

FFI RAPPORT

EKSTRAKSJON AV FOSFONSYRER FRA VANNFASE VED HJELP AV FAST FASE EKSTRAKSJON

HANSEN Lise-Lotte, KALFJØS Hélen Therese, OPSTAD Aase Mari,
RØEN Bent Tore, TØRNES John Aasulf

FFI/RAPPORT-2000/04310

FFIBM/757/138

Godkjent
Kjeller 1 september 2000

Bjørn A Johnsen
Forskningsjef

**EKSTRAKSJON AV FOSFONSYRER FRA
VANNFASE VED HJELP AV FAST FASE
EKSTRAKSJON**

HANSEN Lise-Lotte, KALFJØS Hélen Therese,
OPSTAD Aase Mari, RØEN Bent Tore, TØRNES John
Aasulf

FFI/RAPPORT-2000/04310

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-2000/04310	2) SECURITY CLASSIFICATION UNCLASSIFIED	3) NUMBER OF PAGES 30
1a) PROJECT REFERENCE FFIBM/757/138	2a) DECLASSIFICATION/DOWNGRADING SCHEDULE -	
4) TITLE EKSTRAKSJON AV FOSFONSYRER FRA VANNFASE VED HJELP AV FAST FASE EKSTRAKSJON EXTRACTION OF PHOSPHONIC ACID FROM WATER USING SOLID PHASE EXTRACTION		
5) NAMES OF AUTHOR(S) IN FULL (surname first) HANSEN Lise-Lotte, KALFJØS Hélen Therese, OPSTAD Aase Mari, RØEN Bent Tore, TØRNES John Aasulf		
6) DISTRIBUTION STATEMENT Approved for public release. Distribution unlimited. (Offentlig tilgjengelig)		
7) INDEXING TERMS IN ENGLISH: IN NORWEGIAN:		
a) <u>Methylphosphonic acids</u>	a) <u>Methylfosfosyrer</u>	
b) <u>Solid phase extraction</u>	b) <u>Fast fase ekstraksjon</u>	
c) <u>Methylation using diazometan</u>	c) <u>Metylering med diazometan</u>	
d) _____	d) _____	
e) _____	e) _____	
THESAURUS REFERENCE:		
8) ABSTRACT Methylation of methylphosphonic acids with diazometane gives good results, even if the eluate is acidic. Extraction of methylphosphonic acids from water using solid phase extraction has been tested with three different columns, SAX, DEA and NH ₂ . The SAX columns give highest recoveries. Different solvents for eluation were tested, and methanol with at least 0,6 % HBr in the eluent show the best recovery rates. Variation in pH does not influence the recovery rates. Different contents of salt in the sample were also tested. If the sample volumes are between 50 and 100 ml, the capacity of solid phase column has to be at least 500 mg. Amounts of methylphosphonic acids in samples below about 700 ng/ml will decrease the recovery rate. The limit of quantification for this method is less than 100 ng/ml with standard deviation less than 10 %		
9) DATE 1 september 2000	AUTHORIZED BY This page only Bjørn A Johnsen	POSITION Director of Research

ISBN-82-464-0442-3

UNCLASSIFIED

SECURITY CLASSIFICATION OF THIS PAGE
 (when data entered)

INNHOOLD

	Side	
1	INNLEDNING	7
2	TEORI	7
2.1	Nervegasser	7
2.2	Prøveopparbeidelse	9
2.2.1	Fast fase ekstraksjon (Solid Phase Extraction, SPE)	9
2.2.1.1	Ionebytterekstraksjon	9
2.2.1.2	Ekstraksjonskolonner	10
2.2.1.3	Praktisk utførelse	10
2.2.2	Metylering	11
3	MATERIALER OG METODER	12
3.1	Flytskjema	12
3.2	Ekstraksjon	12
3.2.1	Utstyr	12
3.3	Metylering	13
3.3.1	Utstyr og kjemikalier	13
3.4	GC - analyse	13
3.4.1	Utstyr	13
3.4.2	Analysebetingelser	13
3.5	Kjemikalier for ekstraksjon og GC-analyse	13
3.6	Løsninger	14
3.7	Internstandard metode	15
4	METODEUTVIKLING	15
4.1	Derivatisering av EMPA og PMPA med diazometan	15
4.1.1	Forsøksoppbygging	15
4.1.2	Resultater og diskusjon	15
4.2	Undersøkelser av ekstraksjonskolonner og elueringsmiddel	17
4.2.1	Forsøksoppbygging	17
4.2.2	Resultater og diskusjon	17
4.3	Undersøkelser av NH ₂ – kolonnen	18
4.3.1	Forsøksoppbygging	18
4.3.2	Resultater og diskusjon	18
4.4	Sammenligning mellom gamle og nye SAX-kolonner	19
4.4.1	Forsøksoppbygging	19
4.4.2	Resultater og diskusjon	19
4.5	Undersøkelser av prøvevolum og salttilsetning	19
4.5.1	Forsøksoppbygging	19
4.5.2	Resultater og diskusjon	19
4.6	Undersøkelser av metodens robusthet	20
4.6.1	Forsøksoppbygging	20
4.6.2	Resultater og diskusjon	20

5	OPPSUMMERING	21
6	VIDERE UNDERSØKELSER	22
6.1	SAX-kolonner med forskjellig størrelse	22
6.1.1	Forsøksoppbygging	22
6.1.2	Resultater og diskusjon	22
6.2	Forskjellig elueringsmengde og konsentrasjon av HBr	22
6.2.1	Forsøksoppbygging	22
6.2.2	Resultater og diskusjon	23
6.3	Kvantifiseringsgrense	23
6.3.1	Forsøksoppbygging	23
6.3.2	Resultater og diskusjon	24
7	KONKLUSJON	24
APPENDIKS		
A	BRUKERVEILEDNING FOR MINI DIAZALD – DIAZOMETANGENERATOR	26
A.1	INNLEDNING OG SIKKERHETSREGLER	26
A.2	UTSTYR	27
A.2.1	Glassutstyr	27
A.2.2	Kjemikalier og løsninger	27
A.3	FREMSTILLING	27
A.4	LITTERATUR	28
	Litteratur	29
	Fordelingsliste	30

EKSTRAKSJON AV FOSFONSYRER FRA VANNFASE VED HJELP AV FAST FASE EKSTRAKSJON

1 INNLEDNING

Den første delen av rapporten (til og med kapittel 5) omfatter arbeidet til to kjemiingeniørstudenter fra Høgskolen i Oslo. Arbeidet med hovedprosjektoppgaven ble utført våren 2000 ved Forsvarets forskningsinstitutt (FFI) (1)

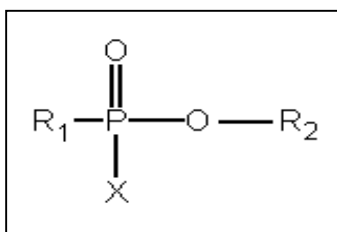
Den internasjonale kjemivåpenkonvensjonen, CWC, trådte i kraft 29 april 1997. Konvensjonen forbyr utvikling, produksjon, lagring og bruk av kjemiske stridsmidler. Den er effektiv kun når muligheten for å registrere brudd på lovene er mulig (2). Kvalifisert personell samler derfor inn prøver etter påstått bruk av kjemiske våpen, gjennom rutineinspeksjoner og stikkprøver av kjemisk industri. Det er av stor betydning å ha gode og velutviklede metoder for rask verifisering.

En viktig del av FFIs arbeid er verifikasjon og beskyttelse mot kjemiske stridsmidler, som f.eks. nervegasser. Når disse nervegassene kommer i kontakt med fuktighet, omdannes de til alkylfosforsyrer. Hensikten med prosjektet var å utvikle en analysemetode for metylfosforsyrer i vann. Ønske om en slik metode var å kunne verifisere bruk og utslipp av ulike typer nervegasser ved å ta vannprøver. Metoden gikk ut på å ekstrahere syrene fra vannfase ved hjelp av fast fase ekstraksjon, derivatisere med diazometan for til slutt å analysere dem på GC. Dette prosjektet skulle ta for seg hydrolyseproduktene av nervegassene soman og VX i vannprøver og undersøke hvilke type ionebytterkolonne som vil være best egnet for ekstraksjon av alkylfosforsyrene. Kunne man metylere med diazometan direkte i eluatet, når eluatet var et surt miljø? Kunne man separere de aktuelle alkylfosfonatene på gaskromatograf (GC) når de befant seg i surt miljø?

2 TEORI

2.1 Nervegasser

Det finnes flere forskjellige typer nervegasser, og de fleste har lik grunnoppbygning, med ulike funksjonelle grupper (figur 2.1).



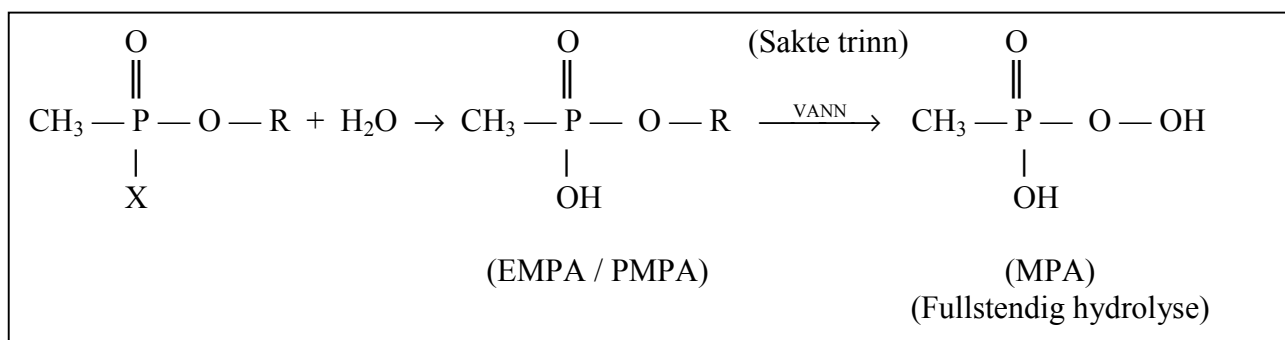
Figur 2.1 Generell formel for nervegass, der R_1 , R_2 og X er forskjellige funksjonelle grupper

De nervegassene som er aktuelle for dette prosjektet, er soman og VX, se tabell 2.1.

	Soman	VX
R1	CH ₃ —	CH ₃ —
R2	$ \begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ -\text{CH} - \text{C} - \text{CH}_3 \\ \quad \\ \text{CH}_3 \quad \text{CH}_3 \end{array} $	-CH ₂ —CH ₃
X	$ \begin{array}{c} \\ \text{F} \end{array} $	$ \begin{array}{c} \\ \text{S} \\ \\ (\text{CH}_2)_2 \\ \\ \text{N} \\ / \quad \backslash \\ \text{CH}_3 - \text{CH} \quad \text{CH} - \text{CH}_3 \\ \quad \\ \text{CH}_3 \quad \text{CH}_3 \end{array} $

Tabell 2.1 Oversikt over de funksjonelle gruppene for de to nervegassene soman og VX

Nervegassene soman og VX reagerer med vann og danner metylfosfonsyrer. Når VX hydrolyseres dannes etyl metylfosfonsyre, EMPA. Når soman hydrolyseres dannes 1,2,2-trimetylpropyl metylfosfonsyre (pinacolyl metylfosfonsyre), PMPA (figur 2.2).



Figur 2.2 Hydrolyse av nervegass til fosfonsyre. Det er EMPA og PMPA som må analyseres for å finne ut hvilken nervegass som er utgangspunktet

Nervegasser er meget giftige organiske fosforkomponenter som er relativt enkle og billige å fremstille. De reagerer meget hurtig og de trer inn i kroppen gjennom inhalering eller gjennom huden, enten som gass eller væske.

Nervegassene virker slik at de binder seg til enzymet acetylcholinesterase i nervesystemet og hindrer dermed hydrolysen av det vitale acetylcholin i denne delen av systemet. Det er dette som gjør dem dødelige.

2.2 Prøveopparbeidelse

Enkelte prøver kan ikke analyseres slik de er. Det kan være flere årsaker til det.

- a) Prøven inneholder stoffer som ødelegger separasjonsmetoden/systemet. De lar seg ikke analysere i sin opprinnelige form.
- b) Prøven inneholder stoffer som interfererer med analysen av de aktuelle komponentene.
- c) Konsentrasjonen av de aktuelle komponentene kan være så lav at de ikke blir detektert.

I disse tilfellene må det gjøres en prøveopparbeidelse. Opparbeidelsen har som mål å rense og oppkonsentrere aktuelle stoffer i prøven, eventuelt overføre dem til et annet løsningsmiddel der de lar seg separere og detektere. Væske – væske ekstraksjon og fast fase ekstraksjon er de viktigste metodene. Videre teori tar kun opp fast fase ekstraksjon.

2.2.1 Fast fase ekstraksjon (Solid Phase Extraction, SPE)

Fast fase ekstraksjon er basert på et stoffs fordeling mellom en væske og overflaten til et fast materiale, en sorbent. Fast fase ekstraksjon, heretter forkortet SPE, benyttes i likhet med væske – væskeekstraksjon til å isolere, rense og oppkonsentrere stoffer i væsker.

Hvis et stoff skal isoleres på overflaten til en fast sorbent må overflaten ha kjemiske grupper som gir en interaksjon med stoffet som er sterkere enn interaksjonen mellom stoffet og væsken det er løst i. Selektive ekstraksjoner oppnås ved å bruke sorbenter som gir interaksjon med stoffet og ikke forurensninger i prøven. I dette prosjektet ble det kun gjennomført ionebytterekstraksjon, derfor vil bare denne typen teori beskrives. I tillegg forutsettes teori om sorbenter som kjent.

2.2.1.1 Ionebytterekstraksjon

Ionebytterekstraksjon benyttes vanligvis til å isolere ioniserte stoffer fra vandige prøveløsninger. Ekstraksjon er basert på ioniske interaksjoner mellom sorbent og stoff. Positivt ladde kationer ekstraheres av negativt ladde kationbytttere, mens negativt ladde anioner ekstraheres av positivt ladde anionbytttere.

En skiller mellom sterke og svake ionebytttere. De sterke ionebyttterne har funksjonelle grupper som er ionisert i hele pH-området. De svake ionebyttterne har funksjonelle grupper, som avhengig av pKa-verdien, er ioniserte i deler av pH-området.

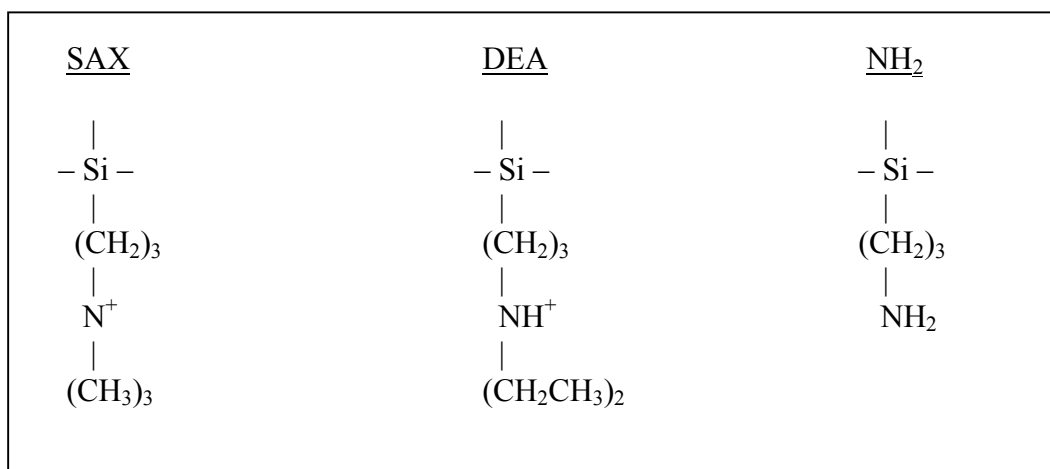
En forutsetning for å få retensjon er at prøveløsningen har en pH hvor både stoff og sorbent er på ladet form. Antall kationiske grupper øker ved pH-verdier lavere enn pKa-verdien, mens antall anioniske grupper øker ved pH-verdier høyere enn pKa-verdien. I praksis velges pH minst 2 pH-enheter lavere enn pKa-verdien av et kation, og minst 2 pH-enheter over pKa-verdien av et anion. Da vil minst 99 % av gruppene være ladet.

Hvis pH økes over pKa-verdien til kationet, eller senkes under pKa-verdien til anionet, vil den ioniske binding brytes fordi sorbenten eller stoffet blir nøytralisert.

En annen forutsetning for å få retensjon er at prøven eller løsningsmidlet ikke inneholder høye konsentrasjoner av sterkt konkurrerende, ioniske stoffer med samme ladning som stoffet. Høy ionestyrke bryter ioniske bindinger, mens lav ionestyrke fremmer ioniske bindinger mellom stoff og sorbent. Visse ioniske grupper vil bindes sterkere enn andre (3).

2.2.1.2 Ekstraksjonskolonner

Ekstraksjonskolonnene som blir brukt i prosjektet er SAX, DEA og NH₂. SAX-kolonnen er en sterk ionebytter, mens både DEA- og NH₂-kolonnen er svake ionebyttere. På alle kolonnene er det en funksjonell aminogruppe som vil retardere metylfosfonsyrene i varierende grad, se figur 2.3.



Figur 2.3 Strukturformler av ekstraksjonskolonnene SAX, DEA og NH₂

For å eluere ut syrene fra kolonnene må pH justeres i elueringsløsningen slik at enten sorbenten eller syrene blir nøytralisert, og ionebindingene brytes. Det kan også være til hjelp å tilføre et motion som har større affinitet til aminogruppen enn syrene. Dette ionet bytter plass med syrene, som da følger med elueringsløsningen ut (4).

2.2.1.3 Praktisk utførelse

SPE består av fire trinn:

- Kondisjonering av sorbent
- Påsetting av prøve
- Utvasking av forurensninger
- Eluering av aktuelt stoff

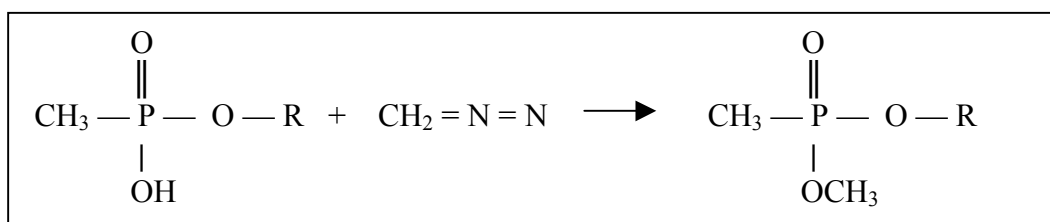
Kondisjoneringen har som mål å reise opp de funksjonelle gruppene og øke det aktive overflatearealet. Kondisjoneringen utføres ved å la et løsningsmiddel, som både fukter de funksjonelle gruppene og silikaoverflaten, passere gjennom kolonnen. Metanol er et effektivt kondisjoneringsmiddel fordi det gir interaksjon med både silanolgruppene på overflaten og med karbonatomene i de funksjonelle gruppene.

Før prøvepåsetting må metanolen vaskes ut av kolonnen med et løsningsmiddel som er mest mulig likt prøveløsningen. Når prøveløsningen suges gjennom kolonnen, blir aktuelle stoffer retardert.

Komponenter i prøven som har svak interaksjon med sorbenten, vaskes ut av kolonnen med en vaskeløsning. Aktuelle stoffer blir deretter eluert fra kolonnen med et egnet elueringsmiddel.

2.2.2 Metylering

Metylfosfonsyrene har syregrupper som gjør dem lite egnet for GC analyse. For å få de analysert på GC, må derfor de aktuelle komponentene derivatiseres. Ved metylering vil hydrogenet på hydroksylgruppen byttes ut med en metylgruppe fra metyleringsreagenset. (figur 2.4).

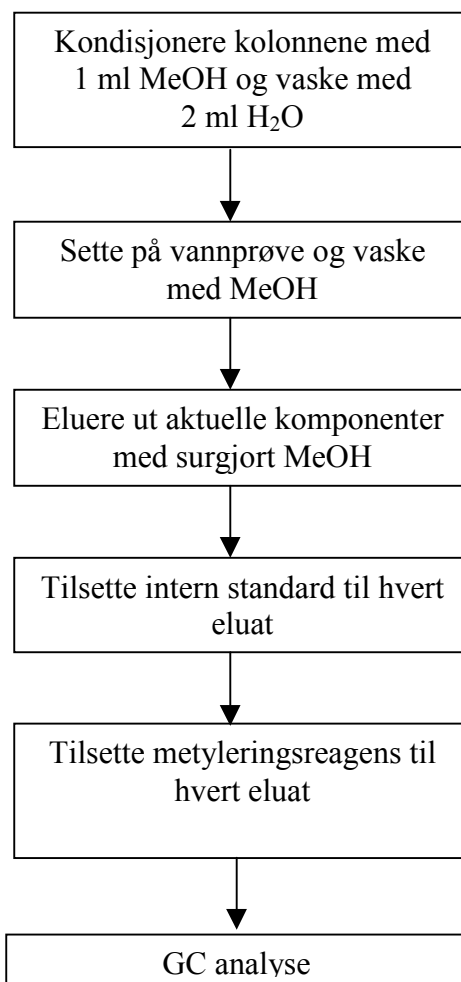


Figur 2.4 Reaksjonslikning for reaksjonen mellom metylfosfonsyre og metyleringsreagens, diazometan

3 MATERIALER OG METODER

3.1 Flytskjema

Oppbygning av metoden, trinn for trinn, er vist i figur 3.1.



Figur 3.1 Flytskjema som viser prosedyren for bestemmelse av metylfosfonsyrer i vann med 100 mg SPE-kolonner

3.2 Ekstraksjon

3.2.1 Utstyr

- ❖ Kolonner:
 - DEA, 100 mg fra Varian
 - NH₂, 100 mg fra Varian
 - SAX, 100 mg fra Varian
- ❖ Vakuumsystem for SPE fra Varian
- ❖ Microprocessor pH-meter, Hanna Instruments, HI 9321

3.3 Metylering

3.3.1 Utstyr og kjemikalier

- ❖ Metyleringsreagens, se appendiks A.

3.4 GC - analyse

3.4.1 Utstyr

- ❖ Perkin Elmer S autosystem gasskromatograf (PE1):
 - J & W DB5- kolonne: upolar, lengde 30 m, indre diameter 0,25 mm, filmtykkelse 0,25 µm.
 - Split/splitless - injektor
 - Åpen liner
 - Bæregass: He
 - Autosampler
 - FID – detektor

- ❖ Perkin Elmer S autosystem XL gasskromatograf (PE3):
 - J & W DB200- kolonne, polar, lengde 15 m, indre diameter 0,32 mm, filmtykkelse 0,5 µm.
 - Split/splitless injektor
 - Åpen liner
 - Bæregass: He
 - Autosampler
 - FID-detektor

3.4.2 Analysebetingelser

For programmering av GC ble programmet TurboChrom Navigator fra Perkin Elmer benyttet.

Standard analysebetingelser:

- Vask av injektornål: Aceton
- Bæregasshastighet: PE1: 1 ml/min
PE3: 1,5 ml/min
- Splitless injeksjon, åpnet splitt etter 1,5 min
- Injeksjonsvolum: 1 µl
- Injektortemperatur: 250 °C
- Detektortemperatur: 300 °C

Temperaturgradient:

PE1: 40 °C (2 min) → 30 °C/min. → 280 °C (4 min)

PE3: 40 °C (2 min) → 15 °C /min → 140 °C (0 min) → 30 °C/min → 240 °C (2 min)

3.5 Kjemikalier for ekstraksjon og GC-analyse

- ❖ Etyl metylfosfonsyre (EMPA), 98 % Cas no 1832-53-7 fra Aldrich
- ❖ Pinakolyl metylfosfonsyre (PMPA), 99 % Cas no 616-52-4 fra Aldrich
- ❖ Metanol (MeOH), Cas no 67-56-1, ultra resi analyzed fra J T Baker
- ❖ Aceton, Cas no 67-64-1, , ultra resi analyzed fra J T Baker
- ❖ Saltsyre (HCl), 30 %, Suprapur fra Merck
- ❖ Bromsyre (HBr), 47 %, Suprapur fra Merck

❖ Tridecan (C13) fra Koch-Light Laboratories Ltd

3.6 Løsninger

På grunn av høy viskositet ble fosfonsyrene veid inn på analysevekt ved tillaging av løsningene.

Kalibreringsløsning: 0,5 µl som tilsvarer ca 0,5 mg, av hver enkelt syre/ml MeOH
500 µl ble tatt ut, tilsatt 100 µl internstandardløsning og 700 µl metyleringsreagens

Vannløsning 1: 0,025 µl som tilsvarer ca 0,025 mg av hver enkelt syre/ml vann

Vannløsning 2: Vannløsning 1 ble fortynnet 1:5.

Vannløsning 3: Vannløsning 1 ble fortynnet 1:10

Gjennom ekstraksjonskolonnen ble det som standard prøvevolum, brukt 10 ml, pH: 5,5-6,5

pH-løsning: Lav pH: Vannløsning 1 ble korrigert med fortynnet blanding av
1 ml H₂SO₄ og 1 ml HNO₃ til pH = 4,4.
Høy pH: Vannløsning 1 ble korrigert med NaOH til pH = 8,4.

Saltløsning: 50 ppm Cl⁻-løsning: Vannløsning 1 ble tilsatt NaCl.
100 ppm Cl⁻-løsning: Vannløsning 1 ble tilsatt NaCl.
50 ppm SO₄²⁻-løsning: Vannløsning 1 ble tilsatt K₂SO₄.
100 ppm SO₄²⁻-løsning: Vannløsning 1 ble tilsatt K₂SO₄.

Elueringsløsning A: A1: 25 µl HBr/ml MeOH.
A2: 25 µl HCl/ml MeOH.

Elueringsløsning B: B1: 0,5 µl HBr/ml MeOH.
B2: 2,0 µl HBr/ml MeOH

Elueringsløsning C: C1: 12,5 µl HBr/ml MeOH.
C2: 50 µl HBr/ml MeOH.

Gjennom ekstraksjonskolonnen ble det, som standard elueringsvolum, brukt 500 µl løsning.

Internstandardløsning: 2,5 µl C13/ml MeOH
Det ble tilsatt 100 µl av løsningen til hvert eluat, slik at totalt volum ble 600 µl.

Metyleringsreagens: Dette er en allerede godt utprøvet metode ved FFI, der det finnes brukerveiledning tilgjengelig, se appendiks A.
Det ble tilsatt rundt 700 µl metyleringsreagens til hvert eluat, slik at totalt volum ble ca. 1,3 ml.

3.7 Internstandard metode

For å beregne gjenfinning av metylfosfonatene ved analyse på GC, ble det brukt internstandard metode. En kjent mengde internstandard (IS) ble tilsatt eluatet for å korrigere for forandring i injisert volum. Formelen som dataprogrammet TurboChrom Navigator bruker, er vist i figur 3.2.

1.	$R_f = (A_x / A_{IS}) * (m_{IS} / m_x)$
2.	$m_x = (A_x / A_{IS}) * 1/R_f * m_{IS}$
der	
R_f	= Responsfaktor
A_x	= Arealet av aktuell komponent
A_{IS}	= Arealet av IS
m_x	= Masse av aktuell komponent
m_{IS}	= Masse av IS

Figur 3.2 Formel for beregning av gjenfinning av aktuelle komponenter i hver enkelt prøve. Responsfaktoren beregnes v h a kalibreringsløsningen, og brukes i 2 til beregning av masse av aktuell komponent i prøven

4 METODEUTVIKLING

4.1 Derivatisering av EMPA og PMPA med diazometan

4.1.1 Forsøksoppbygging

Hensikten med forsøket var å finne ut om komponentene lot seg derivatisere og analysere når de befant seg i surt miljø.

6 paralleller av en løsning av fosfonsyrer ble tilsatt elueringsløsning A1 og A2 og sammenlignet med 6 paralleller av en løsning av fosfonsyrer i ren MeOH. Disse ble metylert med diazometan og analysert på GC.

4.1.2 Resultater og diskusjon

Det viste seg at EMPA og PMPA lot seg derivatisere både med HCl og HBr tilstede. Sammenligning av resultatene av fosfonsyrene i ren MeOH og fosfonsyrene i surt eluat, viste at arealet for estertoppene i de tre løsningene i gjennomsnitt var omtrent like. Derivatiseringen antas derfor å være fullstendig. Mengde ester funnet ved analyse på GC vil tilsvare mengde gjenfunnet syre i vannprøven. I senere forsøk er derfor gjenfinningsprosent og standardavvik for EMPA og PMPA oppgitt selv om det er esterene som måles.

Komponentene er ganske nøytrale og lite polare etter metylering til estere, og retensjonsrekkefølgen ved analyse på GC domineres således av flyktigheten uavhengig av hvilket kolonnemateriale som brukes. Retensjonstidene for komponentene var derfor som forventet. EMPA esteren, som er mest flyktig, kom først ut.

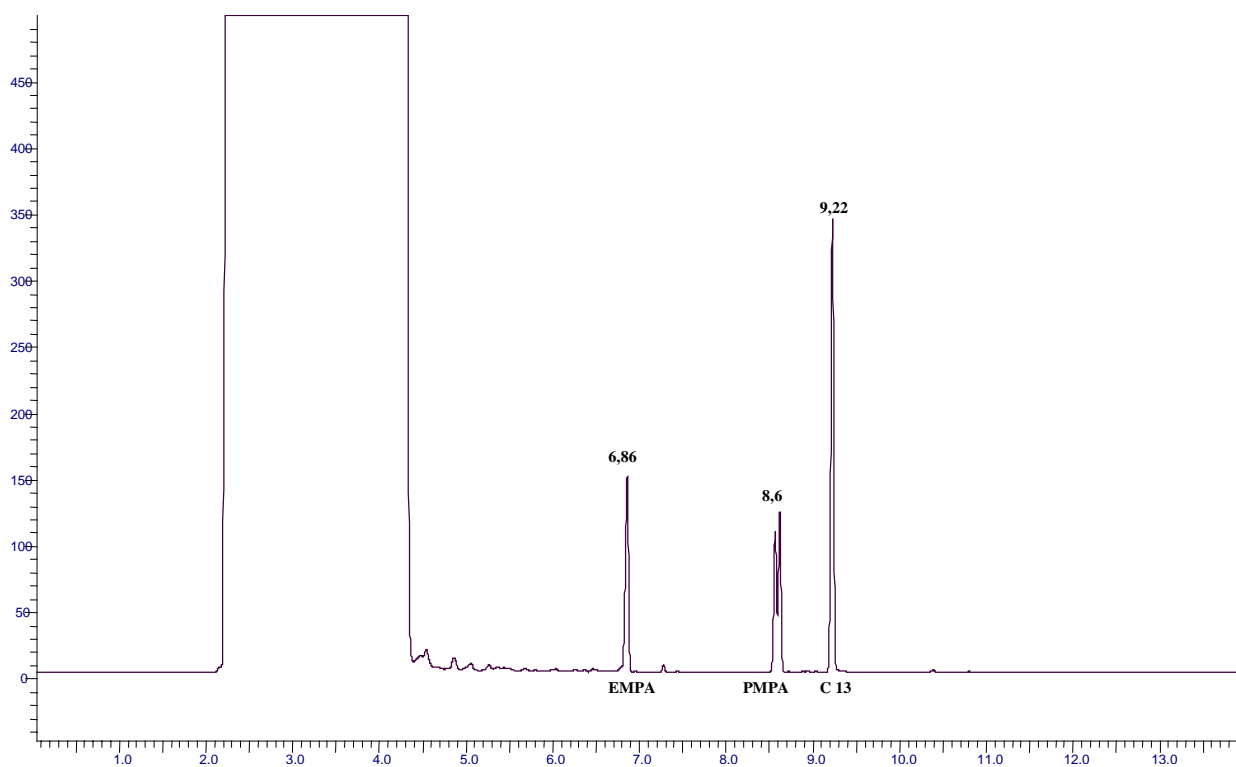
IS hadde retensjonstid ganske nært metylert PMPA i PE1, men ikke så nær at den ville interferere med esteren. I PE3 ble retensjonstiden for IS kortere p g a at DB200-kolonnen er polar, mens IS er en upolar forbindelse. Den interfererte fortsatt ikke med noen av de aktuelle komponentene.

I kromatogrammene i figur 4.1 og 4.2, vises somanesteren som en dobbel topp. Dette skyldes at komponenten inneholder en stereoisomer gruppe, og den trenger derfor ikke grunnlinjeseparerer.

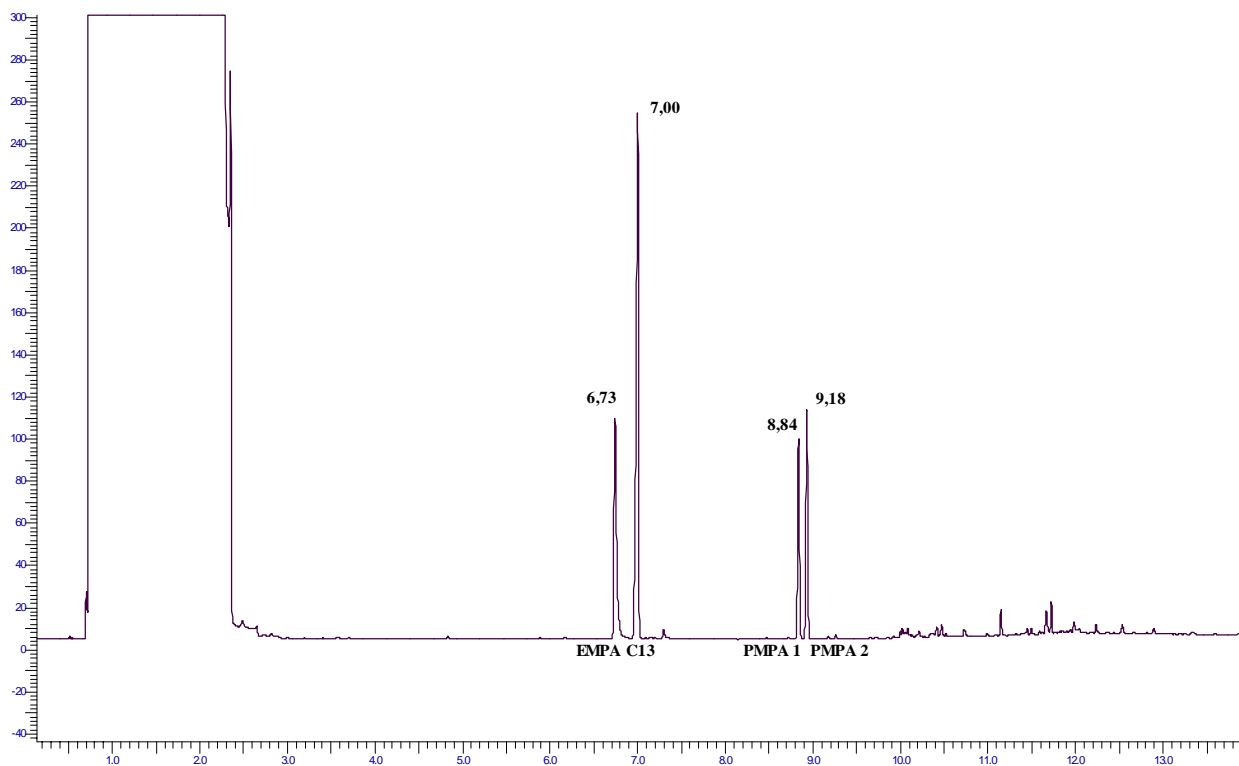
Retensjonstidene til de aktuelle komponentene vises i tabell 4.1.

	EMPA	PMPA	C13
PE1	6,9	8,6	9,2
PE3	6,7	8,8	7,0

Tabell 4.1 Retensjonstidene i minutter for metylestere av de aktuelle komponentene ved forskjellige kolonner og GC-program



Figur 4.1 Kromatogram fra PE1 med metylestere av de aktuelle komponentene EMPA og PMPA i tillegg til IS (C13)



Figur 4.2 Kromatogram fra PE3 med de aktuelle komponentene EMPA og PMPA i tillegg til IS (C13)

4.2 Undersøkelser av ekstraksjonskolonner og elueringsmiddel

4.2.1 Forsøksoppbygging

Dette forsøket hadde til hensikt å finne ut hvilken av kolonnetypene SAX, NH₂ og DEA som ga best utbytte, og om det var mulig å eluere syrene ut av kolonnene med surgjort metanol. Det skulle også bestemmes hvilken av de to syrene, HCl eller HBr, som metanolen skulle surgjøres med for å få best resultat.

Under ekstraksjonsprosessen ble både eluat og MeOH brukt til vasking av kolonnen samlet opp for analyse fra alle 3 kolonnetypene.

4.2.2 Resultater og diskusjon

Fra dette forsøket kunne det fastslås en del ting: Resultatene viste at det ble best utbytte der metanol surgjort med HBr ble brukt som elueringsmiddel. Dette var et forventet resultat, da Br⁻ er et sterkere motion enn Cl⁻. I videre forsøk ble det, på bakgrunn av dette, kun eluert med elueringsløsning A1.

Kolonnetyper, elueringsløsning	% gjenfinning		Standardavvik	
	EMPA	PMPA	EMPA	PMPA
SAX, A1	62,0	93,6	1,87	2,10
NH ₂ , A1	6,2	10,4	0,43	0,87
DEA, A1	34,9	69,0	2,54	1,29
SAX, A2	23,3	82,8	7,38	3,13
NH ₂ , A2	4,5	9,0	1,77	3,21
DEA, A2	23,2	38,2	0,66	0,62

Tabell 4.2 Oversikt over gjennomsnittlig utbytte og standardavvik av 6 paralleller for kolonnetyperne med elueringsløsning A1 og A2

I tillegg, kunne man i stor grad antyde at SAX- kolonnen ga best utbytte av de tre kolonnetyperne, se tabell 4.2. Sammenlignet med tidligere forsøk utført ved FFI (5), var det forventet høyere utbytte ved bruk av NH₂-kolonnen. Derfor ble det bestemt å undersøke den videre sammen med SAX-kolonnen, mens DEA-kolonnen ikke skulle undersøkes videre.

Analyse av MeOH brukt til vask av kolonnene viste ingen spor av fosfonsyrer. MeOH kunne som en følge av dette brukes til å vaske ut forurensninger, uten fare for tap av aktuelle komponenter.

4.3 Undersøkelser av NH₂ – kolonnen

4.3.1 Forsøksoppbygging

For å finne ut om fosfonsyrene vandret rett gjennom kolonnen eller om de hang fast, ble vannløsning 1 først ekstrahert gjennom en NH₂-kolonne, og deretter gjennom en SAX- kolonne. Både vaskemetanol og eluat fra begge kolonnetyper ble analysert. I tillegg ble vannløsningens pH hevet og senket, for å se om det hadde noen effekt på gjenfinningen (se pH-løsning, kapittel 3.6). Nyinnkjøpte NH₂-kolonner ble også testet, for å se om alderen hadde noen innvirkning på retensjonen.

4.3.2 Resultater og diskusjon

Det viste seg at syrene ikke ble retardert på NH₂-kolonnen, derav de svært lave utbyttene, se tabell 4.2. Kromatogrammene fra analysen viste at syrene hadde vandret rett gjennom NH₂-kolonnen, uten noe retardasjon. Syrene ble funnet igjen i eluatet fra SAX-kolonnen.

Senking av pH til 4,4 ga også dårlig utbytte av fosfonsyrene. Heving av pH til 8,4 ga ustabile resultater, fra ingen gjenfinning til lav gjenfinningen. Alderen på NH₂ –kolonnen hadde heller ingen betydning for resultatet. Nye og gamle kolonner ga like dårlig gjenfinning.

Vi står fremdeles igjen med ubesvarte spørsmål angående NH₂-kolonnen, men siden hensikten med prosjektet var å finne frem til en metode for best mulig gjenfinning av fosfonsyrene, ble resten av tiden konsentrert om SAX-kolonnene.

4.4 Sammenligning mellom gamle og nye SAX-kolonner

4.4.1 Forsøksoppbygging

Hensikten med forsøket var å sammenligne resultatene fra nye kolonner med gamle. Nye kolonner ble derfor kjøpt inn. 6 paralleller av hver kolonne ble undersøkt.

4.4.2 Resultater og diskusjon

Produsenten av kolonnene ble kontaktet i forbindelse med at nøyaktig gjenfinningsprosent av syrene fra kolonnene skulle bestemmes. Produsenten mente at nye kolonner burde benyttes for å få et mer stabilt og nøyaktig resultat, mens for vanlig verifikasjon kunne eldre kolonner brukes. Resultatene fra forsøket viste, på tross av dette, at alderen ikke hadde noen betydning for utbyttet på SAX-kolonnene. De gamle kolonnene, som var ca. 10 år gamle, ga resultater som ikke var noe dårligere enn de nye. Standardavvikene var også tilnærmet like lave, noe som fortalte at både de gamle og nye SAX-kolonnene var stabile (tabell 4.3).

Kolonne	% gjenfinning		Standardavvik	
	EMPA	PMPA	EMPA	PMPA
Gammel SAX	61,5	90,1	1,60	1,40
Ny SAX	62,1	92,0	2,00	3,40

Tabell 4.3 Oversikt over gjennomsnittlig utbytte og standardavvik for 6 paralleller av gammel og ny SAX-kolonne

4.5 Undersøkelser av prøvevolum og salttilsetning

4.5.1 Forsøksoppbygging

Hensikten med forsøket var å endre parameterverdier og påvirke vannet med salter for å se om det hadde noen innvirkning på utbyttet. Volumet av vannløsning gjennom kolonnen ble økt til 50 ml og 100 ml. Siden volumet av vannprøven ble større, måtte konsentrasjonen av syrene fortynnes, slik at total mengde syrer i eluat ble lik som i 10 ml vannløsning 1 (se vannløsning 2 kapittel 3.6).

Det ble for andre paralleller tilsatt NaCl og K₂SO₄ i varierende mengde (se saltløsning kapittel 3.6). Her ble det brukt 10 ml vannløsning som i foregående forsøk.

4.5.2 Resultater og diskusjon

Forsøkene viste at når prøvevolumet gjennom kolonnen økte, så sank utbyttet. I tabell 4.4 vises det at kolonnene er for små til å samle opp syrene fra store mengder vann, slik at syrene ble vasket ut igjen med det samme. For å få et tilfredsstillende resultat vil det nok være nødvendig med større kolonner på så store volumer. Dette har også vist seg i tidligere forsøk utført ved FFI (6).

Resultatene i tabell 4.4 viser også at gjenfinningen av fosfonsyrene avtar ved økende konsentrasjonen av klorid i prøveløsningen. Ut ifra disse resultatene kan vi ikke se noen signifikant effekt av sulfationer i prøveløsning.

Parametre som ble undersøkt	% gjenfinning		Standardavvik	
	EMPA	PMPA	EMPA	PMPA
10 ml prøvevolum	53,3	89,9	5,70	8,50
50 ml prøvevolum * ¹⁾	19,0	22,9	-	-
100 ml prøvevolum * ²⁾	15,4	19,2	-	-
Cl ⁻ , 50 ppm	49,2	78,5	5,00	7,80
Cl ⁻ , 100 ppm	35,1	47,6	1,90	4,30
SO ₄ ²⁻ , 50 ppm	53,0	73,2	23,20	23,40
SO ₄ ²⁻ , 100 ppm	55,3	63,0	11,00	16,10

Tabell 4.4 Oversikt over gjennomsnittlig utbytte og standardavvik av 6 paralleller ved volumøkning og tilsetning av salter
^{*1)} 2 av 6 parallellene ga ikke utbytte. Gjennomsnittlig utbytte er derfor beregnet med 4 paralleller
^{*2)} 4 av 6 paralleller ga ikke utbytte. Gjennomsnittlig utbytte er derfor beregnet med 2 paralleller
 -) Standardavvik ikke beregnet

4.6 Undersøkelser av metodens robusthet

4.6.1 Forsøksoppbygging

Reelle vannprøver hentet fra ulike miljøer, som for eksempel stillestående vann, bekker eller liknende, har ofte en varierende pH. For å teste robustheten av metoden m h p pH, ble derfor forskjellige pH-verdier (fra pH 4,4 til pH 8,4) testet, se pH-løsning kapittel 3.6.

Konsentrasjonen av HBr i elueringsløsningen ble også undersøkt.

4.6.2 Resultater og diskusjon

Parametre undersøkt	% gjenfinning		Standardavvik	
	EMPA	PMPA	EMPA	PMPA
0,5 µl HBr/ml MeOH	-	-	-	-
2,0 µl HBr/ml MeOH	-	-	-	-
12,5 µl HBr/ml MeOH	98,6	97,8	4,09	5,72
25 µl HBr/ml MeOH	101,1	97,5	3,92	4,79
50 µl HBr/ml MeOH	98,7	99,9	3,42	3,42
pH = 4,4	97,0	95,4	8,52	10,62
pH = 8,4	97,3	93,6	4,16	4,98

Tabell 4.5 Oversikt over gjennomsnittlig utbytte og standardavvik for 6 paralleller ved variasjon av HBr-konsentrasjon i elueringsmiddel og endring av pH i vannløsning 1
 -) ikke detektert

Analysene viste at pH-endringen ikke hadde noen innvirkning på utbyttet, tabell 4.5. På grunn av dette ble det anslått at metoden var robust nok til å håndtere reelle vannprøver der pH varierer.

Konsentrasjon av HBr i elueringsmiddel ble også undersøkt, se tabell 4.5. Elueringsløsning med minimum konsentrasjon for å få ut syrene, må ligge et sted mellom 2,0 og 12,5 µl HBr/ml MeOH. Dette ble ikke undersøkt videre p g a tidsmangel.

5 OPPSUMMERING

Undersøkelsene i prosjektet har vært nyttige for å komme fram til en metode for å verifisere metylfosfonsyrer i vann. Det er sannsynlig at de parameterverdier som nå er satt for 100 mg SAX-kolonner i tabell 5.1, vil gi gode resultater i fremtidige forsøk.

Prøveløsning	Vaskeløsning	Elueringsløsning	Internstandard	Metylering
10 ml	2,5 ml MeOH	500 µl 0,6-1,2 % HBr i MeOH	C13	700 µl diazometan

Tabell 5.1 Parameterverdier for 100 mg SAX-kolonner

DB5-kolonnen i PE1 ble benyttet fordi det har vært analysert samme komponenter på denne kolonnen i tidligere forsøk, og dette er den kolonnen som vanligvis brukes når ukjente prøver analyseres i verifikasjonsøyemed. DB200-kolonnen i PE3 ble brukt av mer praktiske årsaker, da denne allerede sto i den andre GC'en som ble benyttet i prosjektet.

Forsøkene med NH₂-kolonnen ga ingen svar på hvorfor syrene ikke ble retardert. P g a tidsmangel og mindre relevans for prosjektet, ble det besluttet å la det ligge som et ubesvart spørsmål. Saltkonsentrasjonene i kapittel 4.5 ble valgt på bakgrunn av tidligere forsøk utført ved Høgskolen i Oslo. Dette forsøket viste at reelle vannprøver kan ha saltkonsentrasjoner opp i mot de valgte verdier (7).

Ingen forsøk i prosjektet er utført med reelle vannprøver. Det kan av denne grunn være forhold som er oversett eller ikke avdekket av undersøkelsene. I reelle vannprøver vil man ofte ha behov for større prøvevolumer for å detektere lave fosfonsyrerester, det er derfor grunn til å tro at det vil være behov for kolonner med større dimensjoner enn 100 mg. Fremtidige forsøk bør ta dette i betraktning.

Variasjonen av gjenfinningsprosenten kan ha sammenheng med at vannløsningene ikke er laget av én batch. Syrene ble veid inn i flere ulike løsninger, noe som har gitt litt forskjellige utbytter. Det kan også skyldes at elueringshastigheten kan ha variert litt fra forsøk til forsøk.

Undersøkelsene av SAX-kolonnen antyder likevel en rimelig god reproducerbarhet av gjenfinningen av syrene.

6 VIDERE UNDERSØKELSER

I de videre undersøkelsene ønsket vi å se på prøvevolum, HBr konsentrasjonen i eluenten, elueringsmengden og deteksjonsgrensen for metoden. I tillegg ønsket vi å se hvordan gjenfinningsprosenten av sarinsyre var i forhold til de andre syrene. Isopropyl metylfosfonsyre (IPMPA) syntetisert ved FFI, ble derfor tatt med.

For å få en bra separasjon ble GC-programmet for PE3 endret slik: 40 °C (3 min) → 10 °C /min → 90 °C (2 min) → 30 °C/min → 240 °C (2 min). Det ble kun brukt 3 paralleller ved hvert forsøk.

6.1 SAX-kolonner med forskjellig størrelse

6.1.1 Forsøksoppbygging

I tidligere forsøk der SAX-kolonner har inneholdt 100 mg pakkemateriale, viste det seg at utbyttet sank ved økende prøvevolum påsatt (kapittel 4.6). Ved analyse av reelle prøver, der konsentrasjonen av fosfonsyrene kan være lave, er det ønskelig å kunne sette på et så stort prøvevolum som mulig. I dette forsøksoppsettet er utbyttet fra kolonner med 100 mg pakkemateriale sammenlignet med kolonner med 500 mg og 1 g pakkemateriale. Flytskjema i figur 3.1 og parameterverdiene i tabell 5.1 ble fulgt, men volumet på løsningene for 500 mg og 1 g ble henholdsvis økt med 5 og 10 ganger i forhold til 100 mg kolonner. Konsentrasjon av vannløsning er som i vannløsning 1 (kapittel 3.6). Konsentrasjonen av bromsyre i eluatet er 1,2 % (elueringsløsning A1). Det ble tatt ut 0,5 ml av hvert eluat og tilsatt IS før derivatisering og analyse på GC.

6.1.2 Resultater og diskusjon

Som tabell 6.1 viser vil ikke den relative gjenfinningsprosenten forandre seg med størrelsen på kolonnen, så lenge forholdet mellom prøvevolum og kolonnestørrelse er konstant.

Størrelse SAX-kolonner og prøvevolum	% gjenfinning ± standardavvik	
	EMPA	PMPA
100 mg med 10 ml prøvevolum	108 ± 4,6	87 ± 7
500 mg med 50 ml prøvevolum	101 ± 6,3	84 ± 6,2
1 g med 100 ml prøvevolum	112 ± 8,1	93 ± 7

Tabell 6.1 Sammenligning av gjenfinningsprosenten og ± standardavvik av EMPA og PMPA ved bruk av SAX-kolonnene med forskjellig størrelse

6.2 Forskjellig elueringsmengde og konsentrasjon av HBr

6.2.1 Forsøksoppbygging

Høye konsentrasjoner av HBr injisert på GC gir stor belastning, spesielt på GC injektor, derfor er det ønske om å gå ned på HBr- konsentrasjonen. Tidligere forsøk har vist at elueringsløsning på 0,1 % HBr (elueringsløsning B2) ga dårlig utbytte mens 0,6 % HBr (elueringsløsning C1) ga tilnærmet samme utbytte som 1,2 % HBr (elueringsløsning A1). Vi valgte likevel å prøve 0,5 %

HBr. Ved oppkonsentrering av eluatet (inndamping) vil også HBr konsentrasjonen øke noe som igjen vil føre til stor belastning på GC'en. For å få et eluat der fosfonsyrene var mest mulig konsentrert, ønsket vi å se om gjenfinningen varierte med variasjon i elueringsmengden. Elueringsmengde ble variert fra 2,5 ml til 1,5 ml. Det ble brukt 500 mg kolonner og prøvevolum (vannløsning 1) påsatt var 100 ml. Det ble tatt ut 500 µl av hvert eluat og IS ble satt til før derivatisering og analyse på GC.

6.2.2 Resultater og diskusjon

Elueringsmengde	% gjenfinning ± standardavvik		
	EMPA	IPMPA	PMPA
2,5 ml 0,5 % HBr	91 ± 4,8	129 ± 6,7	31 ± 1,2
2 ml 0,5 % HBr	84 ± 1,1	119 ± 2,3	29 ± 2,0
1,5 ml 0,5 % HBr	65 ± 3,3	116 ± 3,4	29 ± 1,3

Tabell 6.2 *Hvordan elueringsmengden har innvirkning på gjenfinningsprosenten av EMPA, IPMPA og PMPA fra 500 mg kolonner*

Som tabell 6.2 viser, er gjenfinningen av EMPA lavere ved elueringsmengde på 1,5 ml enn ved elueringsmengde på 2 og 2,5 ml ved samme HBr-konsentrasjon. For IPMPA ser ikke disse elueringsmengdene ut til å ha noen større betydning. Gjenfinning av PMPA var mye lavere enn sammenlignet med tidligere forsøk. Forsøket ble gjentatt med elueringsvolumet på 2 ml og ved å øke HBr-konsentrasjonen. Resultatet av dette forsøket er gitt i tabell 6.3.

Konsentrasjon HBr	% gjenfinning ± standardavvik		
	EMPA	IPMPA	PMPA
2 ml 1 % HBr	82 ± 2,7	85 ± 2,1	80 ± 0,2
2 ml 1,2 % HBr *)	83	85	79

Tabell 6.3 *Gjenfinningsprosenten ± standardavvik av EMPA, IPMPA og PMPA med 1 og 1,2 % HBr i eluenten fra 500 mg kolonner*
*) basert på to prøver

Ved å øke konsentrasjonen av HBr fra 0,5 % til 1%, økte også utbyttet av PMPA. Selv om tidligere forsøk har vist at 0,6 % av HBr ga et bra resultat, kan denne konsentrasjonen ligge i grenseland for et godt utbytte.

6.3 Kvantifiseringsgrense

6.3.1 Forsøksoppbygging

For å se om lave konsentrasjoner lot seg kvantifisere og om gjenfinningen varierte med synkende konsentrasjon, ble vannprøver med en bestemt mengde av EMPA, IPMPA og PMPA fortynnet og påsatt 500 mg SAX-kolonner. Det ble satt på 100 ml av hver vannprøve og kolonnene ble eluert med 2 ml MeOH med 1 % HBr. Det ble tatt ut 500 µl av hvert eluat og tilsatt IS før metylering.

6.3.2 Resultater og diskusjon

De laveste konsentrasjonene som ble påsatt var for EMPA og PMPA 70 ng/ml og for IPMPA 100 ng/ml. Fosfonsyrene lot seg kvantifisere med et relativt standardavvik mindre enn 10 % ved konsentrasjoner på 70 ng/ml for EMPA, 90 ng/ml for PMPA og 100 ng/ml for IPMPA. Prøver med konsentrasjoner under 0,7 µg/ml som tilsvarer påsatt mengde omtrent 70 µg for EMPA og PMPA og 112 µg for IPMPA (tabell 6.4), vil gi en avtagende gjenfinningsprosent.

Fosfonsyre	Påsatt (µg)	Målt (µg) ± std avik	Gjenfinning (%)± std avik
EMPA	360	264 ± 2,9	74 ± 3,2
	180	132 ± 2,7	73 ± 5,9
	72	56 *)	75 *)
	36	20 ± 0,6	59 ± 7,1
	18	12 ± 0,2	59 ± 4,6
	7,2	3,6 ± 0,1	42 ± 3,9
IPMPA	560	424 ± 3,8	76 ± 2,7
	280	216 ± 3,8	77 ± 5,4
	112	88 *)	79 *)
	56	35,6 ± 1,0	63 ± 7,2
	28	17,6 ± 0,6	62 ± 8,3
	11	3,6 ± 0,1	27 ± 2,5
PMPA	350	264 ± 3,8	76 ± 4,3
	175	132 ± 3,8	75 ± 8,7
	70	52 *)	76 *)
	35	24 ± 0,6	63 ± 6,5
	18	12 ± 0,2	60 ± 4,8
	7	-	-

Tabell 6.4 Gjenfinningsprosenten ± standardavvik for EMPA, IPMPA og PMPA ved forskjellige konsentrasjon i vannløsning

*) basert på to prøver

-) ikke detektert

7 KONKLUSJON

Det viste seg at metylering av syrene EMPA, IPMPA og PMPA med diazometan, og separering av de aktuelle fosfonatene på GC, er mulig selv om eluatet er et surt miljø.

Metodeutviklingen viser at SAX-kolonnen er best egnet for ekstraksjon av metylfosfonsyrene. Av de to testede elueringsmidlene er det HBr som gir best resultat. Konsentrasjonen av HBr-løsningen må minimum være 0,6 % i MeOH. Den optimale mengden av de undersøkte vannvolumene gjennom en 100 mg SAX-kolonne, viste seg å være 10 ml, mens en 500 mg kolonne har god kapasitet for en vannprøve på 100 ml. Elueringsmengden for en 500 mg kolonne kan variere mellom 2 og 2,5 ml.

Der mengder av fosfonsyrene i vannprøver er under $0,7 \mu\text{g/ml}$ som tilsvarer rundt $70 \mu\text{g}$ påsatt, vil gjenfinningsprosenten avta. Med et relativt standardavvik mindre enn 10 %, lot fosfonsyrene seg kvantifisere ved konsentrasjoner under 100 ng/ml .

Metoden er meget robust med hensyn til variasjon av pH. Metoden er derimot mindre robust ovenfor saltmengden i vannet. Naturlige vannprøver vil på den annen side ikke ha så høye saltkonsentrasjoner som i disse forsøkene, så metoden vil fungere tilfredsstillende til verifikasjon av metylfosfonsyrer i vann.

APPENDIKS

A BRUKERVEILEDNING FOR MINI DIAZALD – DIAZOMETANGENERATOR

A.1 INNLEDNING OG SIKKERHETSREGLER

Diazometan (CH_2N_2) kan fremstilles fra *N*-methyl-*N*-nitroso-*p*-toluensulfonamid (Diazald). Diazald er irriterende for huden. Det er stabilt ved romtemperatur i minst ett år. For lengre lagringstid anbefales bruk av kjøleskap. Ved tilsats av base dannes det giftig diazometangass.

Det ønskede produktet diazometan er en gass ved romtemperatur (kokepunkt $-23\text{ }^\circ\text{C}$). Det er ekstremt giftig og kreftfremkallende. All mulig kontakt må derfor unngås.

Det skal benyttes **labfrakk, beskyttelsesbriller og hansker** (ikke engangshansker) ved tillaging av diazometan. Ved metylering med bruk av tillaget diazometan skal det også brukes labfrakk, beskyttelsesbriller og hansker (også engangshansker kan brukes her). Ved åpning av prøveglass med innhold av diazometan (gul farget) skal det brukes engangshansker.

Fremstilling og behandling av diazometan må kun skje i **godt ventilert avtrekk**. Det skal manuelt kontrolleres at avtrekket suger skikkelig, at lampene for at avtrekket står på lyser samt at avtrekket er satt til å gi alarm ved for lav luftgjennomstrømning. Avtrekksluken skal være så langt nede som mulig. Ved alarm, strømbrudd eller hvis avtrekket suger for dårlig må rommet forlates og døra lukkes hvis diazometan står åpent til luft. Ingen andre enn de som skal bruke diazometan skal bruke avtrekket mens diazometan lages eller står på is i avtrekket. Avtrekket skal merkes med at giftig forsøk pågår.

Generatoren må vaskes separat. Glassutstyret må ikke få riper. Hvis generatoren får riper skal den ikke benyttes. Den må da byttes ut med en ny. Det er viktig å kun benytte feilfritt glassutstyr under fremstilling av diazometan fordi **skarpe flater kan føre til eksplosjon**. Det må heller ikke benyttes glassutstyr med slip. Unntaket er sliputstyr med klare flater (Clear Seal Joints). For å unngå skarpe flater må det heller ikke benyttes løsningsmidler som fryser og danner krystaller. Alt annet glassutstyr (f eks glassrør) må brennes med en gassflamme for å fjerne skarpe kanter før utstyret kan tas i bruk ("firepolishing"). Det vises forøvrig til "Verneinstruks for arbeid med giftige stoffer ved Forsvarets forskningsinstitutt, Avdeling for miljøtoksikologi".

Av sikkerhetsgrunner skal **IKKE** fremstilt diazometan lagres på annen måte enn på is i avtrekk. Diazometan må **IKKE** oppbevares i fryser i rom på grunn av fare for avdamping.

Ikke-benyttet diazometan skal destrueres samme dag.

A.2 UTSTYR

A.2.1 Glassutstyr

Aldrich Mini Diazald generator, Z10,889-8
 Aldrich Rundkolbe 100 ml m/Clear Seal Joints, Z10,035-8
 Aldrich Skilletrakt 250 ml, m/teflon krane og Clear Seal Joints, Z10,038-2

A.2.2 Kjemikalier og løsninger

Diazald , Aldrich D2,800-0
 Ethanol, 96%
 Kaliumhydroksid
 Destillert ionebyttet vann
 Dietyleter
 Tørris/acetone
 Natriumklorid

Kaliumhydroksidløsning lages ved å løse 5 g KOH i 8 ml destillert ionebyttet vann og tilsette etanol (96%, 10 ml).

Diazaldløsning lages ved å løse Diazald (5.0 g, 23 mmol) i dietyleter (45 ml).

NaCl/is bad lages ved å blande NaCl og is. 33 g NaCl i 100 g is gir en temperatur på $-21,3\text{ }^{\circ}\text{C}$.

A.3 FREMSTILLING

Fremstillingsmetoden følger AL-180 for fremstilling av en eterløsning med innhold av alkohol (se Litteratur). For skjematisk oppsett av apparaturen, se denne.

Dewar kjøleren fylles med tørris og deretter med acetone inntil kjøleren er ca en tredjedel full. Deretter tilsettes kaliumhydroksidløsningen til reaksjonsbeholderen. Det festes en 100 ml rundkolbe (med Clear Seal Joints) til kjøleren. Denne senkes ned i et isbad. Av sikkerhetsmessige grunner skal det benyttes en eterfelle (2 ml) på sidearmen over rundkolben. Denne eterfellen skal kjøles ned med et NaCl/is bad. NB! Glassrøret må være "firepolished".

En skilletrakt (med Clear Seal Joints) plasseres på reaksjonsbeholderen og fylles med Diazaldløsningen. Reaksjonsbeholderen med innhold varmes til $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ ved hjelp av et vannbad. Deretter tilsettes Diazaldløsningen over 20 minutter. Destillasjonshastigheten skal være tilnærmet lik tilsetningshastigheten. Om nødvendig etterfylles det med tørris/acetone. Etter at alt Diazald har blitt oppbrukt tilsettes det 10 ml eter. Fortsett destillasjonen til destillatet er fargeløst. Eteren i rundkolben vil nå inneholde ca. 700 mg (17.6 mmol) diazometan.

En prosedyre for fremstilling av en alkoholfri eterløsning av diazometan er gitt i AL-180 og gir tilsvarende utbytte som prosedyren over.

Fremstilt diazometan i rundkolben oppbevares på is i avtrekk inntil bruk. **Det er ekstremt viktig at diazometan hele tiden er avkjølt med et isbad, også etter at fremstillingen er ferdig.**

Etter bruk skal ubenyttet diazometan destrueres med fortynnet eddiksyre. Løsningen er holdbar i én dag.

A.4 LITTERATUR

Aldrich Technical Information Bulletin, AL-180: Diazald, MNNG and Diazomethane Generators.

Black T H (1983): The Preparation and Reactions of Diazomethane, *Aldrichimica Acta*, **16**, 3.

Verneinstruks for arbeid med giftige stoffer ved Forsvarets forskningsinstitutt, Avdeling for miljøtoksikologi, Kjeller 1 februar 1995.

Litteratur

- (1) Hansen L-L, Kalfjøs H T (2000): Ekstraksjon av fosfonsyrer fra vannfase ved hjelp av fast fase ekstraksjon. Hovedprosjekt for ingeniørutdanningen ved Høgskolen i Oslo.
- (2) Tørnes J Aa, Opstad Aa M (1996): Research report on verification of the chemical weapons convention-part XIII. Evaluation of Recommended Operating Procedures for Sampling and Analysis, FFI/RAPPORT-96/05379, Forsvarets forskningsinstitutt, Offentlig tilgjengelig.
- (3) Greibrokk T, Lundanes E, Rasmussen K E (1998, 3 utg): Kromatografi, Universitetsforlaget, Oslo, 60-80,109-154, 275-288.
- (4) Simpson N, Van Horne K C (1993): Varian Sample Preparation Products, Handbook for sorbent extraction technology.
- (5) Tørnes J Aa, Johnsen B A (1989): Gas chromatographic determination of methylphosphonic acids by methylation with trimethylphenylammonium hydroxide, *Journal of Chromatography* **467**, 129-138.
- (6) Tørnes J Aa, Opstad Aa M, Johnsen, B A (1991): Use of solid-phase extraction in determination of chemical warfare agents. Part I: Evaluation of the Solid-Phase Extraction Technique , *Intern J Environ Anal Chem* **44**, 209-225.
- (7) Hansen L-L, Kalfjøs H T (1999): Prosjektrapporter i Instrumentell Analyse, del nr 2, Høgskolen i Oslo.

FORDELINGSLISTE

FFIBM **Dato:** 25 august 2000

RAPPORTTYPE (KRYSS AV) <input checked="" type="checkbox"/> RAPP <input type="checkbox"/> NOTAT <input type="checkbox"/> RR	RAPPORT NR. 2000/04310	REFERANSE FFIBM/757/138	RAPPORTENS DATO 1 september 2000
RAPPORTENS BESKYTTELSESGRAD UGRADERT		ANTALL EKS UTSTEDT 50	ANTALL SIDER 30
RAPPORTENS TITTEL EKSTRAKSJON AV FOSFONSYRER FRA VANNFASE VED HJELP AV FAST FASE EKSTRAKSJON		FORFATTER(E) HANSEN Lise-Lotte, KALFJØS Hélen Therese, OPSTAD Aase Mari, RØEN Bent Tore, TØRNES John Aasulf	
FORDELING GODKJENT AV FORSKNINGSSJEF:		FORDELING GODKJENT AV AVDELINGSSJEF:	

EKSTERN FORDELING

INTERN FORDELING

ANTALL	EKS NR	TIL	ANTALL	EKS NR	TIL
1		FABCS	14		FFI-Bibl
1		v/Maj Per Ballangrud	1		Adm direktør/stabssjef
1		v/Maj Åge Rolland	1		FFIE
1		FO/HST	1		FFISYS
1		v/Maj Arne Helling	3		FFIBM
1		FO/LST/BFI	1		Leif Haldor Bjerkeseth, FFIBM
1		v/Maj James R Kristiansen	1		Odd Busmundrud, FFIBM
1		KNM T/HAS	1		Monica Endregard, FFIBM
1		v/Kapt lt Arne Søyland	1		Hans Christian Gran, FFIBM
1		SFK	1		Fatima Hussain, FFIBM
1		v/Lt Geir Sætre	1		Bjørn Arne Johnsen, FFIBM
1		HFK	2		Aase Mari Opstad, FFIBM
1		v/Kapt Bård O Nilsen	1		Bjørn Pedersen, FFIBM
1		LFK	2		Bent Tore Røen, FFIBM
1		v/Maj Even Mølmshaug	1		John Aasulf Tørnes, FFIBM
1		VETINSP			FFI-veven
1		Lise Lotte Hansen Grenseveien 9D 0571 Oslo			
1		Hélen Therese Kalfjøs Garder 1540 Vestby 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.