotokollen av 1925 som trådte i kraft i 1928 (2). I Norge og ved deltagelse i internasjonale operasjoner, vil prøvetaking i forbindelse med mistanke om bruk av kjemiske stridsmidler foretas av spesialistprøvetakingslag fra FFI og FABCS, veterinært næringsmiddelkontrollag (3) eller av andre NATO-lands prøvetakingslag.

For å foreta en sikker identifikasjon av kjemiske stridsmidler og relaterte forbindelser sendes de innsamlede prøvene til et NATO-godkjent SICA-laboratorium. Forsvarets forskningsinstitutt (FFI) er et slikt laboratorium. Dette kan bety at prøvene må transporteres over lengre avstander, hvor flytransport vil være den eneste akseptable transportmetoden. Tidligere erfaringer har vist at militær flytransport av prøvene kan være tidkrevende/vanskelig gjennomførbart, på grunn av utilfredsstillende/uklare retningslinjer for dette (4) (5). Forsvarskommando Sør-Norge (FKS) har nå imidlertid bestemt at transport av prøver skal skje i henhold til AFJM 24-204 (6).

Prøvene vil sannsynligvis ankomme analyselaboratoriet en god stund etter prøveinnsamling. Eventuelle nervegasser vil i løpet av dette tidsrommet eller før prøvetaking gjennomføres, kunne komme i kontakt med fuktighet og hydrolyseres helt eller delvis til alkylfosfonsyrer (7).

Ved FFI har analyse av alkylfosfonsyrene blitt utført på gasskromatograf med flammeionisasjonsdetektor (GC/FID), gasskromatograf-massespektrometer (GC-MS), væskekromatograf-termspray tandem massespektrometer (HPLC-TSP-MS-MS) og væskekromatograf-elektrospray massespektrometer (HPLC-ESI-MS) (8) (9) (10) (11). Vanligvis har rutineanalyser av alkylfosfonsyrene blitt gjort på GC-MS etter derivatisering. De mest brukte derivatiseringsteknikkene er metylering med diazometan (12) (13) eller trimetylfenylammoniumhydroksid (14), og dannelse av trimetylsilyl (TMS) etere (15) eller *tert*-butyldimetylsilyl (*t*-BDMS) etere (16) av syrene. Derivatiseringen er som regel tidkrevende og reagenser som diazometan er svært giftige og kreftfremkallende. Den siste utviklingen av væskekromatograf-massespektrometer (HPLC-MS) systemer har gjort det mulig å analysere fosfonsyrene direkte.

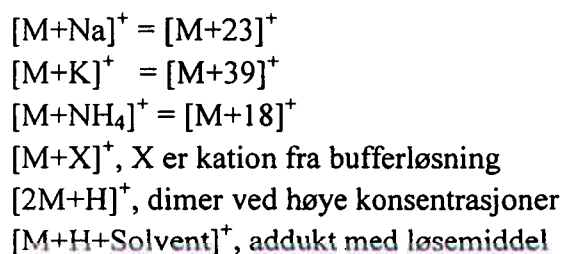
FFI har nylig kjøpt en bordmodell HPLC-ESI-MS som skal erstatte analyse på tandem HPLC-ESI-MS-MS instrumentet. Konstruksjonen på overgangene mellom HPLC og MS på de tidligere systemene ga for dårlig stabilitet (9) (10) (11). Samtidig har det vært et ønske om å anvende et rutineinstrument som er enklere å arbeide med. Denne rapporten tar for seg metodeutvikling for

analyse av fosfonsyrer i vann på det nye instrumentet. Forsøk har blitt utført for å finne de optimale verdiene for parametrene på væskechromatografen og elektropray massespektrometeret i positiv ion modus.

## 2 TEORI

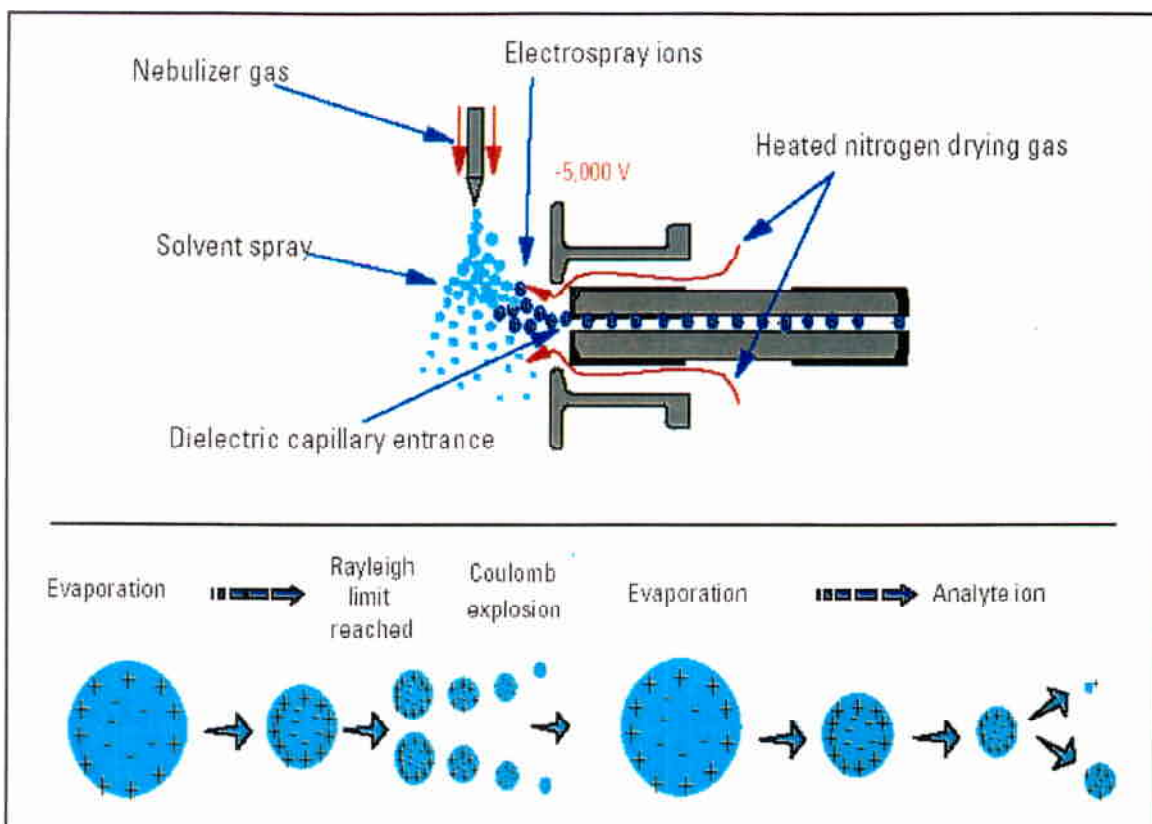
En HPLC-MS med API-ES (atmospheric pressure ionization-electrospray) overgang egner seg godt til analyse av relativt store, flerladete molekyler med masse opp til 150 000 Daltons, slik som proteiner, peptider og oligonukleotider (17). Enkelt ladete små molekyler som pesticider og fosfonsyrer blir også analysert. Elektropray er egnet for applikasjoner hvor analytten er et ion eller kan overføres til en ladd partikkel (18). Ved senking av pH vil basiske forbindelser protoneres og kan analyseres i positiv ion modus elektropray. Ved å heve pH-verdien til mobilfasen kan syrer få negativ ladning. Disse kan analyseres i negativ ion modus. Tilstedeværelse av analyttioner i mobilfasen før elektroprayovergangen er viktig for å oppnå god følsomhet.

Elektropray er en mild ionisasjonsteknikk for polare komponenter, hvor kovalente bindinger i molekylet i hovedsak ikke brytes (10). I positiv ion modus vil molekylet protoneres og gi pseudomolekylionet  $[M+H]^+$ , men det vil også dannes addukter. Adduktene kan være doble eller triple molekyler i protonert form ( $[2M+H]^+$ ,  $[3M+H]^+$ ) eller addisjon av løsemiddel-molekylet til analytten ( $[M+H+Solvent]^+$ ). Når et relativt lite molekyl blir analysert i positiv ion modus, vil det protonerte molekylionet være det mest dominerende fragmentet i massespektret. Andre pseudomolekylioner vil også dannes, avhengig av mobilfase, modifikatorer og urenheter. Vanlig forekommende ioner i positiv modus er (7) (18) (19):



I negativ ion modus vil molekylet deprotoneres og gi pseudomolekylionet ( $[M-H]^-$ ). De mest vanlige adduktene er  $[M-H+Solvent]^-$  og  $[M+X]^-$  (X er anion fra bufferløsning) (18).

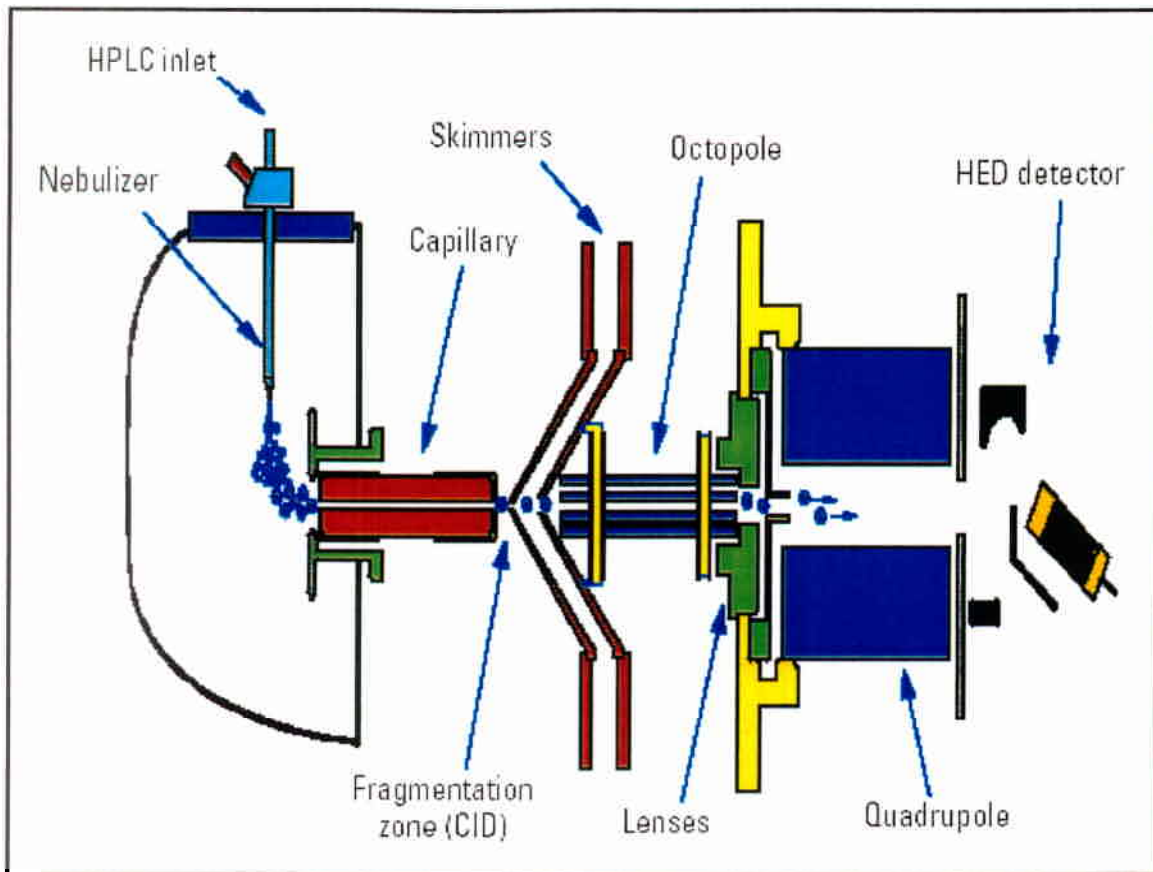
I forhold til tidligere HPLC-MS overganger er API-ES på det nye instrumentet mer robust. Denne konstruksjonen tillater en mobilfasehastighet på 1 til 2 ml/min, uten splitting av væskemengden fra HPLC før elektrosprayen (20). Første generasjons overganger hadde maksimum væskehastighet på 10  $\mu$ l/min, og ga dermed dårligere følsomhet (10) (11). I første og andre generasjons systemer ble sprayen fra væskechromatografen ledet horisontalt inn til linseaksene for masseanalysatoren (10) (11). I nyere utforming ledes væskemengden fra HPLC via nebulizeren (nålen), ortogonalt på munningen til kapillæret (figur 2.1). Denne konstruksjonen hindrer uladet materiale å entre kapillæret. Det reduserer plugging og behov for rensing ved bruk av blant annet uorganiske buffere som mobilfase (18).



Figur 2.1 Skjematisk fremstilling av API-ES ionisasjon (21) (22)

Ved elektro sprayionisasjon føres en prøveløsning gjennom nebulizeren (nålen) inn i spray-kammeret (figur 2.1). Nebulizeren er jordet og er omgitt av en halv sylindrisk elektrode som har relativt høy spenning (18) (20). Elektroden er ikke illustrert i figur 2.1. Potensialforskjellen mellom nebulizeren og elektroden gir et sterkt elektrisk felt. Dette feltet gir ladning til overflaten av væsken som kommer fra nebulizeren, og danner en fin spray av små dråper (aerosol). En gasstrøm med nitrogen langs nebulizeren bistår med dannelsen av sprøyen. De ladde dråpene trekkes mot åpningen til kapillæret, hvor det er en motstrøm av oppvarmet tørkegass (nitrogen). Tørkegassen krymper dråpene og fjerner uladet materiale. Dråpene fortsetter å krympe inntil de elektrostatiske frastøtningkreftene (Coulombske) overskrider kohesjonskreftene (overflatespenning), og medfører at dråpen sprekker. Denne prosessen gjentar seg helt til analyttionene er i gassfase.

Etter ionisering føres ionene gjennom kapillæret og akselereres videre mot skimmerne (figur 2.2). Skimmerne fokuserer ionene og fjerner eventuelle nøytrale gass- og løsemiddel-molekyler før ionene kommer til høyvakuumområdet ( $10^{-6}$  Torr) av massefiltret. Oktopolen vil fokusere ionene mot kvadrupolen. I denne delen vil også en betydelig mengde av de nøytrale molekylene bli pumpet vekk. Oktopolen vil også gi ionene en mer ensartet energifordeling før ionene trer inn i kvadrupolsystemet. I kvadrupolsystemet vil en bestemt verdi av RF og likespenning på stavene medføre at kun en masse ( $m/z$ ) om gangen vil komme fram til High Energy Dynode (HED) detektoren (elektronmultiplikator). Ionestrømmen blir plottet som funksjon av masse per ladning i et massespektrum.



Figur 2.2 Skjematisk fremstilling av atmospheric pressure ionization-electrospray (API-ES) fra Agilent Technologies (21)

### 3 EKSPERIMENTELT

#### 3.1 Kjemikalier

Acetonitril (ACN),  $\text{CH}_3\text{CN}$ , HPLC grade S, Rathburn Chemicals Limited

Trifluoreddiksyre (TFA),  $\text{CF}_3\text{COOH}$ , uvasol (>99,8%), Merck

Metylfosfonsyre (MPA),  $\text{CH}_3\text{P}(\text{O})(\text{OH})_2$ , 98%, Aldrich

Etylfosfonsyre (EPA),  $\text{C}_2\text{H}_5\text{P}(\text{O})(\text{OH})_2$ , 98%, Aldrich

n-Propylfosfonsyre (NPPA),  $\text{n-C}_3\text{H}_7\text{P}(\text{O})(\text{OH})_2$ , 95%, Aldrich

Etyl metylfosfonsyre (EMPA),  $\text{CH}_3\text{P}(\text{O})(\text{OH})(\text{OC}_2\text{H}_5)$ , FFI

i-Propyl metylfosfonsyre (IPMPA, sarinsyre),  $\text{CH}_3\text{P}(\text{O})(\text{OH})(\text{O-i-C}_3\text{H}_7)$ , FFI

n-Propyl metylfosfonsyre (NPMPA),  $\text{CH}_3\text{P}(\text{O})(\text{OH})(\text{O-n-C}_3\text{H}_7)$ , FFI

Pinacolyl metylfosfonsyre (PMPA, somansyre),  $\text{CH}_3\text{P}(\text{O})(\text{OH})((\text{CH}(\text{CH}_3)(\text{t-C}_4\text{H}_9)))$ , FFI

Vann,  $\text{H}_2\text{O}$ , ultrarent ved bruk av USF ELGA Maxima ultra pure water vannrener

#### 3.2 Instrumenter

Væskekromatograf med binær pumpe, 1100 Series, Agilent technologies

Atmospheric pressure ionization electrospray med kvadrupolsystem massespektrometer (API-



ES-MS), G 1946 B, Agilent Technologies  
 Software, Chemstation versjon A.08.03 [847]  
 Nitrogen generator, 75-72-K727, Whatman  
 Kolonne, Zorbax SB-C18, 15 cm x 2,1 mm i.d., 5 µm partikkelstørrelse, Agilent Technologies  
 Kolonne, Luna C18 (2), 15 cm x 1,0 mm i.d., 5 µm partikkelstørrelse, Phenomenex  
 Vekt, AE 260, Mettler  
 Whirlmikser, IKA-Labortechnik  
 Reagensglass med skrukork, 12 ml, Kimax  
 Autosamplerglass, 2 ml, skrukork med teflonbelagt septa type 8-ST14, Chromacol

Det ble benyttet glassutstyr i klasse A.

## 4 RESULTATER

Flere parametere ved HPLC-API-ES-MS påvirker signal til støyforholdet for analyttene. For å få best mulig følsomhet har vi sett på variable som fragmentorspenning, kapillærspenning, nebulizertrykk, temperatur og hastighet på tørkegass. Ved væskrokromatografen er parametere som injeksjonsvolum, kolonnetemperatur og gradient blitt optimalisert ved bruk av mobilfase bestående av vann, acetonitril og trifluoreddiksyre. Deretter er instrumentets linearitetsområde og deteksjonsgrense for analyttene blitt bestemt.

### 4.1 Fragmentor- og kapillærspenning

For MPA, EPA, NPPA, EMPA, IPMPA, NPMPA og PMPA ble massene  $[M+H]^+$  og  $[2M+H]^+$  (7) brukt ved optimalisering av fragmentor- og kapillærspenning (tabell 4.1). Det ble lagd standarder for hver av forbindelsene med en konsentrasjon på 100 µg/ml i 95/5 vann/acetonitril med 0,05% TFA. Hver analytt ble kjørt i en FIA serie<sup>1</sup> i API-ES Selected Ion Monitoring (SIM) i positiv ion modus. Under disse kjøringene ble de verdiene for fragmentor- og kapillærspenning som ga størst topphøyde bestemt (tabell 4.1). Optimal fragmentorspenning ble testet i området 40 V til 200 V, hvor kapillærspenningen ble satt til 2000 V. Et eksempel er vist i figur 4.1. Deretter ble optimal kapillærspenning testet i området 1000 V til 5500 V med de optimale verdiene for fragmentorspenningene som oppgitt i tabell 4.1. Parametrene som ble holdt konstant under forsøkene er gitt i fotnote<sup>2</sup>.

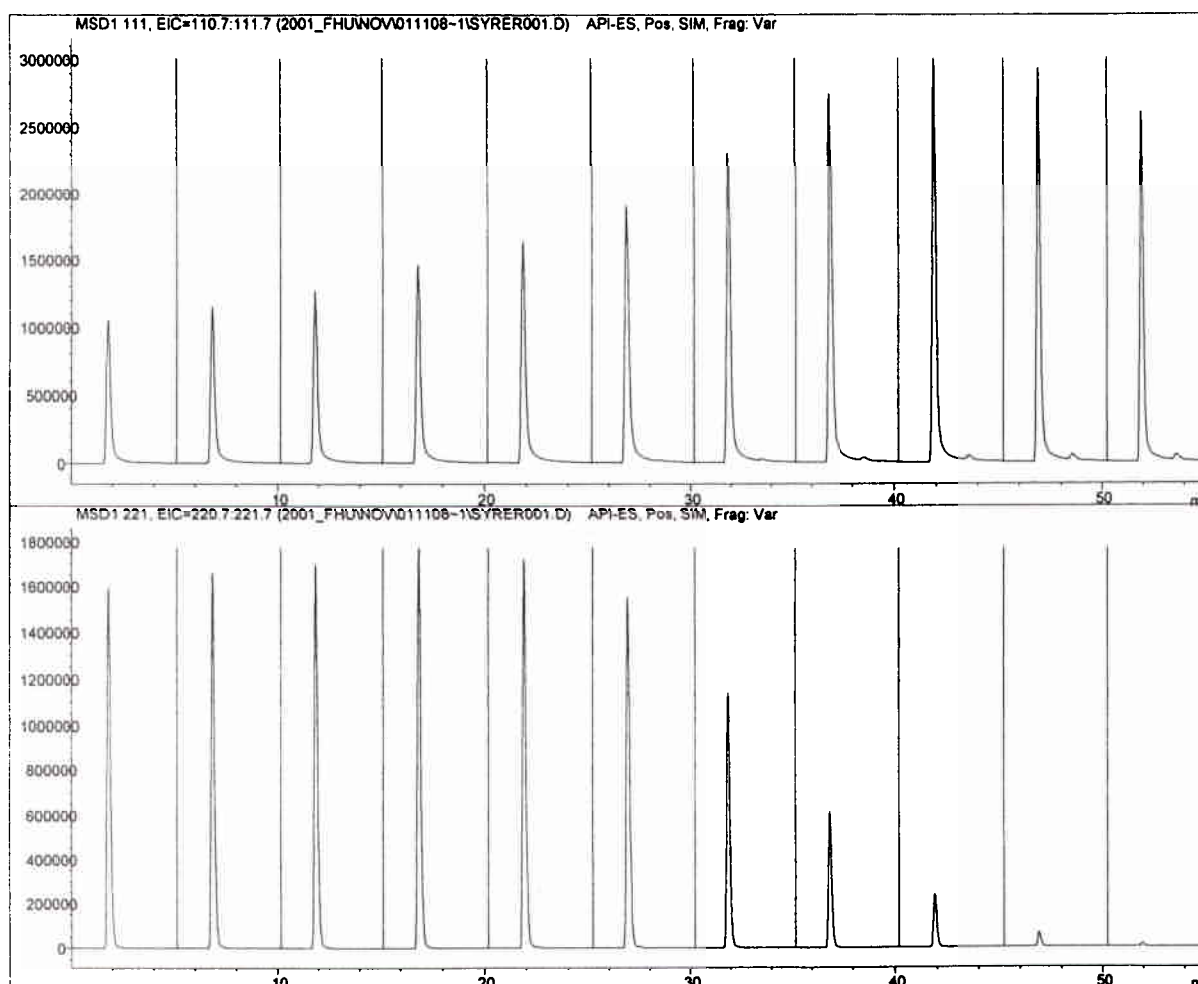
Ut i fra tabell 4.1, er den optimale kapillærspenningen for de fleste analyttene 1000 V, unntatt for IPMPA og PMPA. I de videre forsøkene vil en kapillærspenning på 1000 V bli brukt for alle massene, siden softwaren "Chemstation" kun kan operere med én kapillærspenning. Fragmentorspenningen for hvert enkelt ion vil bli satt til verdier angitt i tabell 4.1.

<sup>1</sup>FIA (Flow Injection Analysis) er en prosess for rask og repeterende analyser hvor prøven injiseres direkte inn til massespektrometret. Hver analyse tar 1-3 minutter og analysene er overlappende

<sup>2</sup>FIA mobilfase: 95/5 vann/acetonitril med 0,05% TFA, isokratisk, 0,25 ml/min. Injeksjonsvolum: 10 µl. Tørkegass: 350 °C og 10 l/min. Nebulizertrykk: 35 psi

Analytt	$[M+H]^+$ ( <i>m/z</i> )	Fragmentor (V)	Kapillær (V)	$[2M+H]^+$ ( <i>m/z</i> )	Fragmentor (V)	Kapillær (V)
MPA	97	110	1000	193	70	1000
EPA	111	120	1000	221	70	1000
NPPA	125	130	1000	249	80	1000
EMPA	125	110	1000	249	70	1000
IPMPA	139	60	1500	277	70	1000
NPMPA	139	80	1000	277	80	1000
PMPA	181	150	1500	361	90	1500

Tabell 4.1 Optimal fragmentor- og kapillærspenninger for  $[M+H]^+$  og  $[2M+H]^+$  for hver av analyttene MPA, EPA, NPPA, EMPA, IPMPA, NPMPA og PMPA

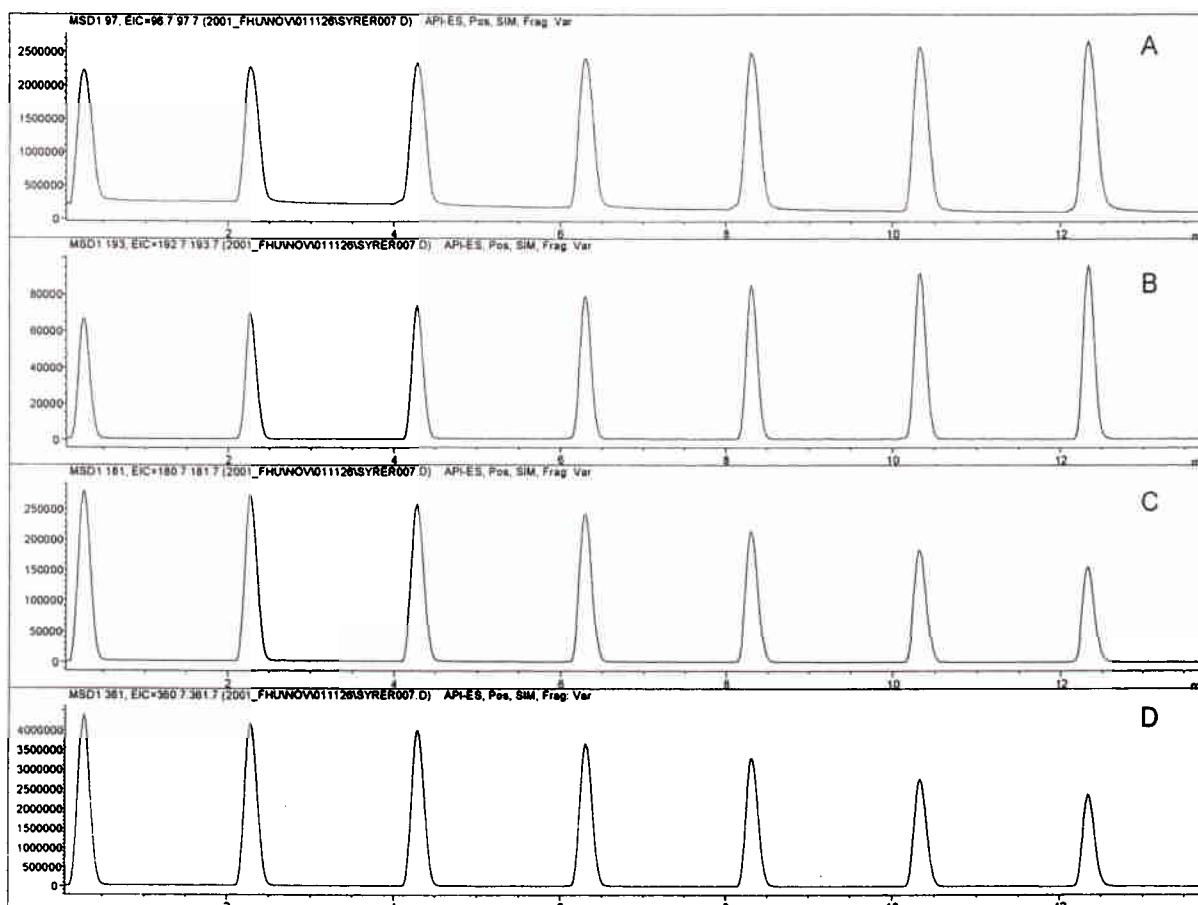


Figur 4.1 Signalene til  $[M+H]^+$  (*m/z* 111, øverst) og  $[2M+H]^+$  (*m/z* 221, nederst) for EPA ved fragmentorspenning 40-140 V med inkrement 10 V og kapillærspenning på 2000 V ved FIA kjøring

#### 4.2 Hastighet og temperatur på tørkegasen nitrogen

I instrumentspesifikasjonene påpekes en hastighet på 10 l/min på tørkegasen (N<sub>2</sub>) som nødvendig, når kjøringen utføres i API-ES modus og væskehastigheten er mellom 100-300 µl/min.

Forsøk ble gjort med 7-8-9-10-11-12-13 l/min med nitrogen som tørkegass, der parametrene som ble bestemt i forrige delkapittel ble benyttet. Standarder med 100 µg/ml MPA og PMPA ble brukt i forsøkene. MPA hadde høyest følsomhet ved 13 l/min, mens PMPA hadde høyest følsomhet ved 7-8 l/min (figur 4.2). For MPA økte følsomheten med økende mengde tørkegass, mens det motsatte var tilfelle for PMPA. En hastighet på tørkegassen på 10 l/min vil bli brukt videre.



Figur 4.2 Signalene til  $[M+H]^+$  og  $[2M+H]^+$  for MPA (A og B) og PMPA (C og D) ved tørkegasshastighet ( $N_2$ ) på 7-8-9-10-11-12-13 l/min ved FIA kjøring

Hvis analyttene ikke er veldig flyktige eller termisk ustabile, anbefaler leverandøren en maksimumstemperatur på 350 °C på tørkegassen. Forsøk ble gjort med 300-325-350 °C på tørkegassen nitrogen med MPA og PMPA som analytter. Det ble ikke observert betydelige endringer i følsomheten ved varierende temperatur på tørkegassen. Ved videre analyse vil 350 °C på tørkegassen bli brukt.

#### 4.3 Nitrogen nebulizertrykk

Det optimale nebulizertrykket avhenger av væskehastigheten, mobilfasesammensetningen og ionisasjonsmodus. Leverandøren anbefaler et nebulizertrykk på 20 psi når væskehastigheten er 50-300 µl/min i API-ES modus. For relativt vandige mobilfaser kan det være nødvendig å bruke

noe høyere trykk enn anbefalt. Forsøk ble gjort med 15-20-25-30-35-40 psi med 100 µg/ml MPA og PMPA. Best følsomhet ble oppnådd med 25 psi som nebulizertrykk.

#### 4.4 Bestemmelse av HPLC parametere

Alkylfosfonsyrene ble separert ved hjelp av en Zorbax SB-C<sub>18</sub> kolonne. Mobilfase A var 95/5 vann/acetonitril med 0,05% trifluoreddiksyre, mens mobilfase B var 95/5 acetonitril/vann med 0,05% trifluoreddiksyre. Elueringsgradienten var 5% B (0-5 min), 5% B til 95% B (5-10 min) og 95% B (10-15 min) med en væskehastighet på 0,25 ml/min. Injeksjonsvolumet var 10 µl. Temperaturen på kolonnen var 40 °C. Noen av disse verdiene er de optimaliserte for væsekromatografen, og bestemmelse av disse parametrene tas nærmere opp i underkapitlene nedenfor. De optimale parametrene som ble bestemt i kapittel 4.1-4.3 ble benyttet i SIM modus.

##### 4.4.1 Mengde trifluoreddiksyre

I mobilfasen ble trifluoreddiksyre brukt som modifikator. TFA gir et surt miljø hvor fosfonsyrene vil være på protonert form, og tilstedeværelse av disse positive ionene er nødvendig ved analyse i API-ES positiv ion modus (kapittel 2). TFA er også tilsatt for å gi bedre kromatografisk separasjon, men for høy konsentrasjon av modifikatoren reduserer følsomheten på MS-signalet (7) (23) (24). Av den grunn er det utført forsøk med 0,01%, 0,05% og 0,1% TFA i mobilfasen (tabell 4.2).

Analytt, Ionemasse (u)	Teoretiske plater (N) 0,01% TFA	Teoretiske plater (N) 0,05% TFA	Teoretiske plater (N) 0,10% TFA
MPA, 97	402 ± 14	384 ± 6	421 ± 7
MPA, 193	577 ± 6	525 ± 8	566 ± 13
EPA, 111	495 ± 20	544 ± 35	605 ± 49
EPA, 221	685 ± 15	774 ± 45	860 ± 55
EMPA, 125	209 ± 10	500 ± 5	789 ± 14
EMPA, 249	404 ± 32	725 ± 11	1127 ± 10
IPMPA, 139	126 ± 17	846 ± 91	1498 ± 19
IPMPA, 277	260 ± 33	1375 ± 98	2303 ± 54
PMPA, 181	57945 ± 60	55619 ± 53	55850 ± 144
PMPA, 361	14058 ± 478	43958 ± 47	53463 ± 653

Tabell 4.2 Antall teoretiske plater<sup>3</sup> (N) for massene  $[M+H]^+$  og  $[2M+H]^+$  for analyttene MPA, EPA, EMPA, IPMPA, og PMPA ved varierende prosentvis mengde trifluoreddiksyre i mobilfasen på en Zorbax SB-C<sub>18</sub> kolonne ved 60 °C. Det ble injisert en blanding bestående av 10 µg/ml av hver av fosfonsyrene MPA, EPA, EMPA, IPMPA og PMPA. Antall teoretiske plater er beregnet ved halve topphøyden og er gitt som middelerdi av tre paralleller og et standardavvik

Ut fra tabell 4.2 ser vi at antall teoretiske plater øker for EMPA og IPMPA med økende prosentvis mengde TFA. Mengden av trifluoreddiksyre har relativ neglisjerbar påvirkning på bånd-

<sup>3</sup>Teoretiske plater (N) er et mål for båndspredning eller evnen til å gi smale bånd for stoffene som skal separeres

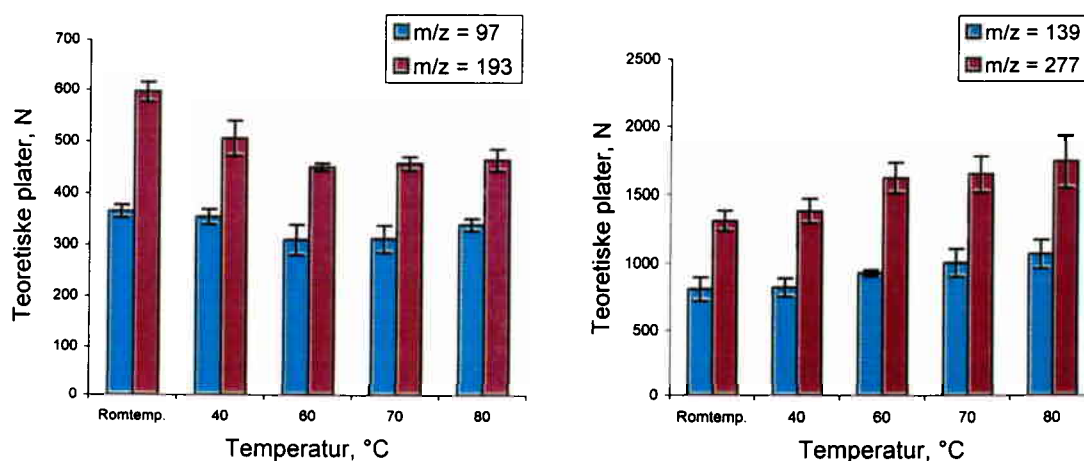
bredden til MPA, EPA og PMPA. Vi har valgt å bruke 0,05% TFA i mobilfasen framfor 0,1% TFA, fordi økende mengde trifluoreddiksyre demper MS-signalet og er korroderende.

I tabell 4.2 er NPPA og NPMPA ikke blitt nevnt. Disyren NPPA har samme masser og retensjonstid som EMPA, mens monosyren NPMPA har samme masser og retensjonstid som IPMPA. Analyttene NPPA og NPMPA vil derfor foreløpig ikke inngå i analysemetoden.

#### 4.4.2 Kolonnetemperatur

Det ble videre gjort forsøk med å variere temperaturen på kolonnen for å se hvilken effekt det hadde på båndbredden og følsomheten. 10 µg/ml standard med MPA, EPA, EMPA, IPMPA og PMPA ble kjørt ved romtemperatur, 40 °C, 60 °C, 70 °C og 80 °C.

For EPA og EMPA er det ingen signifikant endring i antall teoretiske plater (N) ved økende temperatur på separasjonskolonnen. N tenderer mot et større antall plater for IPMPA ved høyere temperaturer (figur 4.3, høyre side). Antall teoretiske plater for  $[2M+H]^+$  ionet for PMPA øker med temperaturen, men temperaturen har ingen signifikans for N for  $[M+H]^+$  ionet. Det ble dessuten observert at standardavviket for  $[M+H]^+$  ionet for PMPA var mye større ved temperaturkontroll enn ved romtemperatur. PMPA har også flest antall teoretiske plater og dermed best separasjon i forhold til de andre analyttene.



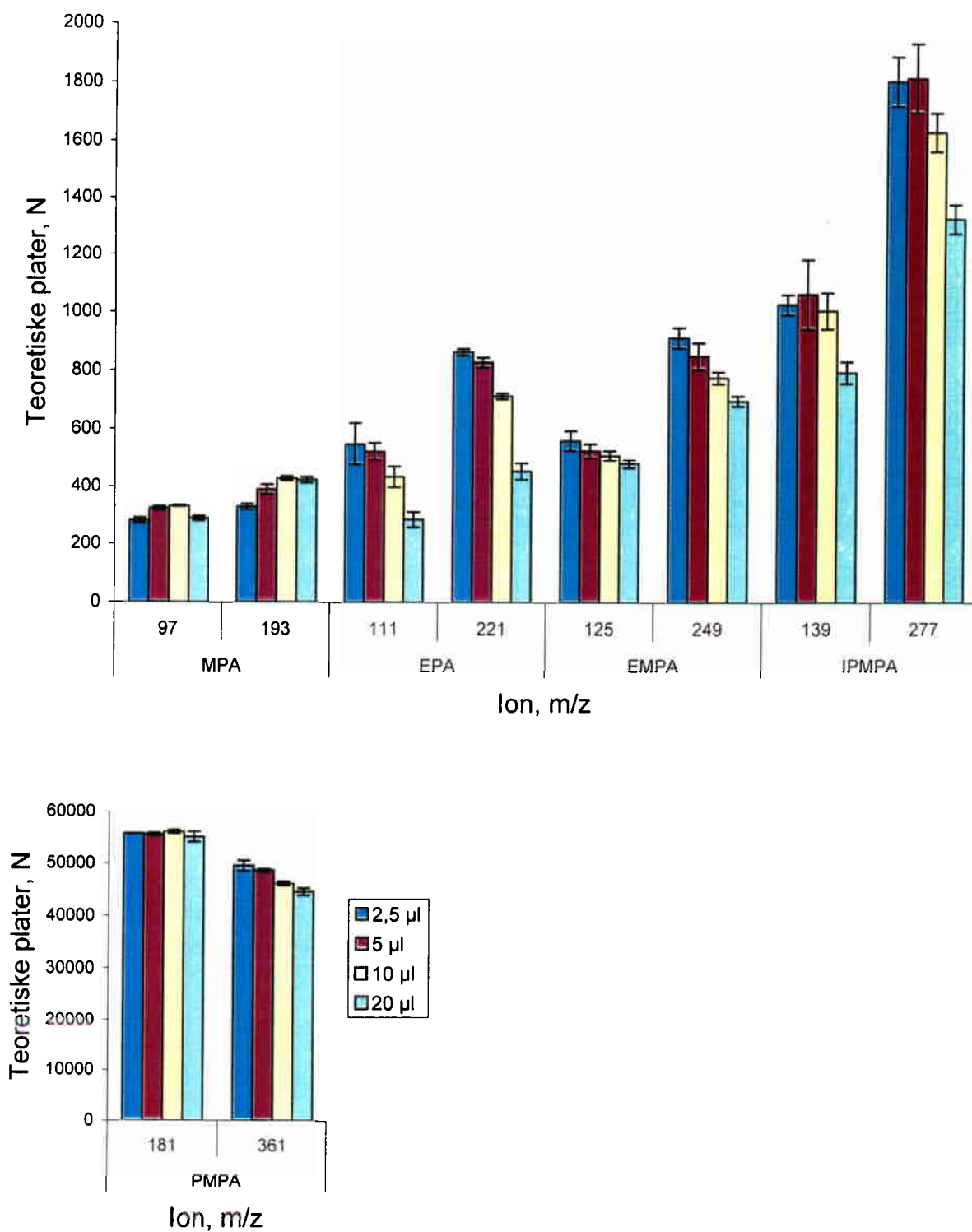
Figur 4.3 Antall teoretiske plater (N) for MPA ( $m/z$  97, 193) og IPMPA ( $m/z$  139, 277) ved forskjellige temperaturer på separasjonskolonnen. N er gitt som middelværdi av tre parallelle forsøk med et standardavvik

MPA er et sekundært nedbrytningsprodukt for alle fosfonsyrene. Det er derfor viktig å få analysert metylfosfonsyre. Ved valg av temperatur på separasjonskolonnen har fokuset derfor blitt lagt på MPA og IPMPA. For MPA har temperaturen ingen signifikans for  $[M+H]^+$  ionet, men  $[2M+H]^+$  ionet har klar avtagende tendens fra romtemperatur til 60 °C, og ingen endring fra 60 °C til 80 °C (figur 4.3, venstre side).  $[2M+H]^+$  ionet ( $m/z$  193) er et karakteristisk ion for

MPA, i motsetning til  $[M+H]^+$  ionet ( $m/z$  97) som også finnes i spektra for de andre analyttene (11). Ved å se på reduksjonen i N for MPA og økningen i antall N for IPMPA, har vi valgt å bruke 40 °C på separasjonskolonnen.

#### 4.4.3 Injeksjonsvolum

Et volum på 2,5  $\mu$ l, 5  $\mu$ l, 10  $\mu$ l og 20  $\mu$ l av en 10  $\mu$ g/ml standardløsning av analyttene ble injisert på HPLC-MS systemet. Et injeksjonsvolum på 20  $\mu$ l gir større båndbredde enn ved injisering av et mindre volum (figur 4.4). 2,5  $\mu$ l gir flest antall teoretiske plater for samtlige analytter unntatt for MPA. Det er relativt liten differanse mellom antall teoretiske plater for 2,5  $\mu$ l, 5  $\mu$ l og 10  $\mu$ l. Med hensyn på deteksjonsgrensen er et injeksjonsvolum på 10  $\mu$ l gunstig.

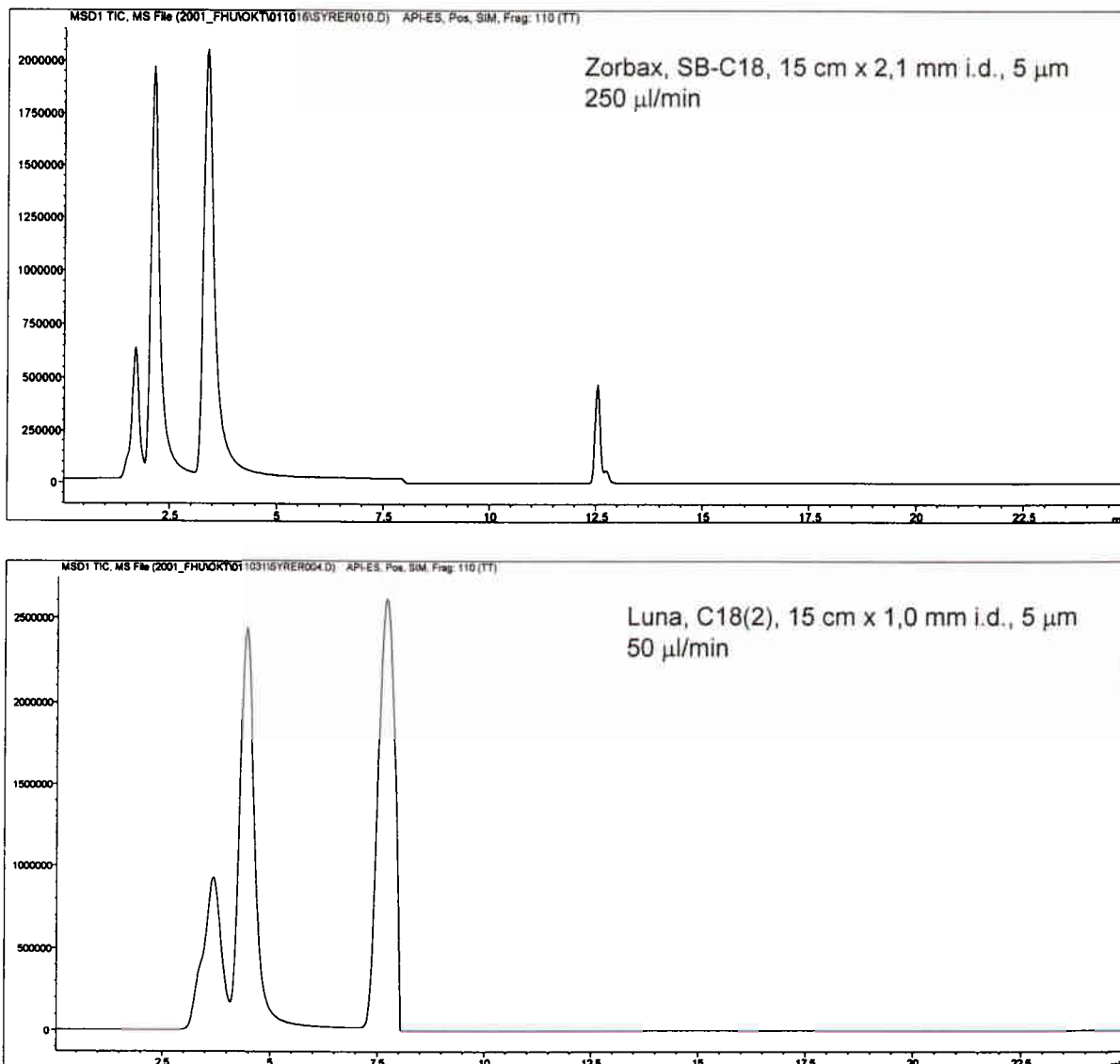


Figur 4.4 Antall teoretiske plater ( $N$ ) for analyttene ved forskjellige injiserte volumer på separasjonskolonnen.  $N$  er gitt som middelerdi av tre parallelle forsøk og et standardavvik

#### 4.4.4 Kolonne

Ved analyse av MPA, EPA, EMPA, IPMPA og PMPA med en Zorbax SB-C18 kolonne med dimensjonen 15 cm x 2,1 mm indre diameter, kommer fire av analyttene i løpet av de fem første minuttene av analysen (figur 4.5), hvor toppene for MPA og EPA er overlappende i total-ionekromatogrammet (TIC). Av den grunn ble kolonnen Luna fra Phenomenex med en indre diameter på 1,0 mm prøvd for å se om den ga bedre separasjon og mindre båndspredning. Luna-kolonnen viste seg å ha dårligere separasjonsevne enn Zorbax-kolonnen (figur 4.5).

Et mindre injeksjonsvolum (1 µl) ble også prøvd på disse kolonnene, men dette ga ikke vesentlig forbedring i separasjonen.



Figur 4.5 Total ion kromatogram (TIC) i SIM modus for 10 µg/ml standard med MPA, EPA, EMPA, IPMPA og PMPA på Zorbax- og Luna-kolonne. Injeksjonsvolumet var 5 µl og kolonnetemperaturen var 60 °C. Retensjonstider ved bruk av Zorbax kolonne: MPA (1,5 min), EPA (1,7 min), EMPA (2,1 min), IPMPA (3,4 min) og PMPA (12,6 min)



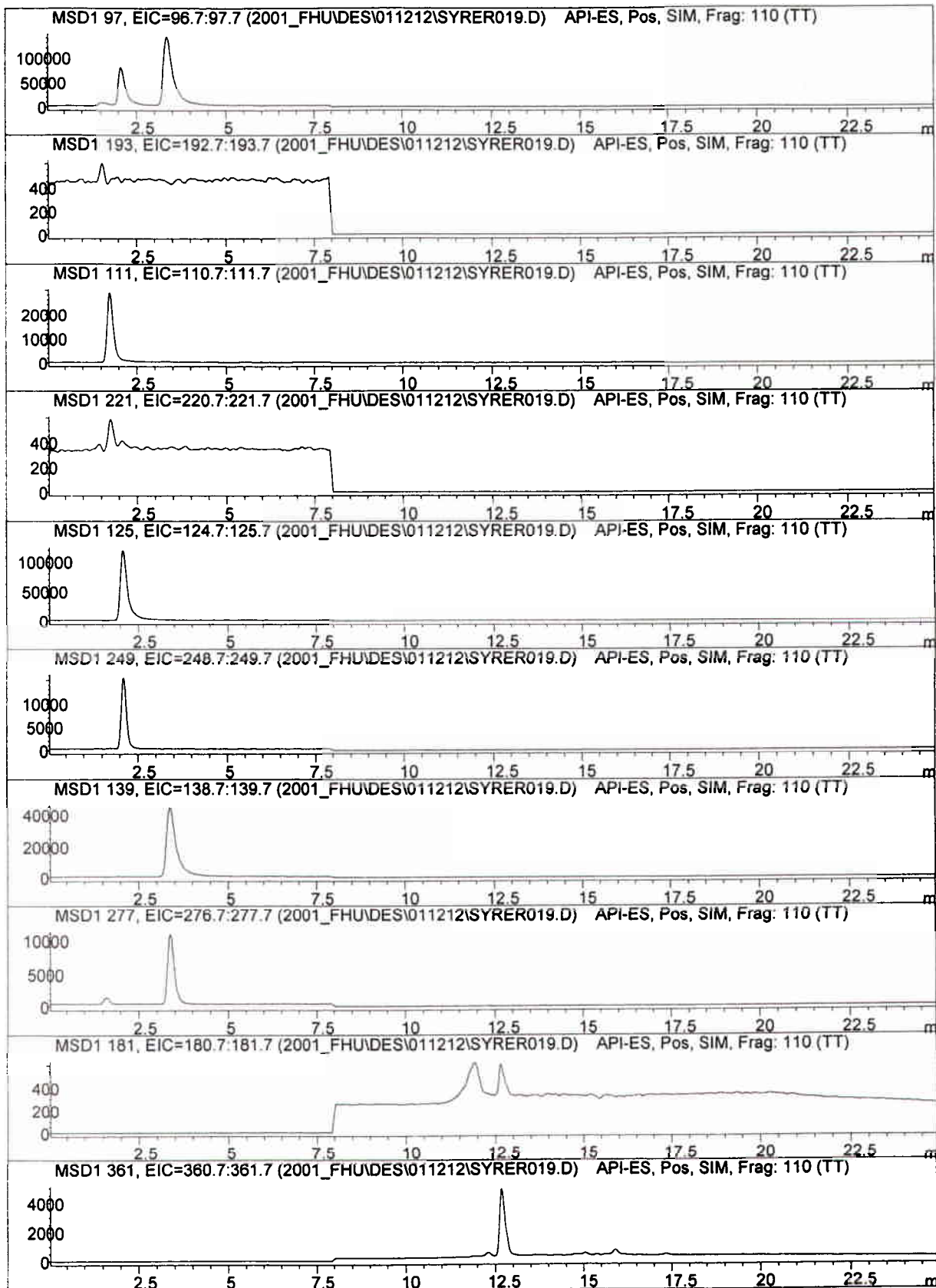
#### 4.5 Deteksjonsgrenser

Deteksjonsgrenser for MPA, EPA, EMPA, IPMPA og PMPA ved HPLC-API-ES-MS analyser ble bestemt ved å analysere fortynninger av en blanding av analyttene i 95/5 vann/acetonitril med 0,05% TFA. For øvrig ble de optimaliserte analyseparametrene som ble bestemt i kapitlene 4.1-4.4 brukt. Positiv ion modus elektropray i SIM ble benyttet der peak width i metoden ble satt til 0,2 min. Resultatene er vist i tabell 4.3. Deteksjonsgrensen er basert på et signal/støyforhold (S/N) på ca tre for  $[M+H]^+$  for analyttene.

Mengde injisert (ng)	MPA		EPA		EMPA		IPMPA		PMPA	
	97	193	111	221	125	249	139	277	181	361
0,1	-	-	x	-	x	-	x	-	-	-
1	-	-	x	-	x	x	x	x	-	-
5	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x

Tabell 4.3 Deteksjonsgrenser for MPA, EPA, EMPA, IPMPA og PMPA ved et injeksjonsvolum på 10  $\mu$ l. S/N større enn tre er angitt som x, og verdier under dette er gitt som -

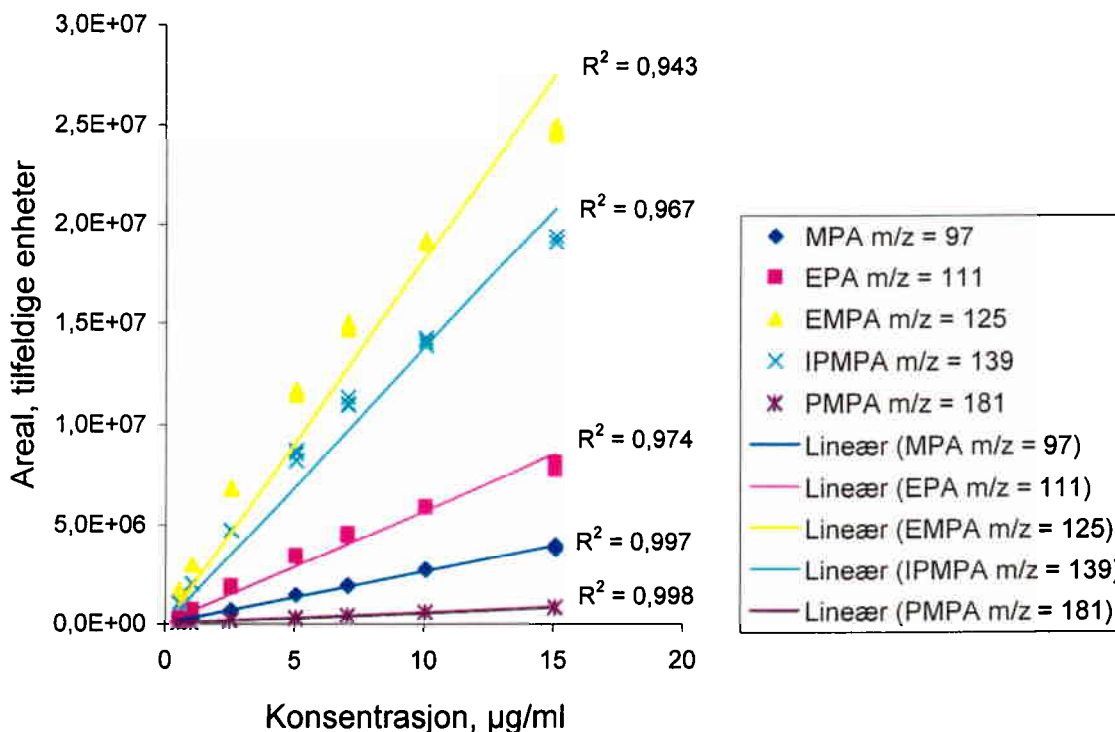
Ut fra tabell 4.3 gir samtlige masser et utslag ved injisering av 5 ng (figur 4.6). Ved injeksjon av 0,1 ng eller 1 ng, gir kun enkelte masser utslag. Deteksjonsgrensen for EPA, EMPA og IPMPA er 0,1 ng og 5 ng for MPA og IPMPA. Dette er basert på at  $[M+H]^+$  for hver forbindelse skal kunne detekteres.



Figur 4.6 Ekstrahert ion kromatogram (EIC) fra injeksjon av en 5 ng av syrene MPA ( $m/z$  97, 193), EPA ( $m/z$  111, 221), EMPA ( $m/z$  125, 249), IPMPA ( $m/z$  139, 277) og PMPA ( $m/z$  181, 361) ved positiv ion modus SIM API-ES-MS

#### 4.6 Instrumentets linearitetsområde

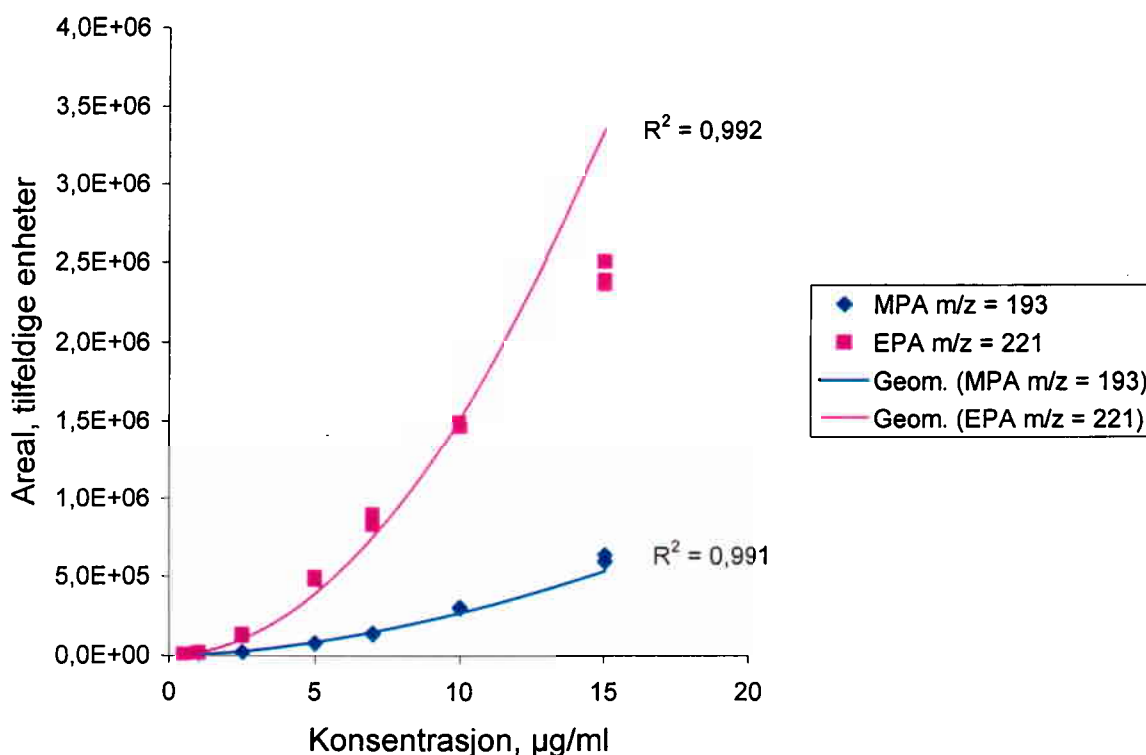
Det ble lagd en utgangsløsning (100 µg/ml) for analyttene i 95/5 vann/acetoneitril med 0,05% TFA. Utgangsløsningen ble fortynnet i flere trinn, slik at det ble lagd en fortynningsrekke fra 15 µg/ml til 0,5 µg/ml. Hver konsentrasjon ble tatt ut i et prøveglass og injisert tre ganger. Linearitet ble undersøkt som konsentrasjon mot areal, slik som vist i figur 4.7.



Figur 4.7 Standardkurver for MPA (m/z 97), EPA (m/z 111), EMPA (m/z 125), IPMPA (m/z 139) og PMPA (m/z 181) i positiv ion modus SIM API-ES-MS

$[M+H]^+$  fragmentet for MPA og PMPA gir et lineært forløp fra 0,5 µg/ml til 15 µg/ml (figur 4.7). Derimot har standardkurvene for  $[M+H]^+$  for EPA, EMPA og IPMPA ikke en like god lineær sammenheng mellom konsentrasjon og respons. Dette gjelder også for  $[2M+H]^+$  ionet for IPMPA ( $R^2 = 0,973$ ) og PMPA ( $R^2 = 0,960$ ).  $[2M+H]^+$  fragmentet for EMPA har et lineært forløp med en regresjonskoeffisient på 0,990.

Kurvene for  $[2M+H]^+$  for MPA og EPA har en geometrisk form (figur 4.8). Det geometriske forløpet kan muligens forklares ved at det dannes flere addukter av molekylionet av typen  $[2M+H]^+$ , når den fysiske avstanden mellom  $[M+H]^+$  ionene minker (18) (25). Siden flere av analyttene ikke har en lineær sammenheng mellom konsentrasjon og areal, bør derfor en framtidig kvantifisering foretas ut fra en standardkurve.



Figur 4.8 Standardkurver for MPA ( $m/z$  193) og EPA ( $m/z$  221) ved positiv ion modus SIM API-ES-MS

Figur 4.7 og 4.8 demonstrerer også den store forskjellen i signalstyrke for de ulike analyttene ved samme konsentrasjon.

## 5 DISKUSJON

Standarder for fosfonsyrer ble lagd i mobilfase A, siden fortykning i vann ga splittede topper i kromatogrammet. Denne effekten skyldes sannsynligvis at selve injeksjonsløsemidlet ( $H_2O$ ) er mer polart enn mobilfasen.

Analyse i full scan ble ikke utført fordi spekteret i scan gir ikke mer strukturinformasjon enn spekteret i SIM. Det skyldes at det dannes relativt få fragmenter ved elektroprayionisasjon. Mer strukturinformasjon kan fås ved å øke fragmentorspenningen, men dette vil redusere følsomheten (figur 4.1). Siden SIM gir bedre følsomhet enn full scan, har bestemmelse av deteksjonsgrensen blitt utført i SIM modus. I positiv ion modus API-ES-MS var deteksjonsgrensen for EPA, EMPA og IPMPA 0,1 ng og 5 ng for MPA og PMPA ved 10 µl injeksjonsvolum. Sammenlignet med første generasjons elektropray, er følsomheten 600 ganger bedre for EMPA og IPMPA og 10 ganger bedre for PMPA (10). Muligens kan en lavere deteksjonsgrense for PMPA fås ved heller å bruke det dominerende fragmentet  $m/z$  97 i spektret (10).

Deteksjonsgrensene som vi har oppnådd for fosfonsyrene er sammenlignbare med dstl (Defence

Science and Technology Laboratory) sine resultater (7). De har tidligere utviklet en kvalitativ screening prosedyre for deteksjon og identifikasjon av nedbrytningsprodukter av nervegasser ved HPLC-ES-MS. Ved denne prosedyren oppnås deteksjonsgrenser for fosfonsyrene på 0,2-8 ng injisert.

En lavere deteksjonsgrense for samtlige analytter kan muligens oppnås ved å benytte negativ ion modus (11). I negativ modus dannes  $[M-H]^-$  ioner ved avspalting av et proton. Fosfonsyrene avgir lettere et proton enn å ta opp et proton, og dette vil muligens gi en lavere deteksjonsgrense i negativ ion modus.

Analyttene NPPA og NPMPA har ikke blitt tatt med i analysemetoden. NPPA har samme retensjonstid og karakteristiske fragmenter som EMPA, mens NPMPA har samme retensjonstid og karakteristiske fragmenter som IPMPA. Det har også tidligere blitt observert vanskeligheter med å separere isomerene NPMPA og IPMPA (10) (11). Det har blitt rapportert at analyse av disse koeluerende analyttene kan utføres ved kollisjonsindusert dissosiering (CID) (26).

## 6 KONKLUSJON

Alkylfosfonsyrene MPA, EPA, EMPA, IPMPA og PMPA ble separert ved hjelp av HPLC og analysert i positiv ion modus med API-ES tilkoblet et massespektrometer i SIM modus. Fragmentorspenningen ble optimalisert for  $[M+H]^+$  og  $[2M+H]^+$  ionene for hver av analyttene. Den optimale kapillærspenningen ble bestemt til 1000 V, nebulizertrykket til 25 psi, tørkegass-temperaturen til 350 °C og tørkegasshastigheten til 10 l/min. Mono- og disyrene ble separert ved hjelp av en Zorbax SB-C<sub>18</sub> kolonne. Mobilfase A var 95/5 vann/acetoneitril med 0,05% trifluoreddiksyre, mens mobilfase B var 95/5 acetoneitril/vann med 0,05% trifluoreddiksyre. Elueringsgradienten var 5% B (0-5 min), 5% B til 95% B (5-10 min) og 95% B (10-15 min) med en væskehastighet på 0,25 ml/min. Injeksjonsvolumet var 10 µl, og temperaturen på kolonnen var 40 °C. Ved injisering av 0,1 ng av EPA, EMPA og IPMPA og 5 ng av MPA og PMPA ga molekylionet et signal/støyforhold større enn 3. I analysemetoden er ikke NPPA og NPMPA blitt tatt med.



**Litteratur**

- (1) Utenriksdepartementet (1993): Stortingsproposisjon nr 77 (1992-93). Om samtykke til ratifikasjon av en konvensjon om forbud mot utvikling, produksjon, lagring og bruk av kjemiske våpen samt ødeleggelse av slike våpen, undertegnet i Paris 13 januar 1993.
- (2) Geneveprotokollen (1925): Protocol for the prohibition of the use in war of asphyxiating, poisonous or other gases, and of bacteriological methods of warfare.
- (3) Pedersen B, Tørnes J Aa (2001): Verifisering av bruk av kjemiske stridsmidler – SICA materiellsats, FFI/RAPPORT-2001/01813, Forsvarets forskningsinstitutt.
- (4) Tørnes J A, Pedersen B, Bjerkeseth L H, Opstad A M, Hussain F (1999): SICA test i forbindelse med øvelse Battle Griffin 1999, FFI/RAPPORT-99/01768, Forsvarets forskningsinstitutt.
- (5) Tørnes J A (1998): Problemer relatert til flytransport av prøver med innhold av kjemiske stridsmidler, FFI/RAPPORT-98/04659, Forsvarets forskningsinstitutt.
- (6) US Air Force (1997): Air Force Joint Manual 24-204, Preparing Hazardous Material for Air Shipment.
- (7) Black R M, Read R W (1998): Analysis of degradation products of organophosphorus chemical warfare agents and related compounds by liquid chromatography-mass spectrometry using electrospray and atmospheric pressure chemical ionisation, *Journal of Chromatography A* **794**, 233-244.
- (8) Hansen L L, Kalfjøs H T, Opstad A M, Røen B T, Tørnes J A (2000): Ekstraksjon av fosforsyrer fra vannfase ved hjelp av fast fase ekstraksjon, FFI/RAPPORT-2000/04310, Forsvarets forskningsinstitutt.
- (9) Tørnes, J A (1994): Identification of some alkyl methylphosphonic acids by thermospray tandem mass spectrometry, FFI/RAPPORT-94/02086, Forsvarets forskningsinstitutt.
- (10) Opstad A M, Tørnes J A (1994): Hydrolyseprodukter av nervegasser identifisert ved bruk av HPLC-MS med elektrospray interface, FFI/RAPPORT-94/06180, Forsvarets forskningsinstitutt.
- (11) Opstad A M, Bjerkeseth L H, Tørnes J A (1996): Nedbrytningsprodukter av nervegasser analysert med elektrospray HPLC-MS, FFI/RAPPORT-96/02824, Forsvarets forskningsinstitutt.

- (12) Verweij A, Degenhardt C E A M, Boter H L (1979): The occurrence and determination of PCH<sub>3</sub>-containing compounds in surface water, *Chemosphere* **3**, 115-124.
- (13) Verweij A, Boter H L, Degenhardt C E A M (1979): Chemical Warfare Agents: Verification of compounds containing the phosphorous-methyl linkage in waste water, *Science* **204**, 616-618.
- (14) Tørnes J A, Johnsen B A (1989): Gas chromatographic determination of methylphosphonic acids by methylation with trimethylphenylammonium hydroxide, *Journal of Chromatography* **467**, 129-138.
- (15) Harvey D J, Horning M G (1973): Derivatives for the characterization of alkyl- and aminoalkylphosphonates by gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry, *Journal of Chromatography* **79**, 65-74.
- (16) Purdon J G, Pagotto J G, Miller R K (1989): Preparation, stability and quantitative analysis by gas chromatography and gas chromatography-electron impact mass spectrometry of *tert.*-butyldimethylsilyl derivatives of some alkylphosphonic and alkyl methylphosphonic acids, *Journal of Chromatography* **475**, 261-272.
- (17) Hewlett Packard (1997): The HP 1100 Series LC/MSD Brochure Brief.
- (18) MS Consult (2001): LCMS og Chemstation, kurs, København, 3-6 desember 2001.
- (19) Borrett V T, Colton R, Traeger J C (1995): The electrospray mass spectra of phosphoric acid, methylphosphonic acid and its alkyl esters, and their complexes with alkali and alkali earth metal ions, *Eur Mass Spectrom* **1**, 131-140.
- (20) Hewlett Packard (1998): Basics of LC/MS.
- (21) HP 1100 Series LC/MSD Reference Collection version B.10.00.
- (22) Hoffmann E De, Charette J, Stroobant V (1996): Mass Spectrometry Principles and Application, John Wiley & Sons, Paris, 28.
- (23) Nugent K, Baldwin S, Stoney K, Chaudhary T, Land A (1997): Optimizing LC-MS/MS conditions for characterization of peptides and proteins. In: *Proceedings of the 45<sup>th</sup> ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics*, Palm Springs, 275.
- (24) Darby S M, Miller M L, Allen R O (1997): Optimization of mobile phase for electrospray LC-MS of proteins and peptides: alternatives to TFA enhancement. In: *Proceedings of the 45<sup>th</sup> ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics*, Palm Springs, 277.



- (25) Tørnes J A, Busmundrud O (2002): Personlig meddelelse.
- (26) Van Baar B L M, Hulst A G, Wils E R J (2001): Electrospray mass spectrometry and tandem mass spectrometry of some alkyl methylphosphonates and ethylphosphonates, TNO report PML 2000-A71, TNO Prins Maurits Laboratory.



## FORDELINGSLISTE

**FFIBM**
**Dato: 27 mai 2002**

RAPPORTTYPE (KRYSS AV) <input checked="" type="checkbox"/> RAPP <input type="checkbox"/> NOTAT <input type="checkbox"/> RR	RAPPORT NR. 2002/01698	REFERANSE FFIBM/826/138	RAPPORTENS DATO 27 mai 2002
RAPPORTENS BESKYTTELSESGRAD  UGRADERT		ANTALL EKS UTSTEDT  60	ANTALL SIDER  29
RAPPORTENS TITTEL NEDBRYTNINGSPRODUKTER AV NERVEGASSER ANALYSERT MED VÆSKEKROMATOGRAF TILKØBLET ATMOSPHERIC PRESSURE IONIZATION ELEKTROSPRAY MASSESPEKTROMETER (HPLC-API-ES-MS) Del I - Positiv ion modus		FORFATTER(E) HUSSAIN Fatima	
FORDELING GODKJENT AV FORSKNINGSSJEF  Bjørn Johnsen 		FORDELING GODKJENT AV AVDELINGSSJEF:  Jan Ivar Botnan 	

**EKSTERN FORDELING**
**INTERN FORDELING**

ANTALL	EKS NR	TIL	ANTALL	EKS NR	TIL
1		FLO/Land	14		FFI-Bibl
1		v/Lt Stian Kjensberg	1		Adm direktør/stabssjef
1		FLO/Sjø	1		FFIE
1		v/KL Geir Sæthre	1		FFISYS
1		FLO/Luft DV	6		FFIBM
1		v/Kapt Vebjørn Hanssen	1		FFIN
1		FABCS	1		Leif Haldor Bjerkeseth, FFIBM
1		v/Kapt Frede Hermansen	1		Odd Busmundrud, FFIBM
1		LST/BFI	1		Alexander F Christiansen, FFIBM
1		v/Maj Odd Skålvold	1		Monica Endregard, FFIBM
1		FOKIV	1		Hans Christian Gran, FFIBM
1		v/Oblt Egil Lie	5		Fatima Hussain, FFIBM
1		FSAN	1		Bjørn Arne Johnsen, FFIBM
1		v/Oblt Dag Hjelle	1		Aase Mari Opstad, FFIBM
1		FO/FST	1		Bjørn Pedersen, FFIBM
1		v/Oblt Hans Kristian Ulimoen	1		Bent Tore Røen, FFIBM
1		v/Oblt Jon-Arne Nyland	1		Halvor Sakshaug, FFIBM
1		KNM T/SSS	1		John Aa Tørnes, FFIBM
1		v/KL Geir Johnsen			FFI-veven
1		v/Lt Terje Sørtun			
		www.ffi.no			

FFI-K1

Retningslinjer for fordeling og forsendelse er gitt i Oraklet, Bind I, Bestemmelser om publikasjoner for Forsvarets forskningsinstitutt, pkt 2 og 5. Benytt ny side om nødvendig.