



FOI MEMO

Projekt/Project

Sidnr/Page no

Kemisk analys av hotämnen

1 (10)

Projektnummer/Project no Kund/Customer

A403820

Försvarsmakten

FoT-område

Handläggare/Our reference

Anders Östin

Datum/Date

2020-03-26

Memo nummer/number

FOI Memo 7222

Analys av kemiska stridsmedelsrester med högupplösande masspektrometri (2016)

Johanna Qvarnström, Anders Östin

FOI MEMO	Datum/Date 2020-03-26	Sida/Page 2 (10)
Titel/Title Analys av kemiska stridsmedelsrester med LC-HRMS		Memo nummer/number FOI Memo 7222

1 Inledning

Vid andra världskrigets slut fanns det stora outnyttjade lager av kemisk ammunition. Enligt Potsdamfördraget skulle Tyskland avvärmas och dess kemvapen inkorporerades i segrarmakternas egen förmåga eller förstördes. Flera metoder för destruering testades med resultatet att större delen av de beslagtagna kemiska vapnen dumpades i Östersjön och Skagerack. Kemvapen som dumpades var senapsgas, arsinolja, Clark I & II, Adamsit, α -kloracetofenon, fosgen, tabun och kvävesenapsgas. Genom att dumpa vapnen på havsbotten förväntades problemen med den kemiska ammunitionen försvinna. Men eftersom det har visat sig att en del av de aktiva ämnena finns kvar på dumpningsplatserna samt att även deras nedbrytningsprodukter skulle kunna ha negativ inverkan på miljön, så utgör de fortfarande ett hot, t. ex. i de fall då vapendelar tas upp ur haven. Denna problematik har studerats i flera forskningsprojekt som exempelvis MERCW, CHEMSEA, MODUM och DIAMON. Dessa vapen omfattas inte av kemvapenkonventionen om kemiska vapen (som trädde i kraft 29 april, 1997) eftersom denna konvention inte omfattar material som grävdes ned före 1977 eller dumpades i havet före 1985 (www.opcw.org). Dumpning av farligt avfall, inklusive kemiska och konventionella vapen, har varit en metod för bortskaffande fram till att Londonkonventionen (1972) trädde i kraft (1975) och "Londonprotokollet" från 1996, som trädde i kraft 2006 (www.imo.org). Inom partnership for peace NATO-projekt "Towards the Monitoring of the Dumped Munitions Threat" (MODUM) så arbetades det fram ett förslag på långsiktig övervakning av dumpade kemiska stridsmedel i Östersjön. Avsikten är att genom regelbundna inspektioner följa händelseförloppet för nedbrytning och läckage från det dumpade materialet och se om otillbörlig aktivitet förekommit i området. Inom ramen för detta testas autonoma undervattensfarkoster (AUV) för att exakt lokalisera sänkta skepp och dumpade objekt med sonarteknik. Dessa AUV-operationer följs av inspektioner med Remote Operated Vehicles (ROV) för att observera förändringar över tid. För att observera läckage av dumpade kemikalier behöver man vid intressanta objekt ta prover av sediment med riktade provtagningsmetoder.

För att uppskatta ett läckage från dumpade vapen krävs omfattande spårämnesanalyser som inkluderar det verksamma stridsmedlet, potentiella nedbrytningsprodukter och tillsatser samt bakteriella metaboliter [1]. Tillämpat på dumpade kemiska stridsmedel innebär detta att omkring trettio olika ämnen används för att påvisa spår av dumpat materiel i sediment som omger dumpade objekt. Vid tidigare undersökningar av dumpningsområden har aktiv senapsgas påvisats i pg/g sediment (torrvikt) nivåer medan dess nedbrytningsprodukter, tillsatser och hydrolysisprodukter som kräkämnen och tångaser påvisats i ng- μ g/g sediment (torrvikt)-nivåer. Vid dagens analyser används en kombination av metoder som baseras på gas- och vätskekromatografi kombinerat med tandem-masspektrometri för att erhålla den känslighet och selektivitet som krävs. Med detta metodval så kommer endast riktade analyser på i förväg valda ämnen att genomföras.

Högupplösande masspektrometri (HRMS) är ett verktyg för exakt massbestämning av ett ämne med en sådan noggrannhet att dess elementära sammansättning kan beräknas. Den senaste tekniska utvecklingen har lett till användarvänlig robust instrumentering med tillräcklig känslighet för att även kunna tillämpas för att identifiera mycket låga halter (spårämnesanalys) [2, 3]. Med denna teknik så kan den önskade selektiviteten erhållas genom hög massnoggrannhet, där dessutom fördelen mot tandem masspektrometri då blir att fler och

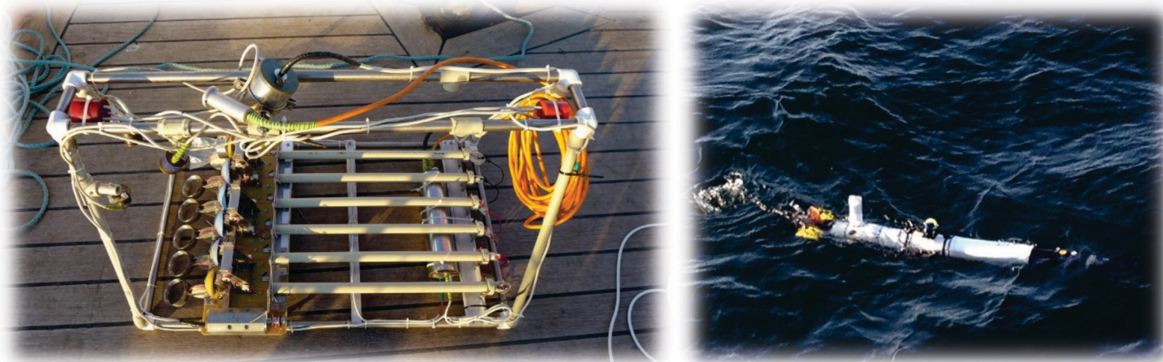
FOI MEMO	Datum/Date 2020-03-26	Sida/Page 3 (10)
Titel/Title Analys av kemiska stridsmedelsrester med LC-HRMS		Memo nummer/number FOI Memo 7222

även oförutsedda komponenter i prover kommer att bestämmas vilket har den fördelen att den möjliggör retrospektiv utvärdering, för att identifiera tidigare oförutsedda ämnen.

I detta arbete har vi med UHPLC–HRMS (ultra high performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry) analyserat autentiskt material, inhämtat från dumpningsplatser av kemisk ammunition från andra världskriget. Resultatet är att denna typ av screeninganalys visat sig ha likvärdig känslighet och selektivitet jämfört med tidigare dokumenterad [1] riktad UHPLC-tandem-masspektrometri analys, UHPLC-MS/MS.

2 Provtagning

Provtagning i projektet MODUM utfördes från forskningsfartyget R/V Oceania som tillhör ”Institute of Oceanology of the Polish Academy of Science” (IOPAS, Polen) vid Bornholmsdjupet 17-29 mars 2015. Delar av dumpningsområdet kartlagdes med sidoscannade sonar med en autonom undervattensfarkost (Iver 2). Vid intressanta objekt togs prover på bottensediment för analys med avseende på rester av dumpade kemiska stridsmedel. Dessa prover togs med en egenutvecklad manuellt manövrerad kassettprovtagare av representanter från ”Shirshov Institute of Oceanology of the Russian Academy of Sciences” (IORAS, Ryssland). Referensprover togs med GEMAX eller van Veen provtagare av IOPAS, enligt metodologi från CHEMSEA [1].



Figur 1 (A) Provtagare för sex stycken sediment prover. Provet samlas i påsar fästa i metallringarna på vänster sida genom att ”skopa” 250 mL av det översta sedimentlagret. (B) Autonom undervattensfarkost som användes under projektet.

2.1 Tandem eller högupplösande masspektrometri?

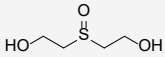
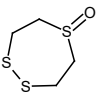
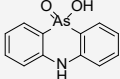
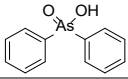
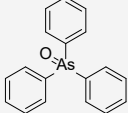
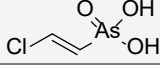
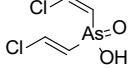
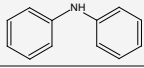
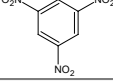
I EU-projektet CHEMSEA upparbetades och dokumenterades metoder och resultat för extrahering och analys av sedimentprover från kemvapendumpningsområden i Östersjön [1, 4, 5]. Extraheringsmetoderna utvecklades med avseende att extrahera ut kemiska stridsmedel och explosivämnen ur sedimentproverna (se lista över ämnen i tabell 1 nedan). Med UHPLC-MS/MS analyserades främst arsenikbaserade ämnen som Adamsit (DM) och Clark-tårgaser (DA), tillsatser till senapsgas som arsinolja (PDCA, DA och TPA) och Lewisit samt explosivämnen, medan senapsgasprodukter analyseras med GC-MS tekniker. För att jämföra analysteknikerna upparbetades nya uttag från CHEMSEA-projektets sedimentprover på samma sätt som tidigare men analyserades istället med högupplösande masspektrometri, UHPLC-HRMS. Kvantifieringsgränserna, (LOQ), för riktade UHPLC-MS/MS-analyser har tidigare beräknats till 1-8 µg/kg torrsvikt [1]. På samma sätt bestämdes kvantifieringsgränserna

FOI MEMO	Datum/Date 2020-03-26	Sida/Page 4 (10)
Titel/Title Analys av kemiska stridsmedelsrester med LC-HRMS		Memo nummer/number FOI Memo 7222

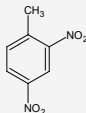
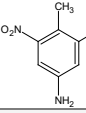
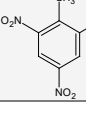
för UHPLC-HRMS och de har visat sig vara likvärdiga för de två teknikerna, se exempel i tabell 1 nedan. I tabellen listas även rekommenderad joniseringsteknik, positiv elektropray-jonisering, +ESI, alternativt negativ jonisering, -APCI. Arsenikinhållande substanser analyseras i oxiderad form, därför behöver väteperoxid tillsättas till prov före analys. Kvantifieringsgräns, LOQ, i sedimentextrakt är beräknat som µg/kg torrsvikt. Analyserna visar följaktligen likvärdiga resultat mellan de två olika teknikerna vad gäller både känslighet och selektivitet för sökta ämnen vid analys av autentiska prover (tabell 2).

Då fullscan-analys med UHPLC-HRMS har visat samma prestanda som riktad analys med UHPLC-MS/MS att kunna verifiera spårmängder av nedbrytningsprodukter från kemiska stridsmedel i havssediment kan båda teknikerna användas för detta ändamål

Tabell 1. Substanser aktuella i CHEMSEA-projektet, analyserade med UHPL-HRMS, beskrivningar och beräknade kvantifieringsgränser.

Namn CAS nummer		Struktur	Beskrivning	Joniserings- teknik	LOQ (µg/kg torrsvikt)
Tiodiglykol sulfoxid 3085-45-8	TDGox		Oxiderad nedbrytningsprodukt av senapsgas	+ESI	15
Oxiderad 1,2,5-tritiepan 22809-86-5	TTPox		Oxiderad nedbrytningsprodukt av senapsgas	+ESI	Ej beräknad
5,10-Dihydrofenoarsazin-10-ol 10-oxid 4733-19-1	DMox		Oxiderad produkt av Adamsite	+ESI	3
Difenylarsinsyra 4656-80-8	DAox		Oxiderad produkt av Clark I och Clark II	+ESI	2
Trifenylarsinoxid 1153-05-5	TPAox		Oxiderad produkt av triphenylarsin: komponent i arsinolja	+ESI	1
Fenylarsinsyra 98-05-5	PDCAox		Oxiderad produkt av phenyl-dikloroarsin	+ESI	1
2-klorvinylarsinsyra 64038-44-4	L1ox		Oxiderad produkt av Lewisit I	+ESI	9
Bis(2-klorvinyl)arsinsyra 157184-21-9	L2ox		Oxiderad produkt av Lewisit II	+ESI	3
Difenylamin 122-39-4	DPA		Stabilisator i krut/explosivämnen	+ESI	Ej beräknad
1,3,5-trinitrobenzen 99-35-4	135-TNB		Nedbrytningsprodukt av TNT	-APCI	2
1,3-dinitrobenzen 99-65-0	13-DNB		Nedbrytningsprodukt av TNT	-APCI	3

FOI MEMO	Datum/Date 2020-03-26	Sida/Page 5 (10)
Titel/Title Analys av kemiska stridsmedelsrester med LC-HRMS		Memo nummer/number FOI Memo 7222

Namn CAS nummer		Struktur	Beskrivning	Joniserings- teknik	LOQ (µg/kg torrvikt)
2,4-dinitrotoluen 121-14-2	24-DNT		Nedbrytningsprodukt av TNT	-APCI	2
4-amino-2,6-dinitrotoluen 19406-51-0	4A26-DNT		Nedbrytningsprodukt av TNT	-APCI	2
Trinitrotoluen 118-96-7	TNT		Vanligt explosivämne i militär amunition	-APCI	3

Tabell 2. Jämförelse mellan resultat från analys av autentiska sedimentprover analyserade med LC-MS/MS och GC-MS i CHEMSEA-projektet och samma prover (men nya upparbetningar) analyserade med LC-HRMS. Notera att halten TPAox (HRMS) är jämförd med resultat från GC-MS analys av TPA eftersom TPAox ej analyserades med LC-MS/MS i CHEMSEA-projektet.

Provkod i projekt CHEMSEA	Koncentration av produkt i sediment (ng/g torr vikt)							
	DMox MS/MS	DMox HRMS	DAox MS/MS	DAox HRMS	PDCAox MS/MS	PDCAox HRMS	TPA GC-MS	TPAox HRMS
WH349/B13/2	4			2				1
WH349/B13/3	1385*	107	10	8		1		2
WH349/B13/8	3		3	2				3
1Apr13ROV			3	2				3
6Apr13ROV	51	18	452*	454*	1330*	953*	30	156
3Apr13BOX#	312*	174	1744*	833*	202*		1165	301
7Apr13ROV	5	3	5.1	11				31
17feb13			21	27	19			12
10Apr13ROV	11	4	196*	293*	19	22		175
13Apr13ROV			2	2				3
LOQ	1	3	2	2	7	1	6	1

* Kvantifiering efter extrapolering av standardkurvan >150 % av högsta standard.

Spårämngder av DPA detekterat.

Fullscan-analys med UHPLC-HRMS visar, vid jämförande analys gjord på CHEMSEA-prover, samma prestanda som riktad analys med UHPLC-MS/MS i att kunna verifiera spårämngder av nedbrytningsprodukter från kemiska stridsmedel. Fördelen med data från UHPLC-HRMS är att man även retrospektivt kan gå in i analysfilen och extrahera ut data från fler föreningar.

FOI MEMO	Datum/Date 2020-03-26	Sida/Page 6 (10)
Titel/Title Analys av kemiska stridsmedelsrester med LC-HRMS		Memo nummer/number FOI Memo 7222

2.2 Screening-analys med högupplösande masspektrometri

För att ytterligare utvärdera HRMS-tekniken har även sedimentextrakt från ytterligare ett projekt: MODUM analyserats. För att ytterligare utvärdera HRMS-tekniken har även sedimentextrakt från ytterligare ett projekt: MODUM, analyserats. I tabell 3 nedan ses exempel på substanser som identifierats i autentiska sedimentprov vid HRMS-screening-analyser. Vid HRMS bestäms molekyylvikten med sådan noggrannhet att en teoretisk beräkning av elementärsammansättning kan erhållas vilken vidare verifieras med isotopmönstret för molekylen. Denna bestämning kan vara tillräcklig för att identifiera förväntade ämnen i ett prov. Retentionstiden (RT) för UHPLC separationen i tabell 3 är inom 0,1 minuter jämfört med analys av en motsvarande standard. Den uppmätta molekyljönens massa (m/z) förväntas ligga inom 2 mDa från teoretiskt värde vilket motsvarar 7 ppm för en massa av 300 Da. Sigma i tabellen är ett värde som beskriver hur det uppmätta isotopmönstret överensstämmer med de teoretiska värdena. Värdet beräknas i mjukvaran som hör till instrumentet och presenteras som [milliSigma]. Ju lägre värde desto bättre överensstämmelse, ett värde under 20 anses vara tillförlitligt.

Tabell 3. Resultat från UHPLC-HRMS-analys av MODUM prov #12 och #7 som exempel på identifiering av misstänkta föreningar i havssediment

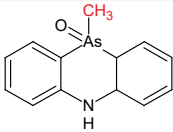
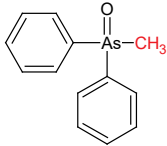
Substans	MODUM prov #	Uppmätt m/z	Avvikelse (ppm)	RT (min)	Molekyl-formel	milliSigma
DMox	12	276,0007	-2,3	2,7	C ₁₂ H ₁₁ AsNO ₂	1,2
DAox	12	263,0055	-2,7	2,9	C ₁₂ H ₁₂ AsO ₂	2,4
TPAox	12	323,0417	-1,6	3,2	C ₁₈ H ₁₆ AsO	8,6
PDCAox	12	202,9688	-2,0	0,9	C ₆ H ₈ AsO ₃	14,6
DPA	12	170,0963	0,6	3,7	C ₁₂ H ₁₂ N	7,1
TTPox	7	168,9814	-2,5	2,6	C ₄ H ₉ OS ₃	0,5

UHPLC-HRMS-tekniken kan även användas för att i efterhand söka efter molekyljoner för andra föreningar av potentiellt intresse. I denna studie genomfördes bl.a. sökningar i data efter oxiderad metylerad Adamsit (metDMox) och oxiderad metylerad Clark (metDAox)) eftersom man i litteraturen har påvisat att arsenikföreningar kan metyleras av marina organismer [6,7]. Dessa föreningars molekyljoner kunde påvisas i insamlat data. För att uppnå ett högre bevisvärde för dessa ämnen behöver man göra en andra analys där provet analyseras med HRMS-tandem masspektrometri, produktjonsanalys. Med detta menas att molekyljonen extraheras i första delen av instrumentet, och fragmenteras med kollisionsenergi, i detta fall, 30eV. Därefter analyseras fragmentjonerna och deras elementärsammansättning beräknas med hjälp av både hög massnoggrannhet och isotopmönster. Exempel på substanser som identifierats endast med hjälp av HRMS-screening med efterföljande produktjonsanalys visas i tabell 4. I prov #12 har och metylerade oxidationsprodukter av DM och DA identifierats.. Molekyljonen för respektive substans är markerad i fetstil och % känslighet för fragmenten jämfört med den jon med högst känslighet, Bp, är listat i tabellen nedan. För beräkning av elementärsammansättning i tabellen har både jämna samt udda joner övervägts, samt att största tillåtna avvikelse av massa begränsats till 5 mDa. Notera att produktjonsanalyserna här genomförts på autentiska sedimentprover med ng/g sediment (torrvikt)-halter av sökta föreningar. För att få ett rättsligt hållbart bevis bör syntetiserade standarder av de metylerade

FOI MEMO	Datum/Date 2020-03-26	Sida/Page 7 (10)
Titel/Title Analys av kemiska stridsmedelsrester med LC-HRMS		Memo nummer/number FOI Memo 7222

substanserna analyseras i samma analytiska system för att verifiera retentionstid, massbestämning och produktionsanalys.

Tabell 4. Nya föreningar identifierade genom HRMS-analys av prov från MODUM-projektet

Substans	Fragment joner, m/z	% av Bp	Beräknad elementarsammansättning
MetDMox 	274,0208	28,8	C ₁₃ H ₁₃ AsNO
	258,9970	10,1	C ₁₂ H ₁₀ AsNO
	241,9943	30,7	C ₁₂ H ₉ AsN
	167,0720	100	C ₁₂ H ₉ N
MetDAox 	261,0254	100	C ₁₃ H ₁₄ AsO
	227,9911	5,0	C ₁₂ H ₉ As
	226,9833	4,3	C ₁₂ H ₈ As
	168,9621	15,6	C ₆ H ₆ AsO
	154,0767	53,1	C ₁₂ H ₁₀

2.3 Applicering av metod

Vid kartläggning av dumpningsplatser med kemisk ammunition kan autonoma undervattensfarkoster användas för att få sonarbilder av havsbotten, se figur 2a och 2b. Med den nya provtagningstekniken som utvecklats inom MODUM kan riktad provtagning mot vrak och dumpade objekt genomföras med meternoggrannhet (vid dumpningsplatserna i Östersjön är havsdjupet cirka 100 meter). Vid efterföljande kemisk analys med UHPLC-HRMS kan bevis säkras med avseende på förekomst av substanser relaterade till Adamsit (DM), Clark (DA), arsinolja (PDCA, DA och TPA), senapsgas och explosivämnen. För ämnesgrupper relaterade till senapsgas behöver man dock kompletterande tekniker som GC-MS då dessa inte är lämpade för LC-MS analys. Resultatet för kemisk analys av MODUM-proverna finns beskrivna i bild 2c och tabell 5. Observera att halten metylerad produkt av DMox och DAox, metDMox respektive MetDAox, är skattad med antagandet att de vid analys har samma känslighet som DMox respektive DAox, eftersom referenssubstans ej fanns tillgänglig.

Vid HRMS-analys kan retrospektiv analys av insamlade data användas för att i efterhand upptäcka fler ämnen som är relevanta och därför bör inkluderas i slutbedömningen av ett prov.

Slutsatsen att HRMS att föredra framför MS/MS vid denna typ av analyser.

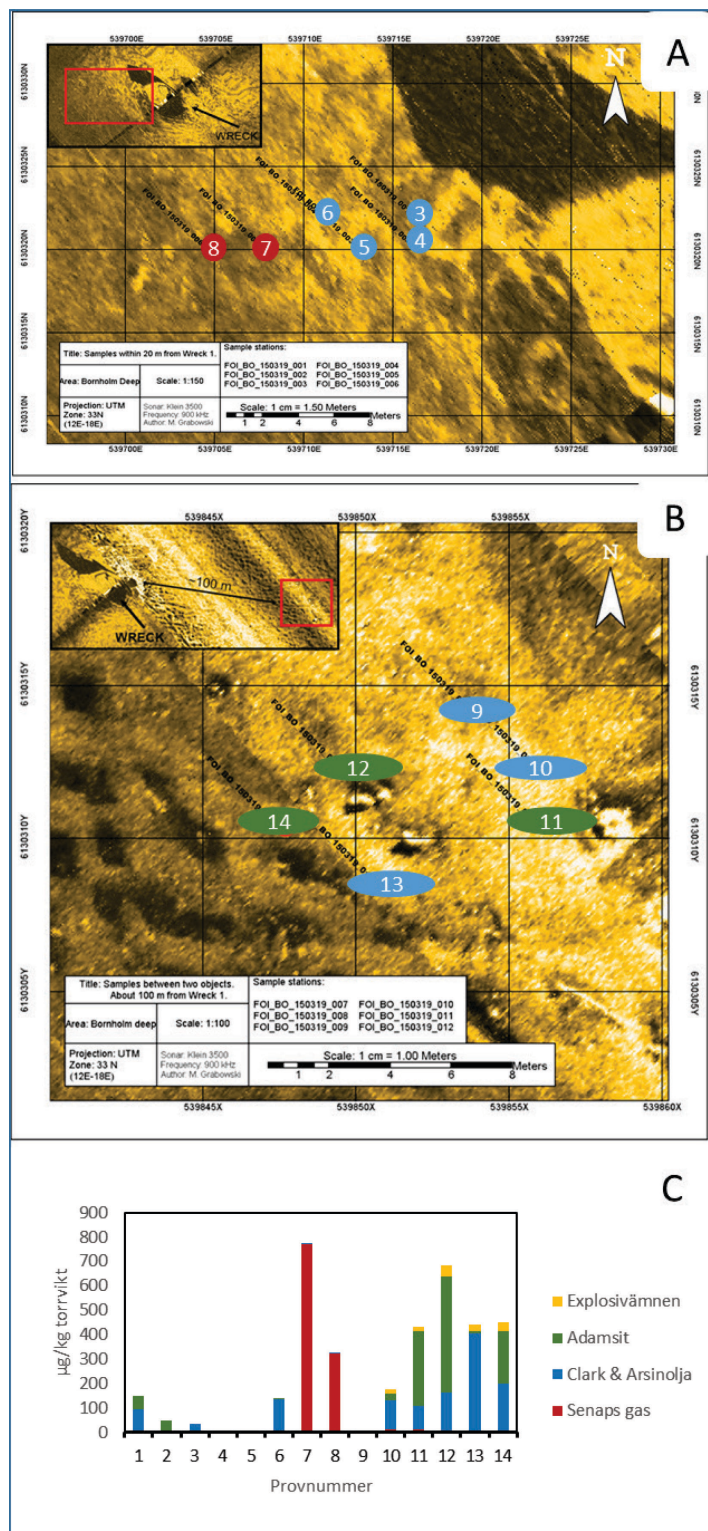
FOI MEMO	Datum/Date 2020-03-26	Sida/Page 8 (10)
Titel/Title Analys av kemiska stridsmedelsrester med LC-HRMS		Memo nummer/number FOI Memo 7222

Tabell 5. Koncentrationer (ng/g sediment torrvtikt) i prov från MODUM-projektet

MODUM Prov #	DAox	MetDAox	DMox	MetDMox	DPA	PDCAox	TPAox	TTPox
1	30	4	56	96		56	3	5
2	8	11	50	481*	13	40	8	4
3	20			3			15	
4				4			2	5
5								
6	62	27		8		65	5	4
7							1	771*
8								325*
9		3		12			2	
10	47	36	29	234	19	20	49	13
11	26	44	302*	233	19	26	43	13
12	33	60	473*	423*	44	42	84	4
13	102	33	11	282	24	3886*	37	5
14	22	36	218	297	35	147	23	5

*Kvantifiering efter extrapolering av standardkurvan.

FOI MEMO	Datum/Date 2020-03-26	Sida/Page 9 (10)
Titel/Title Analys av kemiska stridsmedelsrester med LC-HRMS		Memo nummer/number FOI Memo 7222



Figur 2. Sonarbilder tagna med AUV med provtagningspunkter utsatta vid vrak i Bornholms-djupet. **A)** 0-20 meter från vrak **1 B)** Objekt 100 meter från vrak **1 C)** Summan av uppmätta halter av nedbrytningsprodukter från respektive kemiskt stridsmedel och explosivämnen. Prov 1 & 2 är bakgrundsprover tagna 100 m från vrak och objekt (Sonarbild saknas)

FOI MEMO	Datum/Date 2020-03-26	Sida/Page 10 (10)
Titel/Title Analys av kemiska stridsmedelsrester med LC-HRMS		Memo nummer/number FOI Memo 7222

3 Referenser

- [1] J. Rattfelt Nyholm, Y. Nygren, J. Qvarnström, R. Berglind, A. Östin, Analysis of chemical warfare related compounds in sediment samples from the Baltic Sea performed at the Swedish Defence Research Institute in the CHEMSEA Project., in: FOI-D--0567--SE, FOI, Umeå, 2014.
- [2] J. Acena, S. Stampachiachiere, S. Perez, D. Barcelo, Advances in liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry for quantitative and qualitative environmental analysis, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 407 (2015) 6289-6299.
- [3] A.M. Knolhoff, T.R. Croley, Non-targeted screening approaches for contaminants and adulterants in food using liquid chromatography hyphenated to high resolution mass spectrometry, Journal of Chromatography A, 1428 (2016) 86-96.
- [4] E. Holmgren, S. Ek, A. Colmsjö, Extraction of explosives from soil followed by gas chromatography-mass spectrometry analysis with negative chemical ionization, Journal of Chromatography A, 1222 (2012) 109-115.
- [5] M. Söderström, WP3. Summary of chemical analysis of sediment samples, in, CHEMSEA Chemical Munitions search an assessment, www.chemsea.eu, 2014.
- [6] W.R. Cullen, Chemical Mechanism of Arsenic Biomethylation, Chemical Research in Toxicology, 27 (2014) 457-461.
- [7] H. Niemikoski, M. Söderström, H. Kiljunen, A. Östin, and P. Vanninen Identification of Degradation Products of Sea-Dumped Chemical Warfare Agent-Related Phenylarsenic Chemicals in Marine Sediment Analytical Chemistry 92 (2020) 4891-4899