

FFI RAPPORT

BESTEMMELSE AV THIODIGLYKOL I SALTVANN OG MARINE SEDIMENT MED VÆSKEKROMATOGRAF TILKOBLET ELEKTROSPRAY MASSESPEKTROMETER

HUSSAIN Fatima, OPSTAD Aase M

FFI/RAPPORT-2002/03317

FFIBM/Oppdr 299401/138

Godkjent
Kjeller 22. august 2002

Bjørn Arne Johnsen
Forskningsjef

**BESTEMMELSE AV THIODIGLYKOL I
SALTVANN OG MARINE SEDIMENT MED
VÆSKEKROMATOGRAF TILKOBLET
ELEKTROSPRAY MASSESPEKTROMETER**

HUSSAIN Fatima, OPSTAD Aase M

FFI/RAPPORT-2002/03317

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-2002/03317 1a) PROJECT REFERENCE FFIBM/Oppdr 299401/138	2) SECURITY CLASSIFICATION UNCLASSIFIED 2a) DECLASSIFICATION/DOWNGRADING SCHEDULE -	3) NUMBER OF PAGES 30					
4) TITLE BESTEMMELSE AV THIODIGLYKOL I SALT VANN OG MARINE SEDIMENT MED VÆSKEKROMATOGRAF TILKOBLET ELEKTROSPRAY MASSESPEKTROMETER DETERMINATION OF THIODIGLYCOL IN SALT WATER AND SEA SEDIMENT WITH A LIQUID CHROMATOGRAPH COUPLED TO AN ELECTROSPRAY MASS SPECTROMETER							
5) NAMES OF AUTHOR(S) IN FULL (surname first) HUSSAIN Fatima, OPSTAD Aase M							
6) DISTRIBUTION STATEMENT Approved for public release. Distribution unlimited. (Offentlig tilgjengelig)							
7) INDEXING TERMS IN ENGLISH: <table data-bbox="288 1066 730 1267" style="width: 100%;"> <tr><td>a) <u>Thiodiglycol</u></td></tr> <tr><td>b) <u>Sea water</u></td></tr> <tr><td>c) <u>Sea sediment</u></td></tr> <tr><td>d) <u>HPLC-MS</u></td></tr> <tr><td>e) <u>Detection limits</u></td></tr> </table>			a) <u>Thiodiglycol</u>	b) <u>Sea water</u>	c) <u>Sea sediment</u>	d) <u>HPLC-MS</u>	e) <u>Detection limits</u>
a) <u>Thiodiglycol</u>							
b) <u>Sea water</u>							
c) <u>Sea sediment</u>							
d) <u>HPLC-MS</u>							
e) <u>Detection limits</u>							
THESAURUS REFERENCE:							
8) ABSTRACT Analytical methods for thiodiglycol (TDG) in sea water and marine sediment have been developed. The methods are based on solid phase extraction and analysis by use of HPLC-API-ES coupled to a MS in SIM positive ion modus. The detection limit for TDG in sea water was 0,25 µg/ml (50 ng TDG injected) and 20 ng/g (200 ng TDG injected) for wet sediment, based on the condition that $[M-H_2O+H]^+$ and $[M+H]^+$ should be detected with a S/N > 3. The injection volume was 20 µl.							
9) DATE 22 August 2002	AUTHORIZED BY This page only Bjørn Arne Johnsen	POSITION Director of Research					

ISBN-82-464-0646-9

UNCLASSIFIED

SECURITY CLASSIFICATION OF THIS PAGE
 (when data entered)

INNHOOLD

	Side	
1	INNLEDNING	7
2	TEORI FOR HPLC-MS	7
3	EKSPERIMENTELT	10
3.1	Kjemikalier	10
3.2	Instrumenter og utstyr	10
3.3	Preparering av saltvanns- og marine sedimentprøver	11
4	INSTRUMENTELL OPTIMALISERING AV ANALYSEMETODEN	11
4.1	Spekteranalyse	11
4.2	Fragmentor- og kapillærspenning	11
4.3	Nitrogen nebulizertrykk	13
4.4	Hastighet og temperatur på tørkegassen nitrogen	14
4.5	HPLC parametere	16
5	BESTEMMELSE AV TDG I MARINE MATRISER	17
5.1	Direkte injeksjon av vannprøve	17
5.1.1	Ferskvann	17
5.1.2	Saltvann	19
5.2	Opparbeidelse av saltvannsprøver	20
5.2.1	Uttesting av ENV-kolonne	20
5.2.2	Uttesting av ENV+-kolonne	22
5.2.3	Uttesting av SAX-kolonne	22
5.3	Opparbeidelse av marine sedimentprøver	22
5.4	Oppsummering	23
6	KONKLUSJON	25
	Litteratur	27
	Fordelingsliste	29

BESTEMMELSE AV THIODIGLYKOL I SALTVAENN OG MARINE SEDIMENT MED VÆSKEKROMATOGRAF TILKOBLET ELEKTROSPRAY MASSESPEKTROMETER

1 INNLEDNING

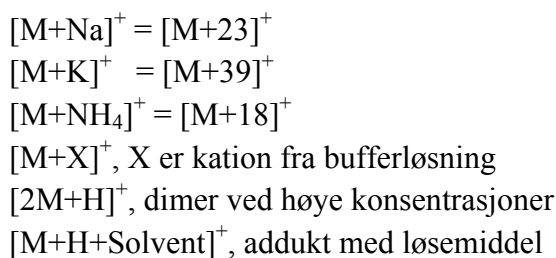
Før og under 2. verdenskrig ble store mengder kjemiske våpen produsert i Sentral-Europa og Sovjetunionen. Siden kjemiske stridsmidler kun i liten grad ble brukt under krigen, fantes det store lagre da krigen sluttet. De tyske lagrene ble overtatt av de allierte og mesteparten ble dumpet i Østersjøen og Skagerrak. Om lag 300 000 tonn kjemisk ammunisjon (brutto) ble dumpet i disse farvann hvorav ca 168 000 tonn i Skagerrak. Ammunisjonen som ble dumpet i Skagerrak, ble fylt i utrangerte skip som ble tauet ut på havet og senket. Forsvarets forskningsinstitutt (FFI) ble i 1989 anmodet av Forsvarsdepartementet (FD) om å foreta en undersøkelse for å finne ut om den kjemiske ammunisjonen dumpet i Skagerrak representerte noen fare. Det ble samlet inn vannprøver i nærheten av fem av de dumpede vrakene. Prøvene ble analysert med hensyn på kjemiske stridsmidler og deres nedbrytningsprodukter. Ingen slike forbindelser ble påvist (1)(2)(3)(4).

I år har FFI fått i oppdrag fra Statens forurensingstilsyn (SFT) om å foreta en liknende undersøkelse for å overvåke situasjonen i Skagerrak. I tillegg til å samle inn vannprøver skal det også tas sedimentprøver i nærheten av de tidligere undersøkte vrakene. Prøvene skal hovedsakelig analyseres for tabun, sennepsgass, sennepsgass nedbrytningsprodukt thiodiglykol og arsenforbindelser (Adamsitt, Clark I og Clark II). Anbefalte kjemiske analysemetoder er tilgjengelig for alle disse forbindelsene (5)(6)(7)(8). Det er likevel ønskelig å utvikle en analysemetode for nedbrytningsproduktet thiodiglykol med væskekromatografi-massespektrometri (HPLC-MS). De eksisterende analysemetodene for thiodiglykol er basert på tidkrevende opparbeidelse med derivatisering før analyse på gasskromatograf (GC). Hensikten med å anvende HPLC-MS er å kunne analysere prøven uten å foreta en like omfattende opparbeidelse. Denne rapporten tar for seg metodeutvikling for analyse av thiodiglykol i saltvann og sediment på HPLC-MS.

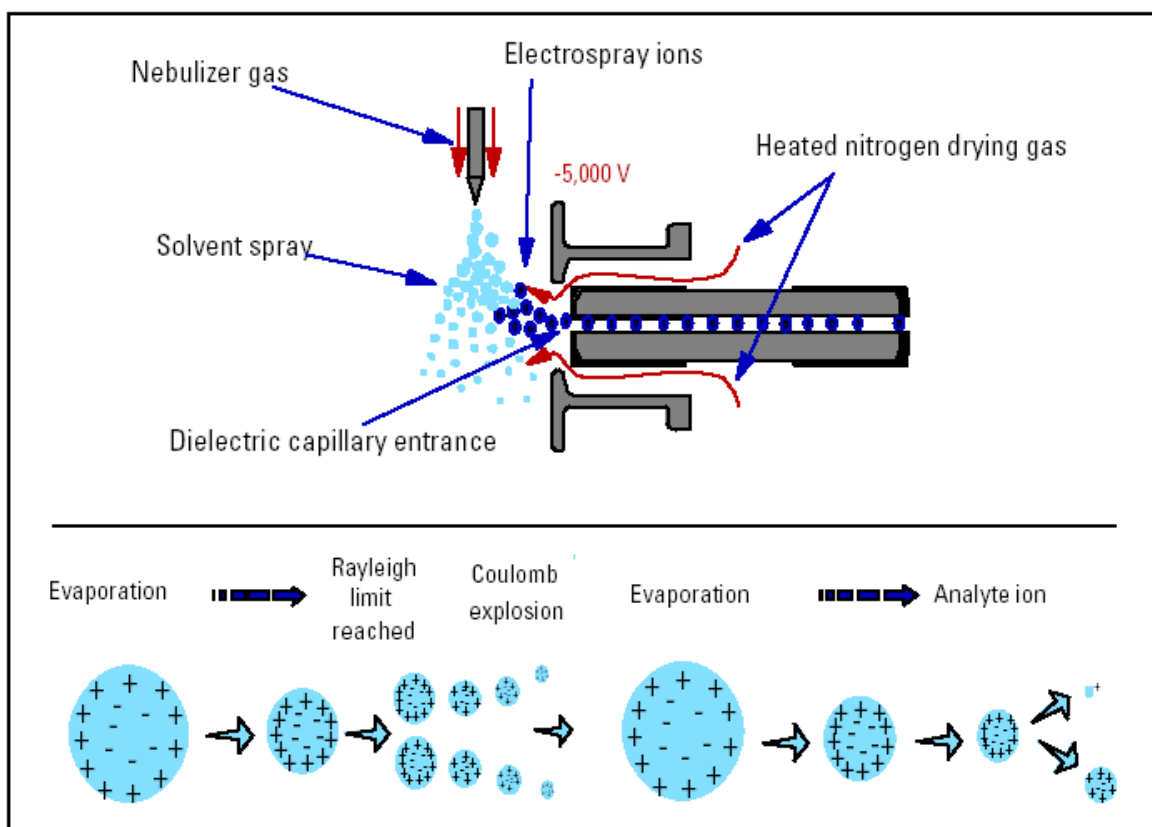
2 TEORI FOR HPLC-MS

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 (9). Enkeltladete små molekyler som pesticider og fosfonsyrer blir også analysert. Elektrospray er egnet for applikasjoner hvor analytten er et ion eller kan overføres til en ladd partikkel (10). Ved senking av pH vil basiske forbindelser protoneres og kan analyseres i positiv ion modus elektrospray. 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 elektrosprayovergangen er viktig for å oppnå god følsomhet.

Elektrospray er en mild ionisasjonsteknikk for polare komponenter, hvor kovalente bindinger i molekylet i hovedsak ikke brytes (11). 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 (10)(12)(13):



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) (10).

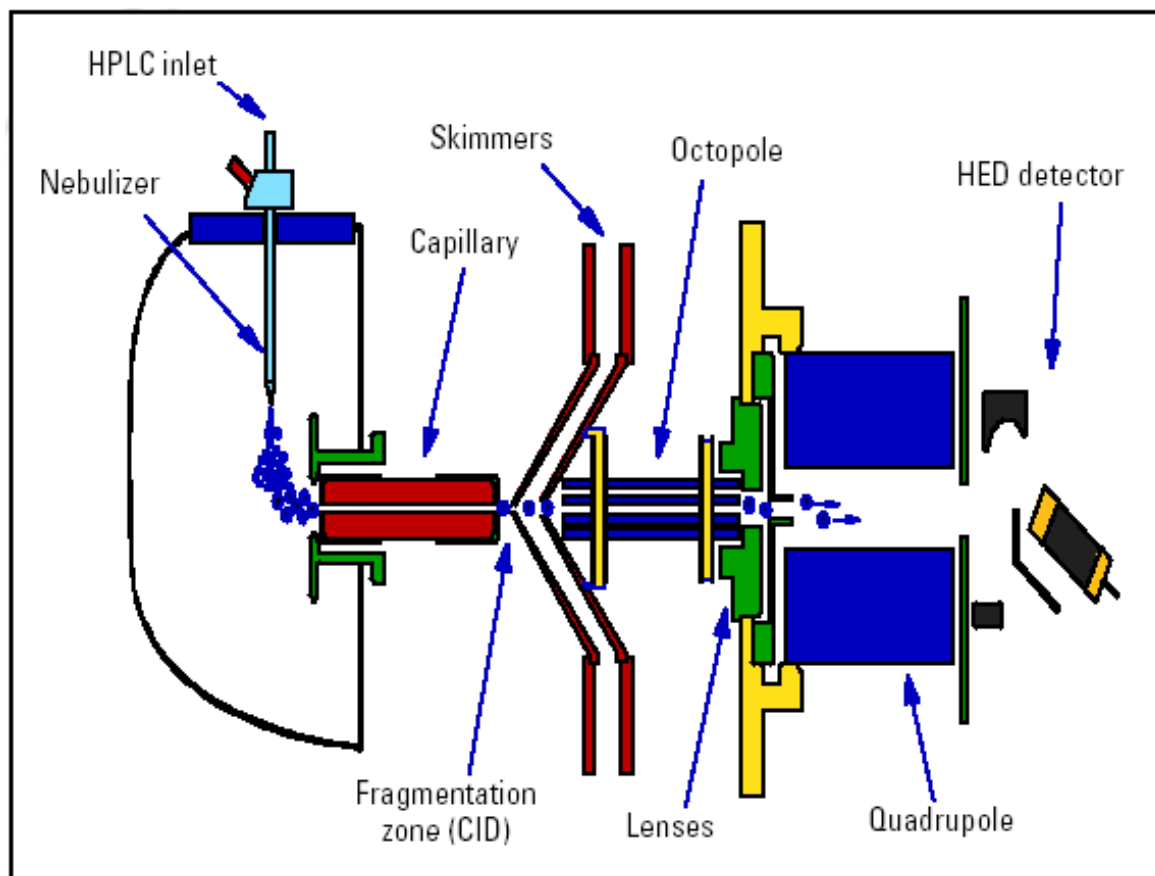


Figur 2.1 Skjematiske fremstilling av API-ES ionisasjon (14)(15)

Ved elektrosprayionisasjon føres en prøveløsning gjennom nebulizeren (nålen) inn i spray-kammeret (figur 2.1). Nebulizeren er jordet og er omgitt av en halv-sylindriske elektrode som har

relativ høy spenning (10)(16). 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 sprayen. 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 frastøtningskreftene (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 høyvakuområdet (10^{-6} Torr) av massefiltret. Oktopolen vil fokusere ionene mot kvadropolen. 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 kvadropolen. I kvadropolsystemet 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 atmosfærisk tryk ioniserings-elektrospray (API-ES) fra Agilent Technologies (14)

3 EKSPERIMENTELT

3.1 Kjemikalier

Thiodiglykol (TDG), (C₂H₅O)₂S, >98%, Sigma Chemical Co
Acetonitril (ACN), CH₃CN, HPLC grade S, Rathburn Chemicals Limited
Metanol, CH₃OH, HPLC grade, Rathburn Chemicals Limited
Trifluoreddiksyre (TFA), CF₃COOH, uvasol (>99,8%), Merck
Vann, H₂O, ultrarent ved bruk av USF ELGA Maxima ultra pure water vannrensere
Sjøvann, Huk badestrand, Oslo
Sjøsediment, Huk badestrand, Oslo

3.2 Instrumenter og utstyr

Væskerkromatograf 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, L 610, Sartorius
Ristebord, IKA Labortechnik
Ultralydbad, Sonorex Super, Bandelin
Whirlmikser, IKA Labortechnik
Inndampingssystem med nitrogen, Techne
Sentrifuge, IEC Centra CL3R, rotor 243
Sentrifugerør med skrukork, FEP, 30 ml, Nalgene
Vakuumsentrifuge, AES 2010, Savant
1 µl Hamilton sprøyte, Alltech
Vakuumsystem for fast fase ekstraksjon, Supelco
ENV bonded phase, 1 ml, 100 mg, Varian
ENV+ bonded phase, 6 ml, 200 mg, Isolute
SAX bonded phase, 3 ml, 500 mg, Varian
Bond Elut reservoir, Varian
10 ml sprøyte uten nål, Terumo
Filter, 0,45 µm type minisart RC 25, Sartorius
Digitale pipetter nr P-1, P-2, P-3, P-4, P-5 og P-19, Labsystems
Reagensglass med skrukork, 15 ml, Pyrex
Autosamplerglass, 2 ml, skrukork med teflonbelagt septa type 8-ST14, Chromacol

Det ble benyttet glassutstyr i klasse A.

3.3 Preparering av saltvanns- og marine sedimentprøver

Opparbeidelsesprosedyren til prøvene tar utgangspunkt i ”Recommended Operating Procedures for Sampling and Analysis in the Verification of Chemical Disarmament” (ROP), kapittel SP 4.6 og SP 7.4 (5). Disse metodene er beregnet på opparbeidelse av ferskvann og jord, hvor prøvematriksene har relativt lavt saltinnhold. På grunn av saltkonsentrasjoner på opp i mot 35,2 psu i prøver fra Skagrrak, var det nødvendig å modifisere opparbeidelsesprosedyren med hensyn på dette (17). Metodeutvikling for opparbeidelse og analyse av thiodiglykol på HPLC-MS tas nærmere opp i kapittel 3.

4 INSTRUMENTELL OPTIMALISERING AV ANALYSEMETODEN

Flere parametere ved HPLC-API-ES-MS påvirker signal til støyforholdet for analytten. For å få best mulig følsomhet for thiodiglykol har vi optimalisert variable som fragmentorspenning, kapillærspenning, nebulizertrykk, temperatur og hastighet på tørkegassen nitrogen. Ved væskrokromatografen er parametere som kolonnetemperatur og injeksjonsvolum blitt optimalisert. Deretter har vi foretatt metodeutvikling for opparbeidelse av saltvannsprøver og marine sedimentprøver. Tilslutt har bestemmelse av deteksjonsgrense for thiodiglykol i ferskvann, saltvann og sjøsediment blitt gjort.

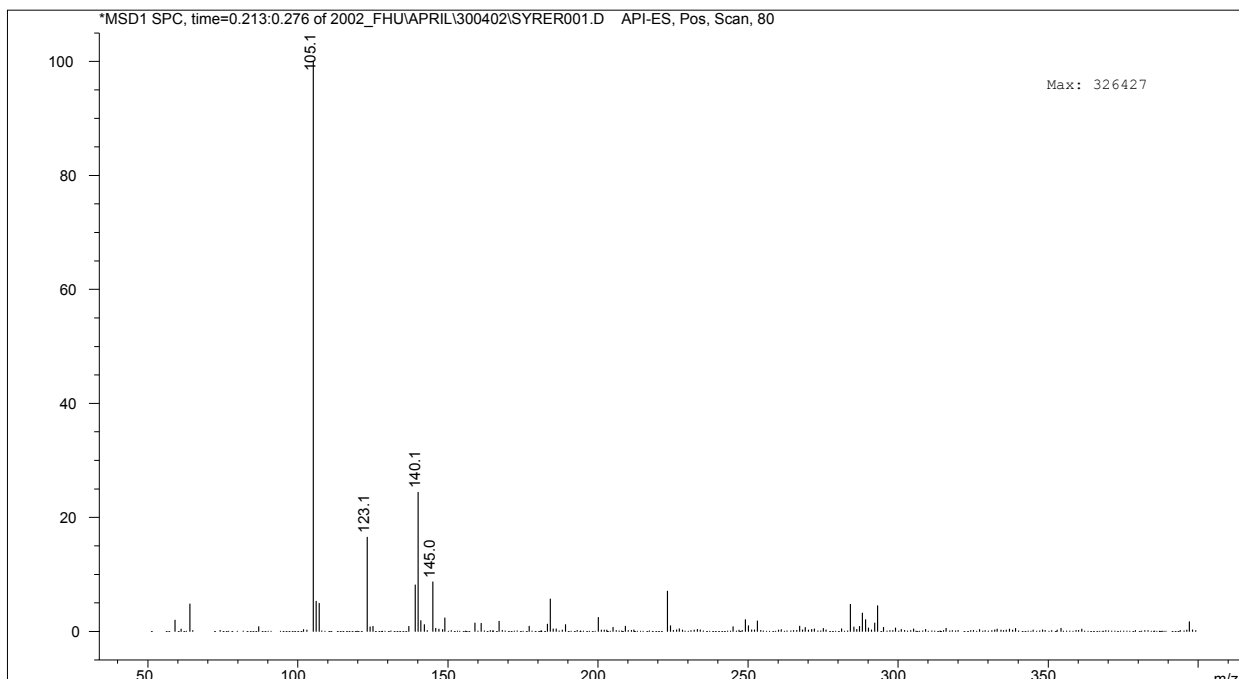
4.1 Spekteranalyse

100 µg/ml standard av TDG i 95/5 vann/acetone nitril med 0,05%TFA ble analysert i scan modus, for bestemmelse av de to mest karakteristiske og intense massene i spektret (figur 4.1). Massene $[M-H_2O+H]^+$ (m/z 105) og $[M+H]^+$ (m/z 123) ble brukt videre i SIM (Selected Ion Monitoring) modus ved optimalisering av MS parametere.

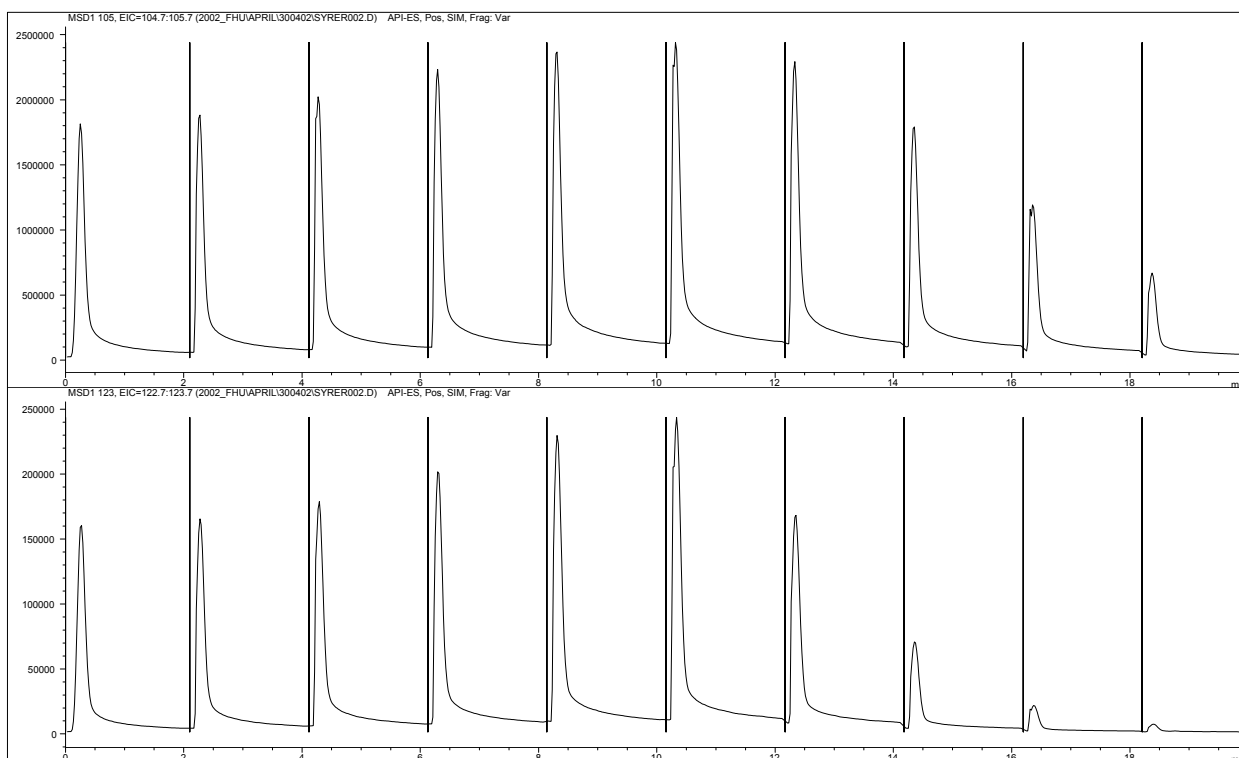
4.2 Fragmentor- og kapillærspenning

For thiodiglykol ble massene $[M-H_2O+H]^+$ og $[M+H]^+$ brukt ved optimalisering av fragmentor- og kapillærspenning. Det ble lagd standard for TDG på 100 µg/ml i 95/5 vann /acetone nitril med 0,05% TFA. Standarden ble kjørt i en FIA serie¹ i API-ES SIM i positiv ion modus. Under disse kjøringene ble de verdiene for fragmentor- og kapillærspenning som ga størst topphøyde bestemt. Optimal fragmentorspenning ble testet i området 40 V til 130 V, hvor kapillærspenningen ble satt til 2000 V. Et eksempel er vist i figur 4.2. Ut i fra figuren er optimal fragmentorspenning for begge massene 90 V.

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

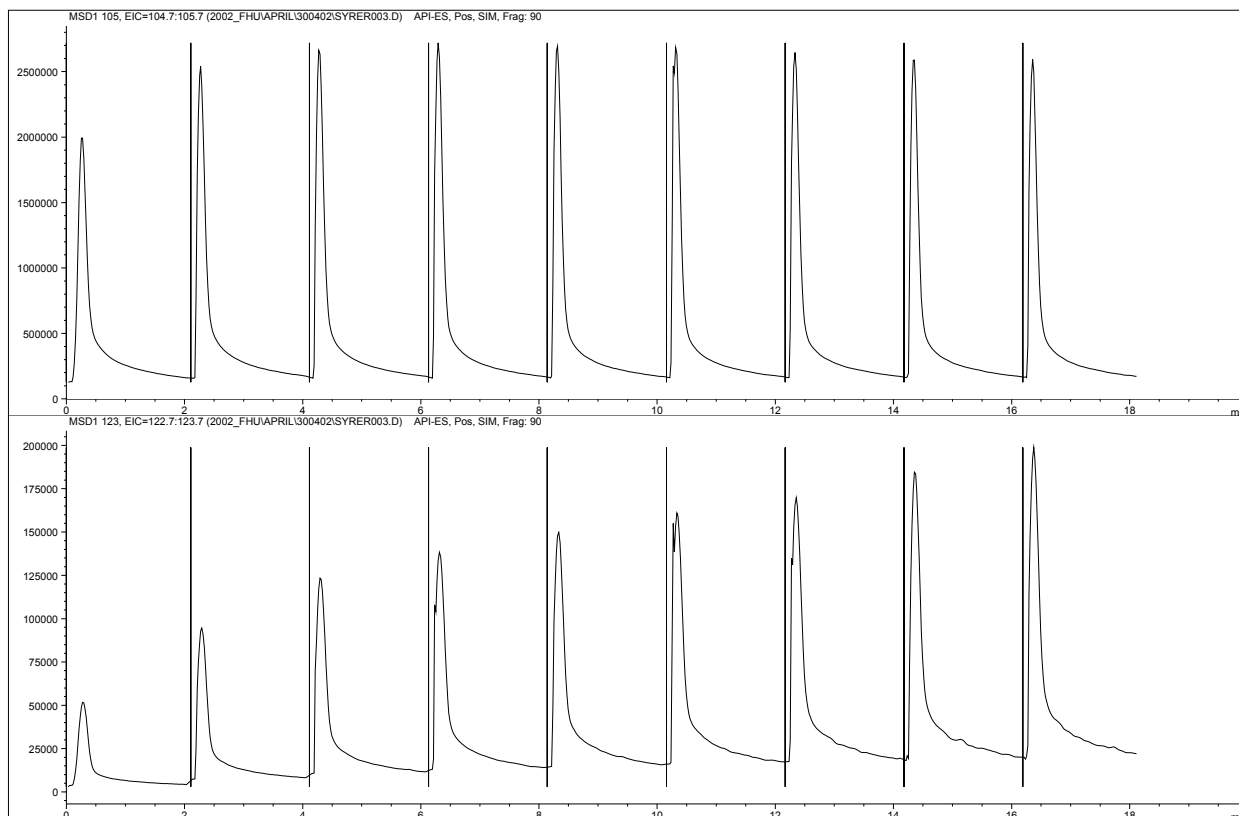


Figur 4.1 Massespekteret til TDG i positiv ion modus ved elektropray ionisasjon. Scan område 50-400 u, fragmentorspenning 80 V, kapillærspenning 2000 V, tørkegasstemperatur 350 °C, tørkegasshastighet 10 L/min og nebulizertrykk 25 psi. Væskrokromatografen ble kjørt isokratisk i 5 min med 95% 95/5 vann/acetonitril med 0,05% TFA og 5% 95/5 acetonitril/vann med 0,05% TFA. Væskeshastigheten var 0,25 ml/min. 10 µl standardløsning ble injisert



Figur 4.2 Signalene til $[M-H_2O+H]^+$ (m/z 105, øverst) og $[M+H]^+$ (m/z 123, nederst) for TDG ved fragmentorspenning 40-130 V med inkrement 10 V og kapillærspenning på 2000 V ved FIA

Deretter ble optimal kapillærspenning testet i området 1000 V til 5000 V med de optimale fragmentorrspenningene som nevnt ovenfor. Parametrene som ble holdt konstant under forsøkene er gitt i fotnote². Ut i fra figur 4.3 er optimal kapillærspenning 2500 V for masse 105, og 5000 V for masse 123. I de videre forsøkene vil en kapillærspenning på 4500 V bli brukt på begge massene, siden softwaren "Chemstation" kun kan operere med én kapillærspenning.

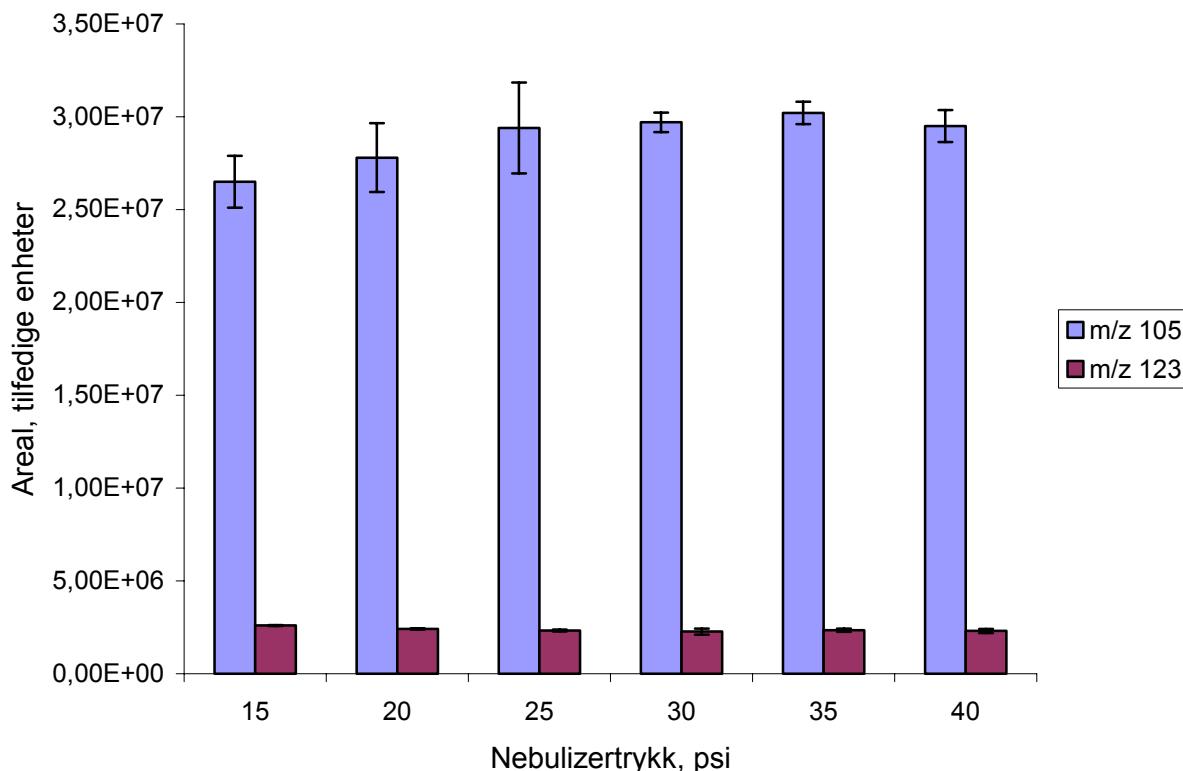


Figur 4.3 Signalene til $[M-H_2O+H]^+$ (m/z 105, øverst) og $[M+H]^+$ (m/z 123, nederst) for TDG ved kapillærspenning 1000-5000 V med inkrement 500 V og fragmentorrspenning på 90 V ved FIA

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 $\mu\text{l}/\text{min}$ 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, der parametrene som ble brukt og bestemt i forrige delkapittel ble benyttet. Det ble ikke observert store endringer i følsomheten ved endring av nebulizertrykket (figur 4.4). Ved videre analyse vil et nebulizertrykk på 25 psi bli brukt.

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

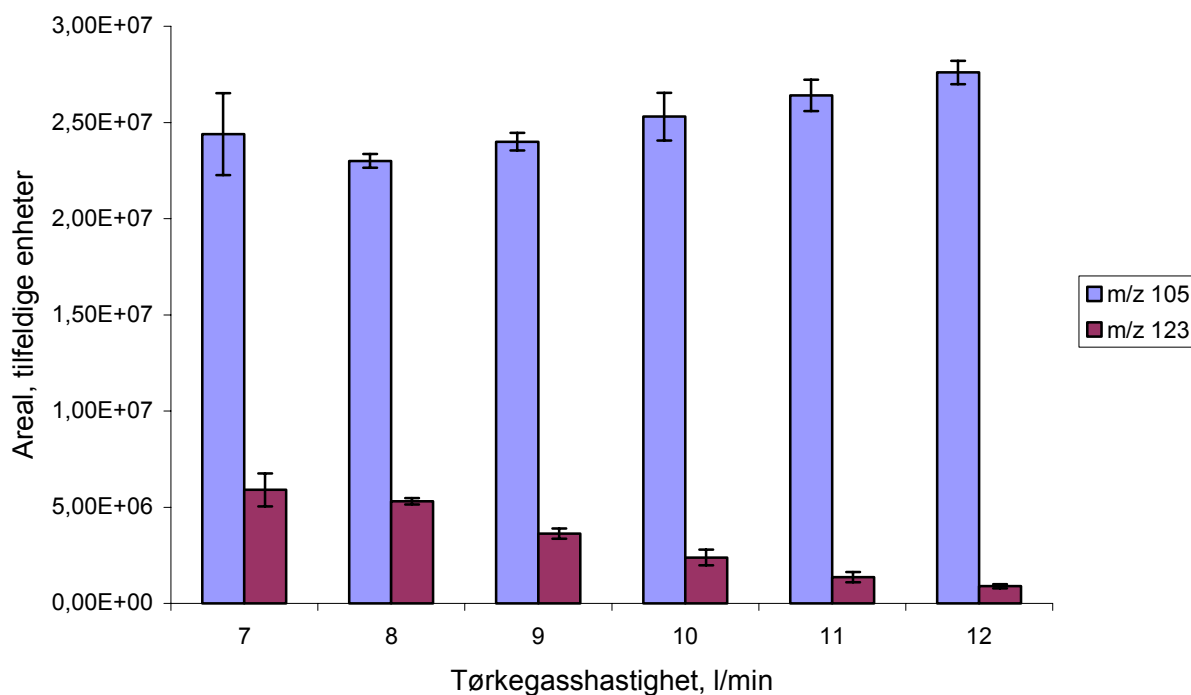


Figur 4.4 Areal for massene m/z 105 og 123 ved forskjellige nebulizertrykk (psi). Arealet er gitt som middelværdi av tre parallelle forsøk med ett standardavvik

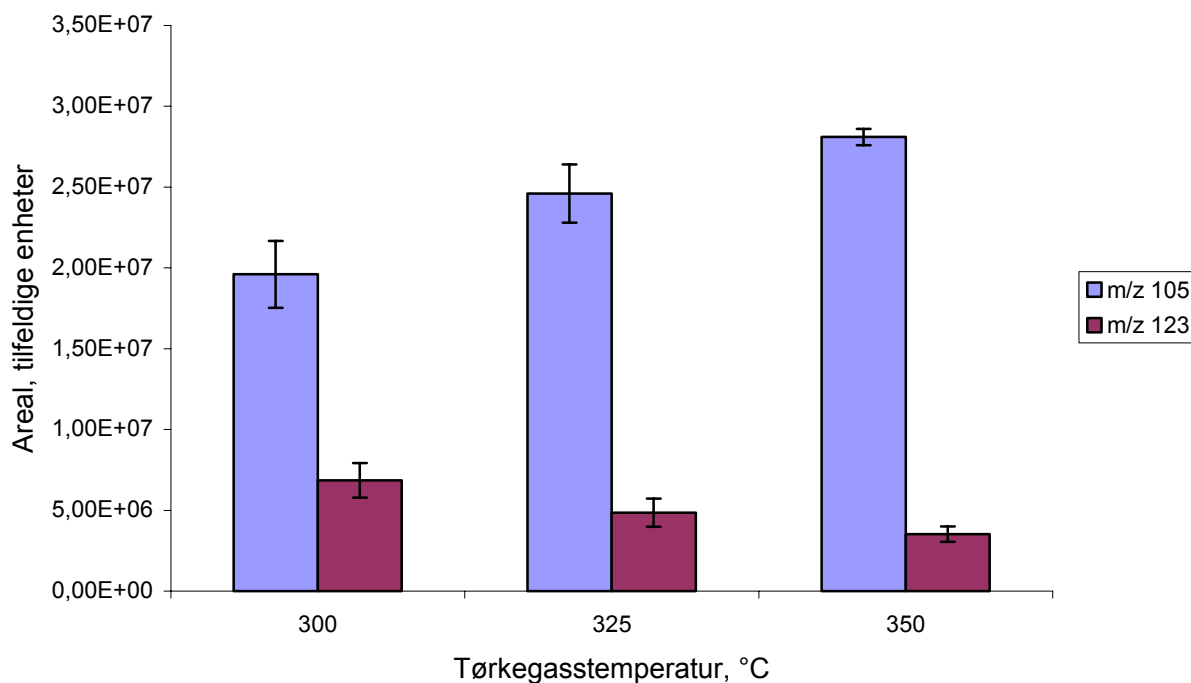
4.4 Hastighet og temperatur på tørkegassen nitrogen

I instrumentspesifikasjonene påpekes en hastighet på 10 L/min på tørkegassen (N_2) som nødvendig, når kjøringen utføres i API-ES modus og væskehastigheten er mellom 100-300 $\mu\text{l}/\text{min}$. Forsøk ble gjort med 8-9-10-11-12 L/min med nitrogen som tørkegass, der parametere som ble brukt og bestemt i forrige delkapittel ble benyttet. Økende hastighet på tørkegassen hadde relativ liten innvirkning på detektorresponsen for masse 105 (figur 4.5). Arealet for masse 123 er 7 ganger større ved 7 L/min enn ved 12 L/min. Dette indikerer at tørkegasshastigheten påvirker signalet til dette fragmentet. Vi har derfor valgt å bruke en tørkegasshastighet på 8 L/min.

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. Arealet til masse 105 øker med økende temperatur, mens det motsatte er tilfelle for masse 123 (figur 4.6). Vi har derfor valgt å bruke en tørkegassstemperatur på 325 °C.



Figur 4.5 Areal for massene m/z 105 og 123 ved forskjellige hastigheter (L/min) på tørkegassen nitrogen. Arealen er gitt som middelværdi av tre parallelle forsøk med ett standardavvik

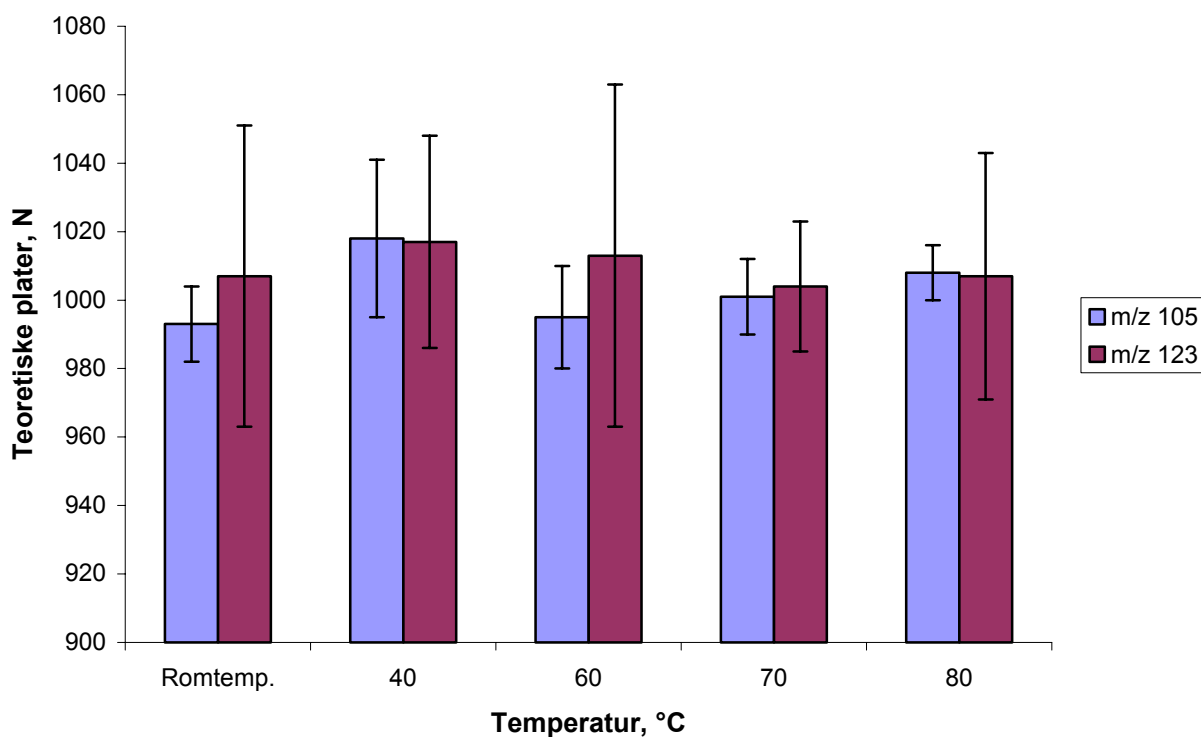


Figur 4.6 Areal for massene m/z 105 og 123 ved forskjellige temperaturer (°C) på tørkegassen nitrogen. Arealen er gitt som middelværdi av tre parallelle forsøk med ett standardavvik

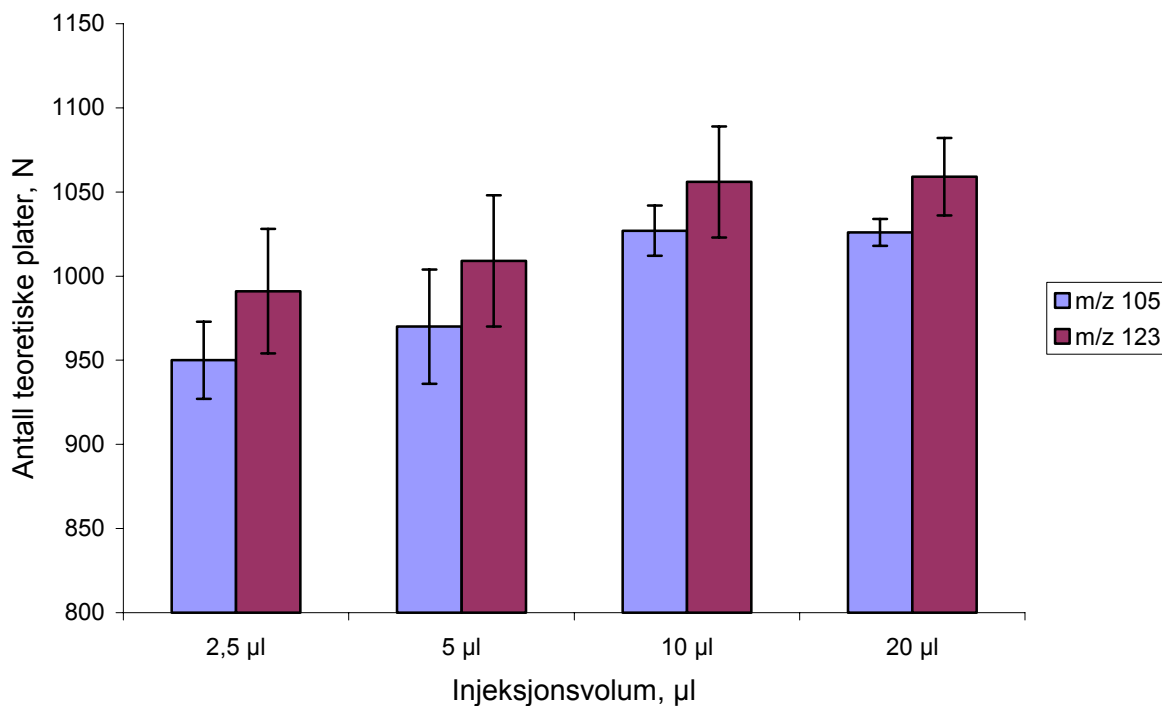
Etter optimalisering av alle parametrene på massespektrometeret, ble standarden analysert igjen for å se om optimal fragmentorspenning fortsatt var 90 V. For masse 105 var den optimale fragmentorspenningen nå 110 V og 80 V for masse 123. Deretter ble disse fragmentorspenningene brukt for å bestemme den optimale kapillærspenningen. Den var fortsatt 4500 V.

4.5 HPLC parametere

En Zorbax SB-C₁₈ kolonne ble benyttet. Mobilfase A var 95/5 vann/acetoneitril med 0,05% trifluoreddiksyre, mens mobilfase B var 95/5 acetoneitril/vann med 0,05% trifluoreddiksyre. Sammensetningen av mobilfasen var den samme som blir benyttet ved separasjon av alkylfosfonsyrer (17). Dette var ønskelig for å hindre unødvendig tidsbruk ved endring og stabilisering av mobilfasen på instrumentet. Elueringsgradienten var 5% B (0-5 min), 5% til 95% B (5-10 min) og 95% B (10-15 min) med en væskehastighet på 0,25 ml/min. Temperaturen på kolonnen ble optimalisert til 40 °C (figur 4.7), mens injeksjonsvolumet ble optimalisert til 20 µl (figur 4.8). De optimale parametrene fra kapittel 4.3-4.4 ble benyttet for massespektrometeret ved analysen.



Figur 4.7 *Antall teoretiske plater (N) for TDG (m/z 105, 123) ved forskjellige temperaturer på separasjonskolonnen. N er gitt som middelverdi av fire parallelle forsøk med ett standardavvik*



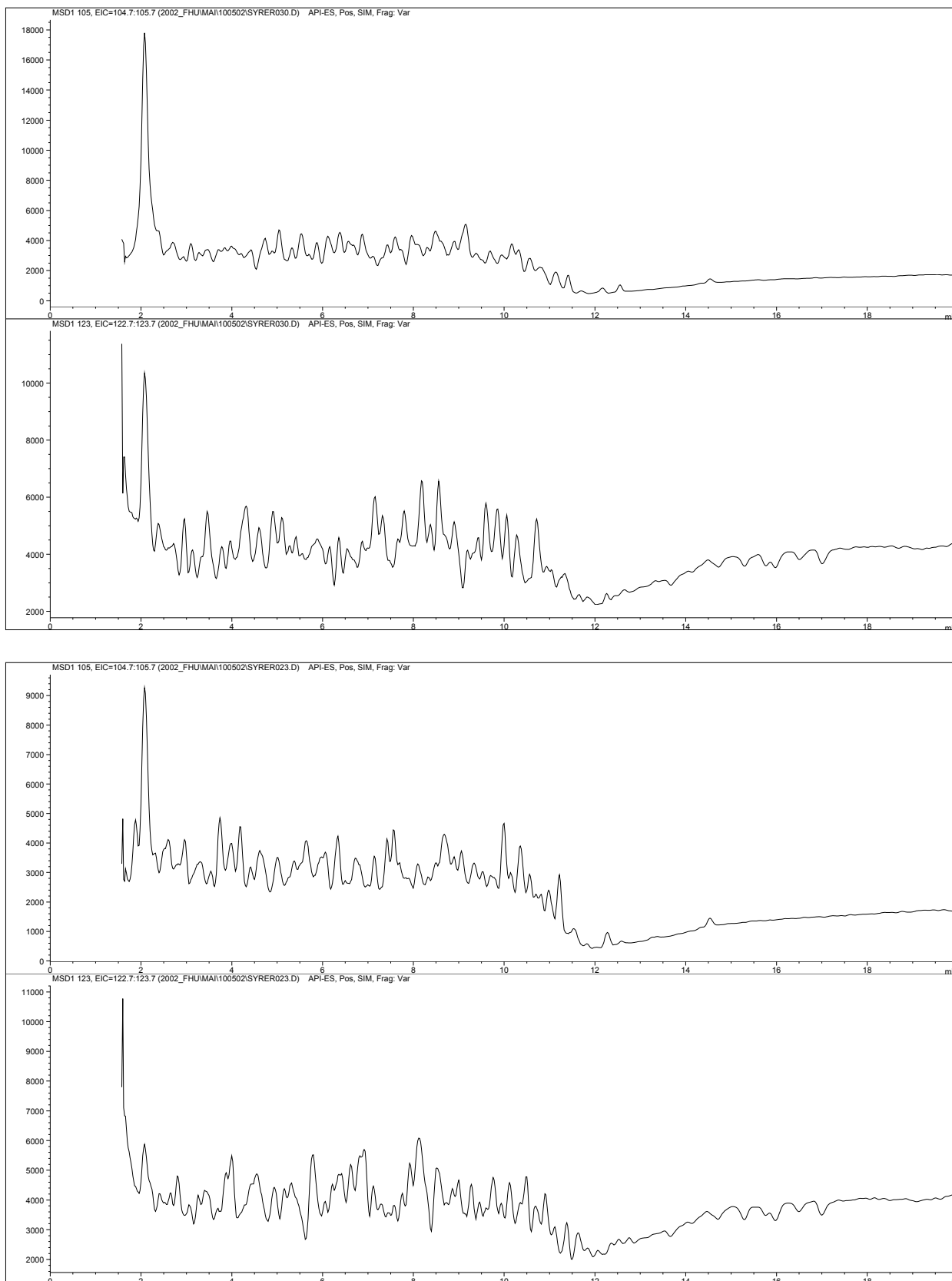
Figur 4.8 Antall teoretiske plater (N) for TDG (m/z 105, 123) ved forskjellige injiserte volumer på separasjonskolonnen. N er gitt som middelværdi av fire parallelle forsøk med ett standardavvik

5 BESTEMMELSE AV TDG I MARINE MATRISER

5.1 Direkte injeksjon av vannprøve

5.1.1 Ferskvann

En standardrekke med konsentrasjoner på 0,05-0,1-0,25-0,5-1 µg/ml TDG i ferskvann ble injisert direkte for å bestemme deteksjonsgrensen. Positiv ion modus elektropray i SIM ble benyttet der peak width i metoden ble satt til 0,2 min. For øvrig ble de optimaliserte parametrene som ble bestemt i kapitlene 4.3-4.5 brukt. Deteksjonsgrensen ble bestemt til å være 0,25 µg/ml (5 ng TDG injisert) (figur 5.1). Denne er basert på et signal/støyforhold (S/N) på ca tre for massene $[M-H_2O+H]^+$ og $[M+H]^+$. En lavere deteksjonsgrense på 0,1 µg/ml (2 ng injisert) kan fås ved å kun detektere for fragmentet $[M-H_2O+H]^+$ (figur 5.1).

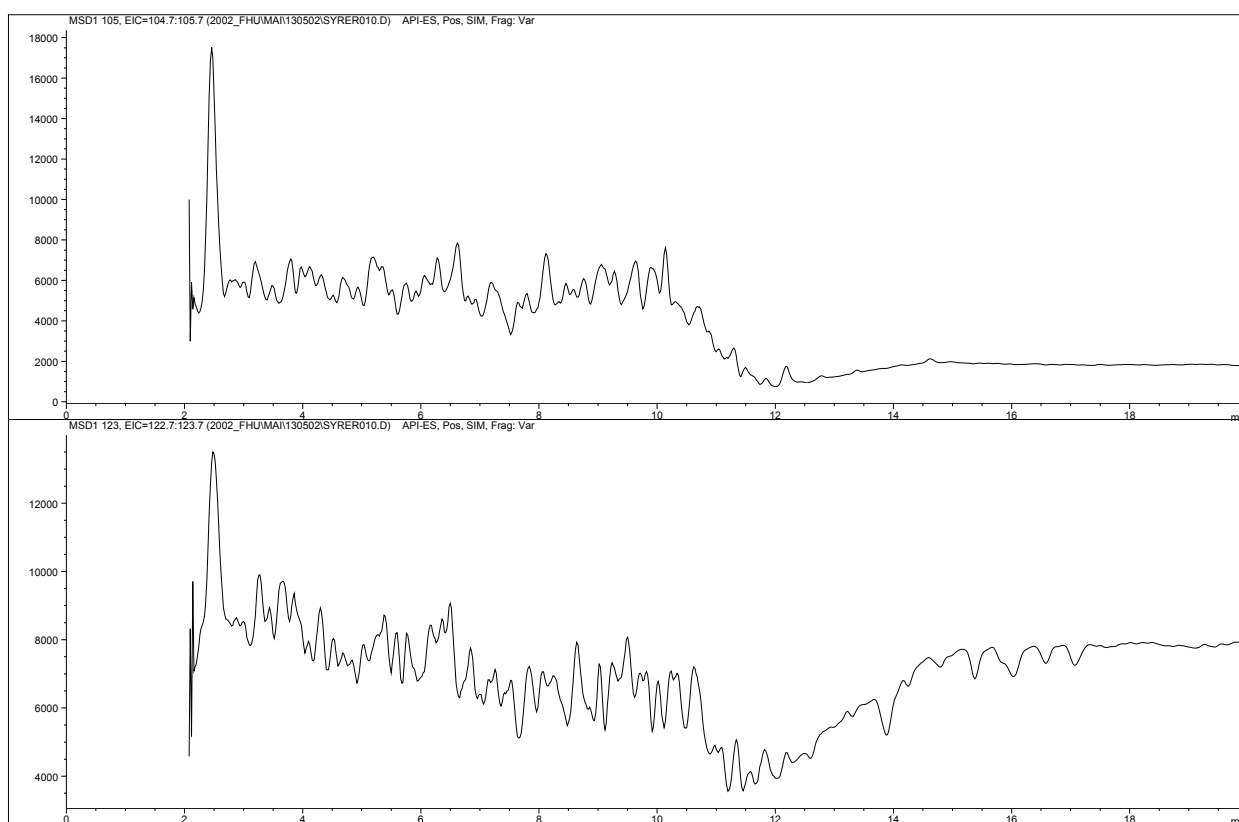


Figur 5.1 Ekstrahert ion kromatogram (EIC) fra injeksjon av 5 ng (øverst) (m/z 105 og 123) og 2 ng thiodiglykol (nederst) i ferskvann ved positiv ion modus SIM API-ES-MS. Opptaket av signalet startet etter 1,5 min fra injeksjon

5.1.2 Saltvann

En standard med 0,25 µg/ml TDG i saltvann (5 ng TDG injisert) ble analysert på tilsvarende måte som ferskvannsprøvene. Mobilfasen ble ledet inn i massespektrometeret først etter en ventetid på 1,5 min fra injeksjon. Ved å sette denne ventetiden til 2-3 min ville saltet sammen med mobilfasen bli ledet ut av instrumentet like før inngangen til massespektrometeret. På denne måten hindres saltavleiringer i selve massespektrometeret og dannelse av andre addukter (19). Siden TDG hadde en retensjonstid (t_R) på 2,1 min ble ventetiden derfor satt noe lavere enn anbefalt. Ved analyse av standarden forsvant derfor signalet i støyen. 0,5 µg/ml TDG i saltvann ga heller ikke utslag. Filtrering av 0,5 µg/ml standard gjennom et 0,45 µm filter før analyse, for å fjerne eventuelt partikulært bundet salt, hadde heller ikke innvirkning på responsen.

Disse forsøkene ble utført med mobilfasen og gradienten nevnt i kapittel 4.5. Med denne sammensetningen hadde TDG en retensjonstid på 2,1 min hvor en ventetid på 1,5 min ikke var tilstrekkelig. Saltet rakk ikke å komme ut av systemet. Ved å endre gradienten til å starte med 0,1% B eller 1% B framfor 5% B fikk TDG en noe lengre retensjonstid på 2,5 min, og ventetiden kunne økes til 2,0 min. Ved å benytte en startgradient på 0,1% B, ble deteksjonsgrensen bestemt til 0,5 µg/ml (10 ng TDG injisert) når standarden var filtrert gjennom et 0,45 µm filter (figur 5.2). Dette indikerte at en økt ventetid påvirket responsen til TDG. Det var derfor videre ønskelig å øke ventetiden ytterligere opp mot 3 min. Dette kan være nødvendig med tanke på prøver med relativt mye saltinnhold. Med hensyn på forskyvninger i



Figur 5.2 Ekstrahert ion kromatogram (EIC) fra injeksjon av 0,5 µg/ml thiodiglykol i saltvann (m/z 105 og 123) ved positiv ion modus SIM API-ES-MS. Standarden ble filtrert gjennom et 0,45 µm filter før analyse. Ventetiden var 2,0 min fra injeksjon

retensjonstid var det også fordelaktig å få en lengre retensjonstid for TDG, slik at differensen mellom retensjonstiden og ventetiden ble større enn 0,5 min. Av den grunn valgte vi å se nærmere på sammensetningen til mobilfasen.

Andelen med vann i mobilfase A ble økt fra 95 til 99, mens andelen acetonitril i mobilfase B ble økt til 99. Gradienten ble startet med 0,1% B istedenfor 5%. Ved disse betingelsene hadde TDG en retensjonstid på 3,6 min og en båndbredde ved halve topphøyden på 0,3 min. For å få en smalere båndbredde ble prosentvis mengde mobilfase B i starten av gradienten økt til 2%, 5% eller 10%. Med disse mengdene av mobilfase B ble imidlertid retensjonstiden til TDG for kort til å kunne sette ventetiden til 3 min.

Dette førte til at vi valgte å utvikle en opparbeidelsesmetode for saltvannsprøver, hvor mesteparten av saltet fjernes før prøven analyseres på instrumentet.

5.2 Opparbeidelse av saltvannsprøver

Metodeutviklingen ble basert på anvendelse av fast fase ekstraksjon (SPE). Mobilfasen nevnt under kapittel 4.5 ble benyttet. Elueringsgradienten nevnt i det samme kapitlet ble endret til å starte med 1% B i stedet for 5% B³. Mobilfasen ble ledet inn i massespektrometeret først etter en ventetid på 1,5 min fra injeksjon, og retensjonstiden for TDG var 2,5 min.

5.2.1 Uttesting av ENV-kolonne

500,0 ml saltvann ble tilsatt 0,5 mg thiodiglykol. Prøven ble ekstrahert gjennom en ENV-kolonne som på forhånd var solvatisert med 1,00 ml metanol og 1,00 ml vann. TDG ble eluert fra SPE-kolonnen med 500 µl ACN eller 500 µl 95/5 ACN/H₂O med 0,05% TFA (mobilfase B). 50 µl av eluatet ble i begge tilfeller fortynnet til 1,00 ml med 95/5 H₂O/ACN med 0,05% TFA (mobilfase A). Dette ble gjort for å få sammensetningen til prøven til å bli så lik som mulig som startgradienten. Ved analyse ga begge eluatene (1 µg TDG injisert)⁴ samme intensitet for signalene for både m/z 105 og m/z 123.

Deretter ble lavere konsentrasjoner av TDG i saltvann opparbeidet. 1,000 L saltvann ble tilsatt 0,5 mg TDG. 10,0 ml og 50,0 ml av prøven ble ekstrahert gjennom en ENV-kolonne. TDG ble eluert fra SPE-kolonnen med 300 µl eller 500 µl mobilfase B. Isteden for å fortynne eluatene ble de heller vakuumsentrifugert (uten lampe) til tørrhet og løst i 500 µl mobilfase A. Vakuumsentrifugering av 300 µl og 500 µl eluat til tørrhet tok omtrent like lang tid. Ved videre forsøk ble 500 µl eluent benyttet for å være sikker på at mesteparten av analytten elueres ut fra SPE-kolonnen. Ved analyse ga 10,0 ml (0,2 µg TDG injisert)⁴ og 50,0 ml saltvannsprøve utslag for masse 105 og 123. Det ble derimot observert at ved gjentakende analyse av samme prøve, ble signalet for masse 123 relativt svakere for hver analyse. Dette kan skyldes dannelse av addukter med saltet på grunn av relativt høy saltkonsentrasjon. I de repeterte analysene ble

³ Gradienten kunne like godt ha startet med 0,1% B, siden både 0,1% B og 1% B ga samme retensjonstid og båndbredde ved halve topphøyden for thiodiglykol

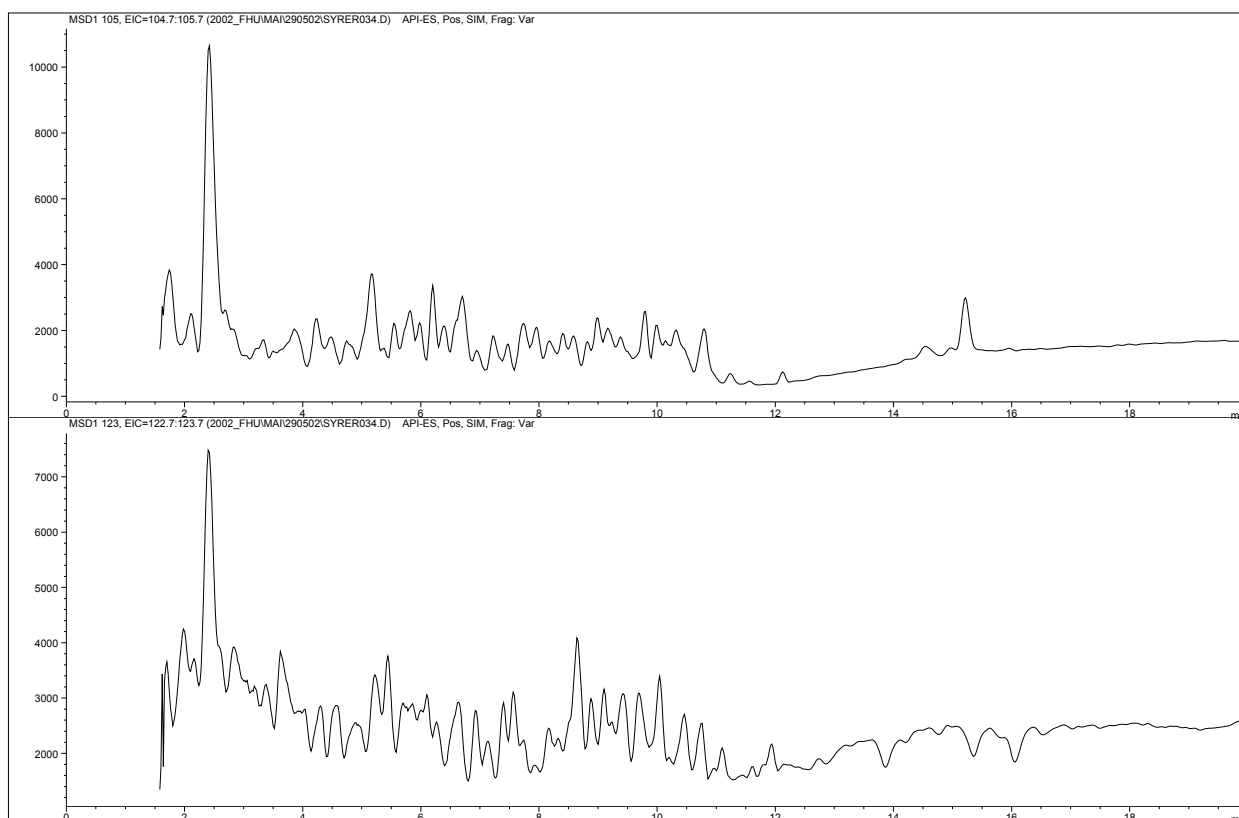
⁴ Dette tallet er basert på 100% effektiv ekstraksjon

nemlig de tørkede eluatene løst i 0,50 ml (i stedet for med 1,00 ml) mobilfase A.

For å undersøke om økt saltkonsentrasjon var grunnen til at signalet til TDG ble svakere for hver repetert analyse, ble det derfor utført forsøk hvor det tørkede eluatet ble løst i henholdsvis 0,50 ml og 1,00 ml mobilfase A. Ved repeterte analyser var signalet for $[M-H_2O+H]^+$ og $[M+H]^+$ relativt stabile for prøver løst i 1,00 ml mobilfase A (0,1 μg TDG injisert)⁴. For eluat løst i 0,50 ml mobilfase A (0,2 μg TDG injisert)⁴ var signalet for masse 105 relativt stabilt, mens signalet for m/z 123 ble svakere for hver injeksjon. Filtrering av prøven gjennom et 0,45 μm filter for å fjerne partikulært bundet salt, hadde ingen påvirkning på intensiteten til signalet.

For å få lav nok saltkonsentrasjon ved analyse, ble derfor det tørkede eluatet i senere forsøk løst opp i 1,00 ml mobilfase A framfor i 0,50 ml.

Etterpå ble det utført forsøk med enda lavere konsentrasjoner av TDG i saltvann (0,005-0,025-0,05-0,25-0,50 $\mu\text{g}/\text{ml}$). 10,0 ml av samtlige konsentrasjoner ble ekstrahert gjennom en solvatisert ENV-kolonne. TDG ble ekstrahert fra kolonnen med 1,00 ml mobilfase B. Dette svarte til henholdsvis 1 ng, 5 ng, 10 ng, 50 ng og 100 ng injisert TDG⁴. Kun 50 ng og 100 ng injisert ga utslag på detektoren (figur 5.3).



Figur 5.3 Ekstrahert ion kromatogram (EIC) fra injeksjon av 0,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ thiodiglykol i 10,0 ml saltvann (50 ng TDG injisert)⁴ (m/z 105 og 123) ved positiv ion modus SIM API-ES-MS. "Acquisition start time" er 1,5 min

Det ble også utført forsøk hvor større volumer enn 10,0 ml ble satt til ENV-kolonne. 200,0 ml av 0,005 µg/ml, 100,0 ml av 0,025 µg/ml og 280,0 ml av 0,025 µg/ml ble påsatt kolonnen. Dette svarte til henholdsvis 20 ng, 50 ng og 140 ng TDG injisert⁴. Ved analyse ga ingen av disse injiserte mengdene signal for de utvalgte massene for TDG. Dette kan muligens skyldes at ved påsetting av økende volum "overmettes" 100 mg ENV-kolonnen med andre forbindelser enn selve analytten.

Det er derfor hensiktsmessig å bruke 10,0 ml saltvannsprøve hvor vi får en deteksjonsgrense på 50 ng injisert TDG (figur 5.3)⁴.

5.2.2 Uttesting av ENV+-kolonne

En utgangsløsning på 0,5 µg/ml TDG i saltvann ble fortynnet til 0,025 µg/ml og 0,05 µg/ml. En 200 mg ENV+-kolonne ble påsatt henholdsvis 100,0 ml og 50,0 ml prøve. Dette tilsvarte 50 ng TDG injisert⁴. Kolonnen var på forhånd solvatisert med 2,0 ml metanol og 2,0 ml vann. 1,00 ml mobilfase B ble brukt som eluent. Eluatet ble vakuumsentrifugert til tørrhet og løst i 1,00 ml mobilfase A. Ingen av prøvene ga signal for thiodiglykol. Årsaken til dette kan enten være at kapasiteten til kolonnen overskrides eller at ENV+-kolonnen ikke har tilstrekkelig affinitet for thiodiglykol. Vi har ikke undersøkt dette nærmere.

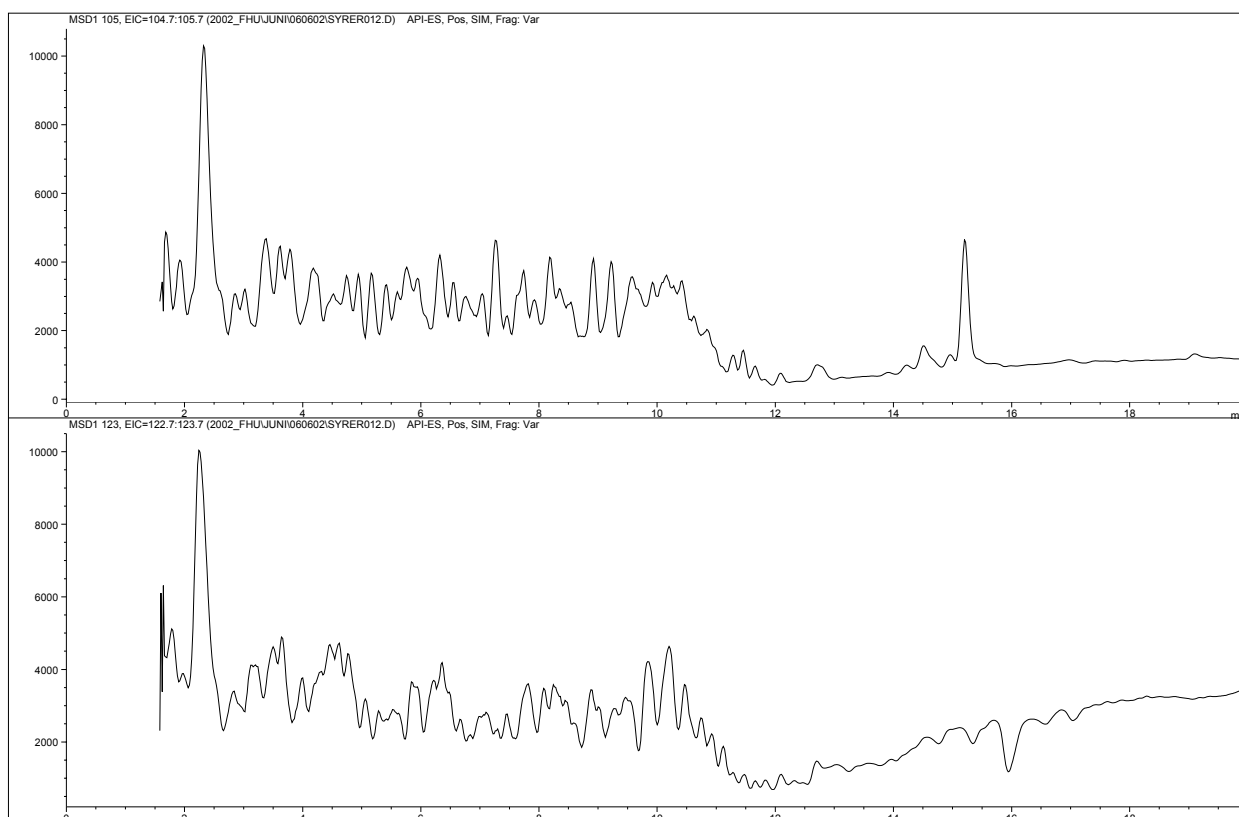
5.2.3 Uttesting av SAX-kolonne

I ROP blir SAX-kolonnen benyttet ved opparbeidelse av væskeprøver (5). Vi har derfor valgt å teste ut denne kolonnen med hensyn på saltvann. 500 mg SAX-kolonne ble solvatisert med 5,0 ml metanol og 5,0 ml vann. 10,0 ml av 0,25 µg/ml, 50,0 ml av 0,05 µg/ml og 70,0 ml av 0,025 µg/ml TDG i saltvann ble påsatt kolonnen. Dette tilsvarte 35-50 ng TDG injisert⁴. 5,0 ml av mobilfase B ble brukt som eluat. Eluatet ble vakuumsentrifugert til tørrhet og løst i 1,00 ml mobilfase A. Ingen av prøvene ga utslag for thiodiglykol.

5.3 Opparbeidelse av marine sedimentprøver

Opparbeidelsesprosedyren er hovedsakelig basert på ROP (5), men det er gjort enkelte modifikasjoner i metoden for å fjerne saltet. 0,5 mg og 1,0 mg TDG ble satt til 10,0 g vått marint sediment. Prøvene ble oppbevart en halv time uten lokk og deretter ristet (med lokk) i en halv time på ristebord på full hastighet. 10,0 ml ultrarent vann ble tilsatt, og prøvene ble ekstrahert på ultralydbad i 10 min. Etter ekstraksjonen ble prøvene sentrifugert i 5 min ved 2000 G og 12 °C, ekstraktet dekantert og ekstraksjonsprosessen ble gjentatt. Deretter ble det samlede ekstraktet filtrert gjennom et 0,45 µm filter for å fjerne partikulært materiale. Det filtrerte ekstraktet ble satt til en 100 mg ENV-kolonne som på forhånd var solvatisert med 1,00 ml metanol og 1,00 ml vann. TDG ble eluert med 1,00 ml mobilfase B, og eluatet ble vakuumsentrifugert til tørrhet. Prøvene ble løst i 0,50 ml fremfor i 1,00 ml mobilfase A (jfr kap 5.2.1), siden eluatet fra sediment inneholder mindre salt enn sjøvann. Ved analyse ga begge prøver (20 og 40 µg TDG injisert)⁴ utslag for både masse 105 og 123.

Forsøket overfor ble gjentatt, men med lavere konsentrasjoner av thiodiglykol. 100 µl av



Figur 5.4 Ekstrahert ion kromatogram (EIC) for 10 g sediment påsatt 5 μg thiodiglykol (200 ng TDG injisert) (m/z 105 og 123) ved positiv ion modus SIM API-ES-MS. Ventetiden var 1,5 min fra injeksjon

50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ og 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ TDG ble satt til 10,0 g vått marint sediment. Dette svarer til henholdsvis 0,2 μg , 0,4 μg og 2 μg injisert TDG⁴. Sediment påsatt 5 μg (0,2 μg injisert) thiodiglykol ga et utslag som var like i overkant av et signal/støyforhold på ca 3 (figur 5.4). Dette må derfor sies å være deteksjonsgrensen for TDG per 10,0 g sjøsediment.

5.4 Oppsummering

For bestemmelse av thiodiglykol i marine matriser ved bruk av HPLC-MS var det ønskelig å kunne foreta en analyse uten en omfattende og tidskrevende opparbeidelse. Det var derfor direkte injeksjon av saltvann på instrumentet ble utført. Ved en ventetid fra injeksjon på 1,5 min og en konsentrasjon på 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (10 ng injisert), ble TDG ikke detektert. Da mobilfasesammensetningen ble endret slik at ventetiden kunne økes til 2,0 min, ga massene 105 og 123 utslag ved en retensjonstid på 2,5 min. Dette indikerte nødvendigheten av å ha en lang nok ventetid, slik at saltet rekker å komme ut av systemet. Med tilstedeværelse av salt i systemet danner saltet addukter med analytten, slik at signalet for de utvalgte massene vil mangle (19). For å få satt en lengre ventetid med hensyn på prøver med relativt høyt saltinnhold, ble sammensetningen til mobilfasen og gradienten endret. Dette førte til enten for bred kromatografisk topp eller for kort retensjonstid for TDG.

Det ble derfor valgt å utvikle en opparbeidelsesmetode for saltvannsprøver, hvor mesteparten av

saltet fjernes før analyse på instrumentet. Opparbeidelsen ble basert på fast fase ekstraksjon (SPE). Tre forskjellige SPE-kolonner ble testet ut: ENV, ENV+ og SAX, hvorav kun ENV ga utslag for TDG ved analyse av eluat.

Ved SPE ekstraksjon av 10,0 ml sjøvann ble det benyttet en 100 mg ENV-kolonne med 500 μ l 95/5 ACN/H₂O med 0,05% TFA som eluat. Eluatet ble dampet inn til tørrhet på vakuumsentrifuge og løst i 1,00 ml 95/5 H₂O/ACN med 0,05% TFA (mobilfase A). Ved bruk av mindre volum løsning forsvant signalene over tid.

Deteksjonsgrensen for thiodiglykol i saltvann ved denne metoden ble funnet å være 0,25 μ g/ml (50 ng TDG injisert)⁴. Ved påsetting av større volum prøve ble ikke TDG detektert. Dette kan skyldes at 100 mg kolonne "overmettes" med andre forbindelser enn selve analytten.

Opparbeidelsen for saltvannsprøver ble mer omfattende enn vi hadde antatt. Dette skyldtes hovedsakelig mengden salt i prøven som måtte fjernes før analyse på instrumentet. I en tidligere analysemetode ble deteksjonsgrensen i saltvann bestemt til 10 μ g/L, hvor TDG ble omgjort til sennepsgass og analysert på GC-MS etter fast fase ekstraksjon på C₁₈-kolonne(1). Det har også blitt rapportert en deteksjonsgrense på 5 μ g/L for ferskvann hvor TDG ble silylert med *N*-metyl-*N*-(*tert*-butyldimetylsilyl)trifluoracetamid (MTBSTFA) og analysert på GC-FID (7). Disse verdiene er betydelig lavere enn hva vi har oppnådd i denne rapporten.

Deteksjonsgrensen for TDG i ferskvann ved HPLC-MS er mer sammenlignbar med andres resultater. Ved direkte injisering av 5 ng TDG i ferskvann (0,25 μ g/ml) ga [M-H₂O+H]⁺ og [M+H]⁺ et signal/støyforhold større enn 3. Defence Research Establishment Suffield (DRES) rapporterer om en deteksjonsgrense på 2 μ g/ml (10 ng injisert) ved HPLC-ESI-MS i scan modus (20). Defence Science and Technology Laboratory (Dstl) har en deteksjonsgrense på 0,01 μ g/ml (0,2 ng injisert) ved analyse i SIM APCI-MS (Atmospheric Pressure Chemical Ionisation) på [M-H₂O+H]⁺ og [M+H]⁺ (21).

Marine sedimentprøver ble opparbeidet ved bruk av ultralydbad og fast fase ekstraksjon. Samme SPE-kolonne og eluat ble benyttet som ved opparbeidelse av vannprøver. Det tørkede eluatet ble løst i 0,50 ml 95/5 H₂O/ACN med 0,05% TFA. Deteksjonsgrensen for thiodiglykol i sediment ble bestemt til å være 200 ng injisert (20 ng/g våtvekt)⁵. Det er tidligere ikke blitt rapportert om bestemmelse av deteksjonsgrense for thiodiglykol i verken jord, sand eller marine sediment ved bruk av HPLC-MS.

⁵ Tørrstoffinnholdet er beregnet til 967,2 g/kg sedimentprøve. Sedimentet ble tørket ved 105 °C i minimum 20 timer

6 KONKLUSJON

Thiodiglykol ble analysert med HPLC-API-ES tilkoblet et massespektrometer i SIM positiv ion modus. Fragmentorspenningen for $[M-H_2O+H]^+$ (m/z 105) og $[M+H]^+$ (m/z 123) ble optimalisert til henholdsvis 110 V og 80 V. Den optimale kapillærspenningen ble bestemt til 4500 V, nebulizertrykket til 25 psi, tørkegasstemperaturen til 325 °C og tørkegasshastigheten til 8 L/min. En Zorbax SB-C₁₈ kolonne ble benyttet. Mobilfase A var 95/5 vann/acetonitril med 0,05% trifluoreddiksyre, mens mobilfase B var 95/5 acetonitril/vann med 0,05% trifluoreddiksyre. For prøver som inneholdt saltvann var elueringsgradienten 1% B (0-5 min), 1% til 95% B (5-10 min) og 95% B (10-15 min) med en væskehastighet på 0,25 µl/min. Det optimale injeksjonsvolumet ble bestemt til 20 µl, og temperaturen på kolonnen til 40 °C. Ventetiden før mobilfasen ble ledet inn i massespektrometeret var 1,5 min fra injeksjon.

Saltvannsprøver og marine sedimentprøver ble hovedsakelig opparbeidet ved bruk av ENV-kolonne (fast fase ekstraksjon, SPE). Ved injisering av 50 ng av TDG i saltvann (0,25 µg/ml) ga både $[M-H_2O+H]^+$ og $[M+H]^+$ et signal/støyforhold større enn 3. For marine sediment var deteksjonsgrensen 20 ng/g våtvekt⁵ (200 ng injisert).

Litteratur

- (1) Tørnes J Aa, Blanch J H, Wedervang T I, Andersen A G, Opstad A M (1989): Undersøkelse av skipsvrak inneholdende kjemisk ammunisjon senket i norske farvann etter annen verdenskrig, FFI/RAPPORT-89/6007, Forsvarets forskningsinstitutt.
- (2) Tørnes J Aa (1992): Investigation of ships carrying chemical ammunition sunk in Norwegian waters after world war II, FFI/RAPPORT-92/6010, Forsvarets forskningsinstitutt.
- (3) Study of the Sea Disposal of Chemical Munitions. CHEMU 2/2 (8 September 1993) submitted by United States of America.
- (4) Report on sea dumping of chemical weapons by the United Kingdom in the Skagerrak waters post World War II. CHEMU 2/2/5 (28 September 1993) submitted by United Kingdom.
- (5) The Ministry for Foreign Affairs of Finland (1994): Recommended Operating Procedures for Sampling and Analysis in the Verification of Chemical Disarmament (ROP), Helsinki.
- (6) Tørnes J Aa, Opstad A M (1995): Bestemmelse av noen kjemiske stridsmidler i sjøsediment, FFI/RAPPORT-95/05838, Forsvarets forskningsinstitutt.
- (7) Lersch M (2000): Analyse av silylderivater av tioglykol og etanolaminer i vandige prøver med gasskromatografi, FFI/NOTAT-2000/04578, Forsvarets forskningsinstitutt.
- (8) Opstad A M, Bjerkeseth L H, Tørnes J Aa (2002): Identification and quantification of sulfur mustard and related compounds after long time storage in sea water by GC-MS, FFI/RAPPORT-2002/03237, Forsvarets forskningsinstitutt. Under skriving.
- (9) Hewlett Packard (1997): The HP 1100 Series LC/MSD Brochure Brief.
- (10) MS Consult (2001): LCMS og Chemstation, kurs, København, 3-6 desember 2001.
- (11) Opstad A M, Tørnes J Aa (1994): Hydrolyseprodukter av nervegasser identifisert ved bruk av HPLC-MS med elektrospray interface, FFI/RAPPORT-94/06180, Forsvarets forskningsinstitutt.
- (12) 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.
- (13) 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.
- (14) HP 1100 Series LC/MSD Reference Collection version B.10.00.

- (15) Hoffmann E De, Charette J, Stroobant V (1996): *Mass Spectrometry Principles and Application*, John Wiley & sons, Paris, 28.
- (16) Hewlett Packard (1998): *Basics of LC/MS*.
- (17) Skogen M D, Svendsen E, Ostrowski M (1998): Quantifying volume transports during SKAGEX with the Norwegian Ecological Model system, *Continental Shelf Research* **17**, 1817-1883.
- (18) Hussain F (2002): Nedbrytningsprodukter av nervegasser analysert med væskekromatograf tilkoblet atmospheric pressure ionization elektropray massespektrometer (HPLC-API-ES-MS), del 1-positiv ion modus, FFI/RAPPORT-2002/01698, Forsvarets forskningsinstitutt.
- (19) Henrik Sillén, Agilent Technologies (2002): Personlig meddelelse.
- (20) D'Agostino P A, Provost L R, Hancock J R (1998): Analysis of mustard hydrolysis products by packed capillary chromatography-electrospray mass spectrometry, *Journal of Chromatography A* **808**, 177-184.
- (21) 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.

FORDELINGSLISTE

FFIBM
Dato: 22. august 2002

RAPPORTTYPE (KRYSS AV)			RAPPORT NR.	REFERANSE	RAPPORTENS DATO			
<input checked="" type="checkbox"/>	RAPP	<input type="checkbox"/>	NOTAT	<input type="checkbox"/>	RR	2002/03317	FFIBM/Oppdr 299401/138	22. august 2002
RAPPORTENS BESKYTTELSESGRAD				ANTALL EKS UTSTEDT	ANTALL SIDER			
UGRADERT				59	30			
RAPPORTENS TITTEL				FORFATTER(E)				
BESTEMMELSE AV THIODIGLYKOL I SALTVANN OG MARINE SEDIMENT MED VÆSKEKROMATOGRAF TILKOBLET ELEKTROSPRAY MASSESPEKTROMETER				HUSSAIN Fatima, OPSTAD Aase M				
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		Det Kgl Norske Utenriksdepartementet	14		FFI-Bibl
		Sikkerhetspolitisk avdeling	1		Adm direktør/stabssjef
		Seksjon for nedrustning og atomsikkerhet	1		FFIE
1		v/Jan Arve Knudsen	1		FFISYS
1		v/Håvard Austad	1		FFIBM
			1		FFIN
1		FLO/Land	2		Forfattereksemplar(er)
1		v/Lt Stian Kjensberg	14		Restopplag til FFI-Bibl
1		v/ Lt Nils Holm Toverud			Elektronisk fordeling:
1		FLO/Sjø			FFI-veven
1		v/KL Geir Sæthre			Leif Haldor Bjerkeseth, (LHB)
1		FLO/Luft DV			Odd Busmundrud, (OBu)
1		v/Kapt Vebjørn Hanssen			Alexander Christiansen, (ACF)
1		FABCS			Monica Endregard, (MEn)
1		v/Kapt Frede Hermansen			Hans Christian Gran, (HCG)
1		LST/BFI			Fatima Hussain, (FHu)
1		v/Maj Odd Skålvold			Bjørn Arne Johnsen, (BAJ)
1		FOKIV			Aase Mari Opstad, (AMO)
1		v/Obt Egil Lie			Bjørn Pedersen, (BjP)
1		FSAN			Bent Tore Røen, (BTR)
1		v/Obt Dag Hjelle			John Aa Tørnes, (JAT)
1		FO/FST			
1		v/Obt Hans Kristian Ulimoen			
1		v/Obt Jon-Arne Nyland			

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.

EKSTERN FORDELING**INTERN FORDELING**

ANTALL	EKS NR	TIL	ANTALL	EKS NR	TIL
1		KNM T/SSS			
1		v/KL Geir Johnsen			
1		v/Lt Terje Sørtun			
		www.ffi.no			