

FFI RAPPORT

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

HUSSAIN Fatima

FFI/RAPPORT-2002/01729

FFIBM/826/138

Godkjent
Kjeller 10 juni 2002

Bjørn Arne Johnsen
Forskningsjef

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

HUSSAIN Fatima

FFI/RAPPORT-2002/01729

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

P O BOX 25
 NO-2027 KJELLER, NORWAY
REPORT DOCUMENTATION PAGE

SECURITY CLASSIFICATION OF THIS PAGE
 (when data entered)

1) PUBL/REPORT NUMBER FFI/RAPPORT-2002/01729	2) SECURITY CLASSIFICATION UNCLASSIFIED	3) NUMBER OF PAGES 23
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 II - Negativ 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 II - Negative 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-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 5 ng for the analytes, based on the condition that [M-H] ⁻ should be detected with a S/N > 3. The injection volume was 10 µl.		
9) DATE 10 June 2002	AUTHORIZED BY This page only Bjørn Arne Johnsen	POSITION Director of Research

ISBN-82-464-0638-8

UNCLASSIFIED

SECURITY CLASSIFICATION OF THIS PAGE
 (when data entered)

INNHOOLD

	Side	
1	INNLEDNING	7
2	EKSPERIMENTELT	8
2.1	Kjemikalier	8
2.2	Instrumenter og utstyr	8
3	RESULTATER	8
3.1	Fragmentor- og kapillærspenning	9
3.2	Temperatur og hastighet på tørkegassen nitrogen	10
3.3	Nitrogen nebulizertrykk	11
3.4	Bestemmelse av HPLC parametere	13
3.4.1	Konsentrasjonen av ammoniumformiat	13
3.4.2	Kolonnetemperatur	15
3.5	Deteksjonsgrenser	17
4	DISKUSJON	19
5	KONKLUSJON	19
	Litteratur	21
	Fordelingsliste	23

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

1 INNLEDNING

Ved Forsvarets forskningsinstitutt (FFI) har nedbrytningsprodukter av nervegasser (alkylfosfonsyrer) tidligere blitt analysert på bordmodell HPLC-API-ES-MS i positiv ion modus (figur 1.1) (1). I denne modusen var deteksjonsgrensen 0,1 ng for EPA, EMPA og IPMPA og 5 ng for MPA og PMPA. Sammenlignet med første generasjons elektropray (ESI-I), er deteksjonsgrensen 600 ganger bedre for EMPA og IPMPA og 10 ganger bedre for PMPA (2). Følsomheten ved bruk av en videreutviklet modell (ESI-II) i negativ ion modus var opptil 60 ganger bedre enn ved ESI-I i positiv ion modus (3). I negativ ion modus dannes pseudomolekylionet $[M-H]^-$ ved avspalting av et proton. Fosfonsyrene avgir lettere et proton enn de tar opp et proton, og vil derfor teoretisk kunne gi en lavere deteksjonsgrense i negativ ion modus. Det er derfor ønskelig å se om bordmodell HPLC-MS systemet også har en bedre følsomhet i negativ enn i positiv ion modus.



Figur 1.1 Bordmodell væskechromatograf tilkoblet atmospheric pressure ionization elektropray massespektrometer (HPLC-API-ES-MS)

Denne rapporten tar for seg analyse av alkylfosfonsyrer i negativ ion modus på HPLC-API-ES-MS systemet (figur 1.1). Forsøk har blitt utført for å finne de optimale verdiene for parametrene på væskekromatografen og elektrospray massespektrometeret. Deretter er instrumentets deteksjonsgrense for analyttene blitt bestemt for å se om følsomheten er bedre i negativ enn i positiv ion modus.

2 EKSPERIMENTELT

2.1 Kjemikalier

Metanol, CH₃OH, HPLC grade, Rathburn Chemicals Limited
 Ammoniumformiat, HCOONH₄, >97%, BDH Laboratory Supplies
 Metylfosfonsyre (MPA), CH₃P(O)(OH)₂, 98%, Aldrich
 Etylfosfonsyre (EPA), C₂H₅P(O)(OH)₂, 98%, Aldrich
 n-Propylfosfonsyre (NPPA), n-C₃H₇P(O)(OH)₂, 95%, Aldrich
 Etyl metylfosfonsyre (EMPA), CH₃P(O)(OH)(OC₂H₅), FFI
 i-Propyl metylfosfonsyre (IPMPA, sarinsyre), CH₃P(O)(OH)(O-i-C₃H₇), FFI
 n-Propyl metylfosfonsyre (NPMPA), CH₃P(O)(OH)(O-n-C₃H₇), FFI
 Pinacolyl metylfosfonsyre (PMPA, somansyre), CH₃P(O)(OH)((CH(CH₃)(t-C₄H₉))), FFI
 Vann, H₂O, ultrarent ved bruk av USF ELGA Maxima ultra pure water vannrensere

2.2 Instrumenter og utstyr

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
 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.

3 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 tørkeglass. Ved væskekromatografen er parametere som kolonnetemperatur og mengde ammoniumformiat i mobilfasen blitt optimalisert. Deretter er instrumentets deteksjonsgrense for analyttene blitt bestemt.

3.1 Fragmentor- og kapillærspenning

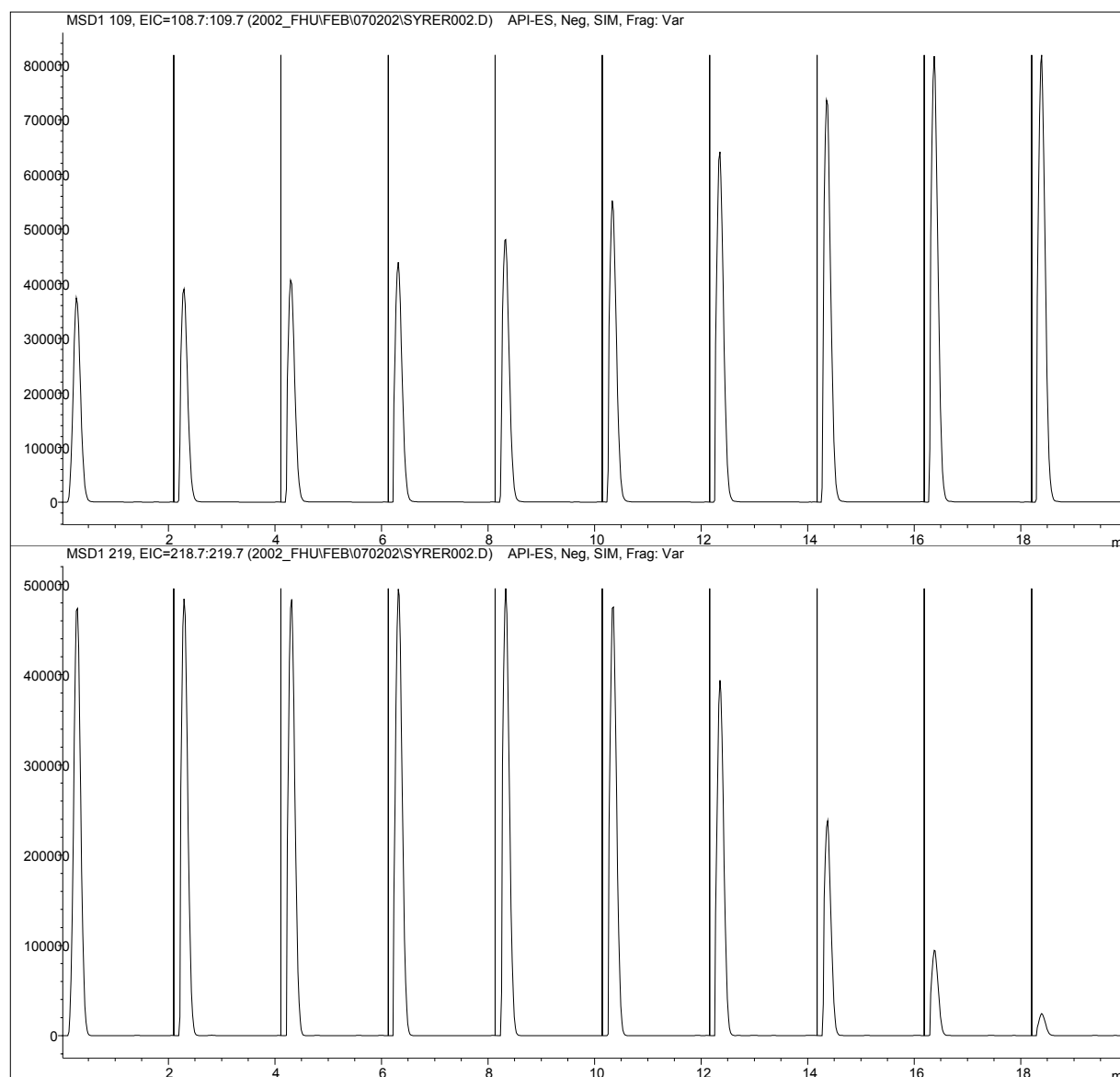
For MPA, EPA, NPPA, EMPA, IPMPA, NPMPA og PMPA ble massene $[M-H]^-$ og $[2M-H]^-$ brukt ved optimalisering av fragmentor- og kapillærspenning (tabell 3.1). Det ble lagd standarder for hver av forbindelsene med en konsentrasjon på 100 $\mu\text{g/ml}$ i 95/5 vann/metanol med 0,02 M ammoniumformiat. Hver analytt ble kjørt i en Flow Injection Analysis (FIA) serie i API-ES Selected Ion Monitoring (SIM) i negativ ion modus. Under disse analysene ble de verdiene for fragmentor- og kapillærspenning som ga størst topphøyde bestemt (tabell 3.1). Optimal fragmentorspenning ble testet i området 30 V til 140 V, hvor kapillærspenningen ble satt til 2000 V. Et eksempel er vist i figur 3.1. Deretter ble optimal kapillærspenning testet i området 1000 V til 5500 V med de optimale fragmentorspenningene som oppgitt i tabell 3.1. Parametrene som ble holdt konstant under forsøkene er gitt i fotnote¹.

Ut i fra tabell 3.1, er den optimale kapillærspenningen for $[M-H]^-$ for monosyrene lavere enn for disyrene, mens det motsatte er tilfelle ved $[2M-H]^-$. I de videre forsøkene vil en kapillærspenning på 2500 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 3.1.

Analytt	$[M-H]^-$	Fragmentor (V)	Kapillær (V)	$[2M-H]^-$	Fragmentor (V)	Kapillær (V)
	(m/z)			(m/z)		
MPA	95	100	2000	191	60	1000
EPA	109	120	2500	219	60	1000
NPPA	123	120	2000	247	70	1500
EMPA	123	80	1500	247	40	3500
IPMPA	137	100	1500	275	60	3500
NPMPA	137	70	1500	275	70	4500
PMPA	179	110	1500	359	80	4500

Tabell 3.1 Optimal fragmentor- og kapillærspenninger for $[M-H]^-$ og $[2M-H]^-$ for hver av analyttene MPA, EPA, NPPA, EMPA, IPMPA, NPMPA og PMPA

¹FIA mobilfase: 95/5 vann/metanol med 0,02 M ammoniumformiat, isokratisk, 0,25 ml/min. Injeksjonsvolum: 10 μl . Tørkegass: 350 °C og 10 l/min. Nebulizertrykk: 25 psi

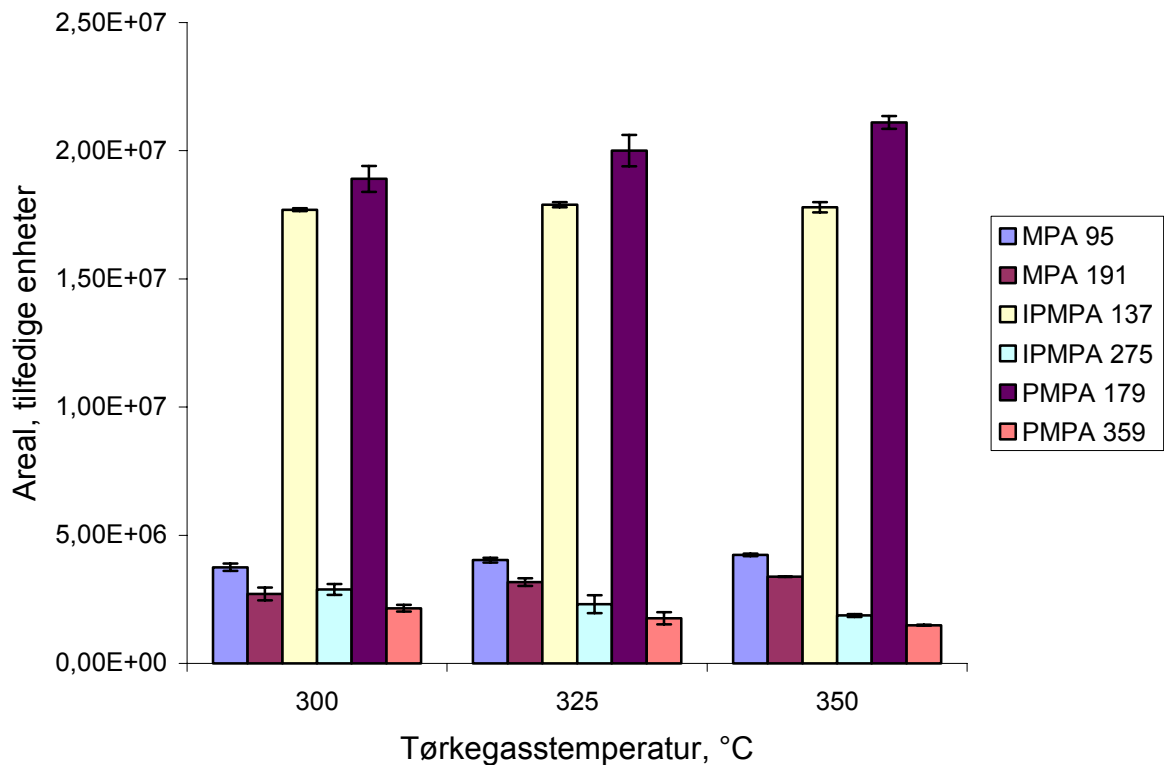


Figur 3.1 Signalene til $[M-H]^-$ (m/z 109, øverst) og $[2M-H]^-$ (m/z 219, nederst) for EPA ved fragmentorspenning 30 V-140 V med inkrement 10 V og kapillærspenning på 2000 V ved FIA

3.2 Temperatur og hastighet på tørkegassen nitrogen

Hvis analyttene ikke er veldig flyktige eller termisk ustabile, anbefales en maksimumstemperatur på 350 °C på tørkegassen. Forsøk ble gjort med 300-325-350 °C på tørkegassen nitrogen, der parametere som ble brukt og bestemt i forrige delkapittel ble benyttet. Standarder med 100 µg/ml MPA, IPMPA og PMPA ble brukt i forsøkene.

Arealet til signalene $[M-H]^-$ og $[2M-H]^-$ for MPA økte relativt lite med økende temperatur (figur 3.2). Temperaturen hadde neglisjerbar innvirkning på arealet til $[M-H]^-$ -signalet for IPMPA, mens arealet til $[2M-H]^-$ -signalet minket noe ved økende temperatur. Det samme var tilfelle for $[2M-H]^-$ for PMPA, mens arealet til $[M-H]^-$ -signalet økte med høyere temperatur. Disse endringene i arealene på signalene med hensyn på tørkegasstemperatur er relativt ubetydelige. Ved videre analyse vil 325 °C på tørkegassen bli brukt.

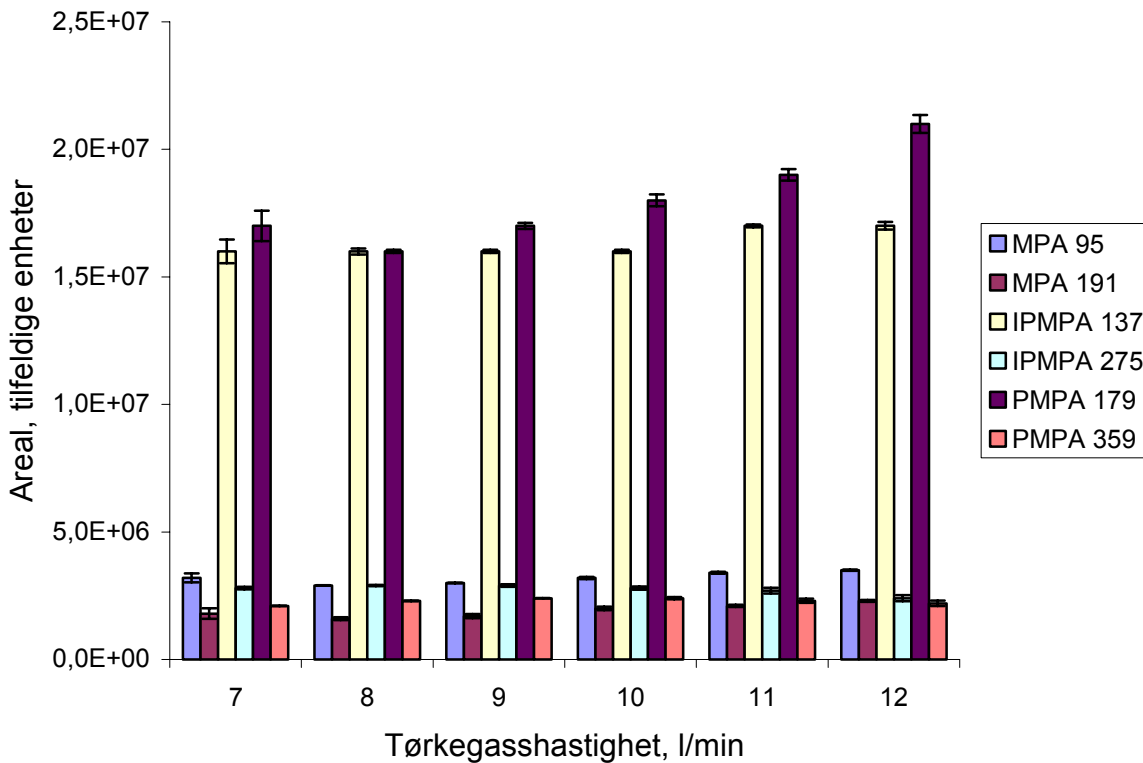


Figur 3.2 Areal for MPA (m/z 95, 191), IPMPA (m/z 137, 275) og PMPA (m/z 179, 359) ved forskjellige temperaturer ($^{\circ}\text{C}$) på tørkegasen nitrogen. Arealet er gitt som middelverdi av tre parallelle forsøk med ett standardavvik

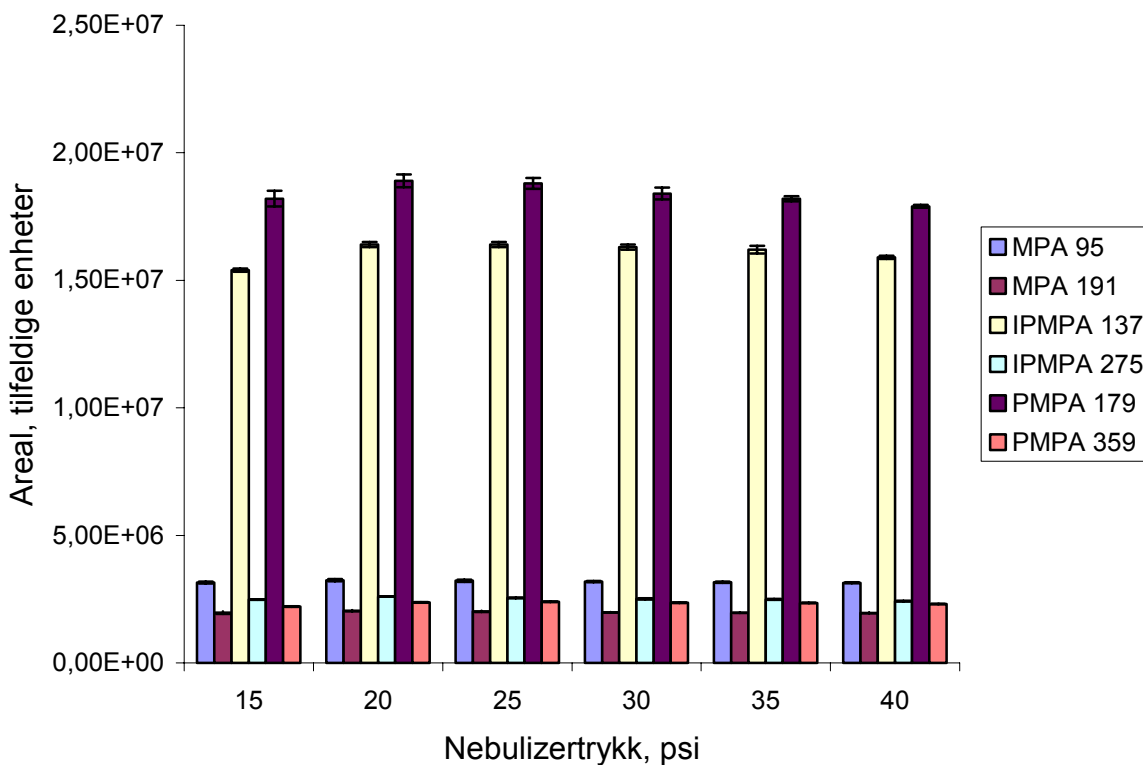
I instrumentspesifikasjonene påpekes en hastighet på 10 l/min på tørkegasen (N_2) som nødvendig, når analysen utføres i API-ES modus og væskehastigheten er mellom 100-300 $\mu\text{l}/\text{min}$. Forsøk ble gjort med 7-8-9-10-11-12 l/min med nitrogen som tørkegass. Standarder med 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ MPA, IPMPA og PMPA ble brukt i forsøkene. Økende hastighet på tørkegasen hadde relativt liten innvirkning på detektorresponsen for de fleste massene (figur 3.3). Arealet for $[\text{M}-\text{H}]^-$ -signalet for PMPA økte med økende tørkegasshastighet fra 8 l/min til 12 l/min. Siden det er ønskelig med et lavt gassforbruk vil en tørkegasshastighet på 10 l/min bli brukt.

3.3 Nitrogen nebulizertrykk

Det optimale nebulizertrykket avhenger av væskehastigheten, mobilfasesammensetningen og ionisasjonsmodus. Leverandøren anbefaler et nebulizertrykk på 20 psi når væskehastigheten er 50-300 $\mu\text{l}/\text{min}$ 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 $\mu\text{g}/\text{ml}$ MPA, IPMPA og PMPA. Det ble ikke observert store endringer i følsomheten ved endring av nebulizertrykket (figur 3.4). Ved videre analyse vil et nebulizertrykk på 25 psi bli brukt.



Figur 3.3 Areal for MPA (m/z 95, 191), IPMPA (m/z 137, 275) og PMPA (m/z 179, 359) ved forskjellige hastigheter (l/min) på tørkegassen nitrogen. Arealet er gitt som middelværdi av tre parallelle forsøk med ett standardavvik



Figur 3.4 Areal for MPA (m/z 95, 191), IPMPA (m/z 137, 275) og PMPA (m/z 179, 359) ved forskjellige nebulizertrykk (psi). Arealet er gitt som middelværdi av tre parallelle forsøk med ett standardavvik

3.4 Bestemmelse av HPLC parametere

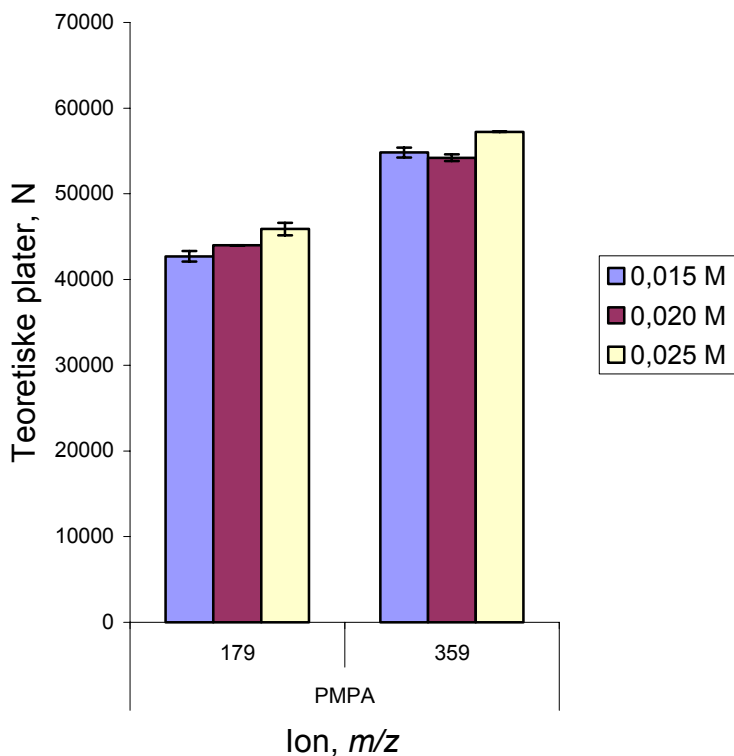
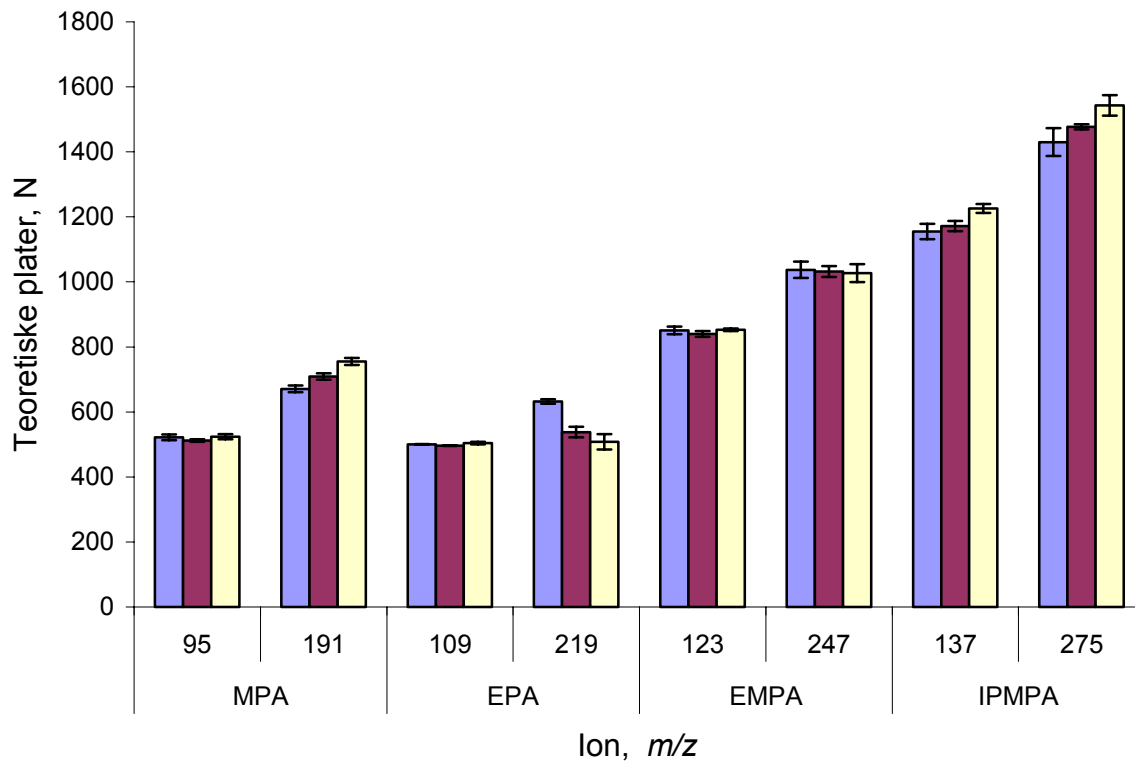
Alkylfosfonsyrene ble separert ved hjelp av en Zorbax SB-C₁₈ kolonne. Mobilfase A var 95/5 vann/metanol med 0,02 M ammoniumformiat, mens mobilfase B var 95/5 metanol/vann med 0,02 M ammoniumformiat. Elueringsgradienten var 5% B (0-5 min), 5% B til 95% B (5-10 min) og 95% B (10-15 min) med en væskehastighet på 0,25 ml/min. Injeksjonsvolumet var 10 µl. Temperaturen på kolonnen var 40 °C. Kolonnens temperatur og mengde ammoniumformiat i mobilfasen er de optimaliserte verdiene for væsekromatografen, og bestemmelse av disse parametrene tas nærmere opp i underkapitlene nedenfor. De optimale parametrene som ble bestemt i kapittel 3.1-3.3 ble benyttet i SIM modus.

3.4.1 Konsentrasjonen av ammoniumformiat

Ved analyse i positiv ion modus ble trifluoreddiksyre benyttet som modifikator (1). Den samme modifikatoren kan derimot ikke benyttes ved spekteranalyse i negativ ion modus. En høyere pH-verdi er nødvendig for at analyttene skal forekomme som [M-H]⁻-ioner. I mobilfasen ble derfor ammoniumformiat brukt som modifikator (4). pH-verdien til løsningen er da 5-6.

Det ble gjort forsøk med forskjellige konsentrasjoner av ammoniumformiat i mobilfasen (figur 3.5). Endring av konsentrasjonen av ammoniumformiat hadde relativ liten effekt på separasjonen og følsomheten (målt med hensyn på topphøyden). Vi har valgt å bruke 0,02 M ammoniumformiat i mobilfasen. I negativ ion modus har vi også valgt å bruke metanol i mobilfasen framfor acetonitril som ble benyttet i positiv ion modus (1). Det har blitt rapportert at det dannes færre addukter ved bruk av metanol framfor acetonitril (4).

I figur 3.5 er NPPA og NPMPA ikke blitt nevnt. Disyren NPPA har samme retensjonstid og masser for [M-H]⁻ og [2M-H]⁻ som EMPA, mens monosyren NPMPA har samme retensjonstid og addukter med samme masser som IPMPA. Vi har fortsatt ikke klart å skille på disse analyttene, selv om sammensetningen av mobilfasen har endret seg (1). Analyttene NPPA og NPMPA vil derfor foreløpig ikke inngå i analysemetoden.



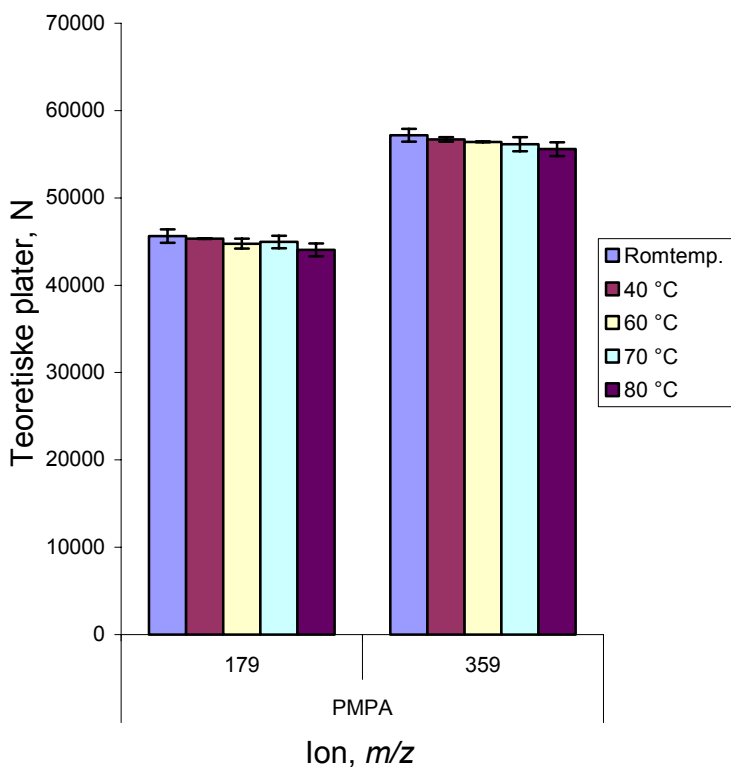
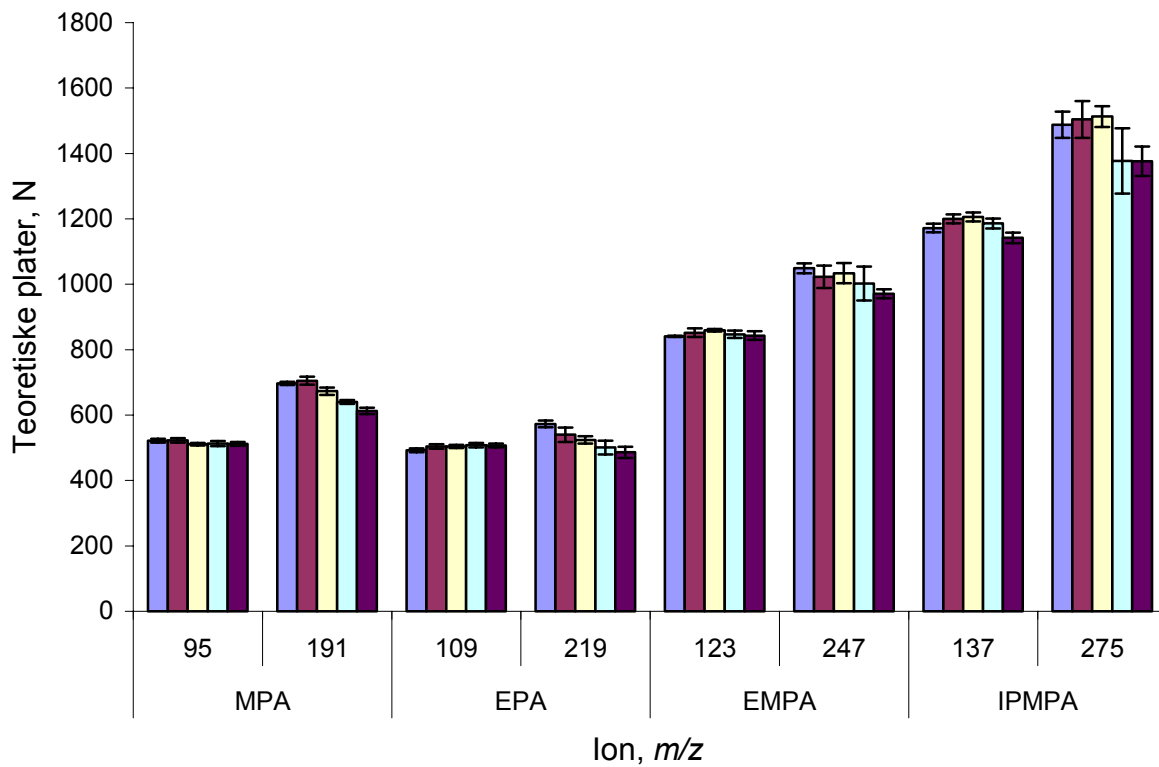
Figur 3.5 *Antall teoretiske plater (N) for MPA (m/z 95, 191), EPA (m/z 109, 219), EMPA (m/z 123, 247), IPMPA (m/z 137, 275) og PMPA (m/z 179, 359) ved varierende konsentrasjon (M) ammoniumformiat i mobilfasen. N er gitt som middelerdi av syv parallelle forsøk med ett standardavvik. 10 μ l av en 10 μ g/ml standardløsning ble injisert ved 40 °C på separasjonskolonnen*

3.4.2 Kolonnetemperatur

Det ble 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 analysert ved romtemperatur, 40 °C, 60 °C, 70 °C og 80 °C.

Det er relativt små variasjoner i antall teoretiske plater for analyttene med varierende temperatur på separasjonskolonnen (figur 3.6). Vi har valgt å bruke 40 °C framfor romtemperatur, 60 °C, 70 °C eller 80 °C. Romtemperatur er en variabel verdi som i stor grad vil påvirkes av aktiviteten i rommet. Hvis temperaturen blir relativt høy i rommet vil ikke dette påvirke resultatene i betydelig grad (figur 3.6). Likevel er bruken av en temperatur høyere enn 40 °C på kolonnen uhensiktsmessig med hensyn på den tiden det tar å få en stabil temperatur og medfører kortere levetid for kolonnen. Vi har ikke utført forsøk som viser hvilken effekt det vil ha på resultatene hvis temperaturen blir lavere enn gjennomsnittlig romtemperatur.

Med hensyn på følsomheten er det også gunstig å bruke 40 °C på separasjonskolonnen. Ved økende temperatur blir arealet til massene $[M-H]^-$ og $[2M-H]^-$ for PMPA lavere. Det samme er tilfelle for MPA, men signalene for begge massene stabiliserer seg fra 70 °C til 80 °C. Signalet for masse 109 for EPA og begge massene ($[M-H]^-$ og $[2M-H]^-$) til EMPA og IPMPA er relativt stabile ved høyere temperatur. Økende temperatur har kun betydelig positiv effekt på arealet til masse 219 for EPA.



Figur 3.6 Antall teoretiske plater (N) for MPA (m/z 95, 191), EPA (m/z 109, 219), EMPA (m/z 123, 247), IPMPA (m/z 137, 275) og PMPA (m/z 179, 359) ved forskjellige temperaturer på separasjonskolonnen. N er gitt som middelerdi av fire parallelle forsøk med ett standardavvik. $10 \mu\text{l}$ av en $10 \mu\text{g/ml}$ standardløsning ble injisert

3.5 Deteksjonsgrenser

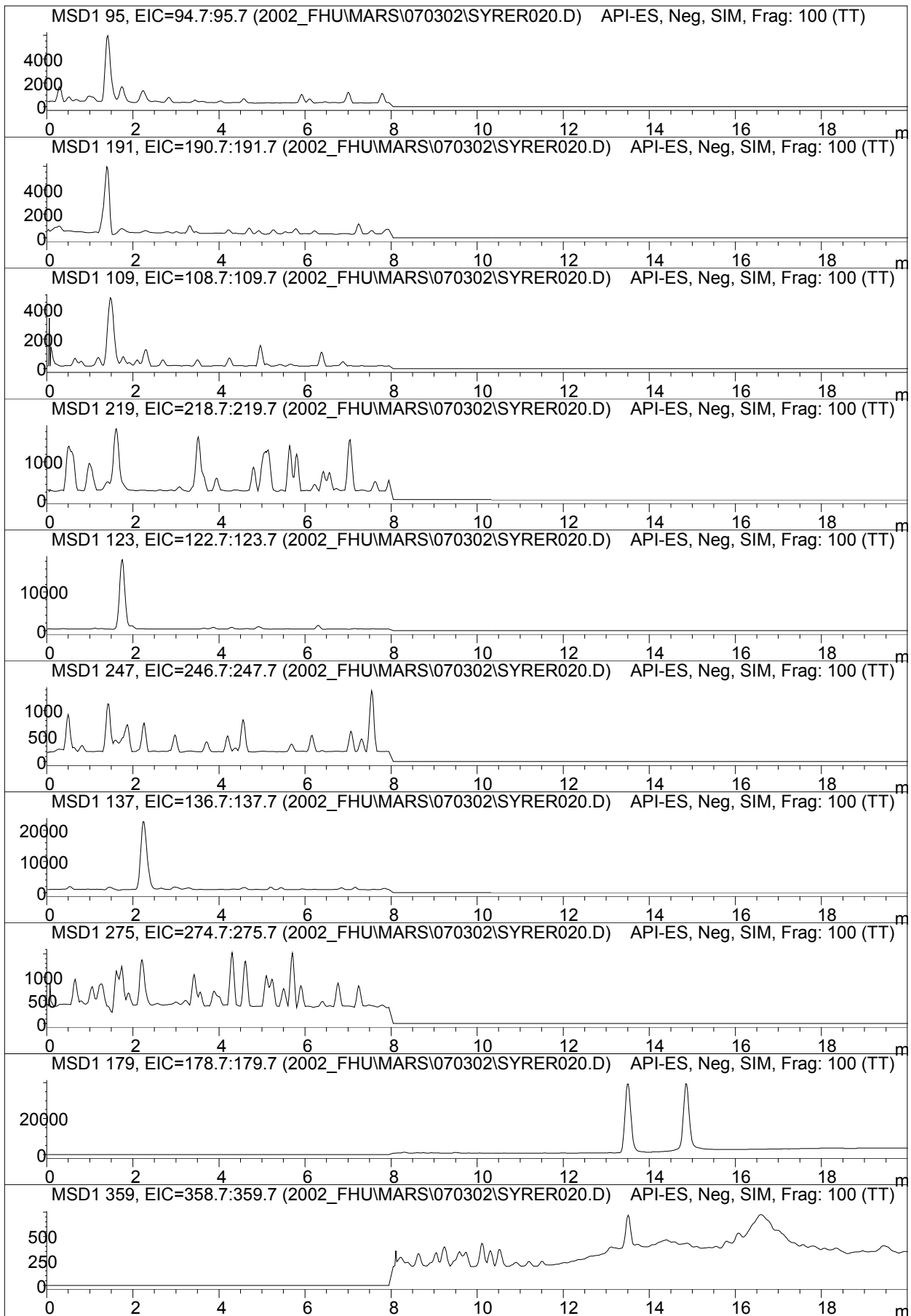
Deteksjonsgrenser for MPA, EPA, EMPA, IPMPA og PMPA ved HPLC-API-ES-MS analyser ble bestemt ved å analysere fortynninger av en blanding av analyttene i 95/5 vann/metanol med 0,02 M ammoniumformiat. For øvrig ble de optimaliserte analyseparametrene som ble bestemt i kapitlene 3.1-3.4 brukt. Negativ ion modus elektropray i SIM ble benyttet der peak width i metoden ble satt til 0,2 min. Resultatene er vist i tabell 3.2. Deteksjonsgrensen er basert på et signal/støyforhold (S/N) på ca tre for massene $[M-H]^-$ og $[2M-H]^-$ for analyttene.

Mengde injisert (ng)	MPA		EPA		EMPA		IPMPA		PMPA	
	95	191	109	219	123	247	137	275	179	359
5	x	-	x	-	x	-	x	-	x	x
10	x	-	x	-	x	-	x	-	x	x
20	x	x*	x	-	x	x*	x	x	x	x

Tabell 3.2 Deteksjonsgrenser for MPA, EPA, EMPA, IPMPA og PMPA ved et injeksjonsvolum på 10 μ l. S/N større enn tre for komponenten er angitt som x og verdier under dette er gitt som -. x* indikerer et S/N for komponenten som er større enn tre, men med tillegg av koeluerende signaler som også er tilstede i blindprøver

Ut fra tabell 3.2 er deteksjonsgrensen for samtlige analytter 5 ng injisert (figur 3.7). Dette er basert på at molekylionet for hver forbindelse skal kunne detekteres. En lavere deteksjonsgrense for $[M-H]^-$ for EMPA, IPMPA og PMPA kan muligens oppnås (figur 3.7). Videre bestemmelse av dette har ikke blitt foretatt, på grunn av relativt mye mer støy i bakgrunnen i negativ ion modus enn i positiv. Ved framtidig analyse av alkylfosfonsyrer er det derfor ønskelig å benytte instrumentet i positiv ion modus framfor i negativ. MPA og PMPA har lik deteksjonsgrense i positiv og negativ ion modus (1). Deteksjonsgrensen for EPA, EMPA og IPMPA er derimot 50 ganger bedre i positiv enn i negativ ion modus.

Ved å sammenligne analyse av 5 ng injisert i positiv og negativ ion modus, er følsomheten med hensyn på signal/støyforholdet for $[M+H]^+$ i forhold til $[M-H]^-$, 2 ganger høyere for IPMPA og 6 ganger høyere for EPA og EMPA. Følsomheten for molekylionet for MPA er likt både i positiv og negativ ion modus. Signal/støyforholdet for molekylionet til PMPA er 140 ganger høyere i negativ ion modus enn i positiv ved 5 ng injisert. Dette indikerer også at det ville være mulig å få en lavere deteksjonsgrense for PMPA i negativ ion modus enn i positiv.



Figur 3.7 Ekstrahert ion kromatogram (EIC) fra injeksjon av 5 ng av syrene MPA (m/z 95, 191) (1,4 min), EPA (m/z 109, 219) (1,5 min), EMPA (m/z 123, 247) (1,8 min), IPMPA (m/z 137, 275) (2,3 min) og PMPA (m/z 179, 359) (13,5 min) ved negativ ion modus SIM API-ES-MS

4 DISKUSJON

FFI har tidligere rapportert om en lavere deteksjonsgrense for alkylfosfonsyrer i negativ ion modus enn i positiv (3). Dette er ikke tilfelle ved bruk av bordmodell HPLC-API-ES-MS systemet. Grunnen til dette kan være ulik utforming på instrumentene som fører til varierende følsomhet i de to modusene. Vi har også observert mer støy i negativ ion modus enn i positiv. Årsakene til dette er ikke undersøkt nærmere. Dstl (Defence Science and Technology Laboratory) har også gjort lignende observasjoner. Ved bruk av 0,05 M ammoniumformiat som modifikator i negativ ion modus var følsomheten relativt lavere enn i positiv ved bruk av 0,1% maursyre (5).

Analyttene NPPA og NPMPA har ikke blitt tatt med i analysemetoden. NPPA har samme retensjonstid og masser for $[M-H]^-$ og $[2M-H]^-$ som EMPA, mens NPMPA har samme retensjonstid og addukter med samme masser som IPMPA. Vi har fortsatt ikke klart å separere disse analyttene, selv om mobilfasen er en annen enn det som ble benyttet i positiv ion modus (1). Det har også tidligere blitt observert vanskeligheter med å separere isomerene NPMPA og IPMPA (1) (3). Det har blitt rapportert at analyse av disse koeluerende analyttene kan utføres ved kollisjonsindusert dissosiering (CID) (6).

5 KONKLUSJON

Alkyfosfonsyrene MPA, EPA, EMPA, IPMPA og PMPA ble separert ved hjelp av HPLC og analysert i negativ 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 2500 V, nebulizertrykket til 25 psi, tørkegasstemperaturen til 325 °C og tørkegasshastigheten til 10 l/min. Mono- og disyrene ble separert ved hjelp av en Zorbax SB-C₁₈ kolonne. Mobilfase A var 95/5 vann/metanol med 0,02 M ammoniumformiat, mens mobilfase B var 95/5 metanol/vann med 0,02 M ammoniumformiat. 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 5 ng ga molekylionet for MPA, EPA, EMPA, IPMPA og PMPA et signal/støyforhold større enn 3. I analysemetoden er ikke NPPA og NPMPA blitt tatt med.

Litteratur

- (1) Hussain F (2002): Nedbrytningsprodukter av nervegasser analysert med væskekromatograf tilkoblet atmospheric pressure ionization elektropray massespektrometer (HPLC-API-ES-MS), FFI/RAPPORT-2002/01698, Forsvarets forskningsinstitutt.
- (2) Opstad A M, Tørnes J A (1994): Hydrolyseprodukter av nervegasser identifisert ved bruk av HPLC-MS med elektropray interface, FFI/RAPPORT-94/06180, Forsvarets forskningsinstitutt.
- (3) Opstad A M, Bjerkeseth L H, Tørnes J A (1996): Nedbrytningsprodukter av nervegasser analysert med elektropray HPLC-MS, FFI/RAPPORT-96/02824, Forsvarets forskningsinstitutt.
- (4) Read R W, Black R M (1999): Rapid screening procedures for the hydrolysis products of chemical warfare agents using positive and negative ion liquid chromatography-mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionisation, *Journal of Chromatography A* **862**, 169-177.
- (5) 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 elektropray and atmospheric pressure chemical ionisation, *Journal of Chromatography A* **794**, 233-244.
- (6) Van Baar B L M, Hulst A G, Wils E R J (2001): Elektropray mass spectrometry and tandem mass spectrometry of some alkyl methylphosphonates and ethylphosphonates, TNO report PML 2000-A71, TNO Prins Maurits Laboratory.

FORDELINGSLISTE

FFIBM
Dato: 12 april 2002

RAPPORTTYPE (KRYSS AV)		RAPPORT NR.	REFERANSE	RAPPORTENS DATO	
<input checked="" type="checkbox"/> RAPP	<input type="checkbox"/> NOTAT	<input type="checkbox"/> RR	2002/01729	FFIBM/826/138	10 juni 2002
RAPPORTENS BESKYTTELSESGRAD			ANTALL EKS UTSTEDT	ANTALL SIDER	
UGRADERT			60	23	
RAPPORTENS TITTEL			FORFATTER(E)		
NEDBRYTNINGSPRODUKTER AV NERVEGASSER ANALYSERT MED VÆSKEKROMATOGRAF TILKOBLET ATMOSPHERIC PRESSURE IONIZATION ELEKTROSPRAY MASSESPEKTROMETER (HPLC-API-ES-MS) Del II - Negativ ion modus			HUSSAIN Fatima		
FORDELING GODKJENT AV FORSKNINGSSJEF			FORDELING GODKJENT AV AVDELINGSSJEF:		
Bjørn Arne Johnsen			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		v/Lt Nils Holm Toverud	1		FFIE
1		FLO/Sjø	1		FFISYS
1		v/KL Geir Sæthre	6		FFIBM
1		FLO/Luft DV	1		FFIN
1		v/Kapt Vebjørn Hanssen	1		Leif Haldor Bjerkeseth, FFIBM
1		FABCS	1		Odd Busmundrud, FFIBM
1		v/Kapt Frede Hermansen	1		Alexander F Christiansen, FFIBM
1		LST/BFI	1		Monica Endregard, FFIBM
1		v/Maj Odd Skålvold	1		Hans Christian Gran, FFIBM
1		FOKIV	5		Fatima Hussain, FFIBM
1		v/Oblt Egil Lie	1		Bjørn Arne Johnsen, FFIBM
1		FSAN	1		Aase Mari Opstad, FFIBM
1		v/Oblt Dag Hjelle	1		Bjørn Pedersen, FFIBM
1		FO/FST	1		Bent Tore Røen, FFIBM
1		v/Oblt Hans Kristian Ulimoen	1		John Aa Tørnes, FFIBM
1		v/Oblt Jon-Arne Nyland			ELEKTRONISK FORDELING: FFI-veven
1		KNM T/SSS			
1		v/KL Geir Johnsen			
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.