

BACHELOROPPGAVE

BACHELOROPPGAVENS TITTEL	DATO
Ekspløsivanalyse av marin biota – metodeutvikling og optimalisering	25. mai 2022
	ANTALL SIDER / BILAG
	86/4
FORFATTERE	INTERN VEILEDER
Akshea Raviraj og Mathilde Vik	Per Ola Rønning

UTFØRT I SAMMARBEID MED	EKSTERN VEILEDER
Forsvarets forskningsinstitutt, FFI	Ragnhild Ueland

SAMMENDRAG
<p>De siste hundre årene ble store mengder ammunisjon dumpet på havbunnen, men vi vet lite om påvirkningen dette har på livet i havet. Analyse av eksplosiver i marin biota kan bidra til økt kunnskap deres påvirkning på marine systemer, og om de når mennesker gjennom matveien. FFI hadde en metode for opparbeiding av biologisk materiale for analyse av eksplosiver på UHPLC-MS, som viste seg å være tidkrevende og tungvint. Oppgavens hensikt var å videreutvikle og optimalisere FFIs metode, med mål om å korte ned på opparbeidingstid uten å redusere utbyttet. Det var også behov for å inkludere to eksplosiver, ETN og pikrinsyre, i FFIs eksisterende analysemetode. Det ble utviklet hurtigere metoder som ble benyttet til ulike optimaliseringsforsøk. Til slutt ble endelig metode utviklet. Den endelige metoden hadde en betydelig reduksjon i tids- og løsemiddelbruk, noe som resulterte i en kostnadsbesparelse på -89 %. Kapasiteten til opparbeidingsmetoden økte med 300 % for én gjennomgang. Gjenfinning av eksplosivene TNT, ISO TNT, ETN og PETN økte betydelig, der den største endringen var på 40 %. De resterende eksplosivene hadde relativt lik gjenfinning som original metode. Analysen viste god presisjon og riktighet, godt innenfor kravene på samt lave deteksjonsgrenser.</p>

Ekspløsiver
Optimalisering
Biologisk materiale

Forord

Denne oppgaven markerer avslutningen av bachelorgrad i bioteknologi- og kjemiingeniørutdanningen på Oslomet. Prosjektet ble utført ved Forsvarets forskningsinstitutt (FFI) fra januar 2022 til mai 2022.

Vi vil takke FFI for at vi fikk anledning til å utføre prosjektet vårt der, et prosjekt vi selv synes var veldig spennende. Vår største takk til vår eksterne veileder Ragnhild Ueland, som har gitt oss omstendelig opplæring og veiledning. Takk for alle hjelpsomme råd, og for at du fulgte oss rundt mens vi ventet på sikkerhetsklarering.

Vi vil også takke førsteamanuensis Per Ola Rønning ved OsloMet for hans hjelp med våre statistiske utfordringer og hans entusiasme for dette prosjektet.

Oslo, 25. mai 2022

Akshea Raviraj

Mathilde Vik

Innhold

Sammendrag	6
Liste over forkortelser og symboler	7
1 Introduksjon	8
1.1 Bakgrunn	8
1.2 Hensikt med oppgaven.....	8
2 Teori.....	10
2.1 Dumpet ammunisjon på havbunnen.....	10
2.1.1 Eksplosivers påvirkning på marine organismer	10
2.2 Utvalgte eksplosiver	11
2.2.1 Trinitrotoluen (TNT).....	12
2.2.2 4-amino-2,4-dinitrotoluen (4-ADNT).....	13
2.2.3 RDX	14
2.2.4 Trinitrofenol (pikrinsyre)	15
2.2.5 Pentaerytritol tetranitrat (PETN).....	16
2.2.6 Erytritol tetranitrat (ETN)	17
2.3 Prøveopparbeiding	18
2.3.1 Mikrobølgeekstraksjon	18
2.3.2 Vakuumsentrifugering for tørking av biologiske prøver	19
2.3.3 Opprensing av prøver	20
2.4 Analyse	22
2.4.1 Væskrokromatografi – UHPLC	22
2.4.2 Massespektrometri	24
2.4.3 Kvantitativ analyse	26
2.4.4 Validering.....	27
3 Materialer og metode	30
3.1 Utstyr.....	31
3.2 Kjemikalier	33
3.3 Utvikling av MS-metode for ETN og pikrinsyre	35
3.4 Preparering av spike-, IS- og kalibreringsløsninger	35
3.4.1 Spike-løsninger	35
3.4.2 IS-løsninger	35
3.4.3 Kalibreringsløsninger	36
3.4.4 Preparering til analyse.....	36
3.5 Analyse på UPLC-MS.....	36
3.6 FFI-metoden – opprinnelig prosedyre.....	38

3.6.1	Ekstraksjon	39
3.6.2	Sentrifugering og TurboVap	40
3.6.3	Opprensing på ENV+ fastfasekolonner.....	40
3.6.4	Sprøytefiltrering og inndamping	40
3.7	Hurtigmetoden – standard	40
3.7.1	Ekstraksjon	41
3.7.2	Sentrifugering og TurboVap	41
3.7.3	Opprensing på ENV+ fastfasekolonner.....	41
3.7.4	Sprøytefiltrering og inndamping	41
3.8	Nedskaleringsmetoden	42
3.8.1	Prøveopparbeiding og ekstraksjon.....	42
3.8.2	Sentrifugering og inndamping.....	42
3.8.3	Opprensing, filtrering og inndamping	42
3.9	Optimaliseringsforsøk	42
3.9.1	Opprensing på Captiva EMR Cartridges	43
3.9.2	Skylling av Captiva EMR Cartridges	43
3.9.3	Eksperimentelle prøver – Vanntilsetting før opprensing på ENV+ og faseskille	43
3.9.4	Vakuumsentrifugering.....	44
3.9.5	Inndamping.....	44
3.9.6	Raskere bruk av ENV+ kolonner	45
3.10	Valg, validering og kvantifisering av endelig metode.....	45
4	Resultater og diskusjon	48
4.1	Ioniseringsteknikk og valg av ioner	49
4.2	FFI-metode vs. Hurtig metode	50
4.3	Optimaliseringsforsøk	51
4.3.1	Opprensing på kolonne: Captiva vs. ENV+	51
4.3.2	Skylling av Captiva-kolonnen.....	53
4.3.3	Eksperimentelle prøver – Vanntilsetting før ENV+ og oppdeling av faseskille	55
4.3.4	Vakuumsentrifugering.....	59
4.3.5	Inndamping.....	61
4.3.6	Raskere bruk av ENV +.....	64
4.4	Valg, validering og kvantifisering av endelig metode.....	65
4.4.1	Effektivitet og kostnad	66
4.4.2	Ionesuppresjon.....	67
4.4.3	Gjenfinning av endelig og opprinnelig metode	68
4.4.4	Deteksjons- og kvantifiseringsgrenser	70

4.4.5	Metodens presisjon og riktighet	72
4.4.6	Resultat av reelle prøver	72
5	Konklusjon	74
5.1	Anbefalinger for videre arbeid	75
	Referanseliste	77
	Bilag	81
	Bilag A: Gjenfinningsverdier for FFI-metode og hurtigmetode.....	81
	Bilag B: Gjenfinningsverdier for de ulike optimaliseringsforsøkene	82
	Bilag C: Sammenlikning av gjenfinning for endelig metode.....	85
	Bilag D: Avvikstest for outliers i forsøk for Captiva uten skylling, skylleforsøk 1 og skylleforsøk 2 ..	86

Sammendrag

De siste hundre årene ble store mengder ammunisjon dumpet på havbunnen, men vi vet lite om påvirkningen dette har på livet i havet. Analyse av eksplosiver i marin biota kan bidra til økt kunnskap deres påvirkning på marine systemer, og om de når mennesker gjennom matveien. FFI hadde en metode for opparbeiding av biologisk materiale for analyse av eksplosiver på UHPLC-MS, som viste seg å være tidkrevende og tungvint. Oppgavens hensikt var å videreutvikle og optimalisere FFIs metode, med mål om å korte ned på opparbeidingstid uten å redusere utbyttet. Det var også behov for å inkludere to eksplosiver, ETN og pikrinsyre, i FFIs eksisterende analysemetode.

Det ble utviklet en hurtig versjon av FFIs opparbeidingsmetode, kalt hurtigmetoden. Metoden hadde vestenlig færre inndampings- og skylletrinn. Nedskalering av hurtigmetoden resulterte i ytterligere effektivisering. Flere optimaliseringsforsøk ble utført for å komme fram til endelig metode. En ny metode for fettopprensing testet, hvor prøvene ble filtrert på Captiva EMR Cartridges. Disse kolonnene ble inkludert i den endelige metoden, da de var vestenlig enklere i bruk enn de den opprinnelige metoden benyttet og ga gode resultater for gjenfinning. MS-metode for ETN og pikrinsyre ble utviklet i programvaren Intellistart. Det ble kjent at ETN er vanskelig å ionisere, mens pikrinsyre ioniseres svært lett og gir dermed godt signal.

Den endelige metoden hadde en betydelig reduksjon i tids- og løsemiddelbruk, noe som resulterte i en kostnadsbesparelse på -89 %. Kapasiteten til opparbeidingsmetoden økte med 300 % for én gjennomgang. Gjenfinning av eksplosivene TNT, ISO TNT, ETN og PETN økte betydelig, der den største endringen var på 40 %. De resterende eksplosivene hadde relativt lik gjenfinning som original metode. Analysen viste god presisjon og riktighet, godt innenfor kravene på ± 15 %, samt lave deteksjonsgrenser. Valideringsparametere kunne ikke regnes for TNT og ETN, da kalibreringskurvene måtte forkastes.

Liste over forkortelser og symboler

4-ADNT	4-amino-2,6-dinitrotoluen
DNP	Dinitrofenol
ETN	Erytritol tetranitrat
ESI	Elektronsprayionisasjon
FFI	Forsvarets forskningsinstitutt
HCl	Hydrogenklorid
HMX	Oktahydro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5,7-tetrazosin
LC	Liquid Chromatography
MAE	Microwave assisted extraction
MRM	Multiple Reaction Monitoring
MS	Massespektromer
Na ₂ SO ₄	Natriumsulfat
PETN	Pentaeritritryl tetranitrat
Pikrinsyre	Trinitrofenol
RDX	1,3,5-trinitro-1,3,5-triazin
SPE	Solid phase extraction
Tetryl	2,4,6-trinitrobenzen
TNB	1,3,5-trinitrobenzen
TNT	2,4,6-trinitrotoluen
UHPLC	Ultra High Pressure Liquid Chromatography

1 Introduksjon

1.1 Bakgrunn

Under og etter andre verdenskrig ble store mengder ammunisjon dumpet langs norskekysten. Det finnes i dag lite kunnskap om hvordan dette påvirker livet i havet og dermed mennesker gjennom matveien. Overvåkning av eksplosivutslipp har hovedsakelig forekommet i kjente dumpeområder, og har som regel blitt gjort sporadisk. Dette har primært blitt utført ved analyse av vann- og sedimentprøver. En undersøkelse av eksplosivers påvirkning på fisk og skalldyr, publisert av FFI i 2021, var den første større undersøkelsen på dette området. Analysene ble da utført av Eurofins TestAmerica (1). FFI har en egen metode for å opparbeide marint biologisk materiale til analyse på UHPLC men denne har ikke vært i bruk på rundt 10 år.

FFIs metode for å analysere eksplosiver på UHPLC-MS/MS er under kontinuerlig utvikling, og inkluderte ikke eksplosivene erytritol tetranitrat (ETN) og trinitrofenol (pikrinsyre). Det var derfor et behov for å undersøke disse forbindelsene og se om de kunne passe inn i den eksisterende kromatografiske metoden, samt utarbeide en metode for massespektrometrisk deteksjon.

1.2 Hensikt med oppgaven

Denne oppgaven har som mål å teste og optimalisere FFIs eksisterende opparbeidingsmetode for biologisk materiale. For å detektere eksplosiver i biologisk materiale, må forbindelsene ekstraheres og isoleres. Før analyse er det nødvendig med tilstrekkelig opprensing av ekstraktet, særlig med hensyn på fjerning av lipider og proteiner. Opparbeiding av biologisk materiale er en tidkrevende prosess. Effektivisering og nedskalering av metoden er derfor et sentralt mål i optimaliseringsprosessen. Opparbeidingsmetoden skal være en multimetode, det vil si at samme metode skal kunne brukes for å analysere flere, totalt 19, eksplosiver samtidig. Optimalisering av metoden må derfor gjøres med hensyn til dette. Det gjøres ved å se på seks eksplosiver som representerer tre ulike klasser av eksplosiver; nitroaminer, nitroaromater og nitratestere. Om metoden fungerer for disse, kan man anta at det samme vil gjelde for andre eksplosiver i samme klasse.

Oppgaven skal også undersøke eksplosivene ETN og pikrinsyre med hensikt å inkludere disse i FFIs eksisterende kromatografiske metode. Egen metode for massespektrometrisk deteksjon og kvantifisering av de to eksplosivene måtte også utvikles og implementeres i metoden. For å gjøre dette var det nødvendig å undersøke hvilke fragmenteringsmønstre som oppstår ved ionisering av ETN og pikrinsyre, og om de var gode nok til å benytte i kvantitativ analyse. Dette er mulig å gjøre ved å benytte multiple ion monitoring (MRM) på en trippelkvardupol MS.

2 Teori

2.1 Dumpet ammunisjon på havbunnen

Andre verdenskrig satt sine spor i Norge, også under vannoverflaten. I perioden under og etter krigen ble norskekysten utsatt for dumping av enorme mengder ammunisjon. Dette var den primære metoden for å kvitte seg med uønsket og ustabil ammunisjon, ikke bare i Norge, og pågikk helt fram til Oslokonvensjonen i 1972 (2). Ammunisjon inneholder mange ulike organiske og uorganiske forbindelser som kan være miljøfarlige (3, s.9). Begrepet ammunisjon omfatter et stort antall prosjektiler og våpen. Innholdet til de ulike ammunisjonstypene er ikke fullstendig kartlagt, men stoffene som er vanlig å bruke i ammunisjon er velkjent (3).

Det finnes enda ingen komplett oversikt over mengdene og stedene med dumpet ammunisjon. I 2018 lanserte FFI en karttjeneste hvor privatpersoner kan registrere dumpingsteder (4) . Det blir stadig oppdaget nye dumpingsteder som ikke er registrert. Karttjenesten har som oppgave å gjøre det enklere å melde fra om disse, samt gi en allment tilgjengelig oversikt. De største mengdene er antatt å være dumpet utenfor Finnmark. Utenom dette er det anslått at rundt 200 000 tonn ammunisjon ble dumpet i Norge. Havbunnen huser i tillegg hundrevis av skipsvrak som var lastet med ammunisjon, og titusenvis av resterende miner (1) En rekke skip ble også fylt med kjemisk ammunisjon og senket i Norskerenna utenfor Arendal (5).

Det er forventet at utslipp av eksplosiver kan bli et økende miljøproblem, da metallhylsene som rommer de eksplosive forbindelsene er utsatt for flere tiår med korrosjon (2).

Eksponering av saltvann kan i noen tilfeller øke sensitiviteten til noen eksplosiver, grunnet rekrystallisering og tap av stabilisatorer. Reaksjoner med korroderte metallhylser kan også danne sensitive metallderivater, som metallpikrater fra pikrinsyre (2).

2.1.1 Eksplosivers påvirkning på marine organismer

Eksplosivers påvirkning på terrestriske systemer og i ferskvann er bedre dokumentert og undersøkt, for eksempel via skyte- og øvingsfelt. Globalt er det liten kunnskap om eksplosive forbindelsers oppførsel i marine systemer, men det er kjent at de brytes ned gjennom en rekke biologiske mekanismer (2). Eksplosive organiske forbindelser har ofte cytotoxiske, mutagene

og karsinogene egenskaper, og har potensial for å akkumulere i organismer (2). I tillegg kan utgangsstoffer fra degradering noen ganger ha et høyere toksisk potensial enn forløperen (2).

2.2 Utvalgte eksplosiver

Et eksplosiv er en forbindelse som, ved raskt dekomponering, utvikler et stort volum varme og gass (3). Dekomponering initieres av termisk eller mekanisk sjokk. Avhengig av om reaksjonshastigheten er ekstremt eller nokså rask, kan eksplosiver defineres som et høy- eller laveksplosiv (6, s.33). Et laveksplosiv vil deflagrere, altså brenne intenst opp, men vil normalt ikke detonere. Høyeksplosiver kan både deflagrere og detonere. Ved detonasjon kan trykkbølger av høy temperatur spres med supersonisk hastighet og forårsake enorme skader (6, s. 33). Meget sensitive eksplosiver brukes ofte i fengsetter for å initiere detonasjon (6, s. 35).

Det finnes tre kjemiske hovedklasser av eksplosiver: uorganiske forbindelser, organiske forbindelser og blandinger av oksiderbare materialer (3). Denne oppgaven fokuserer på organiske eksplosiver. De organiske eksplosivene kan igjen deles inn i ulike subgrupper, basert på deres funksjonelle grupper. Blant vanlige eksplosive forbindelser finner man nitratestere, nitroaromater, nitroaminer, nitroforbindelser og metalliske derivater (3). De utvalgte eksplosivene representerer tre av disse gruppene, og er presentert i tabell 1. Utvalget er gjort med hensyn på at opparbeidingsmetoden skal utvikles som en multimetode. De valgte eksplosivene bør gi et tilnærmet representativt utvalg av eksplosivene i FFIs eksisterende metode. Det har også blitt tatt til betraktning at noen av de utvalgte eksplosivene er de mest brukte og de man vil forvente å finne. Pikrinsyre og ETN var eksplosiver vi fikk i oppgave å inkludere i FFI-metoden. Det ble også valgt et nedbrytningsprodukt av et bestemt eksplosiv, da det vil være relevant å se etter i biologiske prøver.

Tabell 1. De utvalgte eksplosivene for denne oppgaven og dets tilhørende klasse, funksjonell gruppe og type.

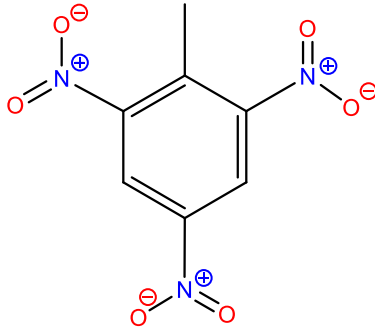
Eksplosiv	Klasse	Funksjonell gruppe	Type
TNT	Nitroaromat	-NO ₂	Eksplosiv
4-ADNT	Nitroaromat	-NO ₂	Nedbrytningsprodukt
RDX	Nitramin	-N(NO ₂)-R	Eksplosiv
Pikrinsyre	Nitroaromat/fenol	-NO ₂	Eksplosiv
PETN	Nitratester	-O-NO ₂	Eksplosiv
ETN	Nitratester	-O-NO ₂	Eksplosiv

2.2.1 Trinitrotoluen (TNT)

TNT er et av de mest kjente eksplosivene, og har ofte blitt brukt som standard for å måle andre stoffers eksplosive kraft (6, s. 42). Det har et lavt smeltepunkt og har en høy stabilitet og brukes derfor mye som eksplosiv i ammunisjon (7). Det ble først brukt under den russisk-japanske krig i 1905, og har blitt brukt i krigføring siden den gang (6, s. 43). Under andre verdenskrig var TNT et standard militært eksplosiv. TNT for militær bruk består av 2,4,6 – isomeren av trinitrotoluen og kan isoleres fra andre isomere forbindelser gjennom rekrytallisering av TNT-isomere (8, s.348). TNT ble ofte brukt i blanding med andre eksplosiver for å øke stabiliteten til andre kraftigere, mer sensitive eksplosiver (6, s. 43). TNT er både enkelt og billig å lage, og produksjonen er relativt sikker og gir høyt utbytte (7). I dag er det sjeldent brukt i våpenindustrien, og det er ikke lengre TNT produksjon i Europa (8, s.349).

TNT gir mange toksikologiske effekter hos mennesker, eksempelvis levertoksisitet og nevrotoksisitet (3). TNT kan brytes ned til et stort antall stoffer gjennom oppløsning, fotodegradering og biologiske prosesser (3). I vann er fotolyse den primære nedbrytningsfaktoren, men dette oppstår i liten grad på dybder over 10 meter, hvor ammunisjonen som oftest er dumpet (3). TNT er relativt stabilt i sjøvann og hydrolyseres i liten grad. Anaerob nedbrytning reduserer TNT til diaminonitrotoluen (DANT), via 4-amino-2,6-dinitrotoluen (4-ADNT) og 2-amino-4,6-dinitrotoluen (4-ADNT) (3). Bioakkumulering av TNT i fisk virker å være lav, men høyere for nedbrytningsproduktene (2). TNT er relativt toksisk for marine organismer, tydelig adferdsforandringer er observert hos fisken ørekyte ved nivåer på 0,46 mg/L (3). TNTs struktur, fysiske og kjemiske egenskaper er vist i tabell 2.

Tabell 2. TNTs struktur og utvalgte fysiske og kjemiske egenskaper.

Struktur	
Empirisk formel	C ₇ H ₅ N ₃ O ₆ (8)
Molekylvekt	227.1 g/mol (8)
Tetthet	1.654 g/cm ³ (8)
Smeltepunkt	81 °C (8)
Deflagrasjonspunkt	300 °C (8)
Løselighet i vann ved 25 °C	0,15 g/l (7)
Løselighet i acetonitril ved 25 °C	~ 1500 g/l (7)
Log P	2,2 (3)
Fysisk forekomst	En svakt gul, krystallinsk substans og kan bli mer brun ved degradering (8)


2.2.2 4-amino-2,4-dinitrotoluen (4-ADNT)

4-ADNT er et av nedbrytningsproduktene til TNT. Under anaerobe forhold vil mikroorganismer kunne omdanne TNT til 2-ADNT og 4-ADNT ved å redusere nitrogruppen til en aminogruppe (7). Undersøkelse av mennesker og pattedyr i etterkant av eksponering for TNT har vist at det kun finnes spormengder av TNT i urinen, mens ADNT er av de metabolittene som dominerer. Dette resultatet kan oppfattes som at TNT raskt blir omdannet i kroppen til blant annet ADNT (7).

Det har også blitt gjort undersøkelser av biomarint materiale der det har blitt funnet spor av 4-ADNT, men ingen spor av 2-ADNT og TNT (9). Noen studier indikerer at ADNTer kan være mer toksisk enn TNT, men disse studiene er begrenset og manglende for marint miljø (7). For å få et helhetlig bilde av tilstedeværelsen av TNT, vil det derfor være viktig å inkludere

metabolitter som 4-ADNT i eksplosivanalyser av biologisk materiale. 4-ADNTs struktur, fysiske og kjemiske egenskaper er vist i tabell 3.

Tabell 3. 4-ADNTs struktur og utvalgte fysiske og kjemiske egenskaper

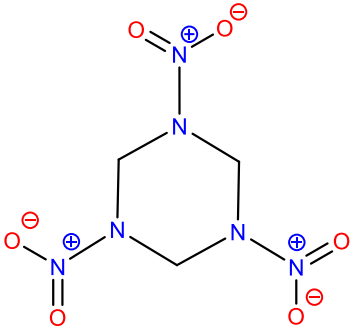
Struktur	
Empirisk formel	C ₇ H ₇ N ₃ O ₄ (10)
Molekylvekt	187,15 g/mol (10)
Tetthet	1,5 g/cm ³ (7)
Smeltepunkt	171-176 °C (7)
Løselighet i vann ved 25 °C	0,042 g/l (7)

2.2.3 RDX

RDX (Research Department eXplosive), også kalt hexogen, er et av de viktigste høyeksplosivene med en av de høyeste detonasjonsratene (6, s. 43) . Det er et viktig militært eksplosiv, siden det er kjemisk stabilt og et kraftigere sprengstoff enn TNT (7). Under andre verdenskrig ble RDX produsert i storskala, og ble ofte brukt i blanding med TNT som en «booster» (8, s.179).

Brekninger og mental forvirring har vært de mest markerte symptomene på RDX-forgiftning. RDX påvirker først og fremst nervesystemet, men det har også blitt observert skader i hud, øyne, nyrer og lever. Blant vannlevende organismer er RDX moderat giftig, mens nedbrytningsproduktene hydrazin og dimetylhydrazin er giftige (3). Anaerob nedbrytning avhenger av mikroorganismenes tilgang til næringsstoffer, aerob nedbrytning er ikke observert (3). Strukturen av RDX og noen fysiske og kjemiske egenskaper er plassert i tabell 4.

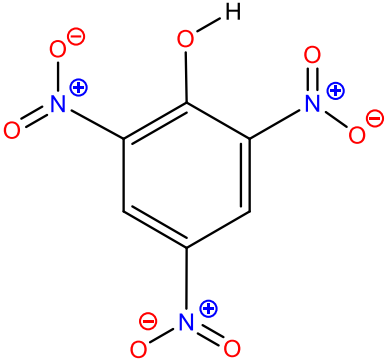
Tabell 4. Struktur og utvalgte fysiske og kjemiske egenskaper til RDX.

Struktur	
Empirisk formel	C ₃ H ₆ N ₆ O ₆ (8)
Molekylvekt	222.1 g/mol (8)
Tetthet	1.82 g/ cm ³ (8)
Smeltepunkt	204 °C (8)
Løselighet i vann ved 25 °C	0,060 g/l (7)
Løselighet i acetonitril ved 25 °C	55 g/l (7)
Log P	0,87 (3)
Fysisk forekomst	Hvit, hard krystallinsk forbindelse. (8)

2.2.4 Trinitrofenol (pikrinsyre)

Pikrinsyre er et kraftigere eksplosiv sammenliknet med TNT, både når det gjelder styrke og detonasjonshastighet (8, s.261). Fra 1880 årene til og med første verdenskrig ble pikrinsyre i stor grad tatt i bruk i granater. På grunn av dets høye følsomhet er pikrinsyre lite brukt i dag (3). Pikrinsyre er giftig, løselig i vann og lettløselig i alkohol, eter, benzen og aceton. På grunn av nitrogruppens elektronegativitet, er pikrinsyre surere enn fenol, og har en korrosiv effekt på metaller (8). Det har blitt sett at nedbrytningsproduktet 2,4-dinitrofenol kan gi subakutte effekter på lever og nyre hos mennesker (3). Hos vannlevende organismer er giftigheten moderat til lav. Et annet nedbrytningsprodukt, 2-amino-4,6-dinitrofenol, vil ved lave konsentrasjoner sammen med pikrinsyre gi blødning i buken hos fisk (3). Pikrinsyres struktur, fysiske og kjemiske egenskaper er vist i tabell 5.

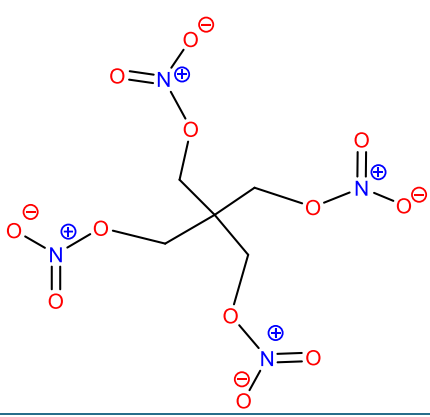
Tabell 5. Oversikt over struktur, fysiske og kjemiske egenskaper til pikrinsyre.

Struktur	
Empirisk formel	$C_6H_3N_3O_7$ (8)
Molekylvekt	229.1 g/mol (8)
Tetthet	1.767 g/ cm ³ (8)
Smeltepunkt	122 °C (8)
Deflagrasjonspunkt	300 °C (8)
Løselighet i vann ved 25 °C	12,7 g/l (3)
pKa ved 24 °C	0,42 (11)
Log P	1,33 (3)
Fysisk forekomst	Gule, vannløselige krystaller eller «nåler», er giftige med bitter smak (6, s. 43).

2.2.5 Pentaerytritol tetranitrat (PETN)

PETN er et av de kraftigste høyeksplosivene. På grunn av PETNs sensitivitet ble det ikke mye brukt før andre verdenskrig (6, s. 39). Sensitiviteten kan reduseres ved blanding med TNT, som kalles pentolitt, og har større eksplosiv kraft enn TNT alene. PETN blir ofte benyttet ublandet i fenghetter som en effektiv detonasjonslunte (3). PETN kan også bli bearbeidet til gelatinøse, industrielle eksplosiver, f.eks. for seismisk prospektering (8, s.252). PETN er veldig stabil, uløselig i vann, lite løselig i alkohol, eter og benzen, og løselig i aceton og metylacetat. Siden det ikke er løselig i vann vil det sannsynligvis bli liggende i området det ble dumpet. Ut fra den lave vannløselighet kan det antas at PETN ikke vil bioakkumuleres i akvatiske organismer (3). PETNs struktur, fysiske og kjemiske egenskaper er plassert i tabell 6.

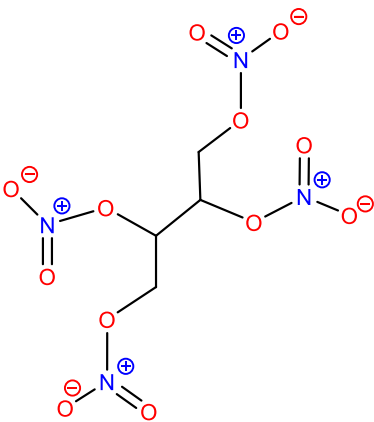
Tabell 6. Struktur, fysiske og kjemiske egenskaper til PETN.

Struktur	
Empirisk formel	C ₅ H ₈ N ₄ O ₁₂ (8)
Molekylvekt	316.1 g/mol (8)
Smeltepunkt	141.3 °C (8)
Tetthet	1.76 g/cm ³ (8)
Deflagrasjonspunkt	190 °C (8)
Løselighet i vann ved 25 °C	0,04 g/l (3)
Log P	1,61 (3)
Fysisk forekomst	Fargeløse krystaller (8)

2.2.6 Erytritol tetranitrat (ETN)

Ren ETN er mer sensitiv for slag og friksjon enn PETN (8, s. 125). ETN kan lages ved å løse erytritol i konsentrert salpetersyre, og deretter felle ut ETN med konsentrert svovelsyre (8, s.125). Økt bruk av erytritol som et kalorifritt søtningsmiddel, gjør substansen lett tilgjengelig. Grunnet enkel syntese og tilgjengelighet av erytritol, er ETN mye studert som et hjemmelaget eksplosiv (HME) (12). ETN er i noen grad løselig i vann, mens ved 20 °C er den like lite løselig som PETN (13). ETNs struktur, samt noen fysiske og kjemiske egenskaper er vist i tabell 7.

Tabell 7. Struktur, fysiske og kjemiske egenskaper til ETN.

Struktur	
Empirisk formel	C ₄ H ₆ N ₄ O ₁₂ (8)
Molekylvekt	302.1 g/mol (8)
Tetthet	1.6 g/cm ³ (8)
Smeltepunkt	61.5 °C (8)
Deflagrasjonspunkt	154-160 °C (8)
Løselighet i vann ved 20 °C	0,0302 g/L (13)
Log P	0,32 (14)
Fysisk forekomst	Fargeløse krystaller (8)

2.3 Prøveopparbeiding

Prøver foreligger sjeldent i en slik form at de kan analyseres direkte på analyseinstrumentet. Ved bruk av HPLC må det også påses at prøven etter endt prøveopparbeiding er i et løsemiddel som er blandbart med, og ikke har høyere løsemiddelstyrke, enn mobilfasen i HPLC. Det er derfor viktig å utføre en prøveopparbeiding, som er prosessen med å omforme prøven til en form som er passende for analysen (15, s. 655). Denne prosessen kan innebære ekstraksjon av analytt fra en kompleks matriks og oppkonsentrering av fortynnete prøver for å oppnå høy nok konsentrasjon slik at de er kvantifiserbare på analyseinstrumentet (16).

2.3.1 Mikrobølgeekstraksjon

Mikrobølgeekstraksjon er en utbredt teknikk der faste stoffer ekstraheres ved hjelp av oppvarming i mikrobølgeovn (16). Spesielle ekstraksjonsbeholdere, såkalte autoklaver,

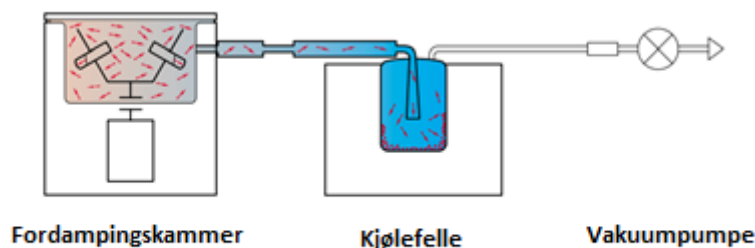
benyttes der materialet som skal ekstraheres overføres sammen med et egnet løsemiddel. I mikrobølgeovnen er det en karusell med plass til mange beholdere som gjør den egnet for ekstraksjon av flere paralleller samtidig. Autoklavene lukkes og plasseres i karusellen for ekstraksjon. Materialet til autoklavene er typisk mikrobølgetransparente som for eksempel kvartsglass, teflon eller andre liknende polymermaterialer (16).

I mikrobølgeovnen vil polare molekyler rette seg inn etter et oscillerende elektrisk felt og føre til en roterende bevegelse blant de polare molekylene. Rotasjonsbevegelsen fører til kollisjon og elektrisk tiltrekning/frastøting, og gjennom dette vil de polare molekylene kunne overføre energi til andre molekyler. Med andre ord vil både den potensielle og kinetiske energien til molekylene øke, der den kinetiske energien observeres som en temperaturøkning i materialet (16). Dette medfører en rask og effektiv oppvarming. Samtidig vil løsemiddelet kunne trenges effektivt inn i prøvematriksen ved hjelp av det moderat høye trykket og den høye temperaturen i ekstraksjonsbeholderen. Dette gir både korte ekstraksjonstider og høyt ekstraksjonsutbytte (16).

2.3.2 Vakuumsentrifugering for tørking av biologiske prøver

Vakuumsentrifugering er en teknikk som kan brukes til å tørke biologiske prøver og ligner metoder for frysetørring. En tørr prøve vil gi bedre ekstraksjon av analytter til organisk fase, da vannet vil hindre god løsemiddelkontakt med upolare organiske løsemiddel.

Vakuumsentrifugering kan utføres med for eksempel Savant SpeedVac. Dette er et instrument som består av en bordsentrifuge som påføres vakuum. Dette fører til en reduksjon i kokepunktet til løsemiddelet, for eksempel vann, og gir dermed en raskere fordampning av væsken. Jo mer væske prøven inneholder, desto mer tid kreves det for å utføre denne prosedyren. Sentrifugering blir benyttet for å hindre aerosoldannelse og støtkoking slik at det ikke blir tap av analytt (17). Systemet består generelt av tre hovedkomponenter: fordampingskammer, kjølefelle og vakuumpumpe (18). Se figur 1.



Figur 1. Skjematisk diagram av Savant SpeedVac system (18).

I praksis vil det benyttes en rotor som har forskjellige rørstørrelser for å imøtekomme forskjellige prøvestørrelser. Rotoren plasseres direkte i sentrifugen og utgjør fordampingskammer som er beskrevet i figur 1 (18). I kjølefellen vil det skje en kondensering og fjerning av dampet løsemiddel ved at løsemiddelet ledes inn i en glasskondensasjonskolbe og kondenserer på veggene. Dette forhindrer dampen i å forurense og potensielt skade den oljetette vakuumpumpen (19).

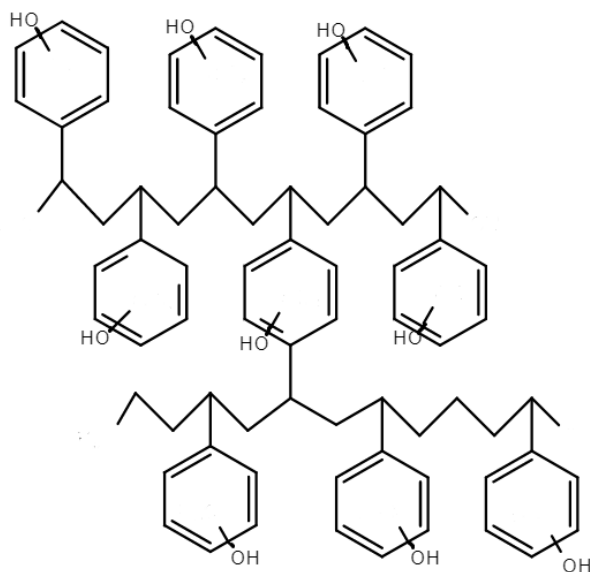
2.3.3 Opprensing av prøver

Kolonnene som blir benyttet i analyseinstrumentet er dyre og kan lett bli degradert av støv eller partikler i prøven eller i løsemiddelet. Filtrering av analyseprøvene før de fylles i vialer for en autosampler er en måte å unngå og introdusere partikulært materiale (15, s.671). For UHPLC er det nødvendig med en økt renslighet av prøvene (bedre filtrering) for å ivareta instrumentets ytelse. 0,2 μm er derfor et godt utgangspunkt for analyser med UHPLC (15, s. 670). For å få en ytterligere opprensing av analyttene kan flere teknikker kombineres i løpet av prøveopparbeidingsprosedyren (16).

2.3.3.1 Fastfase ekstraksjon (SPE)

Fastfase ekstraksjon er en teknikk som bygger på fordelingen av analytt mellom en væskefase og en fast fase, der den faste fasen er en adsorbent. Det kreves lite bruk av løsemiddel, og metoden er enkel og forholdsvis rask, der det er mulig å ekstrahere meget små mengder stoff. Fastfase ekstraksjon utføres i ekstraksjonskolonner som man kan få kjøpt ferdigprodusert for

de fleste applikasjoner (16). Eksempel på dette er ENV+ som kan benyttes for ekstraksjon av organiske forbindelser fra en vandig matriks ved hjelp av dets upolare sorbent (se figur 2) (20). Ofte benyttes silikabaserte adsorbenter i kolonnene, hvor ulike typer funksjonelle grupper er påsatt på partikkeloverflaten (16). I ENV+ er sorbenten innidlertid basert på polystyren.



Figur 2. ISOLUTE ENV+ kolonnemateriale.

En fastfase ekstraksjon utføres ved bruk av et overtrykksystem, slik at væskeprøven suges eller presses gjennom ekstraksjonskolonnen. Dersom mange prøver skal opparbeides kan en såkalt vakuummanifold benyttes, der ekstraksjonskolonnene monteres på inntaksventiler i manifoldens lokk. Undertrykk i selve manifolden kan oppnås med en vannstrålepumpe, og dermed kan væskeprøvene suges gjennom ekstraksjonskolonnene når ventilene i lokket åpnes. Prøverør som står i et stativ inne i manifolden vil kunne sample opp væske-fraksjonene fra hver kolonne (16). Ekstraksjonsprosessen består som regel av 3-4 trinn:

1. Stasjonærfasen kondisjoneres, slik at de funksjonelle gruppene blir tilgjengelig for interaksjon med analytt (16).
2. Prøven påsettes kolonnen, aktuelle analytter blir holdt igjen i kolonnen ved at de binder seg til stasjonærfasen. (16)

3. Om nødvendig, kan kolonnen vaskes for å fjerne forurensninger og matrikskomponenter som er svakt bundet til stasjonærfasen. Det er viktig å påse at vaskeløsningen ikke har for høy løsemiddelstyrke. (16)
4. Analyttene elueres fra stasjonærfasen med løsning av tilstrekkelig løsemiddelstyrke (16).

2.3.3.2 Lipidfiltrering

Det har blitt vist at fosfolipider utgjør en stor del av matrikseffekter i LC/MS/MS bioanalyser ved at de konkurrerer om plass på overflaten av dråper dannet under ESI-prosessen (21).

Denne oppgaven tester kolonner med filtermateriale spesielt tilpasset fjerning av lipider/matriks, kalt Captiva Enhanced Matrix Removal (Captiva EMR) – Lipid cartridges. Med bruk av denne kolonnen skal lipider kunne fjernes basert på størrelsesekskludering og hydrofobe interaksjoner mellom hydrokarbon-halen til lipidene og EMR-lipid-sorbenten. (21) Filtrering kan utføres med samme utstyr som for fastfase ekstraksjon: EMR-kolonnene plasseres på vakuumanifold med samlerør under, prøve påsettes og elueres med gravitasjon, før kolonnen tømmes med vakuum (21).

2.4 Analyse

2.4.1 Væskrokromatografi – UHPLC

Ultra-high-performance liquid chromatography (UHPLC) separerer analytter i en pakket kolonne ved å tvinge gjennom løsemiddel under høyt trykk (15, s. 668). Analyttene føres inn i kolonnen og binder til det stasjonære materialet, før de elueres ut med en væskeformig mobilfase av motsatt polaritet. Separasjonen skjer på grunnlag av analyttens affinitet til stasjonærfasen og deres løselighet i mobilfasen ved at analyttens likevektsfordeling mellom de to fasene bestemmer retensjonen i kolonnen.

Et UHPLC-instrument gir høyere oppløsning enn et HPLC-instrument, da det blant annet har mindre partikler i stasjonærfasen og opererer med høyere trykk. Mindre partikler gir høyere oppløsningsevne og reduserer analys tiden, men de øker motstanden til mobilfasestrømmen.

Derfor kreves det høyere trykk for å få mobilfasen gjennom kolonnen (15, s.669). For at et UHPLC-instrument skal få maks utbytte av fordelene det har over et HPLC-instrument, kreves det trangere kolonner og renere prøver. Mindre partikkelstørrelse, smalere kolonne og høyere strømningshastighet, bidrar til lavere deteksjonsgrenser, fordi prøven blir mindre utsatt for fortykning gjennom systemet (15, s. 669).

2.4.1.1 Stasjonær- og mobilfase

Væskekromatografi utføres for det meste som omvendt fase, hvor man benytter en upolar til svakt polar stasjonærfase, og en polar mobilfase for eluering. Elueringsprosessen kan skje isokratisk, med en konstant sammensetning av mobilfase (15, s. 676). Om isokratisk eluering ikke gir tilstrekkelig separasjon eller eluering, kan gradienteluering benyttes. Ved gradienteluering endres mobilfasesammensetningen underveis, ofte gjennom binære mobilfasesystemer, og danner en kontinuerlig eller trinnvis gradient (15, s.677). Slik kan man variere mobilfasens polaritet til sine kromatografiske behov; økt polaritet vil senke mobilfasestyrken i et omvendt fase system (15, s. 677). Som regel kalles det vandige løsemidlet for mobilfase A, og den organiske for mobilfase B.

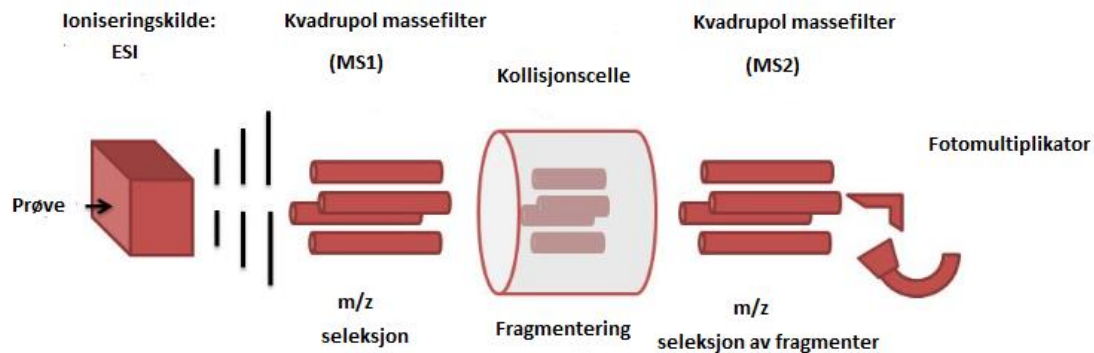
I dette arbeidet ble det benyttet en phenyl-kolonne som, i tillegg til hydrofobe egenskaper, har god affinitet til eksplosiver med aromatisk ring gjennom π -binding-interaksjoner.

Instrumentet har et binært mobilfasesystem, sammensetninger av vann og acetonitril ble benyttet og kjørt som gradient.

2.4.2 Massespektrometri

Massespektrometri (MS) er en mye brukt teknikk for identifisering og kvantifisering av molekyler. Molekylene forgasses og ioniseres før de blir separert i en masseanalysator ut fra deres forhold mellom masse og ladning (m/z) (22). De separerte ionene føres så til en detektor og et massespekter med m/z som funksjon av ionestrøm, kan konstrueres fra signalet.

Figur 3. Skjematisk oversikt av et massespektrometer med ESI ionekilde, trippelkvadrupol masseanalysator og fotomultiplikator detektor.



2.4.2.1 Elektrosprayionisasjon (ESI)

Når analyttene befinner seg i væskefase, som i tilfellet for UHPLC-analyse, må prøven forstøves og forgasses før den kan ioniseres. I en elektrosprayionekilde sprayeres væsken gjennom et tynt kapillær påsatt høy elektrisk spenning, og det dannes statiske ladninger på overflaten av væskedråpene i det de forlater kapillæret (23). En nitrogengasstrøm (nebulizing gas) konsentrert gjennom kapillæret gjør at væsken omdannes til en fin spray.

Sprayen møtes av enda en nitrogengasstrøm (desolvation gas) i elektrospraykammeret, som varmes og fordamper løsemidlene på overflaten av dråpene (23). Elektrospraykammeret er også påsatt et elektrisk felt, ved hjelp av en motelektrode plassert 0,2 -3 cm unna kapillæret

(22). Fordamping av løsemiddel og det sterke elektriske feltet danner små, ustabile dråper med høy elektrisk ladningstetthet på overflaten (22). Ionedannelse kan dermed skje ved at ionene fordamper fra dråpeoverflaten, eller at de frastøtende kreftene på overflaten blir så stor at dråpene «eksploderer» og frie ioner unnslipper til gassfasen (22).

Spenningsfeltet kan justeres til enten positiv eller negativ ladning, avhengig av om man vil analysere kationer eller anioner. I dette arbeidet har vi kun benyttet ESI i negativ modus (ESI⁻). Noen ulemper med ESI er at ionene må dannes i løsningen, samt at analyttene er mer utsatt for ionesuppresjon fra, for eksempel, salter i løsning eller mobilfase (23). For best mulig ionisering av analyttene i ESI⁻, bør analyttene ha en lavere pK_a-verdi enn pH i mobilfasen slik at likevekten skyves mot den deprotonerte formen eller være polare nok til å danne stabile addukt (23).

2.4.2.2 Masseanalysator – trippelkvadrupol

Etter prøven er ionisert, føres ionene videre inn i masseanalysatoren ved hjelp av et elektrisk felt. Trippelkvadrupolens oppgave er å filtrere utvalgte ioner for deteksjon, og er et utmerket redskap for kvantitativ analyse. Trippelkvadrupolen består av to selekterende transmisjonskvadrupoler, ofte kalt MS1 og MS2. Mellom MS1 og MS2 er det plassert en kollisjonscelle, som benyttes for å fragmentere ioner videre før de går inn i MS2. Grunnen til at det kalles en trippelkvadrupol, er at kollisjonscellen i tidlige konstruksjoner var en kvadrupol, men den kan også være bygget på andre måter, for eksempel som en oktapol (22).

En kvadrupol består av fire stavformede poler, som parvis er påsatt like elektriske potensialer. Spenningen består av et konstant likespenningspotential og en vekselspanning i radiofrekvensområdet, som danner et oscillerende elektrisk felt mellom polene (22). Når ionene føres inn i feltet, filtreres ionene med hensyn på deres masse/ladning-forhold (m/z). Feltet justeres slik at ionene med ønsket m/z får stabile oscillasjoner og passerer gjennom kvadrupolen, mens de resterende ionene får ustabile oscillasjoner og kastes ut. I trippelkvadrupolen utføres seleksjonen i to trinn, av MS1 og MS2, og kan gjøres for områder av m/z eller bestemte m/z . Selekterte ioner fra MS1 går først inn i kollisjonscellen, hvor de fragmenteres videre til datterioner, før de føres inn i MS2. Etter siste seleksjon i MS2 føres ionene inn i en detektor som tar opp massespekteret (22).

2.4.2.3 *Multiple Reaction monitoring – MRM*

Trippelkvadrupolen åpner for en verden av analysemetoder, med mulighet til å kombinere ulike seleksjonsteknikker i de to kvadrupolene. En mye brukt teknikk er multiple reaction monitoring (MRM), som tillater en meget selektiv og sensitiv analyse av analytter. MS1 filtrerer bestemte molekyllioner, som fragmenterer videre til ulike datterioner i kollisjonscellen. MS2 velger så ut datterionene som er spesifikk for utvalgt analytt. Seleksjonen foregår dermed på grunnlag av analyttens individuelle fragmenteringsmønstre, som gir et fingeravtrykk av analyttene (22).

2.4.2.4 *Fotomultiplikator*

Når de ønskede ionene er filtrert ut fra kvadrupolene, må de detekteres. En fotomultiplikator er en type detektor som baserer seg på forforescerens. Ionene ankommer detektoren fra masseanalysatoren, og treffer en konverteringsdynode som avgir elektroner i det ionene treffer. Elektronene treffer en fosforescerende skjerm, som avgir lys. Lysstyrken er proporsjonal med antall ioner som originalt traff konverteringsdynoden, og kan registreres ved hjelp av en lyssmåler (22).

2.4.3 *Kvantitativ analyse*

Kvantitativ analyse bestemmelsen av mengden eller konsentrasjonen av analytt i en prøve, og kan utføres og verifiseres gjennom en rekke ulike metoder.

2.4.3.1 *Internstandard (IS)*

En intern standard er en kjent forbindelse som er ulik, men oppfører seg likt som, analytten, og tilsettes prøven i kjent volum før opparbeiding. Tilsetting av IS er nyttig når det forekommer variasjon i responsen til instrumentet, tap av analytt under prøveopparbeiding eller ukjente volum- og masseendringer. Under antagelse om at analytt og IS går gjennom samme endringer under prøveopparbeiding, kan man beregne analytt-konsentrasjon fra signalene og tilsatt volum IS. En ideell IS er stabil og innehar samme kjemiske og fysiske egenskaper som analytten, men lar seg tydelig skille fra analyttsignalet (15, s. 109).

Isotopmerkede varianter av analytt innfrir alle krav for en god IS, men er ikke alltid tilgjengelig eller meget kostbare.

2.4.4 Validering

Validering av analysemetoder er nødvendig for å demonstrere at prosedyren samsvarer med analysens hensikt og gir pålitelige resultater. Valideringsparametere varierer mellom analysemetoder, men for en biologisk analyse trekkes følgende fram som de viktigste å kartlegge: selektivitet, kvantifiseringsgrense, linearitet, måleområde, presisjon, riktighet, matrikseffekter, stabilitet av analytter og intern standard i biologisk matriks og oppbevaring i løsning (24). Metodevalidering er tidkrevende, da parameterne ofte må beregnes fra flere replikaer/prøver eller ved gjentatte forsøk.

Hovedfokuset i denne oppgaven er metodeoptimalisering, men det ble også utført ett forsøk for å innhente data til beregning av aktuelle valideringsparametere for endelig metode.

2.4.4.1 Presisjon og riktighet

Analysers nøyaktighet bestemmes av to parametere kalt presisjon og riktighet. Riktigheten til en metode beskriver hvorvidt de beregnede konsentrasjonene stemmer overens med forventede konsentrasjoner. Minst 5 kontrollprøver spikes på 4 konsentrasjonsnivåer fordelt over kalibreringsområdet, ideelt sett fra en separat standardløsning (24). Riktigheten kan uttrykkes som relativ bias, ved å beregne prøvenes middelerverdi som relativt avvik fra forventet verdi. Relativ bias bør ikke være mer enn $\pm 15\%$.

Analysemetodens presisjon forteller hvor like målinger av prøver med samme konsentrasjon er. Presisjon kan beregnes fra samme målinger som for riktighet, men uttrykkes i form av spredning mellom kontrollprøver av samme nivå. Spredning oppgis som relativt standardavvik, og skal ikke overskride $\pm 15\%$ (24).

2.4.4.2 Deteksjons- og kvantifiseringsgrenser

Deteksjonsgrensen (LOD) er den minste mengden analytt som gir et signal som er signifikant annerledes fra signal fra en blindprøve (15). Selv om definisjonen er nokså tydelig, er estimering av LOD et diskusjonstema. Derfor finnes det flere ulike tilnærminger til å beregne LOD, som alle gir sin vri på definisjonen av LOD (25). Hver tilnærming kommer med sitt sett av statistiske utfordringer og fordeler, som man igjen må vurdere opp mot sine resultater. Beregning av LOD er et estimat, og må forstås og begrunnes for å ha en ordentlig verdi (26). I denne oppgaven benyttes tre ulike tilnærminger til beregning av deteksjonsgrenser:

1. LOD fra signal av blanke prøver

LOD defineres som et signal tre ganger høyere enn signal fra blanke prøver. Verdien omregnes til konsentrasjon ved hjelp av lineær kalibreringskurve tilpasset et lavt konsentrasjonsnivå.

$$LOD = \frac{\left(\frac{A_{\bar{b}}}{A_{\bar{IS}}} \cdot 3\right) - b}{a} \cdot C_{IS}$$

(1)

Der $A_{\bar{b}}$ er snitt av signal fra blanke, $A_{\bar{IS}}$ er snitt av signal fra IS, C_{IS} er konsentrasjonen av IS, b er skjæringspunkt og a er stigningstall.

2. LOD fra regresjonsanalyse av kalibreringskurven

LOD defineres som tre ganger standardavviket til signalverdiene i den lineære kalibreringskurven, delt på stigningstall (harris eller PO). Tilnærmingen forutsetter at signalverdiene i kalibreringskurven har en normalfordelt variasjon som reflekterer støyen i systemet.

$$LOD = \frac{3 \cdot S_y}{a}$$

(2)

Der S_y er standardavvik av y-verdier i kalibreringskurven og a er stigningstallet.

3. LOD fra signal/støy-forhold av kjent konsentrasjon

LOD defineres som konsentrasjonen hvor signal/støy-forholdet (S/N) er lik 3 (PO kilder), og beregnes ved å ekstrapolere fra kjent lav konsentrasjon og tilhørende S/N.

$$LOD = C_{kjent} \cdot \frac{3}{S/N_{kjent}}$$

(3)

Der C_{kjent} er kjent konsentrasjon og S/N_{kjent} er signal/støy-forholdet til toppen med kjent konsentrasjon.

Kvantifiseringsgrensen (LOQ) defineres som den laveste konsentrasjonen som kan detekteres og fortsatt møte krav for nøyaktighet. Kravene kan variere, dermed definisjonen av kvantifiseringsgrensen. Som en tommelfingerregel pleier LOQ å regnes med en faktor 10, der LOD regnes med faktor 3 (evt. 3,3). Det er derfor vanlig å regne LOQ ved å gange LOD med 3,3 (evt. 3), noe vi også har gjort i denne oppgaven. Slik estimeres LOQ som en konsentrasjon fra et signal som er 10 ganger større enn støyen i systemet.

2.4.4.3 Matrikseffekter

For massespektroskopiske metoder bør forekomst av matrikseffekter undersøkes (24). Ved analyse med MS kan det forekomme ionesuppresjon, hvor analyttionene nulles ut av et annet ion med motsatt ladning. Dette fører til at analyttionet ikke blir detektert. Ionesuppresjon kan blant annet motvirkes gjennom god kromatografisk separasjon og opprensing av prøve.

Ionesuppresjon kan beregnes ved å måle signalforholdet mellom en prøve med matriks og en prøve i ren løsning (24). En relativ reduksjon i signal indikerer forekomst av ionesuppresjon og matrikseffekter. Prøven med matriks må opparbeides som blank og spikes post opparbeiding. Ideelt bør testen føres ved å opparbeide prøver med matriks fra 6 individuelle kilder.

3 Materialer og metode

Utstyr som er benyttet i alle forsøk kan sees samlet i tabell 8 og en fortsettelse i tabell 9.

Tilsvarende presenteres kjemikalier benyttet i alle forsøk samlet i tabell 10. Standarder brukt for å lage SS-12 og IS-mix er presentert i tabell 11 og 12. I kapittel 3.3 bestemmes MS-metoden til pikrinsyre og ETN. 3.4 til 3.6 utgjør de ulike metodene benyttet for opparbeiding av fisk, mens forsøkene utført med mål om optimalisering av metodene er beskrevet under 3.6. Til slutt ble det utført en validering og kvantifisering av endelig metode (3.7). Alle prøver ble analysert med de samme analysebetingelsene som er beskrevet i kapittel 3.9.

3.1 Utstyr

Tabell 8. Samlet liste over utstyr som er brukt i alle forsøk..

Utstyr		
Utstyr	Produsent	Modell
Brosme		
Torsk kjøpt på butikk		
Pipette	Thermo Scientific	Finnpipette F2, 10-100 µl
	Labsystems 4500	Finnpipette, 40-200 µl
	Thermo Scientific	Finnpipette F2, 100-1000 µl
	Labsystems 4500	Finnpipette, 1-5 ml
	Thermo Scientific	Finnpipette F2, 1-10 ml
Pasteurpipette	VWR	150 mm og 230 mm
Milli Q vann	Merck Millipore	Advantage A10
Analysevekt	METTLER TOLEDO	AE260 Delta Range
	METTLER TOLEDO	AT260
Stavmikser	Sabor	Ultimate stavmikser 1000W
Mikrobølgeovn	CEM	Mars 6 One Touch Technologies
Teflonb	MarsXpress Vessel	
Sentrifuge,	Thermo Scientific	HEAREUS MULTIFUGE X1R centrifuge
Sentrifugeflasker av teflon		
Inndamper med nitrogengass og vannbad	Zymark	TurboVapp II concentration Workstation
Inndamper	Thermo Scientific	REACTI THERM II #TS-18824
Vakuumanifold	Supelco	Visiprep™, 12 port modell
Kolonne	Agilent Technologies	Agilent Captiva EMR – Lipid, 3 mL
	Biotage	Isolute ENV+, 6 ml

Tabell 9. Fortsettelse av tabell 8 med samlet liste over utstyr som er benyttet i alle forsøk.

Utstyr		
Utstyr	Produsent	Modell
Filter	Millipore	Millex Hydrophobic Fluoropore TM (PTFE) membran 0.45 µm
	Millipore	Millex Hydrophobic Fluoropore TM (PTFE) membran 0.25 µm
Kjøleskap	Liebherr	MediLine
Sprøyte	Henke Sass Wolf	Norm-Ject Luer 10 og 20 ml
12 ml klimaxrør		
2 ml vials	Agilent Technologies	
UHPLC instrument	Waters Acquity UHPLC	
<ul style="list-style-type: none"> UHPLC kolonne 	Acquity UHPLC BEH Phenyl, 2,1 x 100 mm, 1.7 µm partikkelstørrelse	
<ul style="list-style-type: none"> UHPLC Sample Manager 	Waters Acquity™ Ultra Performance LC	D11UPA941M
<ul style="list-style-type: none"> UHPLC Binary Solvent Manager 	Waters Acquity™ Ultra Performance LC	F11UPB165A
<ul style="list-style-type: none"> UHPLC PDA Detektor 	Waters Acquity™ Ultra Performance LC	D11UPD012A
MS	Waters Xevo TQ	VBA530
<ul style="list-style-type: none"> ESI ionekilde 		

3.2 Kjemikalier

Tabell 10. Samlet liste over kjemikalier brukt i alle forsøk.

Kjemikalier			
Kjemikalier	Formel	g/mol	Leverandør
HiPerSolv CHROMANORM	C_2H_3N	41.05	VWR Chemicals
Acetonitril, HPLC LC-MS Grade – suitable for UHPLC/UHPLC instruments (83640.320)			
Ammoniumacetat, for mass spectrometry, LiChropur™, eluent additive for LC-MS (73594-100G-F)	$CH_3CO_2NH_4$	77.08	SIGMA-ALDRICH
Natriumsulfat, ACS reagent, >= 99,0 %m anhydrous, pulver	Na_2SO_4	142.04	SIGMA-ADRICH

Tabell 11. Liste over eksplosivsstandardene som ble benyttet i spikeløsninger.

Eksplosivstandarder	
STANDARD	PRODUSENT
1,3-Dinitrobenzen, 1000 µg/ml i MeOH:AcCN (50:50)	Accustandard
1,3,5-Trinitrobenzen, 1000 µg/ml i MeOH:AcCN (50:50)	
2,4-Dinitrotoluen, 1000 µg/ml i MeOH:AcCN (50:50)	
2,6-Dinitrotoluen, 1000 µg/ml i MeOH:AcCN (50:50)	
4-Amino-2,6-dinitrotoluen, 1000 µg/ml i MeOH:AcCN (50:50)	
2-Amino-2,6-dinitrotoluen, 1000 µg/ml i MeOH:AcCN (50:50)	
HMX, 1000 µg/ml i MeOH:AcCN (50:50)	
PETN, 1000 µg/ml i metanol	
Pikrinsyre, 0,1 mg/ml i Acetonitril:metanol	
RDX, 1000 µg/ml i MeOH:AcCN (50:50)	
Tetryl, 1000 µg/ml i MeOH:AcCN (50:50)	
TNT, 1000 µg/ml i MeOH:AcCN (50:50)	

Tabell 12. Liste over interne standarder brukt i IS-mix.

Interne standarder (IS)	
STANDARD	PRODUSENT
1,3,5-trinitrobenzen (13C6, 99%), 1mg/ml i acetonitril	Cambridge Isotope Laboratories
2,4-DNT (Ring D3, 98 %), 1 mg/ml i acetonitrile-D3	
2,6-DNT (Methyl-D3, 98%), 1 mg/ml i acetonitril	
TNT Wtted W/>33% H2O WT_WT (2,4,6-Trinitrotoluen), (13C7, 99% 15n3, 98 %) 1 mg/ml i benzen	
DNP (2,4-Dinitrophenol), 1mg/ml i metanol-OD (Ring-D3, 98%) Inneholder 0,35 mg/ml D2O	
1,3-dinitrobenzen (13C6, 99%), 1 mg/ml i acetonitrile	

3.3 Utvikling av MS-metode for ETN og pikrinsyre

ETN og pikrinsyre skulle bli inkludert i FFIs eksisterende metode. For å utvikle en metode på massespektrometeret for disse eksplosivene ble de direkte injisert i massespektrometeret ved hjelp av en innbygd sprøyte. ISO DNP, en isotopmerket intern standard, ble også testet på tilsvarende måte som de nevnte eksplosivene, da denne ble valgt som intern standard for pikrinsyre. Den eneste strukturvariasjonen er at pikrinsyre har en ekstra nitrogruppe på karbon 6. Hensikten med direkte injiseringen var å få en indikasjon på ioniseringen av eksplosivene og IS og hvilke ioner som ble dannet. Med IntelliStart-programvaren og en manuell vurdering ble det utført en optimalisering av parametere.

3.4 Preparering av spike-, IS- og kalibreringsløsninger

Selv om oppgaven kun ser på 6 eksplosiver og, ønsket FFI å innhente data for flere eksplosiver og interne standarder. En spike-standard (SS-12) med 12 ulike eksplosiver, samt en blanding av 6 ulike interne standarder (IS-mix), ble dermed tillaget og benyttet i alle forsøkene. De ulike eksplosivene og interne standarder finnes i tabell 11 og 12 (3.2). Vi innhentet kun informasjon om utvalgte eksplosiver, samt ISO TNT som var IS for TNT, 4-ADNT, RDX, PETN og ETN, og ISO DNP som var IS for pikrinsyre.

3.4.1 Spike-løsninger

I SS-12 løsningen hadde alle standardene en konsentrasjon på 62,5 µl/ml bortsett fra pikrinsyre som hadde halvert konsentrasjon på 31,25 µl/ml. Fra SS-12 ble det laget en fortykning kalt SF-12, som ble brukt til å spike prøver. SF-12 hadde en konsentrasjon på 10 µl/ml for alle eksplosiver, utenom pikrinsyre som var 5 µl/ml. Det ble tillaget en ny SF-12 før alle forsøk.

3.4.2 IS-løsninger

I IS-mix hadde alle standardene en konsentrasjon på 100 µl/ml. En fortykning fra denne, IS-F, hadde en konsentrasjon på 10 µl/ml. IS-F ble benyttet i prøveopparbeidingen, og ny løsning ble tillaget til hvert forsøk.

3.4.3 Kalibreringsløsninger

8 kalibreringsløsninger ble laget fra SF-12, og benyttet i det siste forsøket (3.9).

Konsentrasjonene er oppgitt i tabell 13.

Tabell 13. Konsentrasjon av kalibreringsløsninger.

Kalibreringsløsning	Konsentrasjon, µg/mL
K-1	0,018
K-2	0,060
K-3	0,12
K-4	0,48
K-5	1,2
K-5	3,0
K-7	6,0
K-8	10

3.4.4 Preparering til analyse

Som hovedregel ble det preparert en gjenfinningsprøve i ren løsning (GF), en gjenfinningsprøve med opparbeidet matriks (BF-S) og en gjenfinningsprøve opparbeidet uten matriks (B-S).

GF: 100 µl SF-12, 100 µl IS-F og 800 µl acetonitril.

BF-S: 50 µl SF-12, 50 µl IS-F og 400 µl blank fiskeprøve.

B-S: 50 µl SF-12, 50 µl IS-F og 400 µl blank prøve uten fisk.

Ferdig opparbeidede prøver og gjenfinningsprøver ble fortynnet på følgende måte før de ble analysert på UPLC-MS: 150 µl prøve/gjenfinningsprøve og 850 µl Milli Q vann ble tilsatt brun UPLC vial og blandet godt.

3.5 Analyse på UPLC-MS

Alle opparbeidede prøver ble analysert UPLC-MS under samme betingelser og metode.

Analysebetingelser og gradientprogram på UPLC, er vist i tabell 14 og 15. Gradientprogram

startet ved injeksjon og kjørte lineært i 7,5 min, med 5 min seal wash. Analysebetingelser for ionekilde og MS er plassert i tabell 16.

Tabell 14. Flow, mobilfasesammensetning, injeksjonsvolum, kolonnetemperatur og sample temperatur benyttet i UPLC.

Parameter	
Flow	0,5 ml/min
Mobilfase A	98 % Milli Q vann 2 % acetonitril 5 mM ammoniumacetat
Mobilfase B	2 % Milli Q vann 98 % acetonitril 5 mM ammoniumacetat
Injeksjonsvolum	5 µL
Kolonnetemperatur	65 °C
Temperatur i Sample Manager	5 °C

Tabell 15. Gradientprogram benyttet ved i analyse på UPLC-MS.

Gradientprogram		
Tid (min)	% A	% B
Start	87	13
2,50	67	33
6,00	12	88
6,50	7	93
6,51	87	13
7,50	87	13

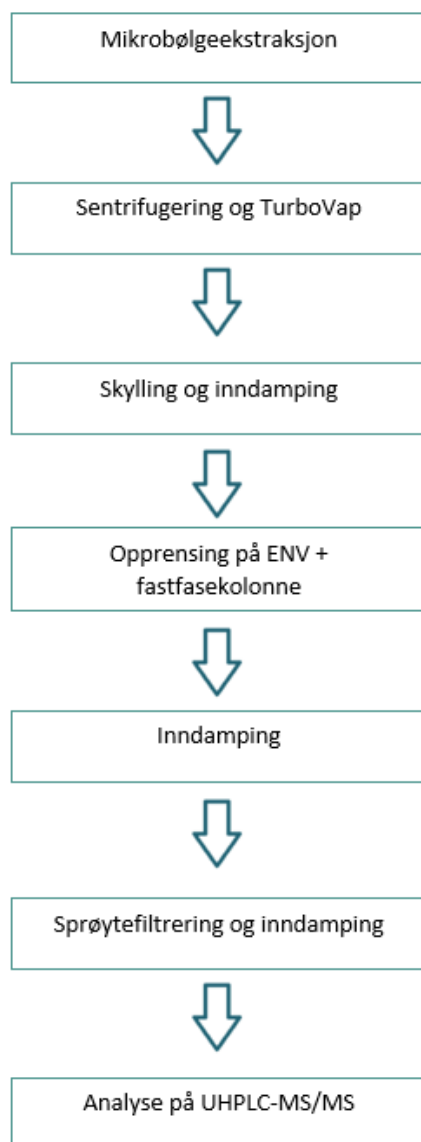
Tabell 16. En oversikt over ionekilde- og MS-parametere.

Parameter	Verdi med oppløsning fra DATO
Capillary	0,50 kV
Corona	15,0 μ A
Desolvation Temp	450 °C
Gas-Flow-Desolvation	1000 L/h
Gas Flow – Cone	50 L/h
LM Resolution 1	3,08
HM Resolution 1	14,61
Ion Energy 1	0,5
LM Resolution 2	2,88
HM Resolution 2	14,82
Ion Energy 2	0,8
Collision Gas Flow	0,15 mL/min
Collision	2

3.6 FFI-metoden – opprinnelig prosedyre

I dette kapittelet testes FFIs eksisterende prøveopparbeidingsmetode av fisk for å undersøke hvilke områder av prosedyren som eventuelt kan forbedres. Flytkjema av prosedyren er vist i figur 4.

FFI-metode



Figur 4. Flytskjema for FFIs metode for prøveopparbeiding av fisk som skal analyseres på UHPLC-MS/MS.

3.6.1 Ekstraksjon

10 g homogenisert torskefilet ble veid ut og overført til mikrobølgebeholder med 8 ml Milli Q vann. 100 µl IS-F ble tilsatt prøvebeholderen, etterfulgt av 20 g natriumsulfat (Na_2SO_4) som ble rørt inn. 100 µl SF-12 ble tilsatt i tillegg for de prøvene som skal spikes. Deretter ble 30 ml acetonitril rørt inn, lokket ble skrudd på og prøvene ble satt til ekstraksjon i

mikrobølgeovn. Prøvene ble ekstrahert ved 100 °C i 10 minutter, med en ramp time på 5 minutter. En temperaturprobe var plassert i den blanke fiskeprøven.

3.6.2 Sentrifugering og TurboVap

Prøvene ble så overført til 250 ml sentrifugerør av teflon, og mikrobølgebeholderne ble skylt med 3x10 ml acetonitril. Prøvene ble så sentrifugert ved air temp 4 °C i 10 minutter på 1500 rpm. Supernatanten ble helt over TurboVap inndampingsglass, og satt til inndamping på TurboVap med 60 °C vannbad og nitrogenstrøm med trykk på ca. 9 psi til væskemengden viste 1-2 ml. Deretter ble prøvene overført til 12 ml kimaxrør med pasteurpipette, og TurboVap-glasset ble skylt med 2 pasteurpipetter acetonitril.

3.6.3 Opprensing på ENV+ fastfasekolonner

Prøvene ble først dampet inn ved 45 °C med nitrogenstrøm, til ca. 2 ml. ENV+ fastfasekolonner ble plassert på en vakuummanifold med teflonsprøytespisser under. Kolonnene ble kondisjonert med 2x 2 ml acetonitril, prøvene ble påsatt og senket ned til rett over kolonnematerialet, før de ble skylt ut med 2x 3 ml + 2 ml acetonitril (totalt 8 ml i tre runder).

3.6.4 Sprøytefiltrering og inndamping

Prøvene ble igjen dampet inn til 1-2 ml ved 45 °C med nitrogenstrøm. 0,20 µm PTFE sprøytefilter ble kondisjonert med 2-3 ml acetonitril og festet på en 12 ml sprøyte hvor stempelet var tatt ut. Prøvene ble helt over på sprøyten, skylt ut med en pasteurpipette acetonitril og filtrert over på et nytt kimaxrør. Før de ble igjen dampet inn til 1 ml, fortynnet (3.4.4) og analysert på UPLC-MS (3.5).

3.7 Hurtigmetoden – standard

I dette kapitlet beskrives den første endrede versjonen av FFI-metoden (3.3). Metoden hadde mål om å korte tidsbruk for opparbeiding ved å kutte ned på inndampingstrinn og skyllesteg. Det ble også fokusert på å gjøre selve prøveopparbeidingen enklere ved å utføre trinnene før

mikrobølgeekstraksjon i et begerglass framfor å gjøre det direkte i mikrobølgebeholderne. Dette er referansemetoden for noen av optimaliseringsforsøkene beskrevet lengre ned.

3.7.1 Ekstraksjon

Det ble benyttet like mengder fisk, SF-12, IS-F og natriumsulfatsom i FFI-metoden, men det ble blandet sammen begerglass i stedet for mikrobølgebeholderne. Fisken ble overført til begerglasset med 4 ml Milli Q vann, spikeløsninger ble tilsatt og rørt. Natriumsulfat ble tilsatt og rørt inn, raskt etterfulgt av 30 ml acetonitril og ytterligere røring, for å unngå harde klumper. Blandingen ble overført til mikrobølgebeholderne, begerglassene ble skylt med 4 ml Milli Q vann og 4 ml acetonitril og rørt inn. Samme temperaturprogram ble benyttet under mikroekstraksjonen.

3.7.2 Sentrifugering og TurboVap

Ved overføring av prøve til sentrifugerør, ble det skylt som tidligere med 30 mL. Prøvene ble sentrifugert under samme betingelser som før. Supernatanten ble overført til TurboVap inndampingsglass med pipette og pasteurpipette, i stedet for å bli helt over. Inndamping på TurboVap var under samme betingelser som tidligere. Etter prøvene var overført til kimaxrør, ble TurboVap-glasset tilsatt 1 ml acetonitril. Dette ble brukt til å skylle veggene flere ganger ved hjelp av pasteurpipette før overføring til tilhørende kimaxrør.

3.7.3 Opprensing på ENV+ fastfasekolonner

Inndampingssteget før fastfaseekstraksjon ble utelatt. Kondisjonerte og påsatt prøve som tidligere, men det ble i stedet skylt med 2x 3,5 ml acetonitril (totalt 7 ml i stedet for 8 ml).

3.7.4 Sprøytefiltrering og inndamping

Inndampingssteget før filtrering ble også utelatt. Kondisjonering av filtre og filtrering foregikk som tidligere, men skyllesteg ved overføring til sprøyten ble droppet. Ved inndamping til 1 ml ble temperaturen økt til 60 °C. Prøvene ble deretter fortynnet og analysert på UPLC-MS (3.4.4 og 3.5).

3.8 Nedskaleringsmetoden

Det ble gjort en nedskalering av hurtigmetoden, som også ble benyttet i tre optimaliseringsforsøk.

3.8.1 Prøveopparbeiding og ekstraksjon

Mengden fiskeprøve og natriumsulfat ble redusert til henholdsvis 1 g og 2 g. Volum SF-12 og IS-F tilsatt var uendret. Fisken ble overført direkte til mikrobølgebeholderne, og 800 µl Milli Q vann, 100 µl SF-12 og 100 µl IS-F ble tilsatt og rørt inn. Natriumsulfat ble rørt inn, etterfulgt av 5 ml acetonitril og ekstraksjon i mikrobølgeovn. Temperaturprogrammet for ekstraksjon var uendret.

3.8.2 Sentrifugering og inndamping

Prøvene ble overført til 30 ml teflon sentrifugerør og mikrobeholderne ble skylt med 2x 1 ml acetonitril. Prøvene ble sentrifugert under samme betingelser som tidligere, bortsett fra at prøvene ble sentrifugert på 1800 rpm i stedet for 1500 rpm. Prøvene ble overført til kimaxrør med pipette og pasteurpipette. Deretter ble de dampet inn til 2 ml under samme betingelser som før med samme inndamper som ble brukt senere i prosessessen. Det var altså ikke nødvendig med TurboVap, som egner seg best til større volum.

3.8.3 Opprensing, filtrering og inndamping

Opprensing ble utført på ENV+, inndamping før og etter sprøytefiltrering ble gjort i henhold til hurtigmetoden (3.7.3, 3.7.4). Prøvene ble klargjort og analysert som beskrevet i 3.4.4 og 3.5.

3.9 Optimaliseringsforsøk

Dette kapitlet beskriver forsøkene som ble utført med mål om å optimalisere hurtigmetoden (3.7) og nedskaleringsmetoden (3.8).

3.9.1 Opprensing på Captiva EMR Cartridges

Kolonner/filtre spesifikt tilpasset for fettopprensning ble testet ut med hurtigmetoden (3.7). Prøvene ble ikke tilsatt IS-F ved starten av opparbeidingen ved et uhell. Etter prøvene var dampet inn til ca. 2 ml på TurboVap, ble de tilsatt 400 µl Milli Q vann og vortexet. Prøvene ble deretter påsatt Captiva-kolonner og trukket gjennom med vakuum. Øvrig prøveopparbeiding ble utført som beskrevet i hurtigmetoden.

3.9.2 Skylling av Captiva EMR Cartridges

Det ble utført to ulike forsøk på å skylle Captiva-kolonner etter prøveopprensingen.

Skyllforsøk 1: Prøvene ble tilsatt 400 µl Milli Q vann og opprenset på Captiva. Deretter ble det skylt med 2,5 ml + 0,5 ml acetonitril (to runder).

Skyllforsøk 2: Prøvene ble tilsatt 500 µl Milli Q vann og opprenset på Captiva. Kolonnen ble så skylt med 2,5 ml av en løsning med 20% Milli Q vann i acetonitril.

Øvrig opparbeiding utført i henhold til hurtigmetoden (3.7).

3.9.3 Eksperimentelle prøver – Vanntilsetting før opprensing på ENV+ og faseskille

Tre prøver ble brukt til å teste ut tre ulike endringer i prøveopparbeidingen. Prøvene ble opparbeidet i henhold til hurtigmetoden (3.7). Endringene ble utført etter TurboVap og før opprensing på ENV+. Det ble ikke opparbeidet en gjenfinningsprøve med matriks for de eksperimentelle prøvene.

3.9.3.1 Vanntilsetting før opprensing på ENV+

To av prøvene ble tilsatt vann før ENV+ opprensingen, den ene ble tilsatt 400 µl Milli Q vann (E1), mens den andre en pasteurpipette Milli Q vann som tilsvarer ca. 1 ml (E3). Etter tilsetting av vann ble det observert en melkeaktig farge i E1 og E3.

3.9.3.2 Faseskille

Etter TurboVap kunne man se to faser i prøvene der det var tydeligst i E2. Det ble derfor forsøkt å skille fasene i E2 fra hverandre. De to fasene fikk navn E2-1 som utgjorde den

øverste fasen, mens E2-2 utgjorde den nederste fasen. Fasene ble overført til hvert sitt nye kimaxrør og volumet ble justert opp til ca. 1 ml, og videre opparbeiding ble utført som før.

3.9.4 Vakuumsentrifugering

Vakuumsentrifugering er en teknikk som kan brukes til å tørke biologiske prøver. Dette forsøket ville undersøke en alternativ metode for å fjerne vann fra prøvene, slik at tilsetning av salt kan unngås.

Tint fiskeprøve ble overført til en liten glassbeholder, SF-12 og IS-F ble tilsatt og rørt inn. Prøvene ble vakuumsentrifugert ved laveste temperaturinnstilling til de var synlig tørre etter omtrent 6-7 timer. Den tørre fiskeprøven ble hakket lett opp med spatel og overført til et begerglass, glassbeholderen ble skylt med 10 ml acetonitril. Begerglasset ble tilsatt 20 ml acetonitril og rørt, før prøven ble overført til mikrobølgebeholder og skylt ut med 4 ml acetonitril. Prøvene ble deretter behandlet som beskrevet i hurtigmetoden (3.7).

3.9.5 Inndamping

Det ble utført tre ulike forsøk med variasjoner i inndampingstrinnene for å se hvorvidt det påvirker gjenfinningen.

3.9.5.1 Inndampingsforsøk 1: 45 °C

Alle inndampingstrinnene ble utført ved 45 °C i stedet for 60 °C, øvrige opparbeidingstrinn ble utført som i hurtigmetoden (3.7).

3.9.5.2 Inndampingsforsøk 2: Inndamping før sprøytefiltrering

Prøvene ble opparbeidet og opprenset som prøvene fra skylleforsøk 2 (3.9.2), men ble i tillegg dampet inn til ca. 1 ml før sprøytefiltrering. Filteret ble også skylt med 1 mL acetonitril for å få med de siste restene av analytt. Øvrig opparbeiding i henhold til hurtigmetoden (3.8).

3.9.5.3 Inndampingsforsøk 3: Ingen inndamping før opprensing på Captiva EMR Cartridges

Prøvene ble opparbeidet i henhold til nedskaleringsmetoden (3.8). Men ble opprenset på Captiva-kolonner uten å være inndampet først. Etter sentrifugering var supernatant rundt 6 ml, prøvene som hadde mindre volum ble justert opp med acetonitril. Så langt var det ikke observert noe utfelling. Prøvene ble tilsatt 1,5 ml vann og vortexet, før opprensing på Captiva-kolonner. Prøvene ble dratt gjennom med vakuum og ikke skylt ut.

3.9.6 Raskere bruk av ENV+ kolonner

Det ble gjort to forsøk på å benytte ENV+ kolonnene på en raskere måte, ved å droppe kondisjonering og skylning, slik man kan med Captiva EMR cartridges. Øvrig opparbeiding ble gjort i henhold til nedskaleringsmetoden (3.8).

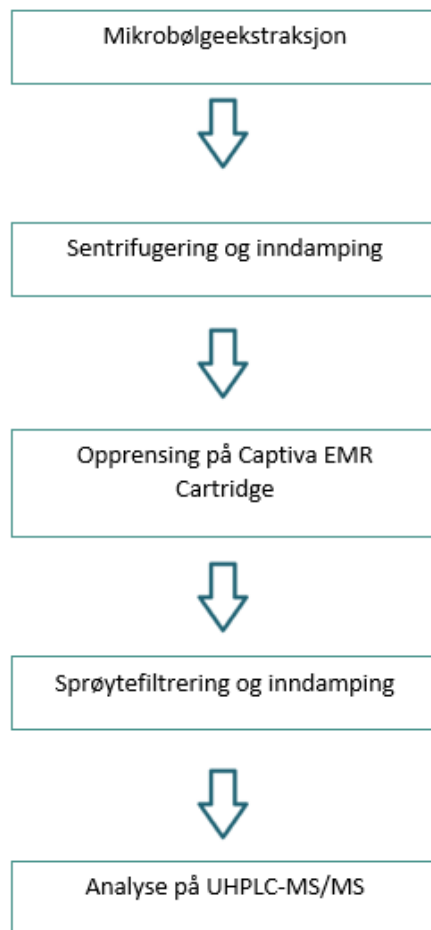
Forsøk 1: ENV+ opprensing ble utført uten kondisjonering og skylning av kolonnene.

Forsøk 2: Prøvene ble ikke dampet inn til 2 ml før opprensing på ENV+, samt opprensing uten kondisjons- og skyllesteg.

3.10 Valg, validering og kvantifisering av endelig metode

Den endelige metoden var basert på nedskaleringsmetoden (3.8). Det ble kun gjort endring i valg av opprenningsmetode og ett inndampingstrinn. Det ble utarbeidet en endelig versjon av nedskaleringsmetoden, som ble benyttet for analyse av 4 reelle prøver, 8 kalibreringsprøver, 6 spikede prøver og 4 blindprøver for validering. Figur 5 viser en skjematisk oversikt av endelig metode.

Endelig metode



Figur 5. Flytskjema for den endelige metoden for prøveopparbeiding av fisk som skal analyseres på UHPLC-MS/MS.

3.10.1.1 Prøveopparbeiding og ekstraksjon

Blanke prøveparalleller ble tillaget av at 1 g fisk ble overført direkte til mikrobølgebeholderne, 800 µl Milli Q vann og 100 µl IS-F ble tilsatt og rørt inn. Reelle prøver ble tillaget på tilsvarende måte, bare med 1 g at ulikt biologisk materiale. 8 kalibreringsprøver ble tillaget som de blanke, men også tilsatt 100 µl kalibreringsløsning 1-8. Konsentrasjon av kalibreringsprøver er oppgitt nedenfor i tabell 17, mens konsentrasjon av kalibreringsløsningene kan finnes i tabell 13 (3.4.3). 6 paralleller spike-prøver tillaget på lignende måte, men kun tilsatt 100 µl av kalibreringsløsning K-6. Videre ble 2 g natriumsulfat rørt inn i alle prøveparalleller, etterfulgt av 5 ml acetonitril og ekstraksjon i mikrobølgeovn. Temperaturprogrammet holdt 100 °C i 10 minutter, med ramp time på 5 minutter.

Tabell 17. Konsentrasjon av kalibreringsprøve 1 til 8.

Nivå	Konsentrasjon [ng/g]
1	1.8
2	6
3	12
4	48
5	120
6	300
7	600
8	1000

3.10.1.2 Sentrifugering og inndamping

Etter mikrobølgeekstraksjon ble prøvene overført til (?) ml teflon sentrifugerør og mikroholderne ble skylt med 2x 1 ml acetonitril. Prøvene ble sentrifugert ved air temp 4 °C i 10 minutter på 1800 rpm og overført til kimaxrør med pipette og pasteurpipette. Prøvene ble dampet inn til 2 ml ved 60° C på inndamper.

3.10.1.3 Opprensing på Captiva

Prøvene ble tilsatt 500 µl Milli Q vann og vortexet, før de ble påsatt kolonnene og dratt gjennom med vakuu. Opprensing av prøver ble utført på Captiva EMR Cartridges.

3.10.1.4 Sprøytefiltrering og inndamping

Inndampingstrinnet før sprøytefiltrering ble utelatt. 0,20 µm PTFE sprøytefilter ble kondisjonert med 2-3 ml acetonitril og deretter på en 12 ml sprøyter hvor stempelet var tatt ut. Prøvene ble helt over på sprøyten og filtrert over på et nytt kimaxrør. Prøvene ble deretter preparert og analysert i henhold til 3.4.4 og 3.5.

4 Resultater og diskusjon

Hensikten med denne oppgaven var å teste og optimalisere FFIs eksisterende opparbeidingsmetode av biologisk materiale. Det ble valgt ut eksplosiver med hensyn på at opparbeidingsmetoden skulle utvikles som en multimetode. Blant de utvalgte eksplosivene fikk vi i oppgave å inkludere pikrinsyre og ETN i FFIs eksisterende metode. Disse ble derfor direkte injisert inn i massespektrometeret, slik at parametere kunne optimaliseres ut fra manuell vurdering og IntelliStart-programvaren.

FFI-metoden ble så testet og gjorde det tydelig at metoden var en tidkrevende prosess. Derfor ble det utviklet en hurtigmetode og nedskalering av hurtigmetoden, som også ble benyttet i ulike optimaliseringsforsøk. I hurtigmetoden ble det benyttet like mengder fisk, SF-12, IS-F og natriumsulfat som i FFI-metoden, men det ble blandet sammen i begerglass i stedet for i mikrobølgebeholderne. Antall inndampingstrinn ble halvert, der inndamping før og etter ENV+ ble utelatt. Inndampingstemperaturen etter sprøytefiltrering ble økt fra 45 °C til 60 °C. Mengde løsemiddel brukt til skylning i løpet av opparbeidningen ble redusert, mens skyllesteget ble utelatt i sprøytefiltreringen. I nedskaleringen av hurtigmetoden ble opparbeidningen utført i mikrobølgebeholderne i likhet med FFI-metoden, men mengden fisk, natriumsulfat og løsemiddel ble redusert. I tillegg var det ikke nødvendig med inndamping på TurboVap, så samme inndamper som i de resterende inndampingstrinnene ble benyttet i stedet. Opprensing på ENV+ ble utført som i hurtigmetoden, men i motsetning til hurtigmetoden ble prøvene dampet inn til 1 ml før sprøytefiltrering.

I de aller fleste forsøkene ble det opparbeidet tre parallelle fiskeprøver som ble spiket før opparbeidning og en blank fisk som ble opparbeidet i likhet med parallellene, men som ble spiket på slutten av prøveopparbeidningen (BF-S). Disse prøvene ble brukt til å beregne gjenfinning ved å se på arealforholdet mellom snittet av parallellene og BF-S. De beregnede gjenfinningsverdiene er oppgitt i bilad A-C, som videre ble benyttet ved utforming av figurene vist i de ulike resultatene som presenteres i dette kapitlet. Basert på resultatene av optimaliseringsforsøkene ble den endelige metoden utviklet og validert.

4.1 Ioniseringsteknikk og valg av ioner

Molekyl- og datterionene som ble dannet etter direkte injeksjon inn i massespektrometeret for ETN og pikrinsyre er beskrevet i tabell 18, mens ioniseringsteknikken og de optimaliserte parameterne er beskrevet i tabell 19. Resultatet i de to tabellene ble inkludert i FFI sin metode. ISO DNP ble også analysert på tilsvarende måte da denne ble valgt som intern standard for pikrinsyre og er derfor inkludert i tabellene.

Tabell 18. Teoretisk masse (g/mol) til de ulike eksplosivene, masser (Da) for tilhørende molekyllioner og fragmenter som brukes i metoden.

Eksplosiv	Teoretisk masse	Molekyllion	Fragment 1	Fragment 2	Fragment 3
ETN	302,1	365,02	61,93	-	-
Pikrinsyre	229,1	227,97	197,98	63,33	79,91
ISO DNP	187,1	185,97	111,97	125,97	155,97

Tabell 19. Valgt ioniseringsteknikk, cone og collision for ETN og pikrinsyre.

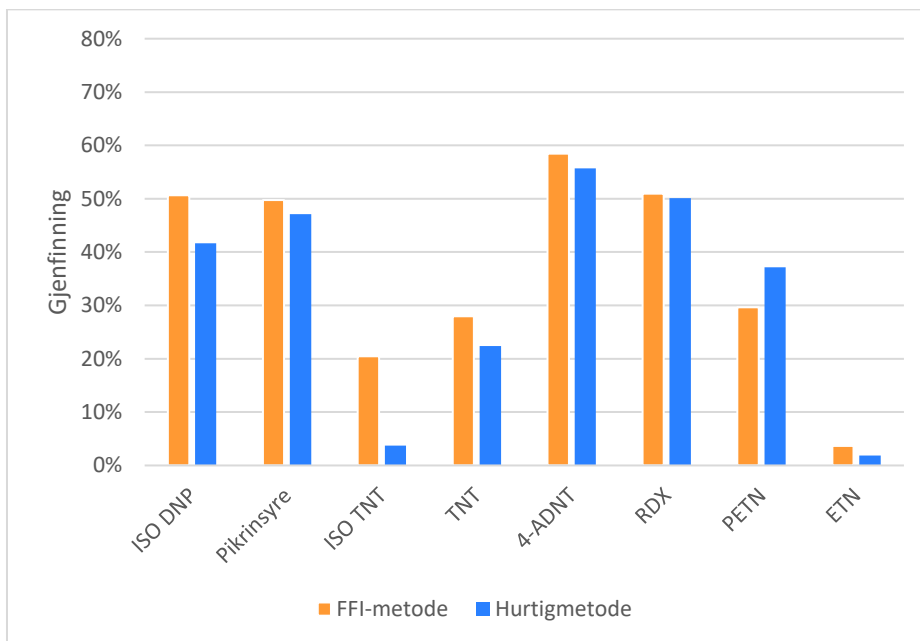
Eksplosiv	Ioniseringsteknikk	Cone (V)	Colission 1 (V)	Colission 2 (V)	Collision 3 (V)
ETN	ESI-	8	22	-	-
Pikrinsyre	ESI-	30	14	22	16
ISO DNP	ESI-	30	24	18	16

Pikrinsyre ga meget godt signal i MSen, som viser at det lett ioniseres. Signalet av pikrinsyre viste seg derimot å være så sterkt, at systemet ble utsatt for overdraging. Derfor valgte vi å halvere konsentrasjonen av pikrinsyre i SS-12 (3.4). ETN viste seg derimot å være vanskelig å ionisere, og dannet bare ett kvantifiserbart fragment (tabell 18). Dette resulterte i svakere signal for ETN i MSen.

4.2 FFI-metode vs. Hurtig metode

I FFI metoden var det utfordrende å blande fisk, salt og løsemiddel i ekstraksjonsbeholderne. Dette skyldtes beholderne som var lang og smal og gjorde det vanskelig i å nå bunnen av beholderen for å kunne blande tilstrekkelig. Det ble dermed brukt mer tid enn nødvendig for dette steget. Vi sparte derfor tid ved å blande komponentene i et begerglass, og deretter overføre det til mikrobølgebeholderne. I tillegg sparte vi tid med å halvere antall inndampingstrinn.

Både med FFI-metoden og hurtigmetoden ble det observert noe salt i supernatanten. Det viste seg å være vanskelig å unngå overføringen av dette saltet til kimaxrørene. Det ble senere observert hvitt bunnfall i alle parallellene, samt faseskille i to av parallellene etter inndamping på TurboVap med FFI-metoden. Dette ble videre observert i det siste inndampingstrinnet (etter sprøytefiltrering). I hurtigmetoden ble det observert hvitt bunnfall i en av prøvene, og fettperler ble observert i de to andre parallellene etter inndamping på TurboVap. Figur 6 er en grafisk representasjon av vedlegg A der gjenfinningen i FFI-metoden og hurtigmetoden sammenliknes.



Figur 6. I figuren sammenliknes FFI-metoden og hurtigmetoden ved å ta utgangspunkt i gjenfinningen av intern standard og de utvalgte eksplosivene.

I figur 6 observeres gjenfinningen i alle eksplosiver til å være relativt lik. FFI-metoden dominerer hos alle eksplosivene og intern standardene med få prosent bortsett fra ISO TNT der differansen er på litt over 15 %. De resterende har en differanse på under 10 %, der pikrinsyre, 4-ADNT og RDX har nærmest lik gjenfinning. ETN har lite gjenfinning både i FFI-metoden og hurtigmetoden. Den relativt store differansen i ISO TNT er mest sannsynlig kunstig stor med tanke på at ISO DNP har en differanse på litt under 10 %. Siden begge kommer fra samme IS-mix burde ikke gjenfinningen variere så stor grad.

I figur 6 observeres gjenfinningen i alle eksplosiver til å være relativt lik. FFI-metoden dominerer hos alle eksplosivene og intern standardene med få prosent bortsett fra ISO TNT der differansen er på litt over 15 %. De resterende har en differanse på under 10 %, der pikrinsyre, 4-ADNT og RDX har nærmest lik gjenfinning. ETN har lite gjenfinning både i FFI-metoden og hurtigmetoden. Den relativt store differansen i ISO TNT er mest sannsynlig kunstig stor med tanke på at ISO DNP har en differanse på litt under 10 %. Siden begge kommer fra samme IS-mix burde ikke gjenfinningen variere så stor grad. Både tidssparingen og gjenfinningen av eksplosivene som var relativt lik for FFI-metoden og hurtigmetoden bidro til valget med å gå videre med hurtigmetoden.

4.3 Optimaliseringsforsøk

Resultatene fra FFI-metoden og hurtigmetoden viste rom for forbedringer. Det ble derfor utført ulike optimaliseringsforsøk med mål om å optimalisere hurtigmetoden og nedskaleringen av hurtigmetoden.

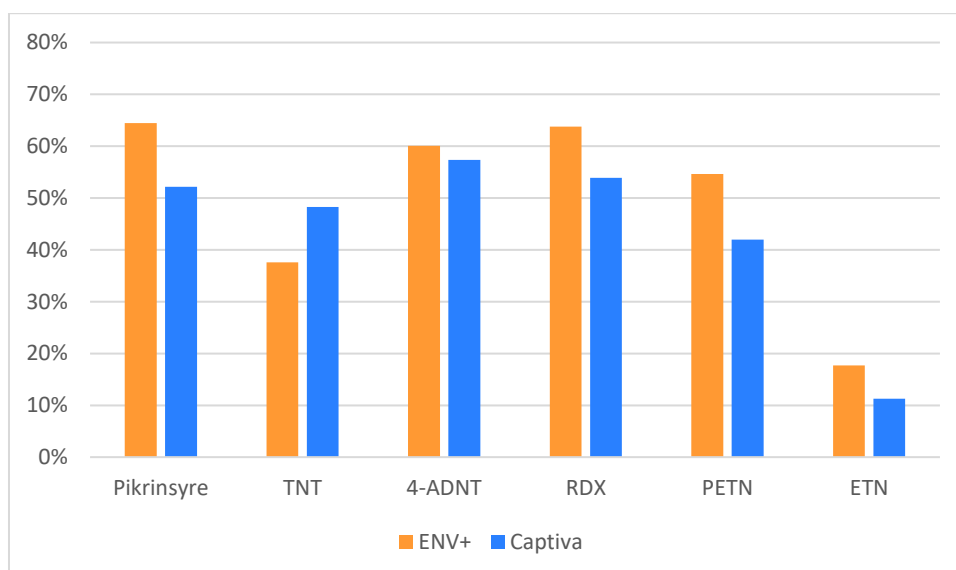
4.3.1 Opprensing på kolonne: Captiva vs. ENV+

Captiva EMR Cartridges ble testet ut som en alternativ metode for opprensing, da de er spesifikt rettet mot fettfjerning. Tidligere studier viser at fiskeprøver kan opprenses med Captiva til analyse av miljøgifter på LC-MS, men vi fant ingen eksempler det var gjort i forbindelse med eksplosivanalyse (27). Captiva-kolonner behøver ikke kondisjoneres og skylles før og etter bruk. Opprensing på Captiva kan dermed utføres i ett enkelt trinn, hvor prøven påsettes og dras gjennom med vakuüm. Sammenlignet med ENV+ er dette meget

tidsbesparende. Opprensing på ENV+ krever sammenlagt 6 trinn, derav 2 kondisjoneringsrunder, påsetting av prøve og 3 skyllerunder.

Hurtigmetoden ble benyttet for opparbeiding av 3 paralleller for hver opprensningsmetode. Før opprensing på Captiva og tilsetting av Milli Q vann ble det observert faseskille i en av prøvene, og hvit farge i de to andre parallellene med tegn til faseskille. Etter det siste inndampingstrinnet for ENV+ ble det observert en parallell med hvitt bunnfall, mens de to andre parallellene så noe urent ut med tegn til fett. Etter det siste inndampingstrinnet for Captiva så prøvene mer ren ut enn ENV+.

Ved beregning av gjenfinning viste det seg at en av Captiva-prøvene hadde et så stort avvik fra resten, at den ble forkastet. Gjenfinning av Captiva er derfor beregnet ut fra 2 paralleller. Avviksbergegning finnes i vedlegg X. ISO DNP og ISO TNT er ikke vist da de ikke ble tilsatt. I dette forsøket ble det ikke opparbeidet en gjenfinningsprøve med fisk for ENV+. Samme prøve for Captiva hadde unormalt lave verdier, og kunne heller ikke brukes. Gjenfinning er derfor beregnet ut fra gjenfinningsprøve GF uten matriks, som pleier å være relativt like gjenfinningsprøvene med matriks. Resultatene er gjengitt i figur 7, som en grafisk framstilling av gjenfinning for ENV+ og Captiva.



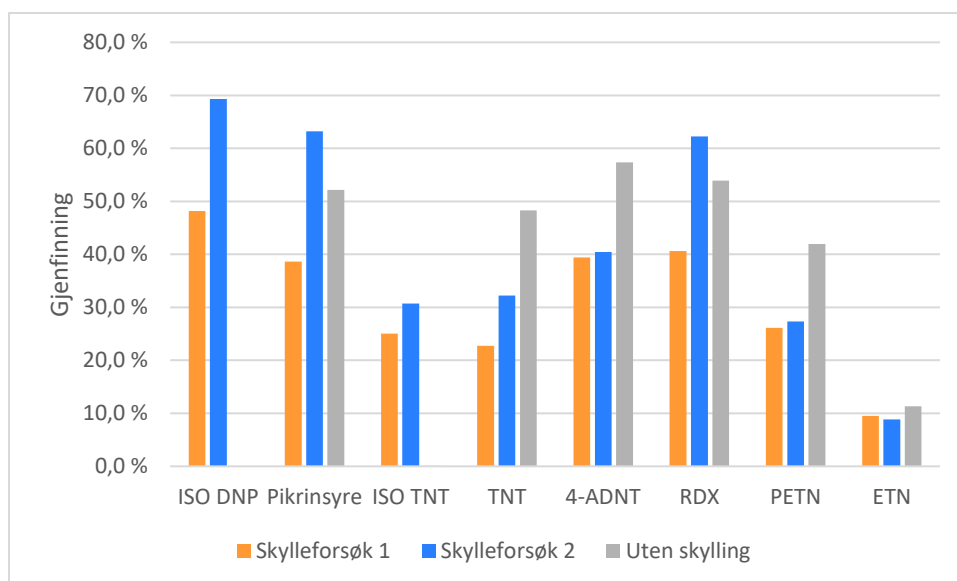
Figur 7. En grafisk framstilling av gjenfinningen av de utvalgte eksplosivene for ENV+ og Captiva.

Opprensing på ENV+ ga best resultater for alle eksplosivene unntatt TNT. Den største differansen i utbytte er 13 % for PETN, minste er 3 % for 4-ADNT. For TNT er derimot Captiva bedre enn ENV+ med en differanse på 10 %. Selv om ENV+ har sammenlagt best gjenfinning, så vi det som hensiktsmessig å gå videre med Captiva, da det gir en betydelig reduksjon i tids- og løsemiddelbruk. Vi vurderte et 3-13% lavere utbytte som akseptabelt opp mot fordelene det bringer til opparbeidingsmetoden.

4.3.2 Skylling av Captiva-kolonnen

Det ble utført forsøk på å øke utbyttet av Captiva, ved å innføre et skylletrinn. To skyllemetoder ble testet; skylleforsøk 1 med acetonitril, skylleforsøk 2 med 20% acetonitril i Milli Q vann (3.6.2). I skylleforsøkene og forsøket uten skylling, måtte en av prøvene forkastes grunnet stort avvik, gjenfinning er dermed utregnet fra to paralleller. Beregningsgrunnlag for forkastede prøver finnes i vedlegg x. Skylleforsøkene er sammenlignet med en blank fiskeprøve som er opparbeidet på samme måte som hvert av forsøkene, og spiket i ettertid. Gjenfinning av forsøk uten skylling er derimot beregnet fra en gjenfinningsprøve uten matriks, da gjenfinningsprøven uten matriks hadde uvanlig lavt signal. Dette gir en ekstra usikkerhet i resultatet, men burde være en grei tilnærming, da gjenfinningsprøvene med og uten matriks generelt er veldig like.

Forsøkene sammenlignes med Captiva-forsøket beskrevet over. Der er gjenfinningene beregnet ut fra 2 paralleller og gjenfinningprøve uten matriks. Internstandard ble ikke tilsatt i det forsøket. ISO TNT og ISO DNP kan dermed ikke sammenlignes med vanlig Captiva uten skylling. Disse faktorene medfører ekstra usikkerhet i resultatene. Gjenfinningene for skylleforsøk 1, skylleforsøk 2 og forsøk uten skylling (4.3.1) er presentert i figur 8.



Figur 8. Gjenfinningen av intern standard og utvalgte eksplosiver for skylleforsøk 1 og skylleforsøk 2 og forsøk.

Figur 8 viser nokså sprikende resultater, med store variasjoner mellom internstandardene og eksplosivene. Internstandarden ISO DNP viser tydelig best resultat for skylleforsøk 2, med nesten 70% gjenfinning mot 57% i skylleforsøk 2. For ISO TNT er det jevnere, med en knapp favør til skylleforsøk 1. Selv om vi ikke har resultater for internstandardene uten skylling, kan man anta at de ville lignet noe på resultatene for deres lignende eksplosiver. ISO DNP har nær slektskap til pikrinsyre, og er begge mer vannløselige enn de resterende. Siden pikrinsyre også har best gjenfinning for skylleforsøk 2 kontra uten skylling, er det mulig at det kan gjelde også for ISO DNP. ISO TNT og TNT har ganske like gjenfinninger for skylleforsøk 1 og 2, på 30 til 34%. Forsøket uten skylling ga derimot 48% gjenfinning for TNT, så det kan tenkes at det også vil være tilfellet for ISO TNT.

Av eksplosivene er det tre som favoriserer metoden uten skylling; TNT, 4-ADNT og PETN. Mens pikrinsyre og RDX har tydelig best utbytte i skylleforsøk 2. Kun ETN viser en fordel for skylleforsøk 1, men denne er så knapp, med under 1% i differanse fra Captiva uten skylling, at det kan neglisjeres. Resultatene viser at utbytte av Captiva-kolonner kan optimaliseres gjennom skylling. Imidlertid vil dette være individuelt for hvert enkelt eksplosiv. Ulike skyllemetoder kan utvikles basert på eksplosivenes kjemiske egenskaper, men det er ikke hensikten med denne oppgaven. Forsøket uten skylling viste jevnt over gode resultater for alle eksplosivene. Skylleforsøk 1 ga relativt like resultater, med unntak av TNT,

men hadde konsekvent lavere utbytte enn for Captiva uten skylling. Skyllforsøk 2 skiller seg ut for pikrinsyre og RDX, men er tydelig dårligere for 4-ADNT og PETN.

Siden målet er å utvikle en multimetode, valgte vi å ikke gå videre med skyllemetoder for Captiva, da metoden uten skylling viste jevnt over gode resultater for mesteparten av eksplosivene. TNT og ISO TNT, som er vanskelige å analysere, kan ha bedre utbytte av at Captiva ikke skylles. RDX og pikrinsyre har som regel de høyeste utbyttene, og kan tåle at gjenfinningen ikke er like høy for Captiva uten skylling. Resultatene for skyllemetodene er også for sprikende og gir for lite total forbedring, til at vi valgte å gå videre med disse metode. Et skylletrinn vil også øke tidsbruk, noe som ikke er ønskelig med mindre det gir en betydelig økning i gjenfinning.

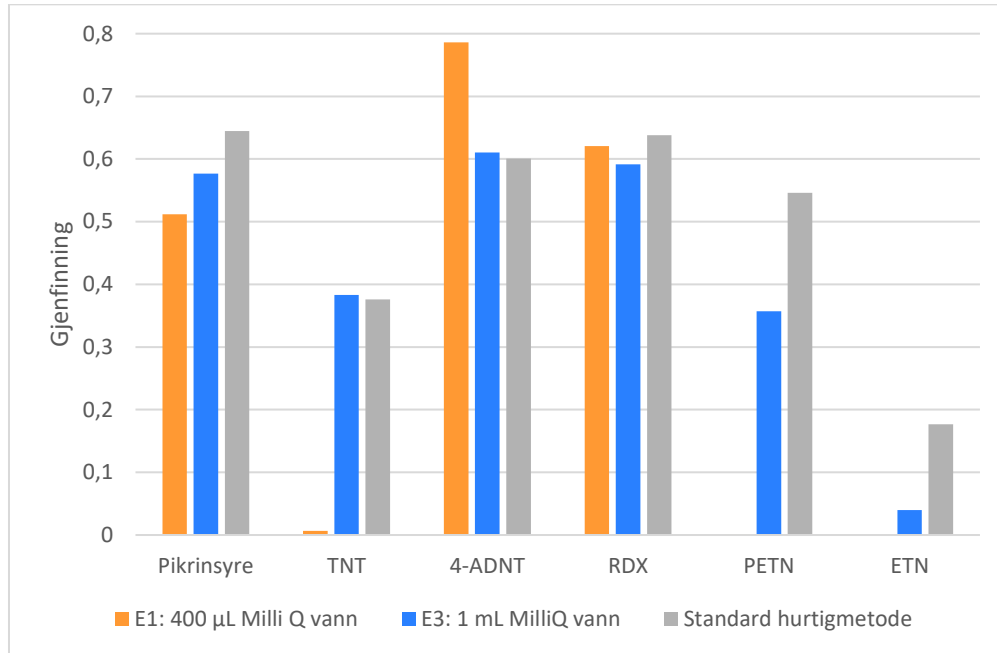
4.3.3 Eksperimentelle prøver – Vanntilsetting før ENV+ og oppdeling av faseskille

Tre eksperimentelle prøver ble opparbeidet i henhold til hurtigmetoden og ble opparbeidet sammen med prøvene beskrevet i resultat 4.3.1. Gjenfinningen i de eksperimentelle prøvene er derfor beregnet i likhet med dette forsøket.

4.3.3.1 Vanntilsetting før ENV+

I eksperimentell prøve 1 (E1) og eksperimentell prøve 3 (E3) tilsettes det ulik mengde milli Q vann til prøvene før de settes på ENV+ kolonnen. Hensikten med de to eksperimentelle prøvene var å se om det ville gi positive effekter ved opprensing på kolonnen som kunne øke utbyttet. Det var også fordi vi ville se om det ble et tydeligere faseskille i prøvene, slik at de kunne behandles som prøven i neste avsnitt, men dette ble ikke observert. I E1 ble det tilsatt 400 µl Milli Q vann, mens i E3 ble det tilsatt 1 pasteurpipette Milli Q vann som skal tilsvare ca. 1 mL. Etter siste inndampingstrinn hadde E1 masse hvitt bunnfall som så mer ut som

biologisk materiale enn salt. Gjenfinningen i E1 og E3 ble sammenliknet med standard hurtigmetode der ENV+ ikke tilsettes vann, se figur 9.



Figur 9. Gjenfinning av de utvalgte eksplosivene for eksperimentell prøve 1 (E1) eksperimentellprøve 3 (E3) der det er tilsatt 400 µL og ca. 1 mL Milli Q vann og satt på ENV+, og standard hurtigmetode der ENV+ ikke tilsettes vann.

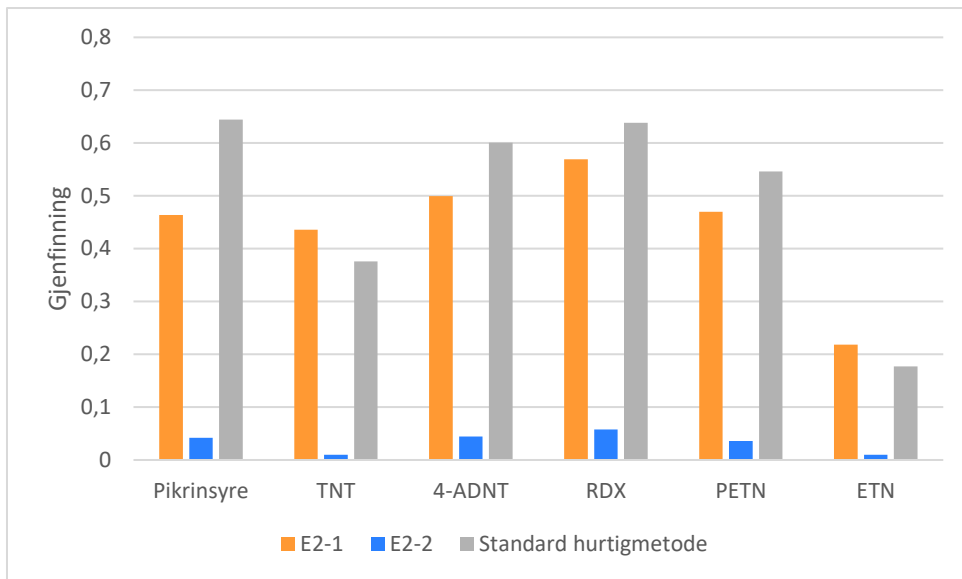
Figuren viser en høyere gjenfinning med ENV+ uten tilsatt vann for pikrinsyre, PETN og ETN, der de to sistnevnte har en differanse på over 10. Av alle prøvene var det funnet høyest gjenfinning i E1 for 4-ANDT på ca. 80 %, mens dets tilsvarende resultater for E3 og ENV+ er nokså likt på ca. rundt 60 %. For PETN, TNT og ETN derimot var det ingen gjenfinning. Dette kan forklares med at E1 endte opp med mye hvitt bunnfall ved slutten av prøveopparbeidingen. Siden TNT er mer løselig i vann sammenliknet med 4-ADNT, PETN og ETN burde man fått noe gjenfinning i E1, med tanke på at 4-ADNT har den største gjenfinningsverdien. Dette kan tyde på at TNT kanskje er mer sensitiv til eget miljø sammenliknet med f.eks. 4-ADNT. Dette tilfellet kan også stemme for PETN og ETN, særlig sistnevnte som allerede har en lav gjenfinning på ENV+ med litt under 20 %. Siden utbytte i 4-ADNT allerede har et bra utbytte i en skitten prøve, er det god grunn til å tro at utbytte kan bli bedre ved en renere prøve.

I E3 der det ble tilsatt ca. 1 ml MilliQ vann har en omtrentlig likhet i gjenfinning med ENV+ i alle eksplosiver bortsett fra PETN og ETN, der ENV+ dominerer med en differanse på henholdsvis ca. 20% og 15%. Med tanke på at 4-ADNT og PETN har nærmest lik løselighet i vann, burde PETN opptrådd i likhet med 4-ADNT som har hakket bedre av gjenfinning sammenliknet med ENV+.

Dette skal i utgangspunktet være en multimetode, og ENV+ uten tilsatt vann før opprensing gir de mest stabile resultatene for de utvalgte eksplosivene. Utelukking av vanntilsetting før ENV+ vil være det mest hensiktsmessige. Det må derimot tas i betraktning at det kun er en parallell av hvert eksperiment og medfører dermed en usikkerhet i resultatet.

4.3.3.2 Faseskille

Det har blitt observert faseskille i enkelte prøver under opparbeiding med FFI- og hurtigmetoden, før opprensing på ENV+ (4.2 og 4.3.1). Årsaken er sannsynligvis naturlig variasjon, der noen fiskeprøver har mer fett enn andre. Den øverste fasen lignet mest på acetonitril, så vi ville forsøke å separere fasene for å se om det meste av eksplosiver oppholdt seg der. Det ble observert et tydelig faseskille i eksperimentell prøve 2 (E2) etter TurboVap. Den øverste fasen (E2-1) var mindre viskøs og så tydelig renere ut enn fasen under (E2-2), som hadde et fettete preg. De to fasene, E2-1 og E2-2, ble skilt fra hverandre og opparbeidet videre slik som i hurtigmetoden. Resultatet av gjenfinning er presentert i figur 10, der E2-1 og E2-2 sammenliknes med standard hurtigmetode.



Figur 10. Gjenfinning av intern standarder og utvalgte eksplosiver i eksperimentell prøve 2 fase 1 (E2-1) og fase 2 (E2-2) som sammenliknes med standard hurtigmetode.

I figur 10, observeres det at ENV + fikk høyest gjenfinning for alle eksplosivene bortsett fra ETN og TNT som hadde mer gjenfinning i E2-1. Generelt avviker ikke E2-1 stort fra gjenfinningen i standard hurtigmetode. Det største utbytte av eksplosiv i E2-2 er hos RDX med 6 %. Resultatet indikerer at de fleste analyttene oppholdt seg i E2-1. Resultatet ble som forventet med tanke på at E2 hadde en mer fett-liknende konsistens, og vi forventet at analyttene skulle ligge i det som ble observert som en klar fase.

TNT og ETN i E2-1 hadde et bedre utbytte enn ENV+ og dette kan henge sammen med at de var i en renere fase. Slik det var nevnt under de andre eksperimentelle prøvene (E1 og E3) kan det virke som at TNT, PETN og ETN er mer sensitiv til hvorvidt prøven de oppholder seg i er ren. Det vil si at jo mer skitten prøven er desto mindre utbytte blir det. Dette stemmer overens med gjenfinningsverdiene i E2-2 til de nevnte eksplosivene som har det minste utbyttet av alle eksplosivene, der TNT og ETN har en gjenfinning på 1 %, mens det er litt under 5 % for PETN.

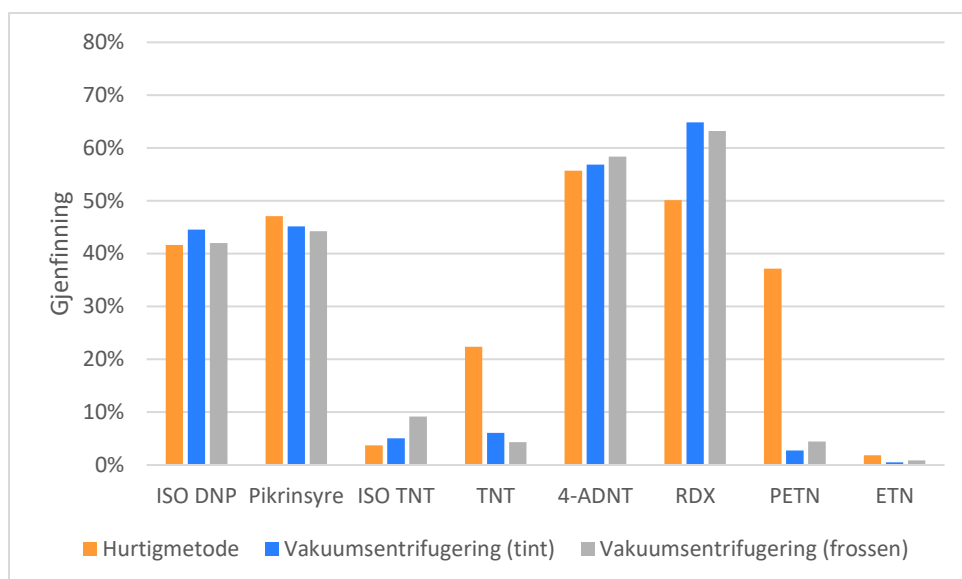
Ser man på resultatene i et helhetlig perspektiv, er analyttene i fettfasen (E2-2) såpass lite at det er mulig å kun gå videre med opparbeiding av den renere fasen, og slik få fjernet det meste av fett i prøvene. TNT og ETN fikk bedre gjenfinning av denne metoden, som indikerer at disse i større grad påvirkes av matrikseffekter fra fisk. De resterende hadde bedre gjenfinning for ordinær fettopprensing, men forskjellene var ikke betydelige. Derimot dannes

ikke alltid et faseskille i prøvene, siden fettinnholdet i fiskeprøvene ofte varierer, og gjør det utfordrende å belage seg på denne metoden.

4.3.4 Vakuumsentrifugering

Salt tilsettes både i FFI-metoden og hurtigmetoden for å fjerne vannet i de biologiske prøvene, da vann hindrer god løsemiddelkontakt ved ekstraksjon av analytt til acetonitril. I begge metodene ble det observert salt i supernatanten etter sentrifugeringen. Ved overføring til kimaxrør fulgte saltet med supernatanten noe som senere bidro til hvitt bunnfall ved videre inndampingstrinn (4.1). Dette er ikke ønskelig da salt kan bidra til ionesuppresjon. Vi ønsket å unngå tilsetning av salt for å se om det ville gi bedre gjenfinning.

En artikkel benyttet frysetørring for å tørke biologiske prøver i forbindelse med eksplosivanalyse (28). FFI hadde ikke frysetørrer, men en vakuumsentrifuger, som er relativt lik tørketeknikk. Denne ble testet som en alternativ metode for fjerning av vann i prøvene. Vi ville også se på om det ble noe forskjell i resultat ved opparbeiding av tint og frossen fiskeprøve, så det ble derfor opparbeidet tre tinte prøver og en prøve som var frossen. Vakuumsentrifugeringsprøvene ble opparbeidet som hurtigmetoden etter mikrobølgeekstraksjonen. Før ENV+ hadde prøvene tydelige vevbiter fra fisken og en svak gulfarge. Etter ENV+, før skyllesteget hadde fiskeprøvene fått en klar farge. Etter det siste inndampingstrinnet hadde prøvene hvitt bunnfall. I figur 11 sammenliknes vakuumsentrifugeringsprøvene mot hurtigmetoden som salt for fjerning av vann.



Figur 11. Gjenfinning av internstandarder og utvalgte eksplosiver for hurtigmetoden, vakuumsentrifugering av tinte prøve og frossen prøve som ble opparbeidet.

I figur 11 ser man at det er liten variasjon i gjenfinning blant de tinte og frosne prøvene, der den største differansen blant eksplosivene er på ca. 4 for ISO TNT. Gjenfinningen er nokså lik blant pikrinsyre, 4-ADNT, RDX og ETN. RDX har høyest gjenfinning blant prøvene på over 60 %. ETN derimot har nærmest ingen gjenfinning. Vakuumsentrifugering sammenliknet med hurtigmetode har gitt nokså like gjenfinningsverdier hos pikrinsyre, 4-ADNT, mens hurtigmetoden for RDX har en gjenfinning på ca. 50 % som er noe lavere enn vakuumsentrifugeringsprøvene med en verdi på litt over 60 %. Hos TNT er gjenfinningen høyere enn vakuumsentrifugering med en differanse på litt over 15 %, og tilsvarende for PETN en differanse på over 30. For ETN er det funnet mer gjenfinning i hurtigmetoden enn vakuumsentrifugeringen.

Resultatene indikerer at vakuumsentrifugering ikke er egnet for en multianalyse av de utvalgte eksplosivene. Teknikken tar i tillegg lenger tid enn hurtigmetoden. Resultatet tyder også på at saltet ikke påvirker analysen i like stor grad som det er tenkt hittil i og med at gjenfinningsverdiene for det meste er relativt lik eller bedre med hurtigmetoden framfor vakuumsentrifugering. Med hurtigmetoden får man mer gjenfinning for de utvalgte eksplosivene, mens dette ikke er tilfellet med vakuumsentrifugering der ETN og PETN har betraktelig mindre utbytte. Det mindre utbytte av sistnevnte eksplosivene kan være et resultat av at prøvene ikke var ren på slutten av opparbeidingen, da det i tidligere forsøk også har vist

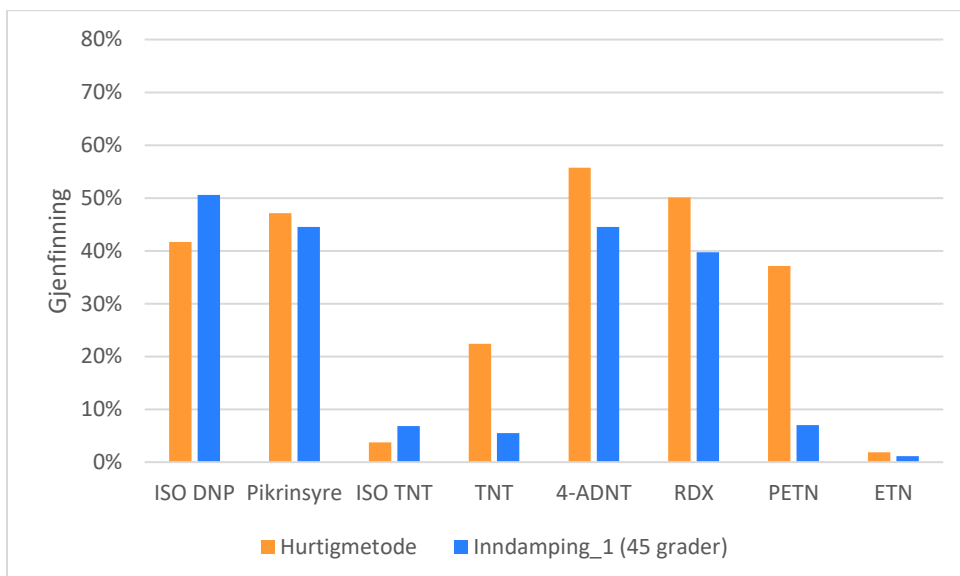
et mindre utbytte (4.3.3). Dersom dette ikke er tilfellet kan vakuumsentrifugering benyttes for analyse av spesifikke eksplosiver, f.eks. RDX, da dette hadde et høyere utbytte med denne teknikken.

4.3.5 Inndamping

Det neste vi testet var inndampingstrinnene, for å se hvordan de påvirker gjenfinningen av eksplosivene og internstandardene. Det ble utført tre inndampingsforsøk.

4.3.5.1 Inndampingsforsøk 1: 45 °C

I inndampingsforsøk 1 ble inndampingen utført ved 45 °C i stedet for 60 °C, og øvrige opparbeidingsstrinn ble utført som i hurtigmetoden. Dette var for å sjekke om en redusert temperatur kunne gi et bedre utbytte, særlig når det gjaldt ETN som har et smeltepunkt på 61,5 °C som akkurat er over temperaturen benyttet i hurtigmetoden. I figur 12 sammenliknes dette forsøket mot hurtigmetoden.



Figur 12. Gjenfinning av internstandard og utvalgte eksplosiver for hurtigmetoden og inndampingsforsøk 1 hvor det har blitt benyttet 45 °C.

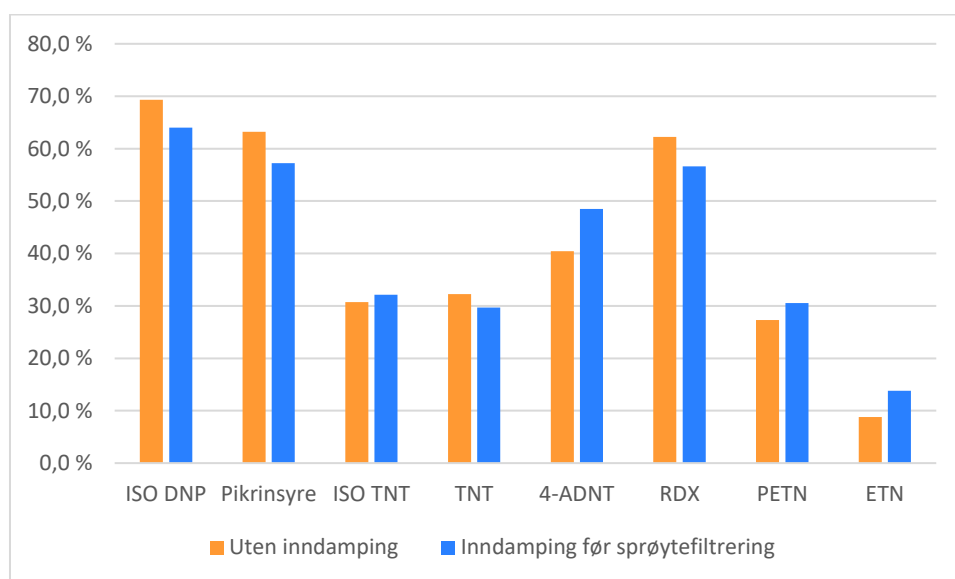
Fra figur 12 kan man se at hurtigmetoden har høyere gjenfinningsverdier i alle eksplosiver, mens internstandardene har bedre gjenfinning gjennom inndampingsforsøket. ISO DNP og ISO TNT hadde et lavere utbytte med en differanse fra hurtigmetoden på henholdsvis ca. 9 og 3. Slikt sett kan det virke som intern standardene er mer temperatursensitive.

Differansen i gjenfinning mellom internstandard og hurtigmetoden var ikke betraktelig stor og siden eksplosivene hadde bedre gjenfinning i hurtigmetoden, og inndampingen går fortere med høyere temperatur, valgte vi derfor å fortsette bruk av 60 °C.

4.3.5.2 Inndampingsforsøk 2: Inndamping før sprøytefiltrering

Sprøytefiltrering etterfulgt av inndamping har gitt hvitt bunnfall (se 4.2 og 4.3.1), noe som er ugunstig for videre analyse på UHPLC. Med inndampingsforsøk 2 ble prøvene opparbeidet og rensert som prøvene fra skylleforsøk 2 (3.6.2), men ble i tillegg dampet inn til ca. 1 ml før sprøytefiltrering slik at eventuelt synlig bunnfall kunne bli fanget i filteret. Etter sprøytefiltrering ble filteret også skylt med 1 mL acetonitril for å få med de siste restene av analytt. Videre opparbeiding ble gjort i henhold til hurtigmetoden.

Det ble observert at prøvene for inndampingsforsøket var opakt gulhvitt med litt utfelling etter inndamping før filtrering. Etter filtrering så prøvene ut til å være klarere med en gulaktig farge. Etter siste inndampingstrinn var prøvene fortsatt klare med hvitgul farge. Gjenfinning av eksplosivene og intern standardene i inndampingsforsøk 2 ble sammenliknet med skylleforsøk 2 som heter «uten inndamping» i figur.



Figur 13. Gjenfinning av intern standarder og utvalgte eksplosiver for forsøk med- og uten inndamping før sprøytefiltrering.

Fra figuren ser man at gjenfinningen er relativt lik for forsøk med- og uten inndamping før sprøytefiltrering. Uten inndamping før sprøytefiltrering dominerer hos ISO TNT, pikrinsyre, TNT og RDX, mens inndamping før sprøytefiltrering dominerer for de resterende. Begge forsøkene dominerer kun med noen få prosent i gjenfinning med den største differansen hos 4-ADNT med rundt 8 %.

I inndamping før sprøytefiltrering ble det innført et skyllesteg i tillegg slik at det totalt er gjort to variasjoner fra forsøket den sammenliknes med. Med skyllesteg så var tanken å få inn de siste analyttene fra filteret, men de to variasjonene har kun gitt utslag i tre eksplosiver. Visuelt sett derimot har det blitt en forbedring da det ble observert renere prøver etter filtrering og før skyllesteg, samt. etter det siste inndampingssteget. Dette kan forklare hvorfor det har blitt mer gjenfinning av PETN og ETN, da det har blitt indikert i tidligere forsøk at disse har hatt mindre gjenfinning i prøver som har sett mindre ren ut i slutten av prøveopparbeidingen (4.3.3 og 4.3.4). Sett på det helhetlige bildet av resultatene kan det virke som inndamping før sprøytefiltrering kan innføres som en del av hurtigmetoden da prøvene ser tydelig renere ut etter dette steget. På tross av at enkelte eksplosiver har mindre utbytte med dette trinnet er det likevel verdt å innføre inndampingstrinnet fordi avviket i gjenfinningen kun er på noen få prosent.

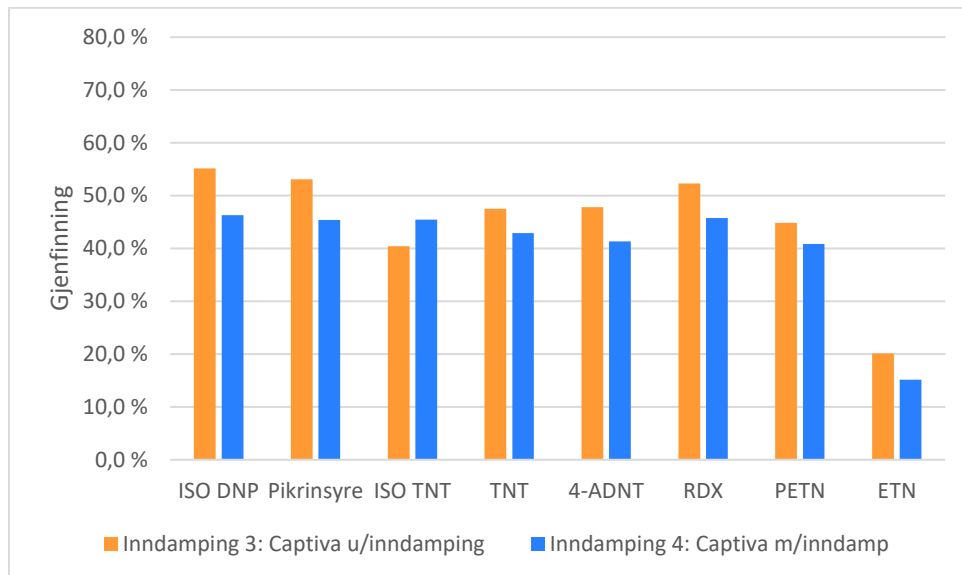
4.3.5.3 Inndampingsforsøk 3: Ingen inndamping før opprensing på Captiva

I FFI-metoden (henvis metode), hurtigmetoden (henvis metode) og test av Captiva (henvis til metode "Opprensing på Captiva") var det observert faseskille og/eller hvitt bunnfall i alle eller enkelte paralleller ved inndamping før opprensing på kolonne. Faseskillet og det hvite bunnfallet var mest sannsynlig en konsekvens av fett fra fisken og saltet.

Inndampingstrinnet før opprensningstrinnet var derfor viktig for å blant annet få urenheter tydeligere frem slik at disse ble rensert på kolonne. I nedskaleringsmetoden opereres det derimot med små mengder av fisk og salt. Vi ville derfor teste hvorvidt det var nødvendig med inndamping før opprensing.

I inndampingsforsøk 3 ble prøvene opparbeidet slik det var beskrevet i nedskaleringsmetoden, bortsett fra at prøvene ikke ble dampet inn før opprensing på Captiva EMR Catridge.

Inndampingsforsøk 4 ble dampet inn til 2 ml før de ble påsatt Captivakolonnen og dratt gjennom med vakuum. Øvrig opparbeiding ble utført i henhold til nedskaleringsmetoden. Begge forsøkene ble tilsatt milliQ vann slik at det ble ca. 20 % vann i acetonitril. Gjenfinningen av inndampingsforsøk 3 og 4 sammenliknes i figur 14.



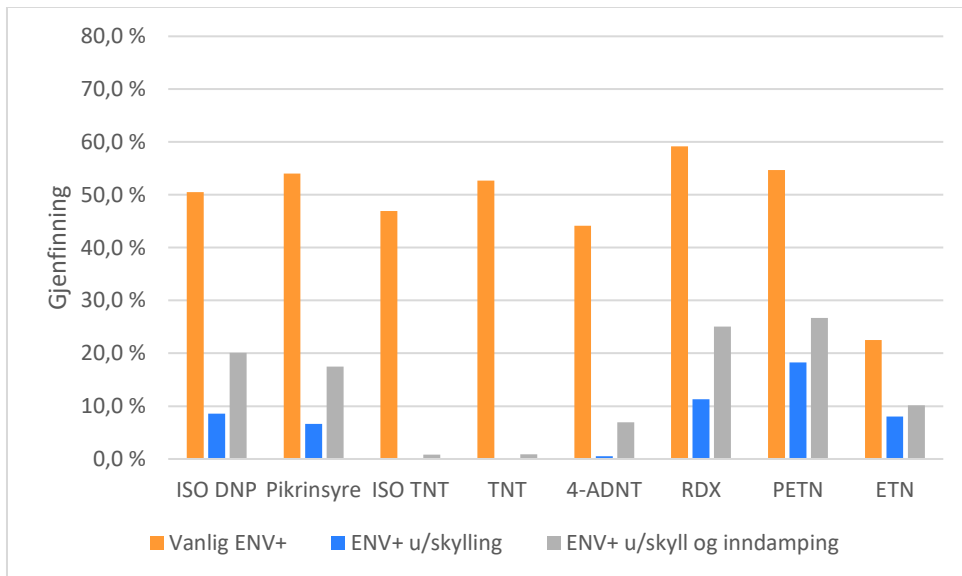
Figur 14. Gjenfinning av internstandard og utvalgte eksplosiver for inndampingsforsøk 3 som er utført uten inndamping- og med inndamping før opprensing på Captiva.

ISO TNT er den eneste med bedre gjenfinning i forsøk 3 framfor 4 med en differanse på 5. De resterende har bedre gjenfinning i inndampingsforsøk 4 hvor det ikke var utført inndamping for Captiva. Sistnevnte forsøk dominerer mest hos ISO DNP med en differanse på ca. 9. I begge forsøkene ble det verken observert faseskille eller hvitt bunnfall. Observasjonene gjort under opparbeiding kombinert med resultatet vist i figur X, tyder på at det ikke er nødvendig med inndampingstrinn før opprensing i nedskaleringsmetoden.

4.3.6 Raskere bruk av ENV +

En av grunnene til å bruke Captiva var nedsatt tid ved at kondisjonering og skylling blir utelatt, og man på den måten også reduserer løsemiddelbruk. Vi ville derfor teste om ENV+ også kunne brukes på en raskere måte i likhet med Captiva. Det ble utført to forsøk på å benytte ENV+ kolonne på en raskere måte.

I forsøk 1 ble opprensing på ENV+ kolonnen utført uten kondisjonering og skylking, i likhet med Captiva. I forsøk 2 ble inndamping til 2 ml før opprensing på ENV+ kolonne utelatt, samt opprensing uten kondisjonering og skyllesteg. I tillegg ble det opparbeidet prøver på ENV+ som vanlig i henhold til nedskaleringsmetoden, og den beregnede gjenfinningen ble sammenliknet med forsøk 1 og 2 i figur 15.



Figur 15. Gjenfinning av intern standarder og utvalgte eksplosiver for prøver opparbeidet i henhold til vanlig ENV+, ENV+ uten skylking og ENV+ uten skylking og inndamping.

Slik det observeres på figuren så er gjenfinningen signifikant større i vanlig ENV+ sammenliknet med de to andre forsøkene, og man kan derfor konkludere med at kondisjonering og skylking er viktige trinn og kan derfor ikke utelates ved bruk av ENV+.

4.4 Valg, validering og kvantifisering av endelig metode

Nedskaleringsmetoden med opprensing på Captiva ble valgt som endelig metode. Årsaken er at Captiva er vesentlig raskere og enklere å bruke, spesielt om man opparbeider mange prøver. At Captiva har vist noe lavere gjenfinning enn ENV+, ble vurdert som akseptabelt. Når ENV+ kolonnene skylles betraktelig med acetonitril, vil deler av fett sannsynligvis følge med. Captiva er spesielt rettet mot fettfjerning, prøvene får trolig bedre opprensing, som skåner UHPLC-kolonnen. Tydelige visuelle forskjeller har vært observert på prøver før og

etter Captiva, fra opak hvit til klar transparent, som har overgått forskjellene med ENV+ (4.2 og 4.3.5.2).

Det ble utført et validerings- og kvantifiseringsforsøk av endelig metode. I forsøket ble det utarbeidet kalibreringskurver for kvantifisering av 4 reelle prøver og 6 paralleller av spikede prøver. Konsentrasjoner av kalibrerings- og spikeprøver finnes i tabell x (i metodekapitlet). Kalibreringskurvene til TNT og ETN viste dårlig linearitet og måtte forkastes. Resultat av reelle prøver er derfor ekskludert TNT og ETN. Valideringsresultat som benytter konsentrasjon i utregning er heller ikke mulig å inkludere for disse eksplosivene. Analysens deteksjons- og kvantifiseringsgrenser, presisjon og riktighet er dermed beregnet for de øvrige eksplosivene. Resultatene som benytter areal ved utregning, ionsuppresjon og gjenfinning, er derimot beregnet også for TNT og ETN, med forbehold om ekstra usikkerhet.

4.4.1 Effektivitet og kostnad

Den endelige metoden viste store fordeler når det gjelder tidsbruk, løsemiddelbruk og kostnad, sammenlignet med FFI-metoden. Resultatet av effektivisering og nedskalering viser en betydelig nedgang i pris og tid per prøve. Dette skyldes hovedsakelig at tid per gjennomgang er kraftig redusert, med rundt 38 %, men kapasiteten på antall prøver per gjennomgang er betydelig økt, med rundt 300 %. Løsemiddelbruken er også redusert med 91 %, som gir miljømessige fordeler. Tabell 20 viser et overslag de nevnte parameterne, og ble beregnet fra tid per gjennomgang, metodens prøvekapasitet, og kostnader av løsemiddel og timepris for arbeidet.

Tabell 20. Overslag av tidsbruk, løsemiddelbruk, prøvekapasitet og kostnad per prøve for FFI- og endelig metode

RESULTAT AV EFFEKTIVISERING OG NEDSKALERING			
	FFI-metode	Endelig metode	Prosentvis endring
Tid per opparbeiding	22 – 26 timer	10 – 16 timer	-38 %
Tid per prøve	220 minutter	25 minutter	-89 %
Antall prøver per opparbeiding	6	24	300 %
Løsemiddel per prøve	77 ml	7 ml	-91 %
Pris per prøve	3705 kr	420 kr	-89 %

4.4.2 Ionesuppresjon

Test for ionesuppresjon ble utført for opparbeidet prøve med og uten matriks (BF-S og B-S).

Prøvene ble spiket etter opparbeiding, og sammenlignet med areal av en ren gjenfinningsprøve (GF). Ionesuppresjon vises som en reduksjon i prosent, positiv verdi indikerer at det ikke forekommer ionesuppresjon (tabell 21).

Tabell 21. Ionesuppresjon i prosent, for prøver med og uten matriks, oppgitt for fire eksplosiver og IS.

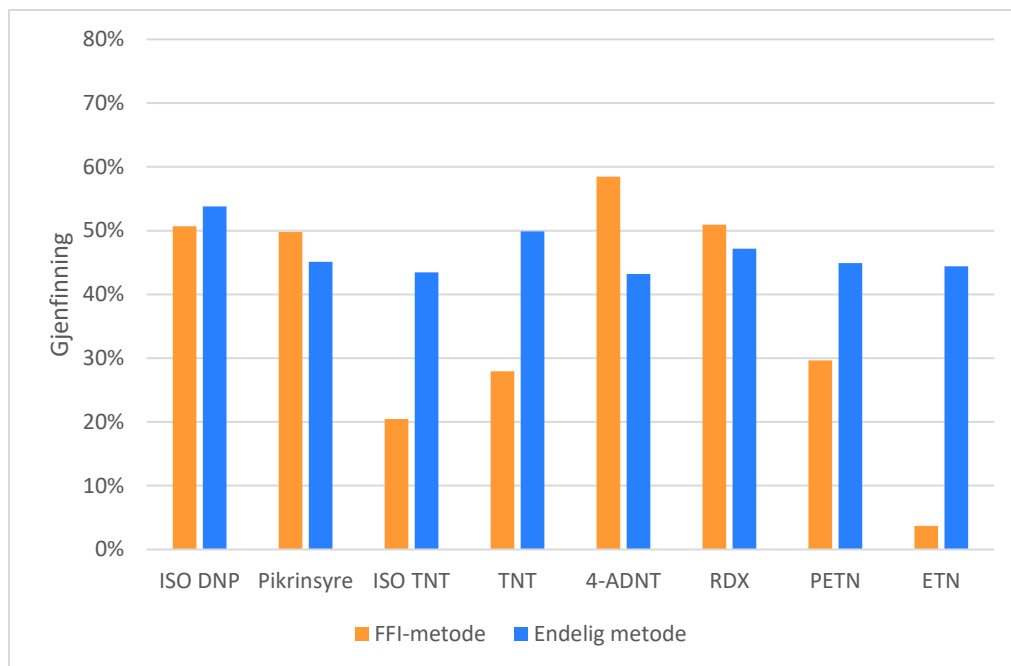
IONESUPPRESJON		
KOMPONENT	Matriks	Metode
ISO DNP	1 %	19 %
ISO TNT	0 %	9 %
TNT	8 %	10 %
4-ADNT	2 %	-3 %
RDX	2 %	-3 %
PIKRINSYRE	5 %	-11 %
PETN	6 %	3 %
ETN	-33 %	9 %

Tabell 21 viser ingen ionesuppresjon for eksplosivene fra matriks, unntatt for ETN. Verdiene varierer fra 0 til 8 %, og betyr at den spikede gjenfinningsprøven var lik eller hadde bedre signal enn ren gjenfinningsprøve. Det er forventet fra tidligere resultater at ETN ville vise utslag på ionesuppresjon som følge av matrikseffekter. Likevel er det mulig at ionesuppresjonen er kunstig høy, da det virker som om BF-S prøven var unormalt lav denne gangen. Ionesuppresjonstest for selve metoden, i hovedsak effekten av natriumsulfat, gir litt mer spredte resultater. 4-ADNT, RDX og PETN påvirkes ikke, med variasjoner på ± 3 %. Det samme kan hevdes for ISO TNT, TNT, ISO DNP, med 9, 10 og 19 % bedre utbytte for opparbeidet prøve uten matriks. Kun pikrinsyre viser en noenlunde tydelig forskjell, med -11 %. Vi har forventet at pikrinsyre kan være mer utsatt for ionesuppresjon av saltet, siden den elueres først ut av kolonnen og OH-gruppen lett deprotoneres. Dette oppstår derimot ikke hos ISO DNP, som også har en OH-gruppe, men det kan forklares ved at pikrinsyre har mye lavere pKa-verdi på 0,42 i forhold til DNP med pKa-verdi på 4,09 (29). Ionesuppresjonen på pikrinsyre virker derimot å bli justert ved tilsetning av matriks.

Testene som er utført har derimot mye usikkerhet, da verdiene er regnet fra én parallell, og ikke tar høyde for spredning i prøvene. Derfor er det mulig at de større utslagene skyldes andre variasjoner i prøvene eller analyseinstrumentet. Ionesuppresjon er vanskelig å måle fra ett forsøk, da det kan endre seg fra gang til gang. Denne testen er mer en indikasjon på at det ikke foreligger noen åpenbare avvik som kan påvirke resultatet i stor grad.

4.4.3 Gjenfinning av endelig og opprinnelig metode

Metodens gjenfinning er beregnet fra gjennomsnittlig areal av spikeprøver og areal av gjenfinningsprøve med matriks. Dette sammenlignes med den opprinnelige FFI-metoden i figur 16.



Figur 16. Gjenfinning av eksplosiver og IS for FFI-metode og endelig metode.

Den endelige metoden viser betydelig bedre gjenfinning for 4 eksplosiver, og tydelig lavere gjenfinning for kun ett eksplosiv. Eksplosivene som viser merkbart bedre gjenfinning, ISO TNT, TNT, PETN og ETN, er også de som har vært vanskeligst å få godt utbytte av gjennom optimaliseringsprosessen. ETN viser største forskjell, med en forbedring på 40%, mens ISO TNT, TNT og PETN har en differanse på 23, 22 og 15 % fra FFI-metoden. Dette anses som svært gode forbedringer, og var ikke forventet, da endelig metode kutter mye i skylle- og oppkonsentreringstrinn.

Utbytte av ETN er svært høyt sammenlignet med tidligere forsøk. Gjennom optimaliseringsprosessen er det observert at signalene av paralleller varierer en god del, sammenlignet med andre eksplosiver. Disse variasjonene kan reflekteres i gjenfinning av ETN, siden den er beregnet fra bare én gjenfinningsprøve (BF-S). Vi har derimot to andre typer gjenfinningsprøver, én som er opparbeidet uten matriks (B-S) og én i ren løsning (GF), som vi kan sammenligne med. De tre ulike gjenfinningsprøvene pleier å være relativt like, og kan derfor benyttes om resultatet fra BF-S virker usikkert. Gjenfinning fra prøver B-S og GF er på henholdsvis 30% og 27%, som er en del lavere, men fortsatt mye bedre enn FFI-metoden. Dette indikere at ETN utsettes for ionesuppresjon fra matriks, som blir bedre opprenset av Captiva. Det samme kan antas for ISO TNT, TNT og PETN. Dette observeres

også i forsøket med vakuumsentrifugering, hvor ETN, TNT og PETN fikk drastisk dårligere utbytte, trolig fordi prøvene hadde høyere nivå av matriks-forurensninger (4.3.4).

4-ADNT viser lavere gjenfinning for endelig metode, med en differanse på -15 %. Varierende resultater av 4-ADNT, gjør det utfordrende å kommentere på differansens årsak. For eksempel har vi sett at 4-ADNT foretrekker opprensing på ENV+, men da var differansen på kun 3 % (4.3.1). Det kom også frem at 4-ADNT fikk bedre utbytte da det ble tilsatt 400 µl Milli Q vann før opprensing på ENV+ (differanse på 18 %), men tilsetning av ca. 1 ml vann ga omtrent lik gjenfinning som vanlig ENV+ (4.3.3). Vi observerer også at 4-ADNT har oppnådd generelt lavere gjenfinning etter metoden ble nedskalert. Det kan tyde på at 4-ADNT får positive effekter av matriks, salt eller økt løsemiddelbruk. Flere forsøk bør utføres for å kartlegge om dette er mulige årsaker til reduksjon i utbytte.

De resterende eksplosivene, ISO DNP, pikrinsyre og RDX, skiller seg lite fra den opprinnelig FFI-metoden. ISO DNP foretrekker endelig metode, med differanse på 3 %, mens pikrinsyre og RDX foretrekker FFI-metoden med differanser på 5 og 4 %. Alt i alt, anser vi resultatene for endelig metode som svært tilfredsstillende. Den endelige metoden har kuttet i mange skylle- og oppkonsentreringstrinn, dermed var det forventet at gjenfinningen skulle være mye lavere. Bruk av Captiva-kolonner viste også en liten nedgang i utbytte fra ENV+, men dette kom ikke utpreget til syne i de endelige resultatene. Det kan ikke utelukkes at resultatene også er preget av at vi har blitt bedre på å utføre prosedyren. Likevel gir de en sterk indikasjon på at FFI-metoden trygt kan kortes ned til en enklere og hyppigere prosedyre.

4.4.4 Deteksjons- og kvantifiseringsgrenser

Deteksjonsgrenser (LOD) og kvantifiseringsgrenser (LOQ) ble beregnet ved hjelp av tre ulike tilnærminger, vist i likning 1, 2 og 3 (2.4.4.2). LOD og LOQ kunne ikke beregnes for TNT og ETN. Beregnet LOD og LOQ for de resterende eksplosivene er presentert i tabell 22.

Tabell 22. Deteksjons- og kvantifiseringsgrenser, LOD og LOQ, beregnet fra likning 1, 2 og 3, for 4-ADNT, RDX, pikrinsyre og PETN.

DETEKSJONS- OG KVANTIFISERINGSGRENSER [ng/g]						
	1: Fra blanke paralleller		2: Fra kalibreringskurve		3: Fra signal/støy-forhold	
Komponent	LOD-1	LOQ-1	LOD-2	LOQ-2	LOD-3	LOQ-3
4-ADNT	0,39	1,29	0,46	1,52	0,21	0,68
RDX	0,84	2,78	15,4	50,9	1,15	3,80
Pikrinsyre	0,76	2,52	0,82	2,69	0,06	0,20
PETN	0,78	2,56	7,07	23,3	0,34	1,11

Ved diskusjon av resultatene i tabell 22, vil vi for enkelthets skyld kun kommentere LOQ, da den LOD x3,3 og viktigere for kvantifisering av reelle prøver. LOQ ble først beregnet med likning 1, og senere med likning 2, da dette syntes å være den mest omtalte metoden. Det ble da oppdaget store forskjeller mellom eksplosivene, som understreker de ulike tilnærmingenes styrker og svakheter. For 4-ADNT og pikrinsyre er LOQ-1 og LOQ-2 tilnærmet like, med differanser på henholdsvis 0,23 og 0,17 ng/g. For RDX og PETN er samme differanse på 48,16 og 16,25 ng/g, en ganske drastisk forskjell. Det er da LOQ-2 som avviker, med merkbart høyere verdier. Dette skyldes at punkt 3 i kalibreringskurvene til RDX og PETN ligger litt høyere enn de resterende punktene. Metoden for beregning av LOQ-2 forutsetter at slike variasjoner i kurven skyldes bakgrunnsstøy, og vil derfor gi et stort utslag i beregnet verdi, selv om lineariteten (r-kvadrat) i begge kurvene er over 0,99. Tilnærming 2 tar heller ikke hensyn til at variasjoner i kalibreringskurven kan skyldes andre faktorer, som feks tillaging.

Likevel var det usikkert om resultatene for LOQ-2 var noe vi kunne se helt bort fra. Tilnærming 3 ble dermed benyttet for å gi et bedre vurderingsgrunnlag av LOQ for RDX og PETN. Beregnet LOQ-3 viser jevnt over lavere verdier enn for LOQ-1 og -2, bortsett fra for RDX hvor den er høyere enn LOQ-1. Beregnet LOQ-3 for RDX og PETN er nærmere LOQ-1, med differanser på 1,02 og 1,45 ng/g. En svakhet ved LOQ-3, er at konsentrasjonen beregnes ved ekstrapolering, som gir større usikkerhet enn beregning fra kalibreringskurve (henvis teori). Likevel bidrar den tredje beregningen med argumentasjon for at LOQ for RDX og PETN ligger rundt verdiene som LOQ-2 viser.

4.4.5 Metodens presisjon og riktighet

De spikede prøveparallelene ble brukt til å beregne relativt standardavvik (RSD) og relativ bias, som sammen kan fortelle noe om analysens nøyaktighet. Relativ bias er oppgitt som avvik fra teoretisk konsentrasjon. Dette er presentert i tabell 23, sammen med beregningsgrunnlaget for verdiene av RSD og bias(%). Presisjon og riktighet kunne ikke beregnes for TNT og ETN.

Tabell 23. Teoretisk og gjennomsnittlig konsentrasjon, standardavvik, relativt standardavvik og relativ bias av eksplosiver og IS for 6 spikede prøver.

PRESISJON OG RIKTIGHET					
KOMPONENT	Teoretisk [ng/g]	Gjennomsnitt [ng/g]	Standardavvik	RSD	Bias(%)
ISO DNP	1000	931,9	53,8	6 %	-7 %
ISO TNT	1000	949,2	78,0	8 %	-5 %
4-ADNT	300	306,3	25,2	8 %	2 %
RDX	300	324,1	23,7	7 %	8 %
PIKRINSYRE	150	148,4	4,1	3 %	-1 %
PETN	300	323,9	28,1	9 %	8 %

Presisjon ble bestemt fra spredning i resultater for spikede paralleller. Beregnet RSD for de spikede prøvene varierer fra 3 til 9 %, som er godt innenfor akseptkrav for spredning på ± 15 % (tabell 23). Pikrinsyre hadde lavest spredning, PETN høyest. Riktighet ble bestemt fra spikeprøvenes relative bias. Pikrinsyre hadde lavest bias på -1 %, mens PETN og RDX hadde høyeste, på 8 % (tabell 23). Dette er igjen innenfor akseptkravet for relativ bias, som også er på ± 15 %. Det foreligger derimot en svakhet i beregnet presisjon og riktighet, da forsøket kun er utført én gang. Prøveparallelene var også spiket fra samme standardløsning, da vi ikke hadde nok TNT-standard til å lage en ny. For sikker bestemmelse bør forsøket utføres minst tre ganger, men det gir likevel en god indikasjon på analysens nøyaktighet.

4.4.6 Resultat av reelle prøver

Konsentrasjoner av reelle prøver er vist i tabell 24. Beregninger av TNT og ETN måtte forkastes, men det ble ikke observert en topp for disse i kromatogrammet.

Tabell 24. Beregnet konsentrasjon av 4-ADNT, RDX, pikrinsyre og PETN for fire reelle prøver, ikke detektert analytt er merket ID.

BEREGNET KONSENTRASJON AV REELLE PRØVER [NG/G]					
PRØVE	4-ADNT	RDX	Pikrinsyre	PETN	
1	ID	ID	ID	ID	2,93
2	ID	ID	ID	ID	ID
3	ID	ID	ID	ID	ID
4	ID	ID	ID	ID	ID

PETN ble detektert i prøve 1, og konsentrasjonen beregnet til 2,93 ng/g prøve. Som diskutert tidligere, ligger det noen usikkerheter rundt beregnede LOQ av eksplosivene, men LOQ-2 vurderes som en fornuftig verdi (4.4.4). LOQ-2 for PETN er beregnet til 2,56 ng/g, beregnet konsentrasjon er dermed over grensen og bør møte krav for nøyaktighet. Det er liten sannsynlighet for at toppen skyldtes overdraging fra tidligere prøver, da de blanke prøvene ble analysert før prøve 1. Om toppen skyldes overdraging bør de blanke prøvene også vist tilsvarende eller tydeligere signal enn prøve 1. Kontaminasjon av prøve 1 vurderes også som lite sannsynlig, ved forurensing fra spike-løsninger burde vi også ha sett andre eksplosiver.

5 Konklusjon

FFIs metode for opparbeiding av biologisk materiale for analyse på LC-MS ble optimalisert med mål om å effektivisere prosedyren, uten betydelig reduksjon i gjenfinning.

Gjenfinningsresultatene for den endelige metoden viste at målet var oppnådd, med enten liten variasjon fra eller bedre gjenfinning enn opprinnelig metode (figur 16). Prosessen fram til den endelige metoden startet med å korte ned på skylle- og inndampingstrinn, som viste liten reduksjon i gjenfinning, men reduserte tidsbruk med rundt 50 %. Videre ble det utført en nedskalering som i tillegg økte kapasitet på antall prøver per opparbeiding, uten å øke total tid for gjennomføring. Tid per prøve ble dermed anslått å ha en total reduksjon på 83 %. Total løsemiddelbruk ble også redusert med rundt 91 %.

For å komme fram til den endelige metoden ble en rekke optimaliseringsforsøk utført med mål om å bedre fettopprensing, gjenfinning og tidsbruk. Lipidfiltreringskolonner, Captiva EMR cartridges, ble testet ut og vurdert opp mot SPE-kolonnene ENV+, som FFI-metoden originalt benyttet. Forsøkene indikerer at Captiva gir grundigere fettopprensing, basert på forbedret gjenfinning av analyttene ETN, ISO TNT, TNT og PETN, som kan være utfordrende å ionisere. Gjenfinning av øvrige eksplosiver viste liten endring fra metoder med ENV+. Captiva tilbyr også enklere og hurtigere fettopprensing enn ENV+. Raskere bruk av ENV+ ble forsøkt, men analyttens affinitet til denne kolonnen gjør at kondisjonerings- og skylletrinn ikke kan utelates. Forsøk på forbedre utbyttet av Captiva ved å inkludere et skylletrinn, viste seg lite egnet for en multimetode. Vi vil dermed anbefale fettopprensing på Captiva-kolonner som et mer effektivt alternativ til ENV+-kolonner. Skylling av Captiva-kolonner er unødvendig.

Det ble til tider observert et faseskille under opparbeiding av prøvene. Fasene ble separert med mål om å øke graden av fettopprensing, og viste gode resultater for TNT og ETN som mistenkes å være mer utsatt for matrikseffekter. Det ble derimot vanskelig å gå videre med metoden, da faseskille varierer mellom prøver. Tilsetning av vann til prøver før opprensing på ENV+ ga ikke tydeligere faseskille og viste spredte resultater, og anbefales ikke. For biologiske prøver med høyere fettinnhold enn fisken vi benyttet, er det sannsynlig at det oppstår konstante og tydeligere faseskiller. I slike tilfeller kan det være hensiktsmessig å ta ut den øverste fasen, da den er merkbart renere og inneholder majoriteten av analytter.

Vakuumsentrifugering ble utprøvd som en alternativ metode til tørking med natriumsulfat, men dette ga svært dårlig gjenfinning av TNT og PETN. Trolig fordi prøvene ble skitnere enn vanlig, noe disse eksplosivene viser seg å være sensitive for. Vakuumsentrifugering ga ikke tilfredsstillende resultater for en multimetode, var tidkrevende, og anbefales ikke. Forsøket viste derimot at saltet bidrar lite til ionesuppresjon. Ulike variasjoner i inndampingstrinn ble undersøkt for å kartlegge hvorvidt de påvirker resultatet. Resultatene viste inndamping på 60 °C ga bedre utbytte enn inndamping på 45 °C. Inndamping til 1 ml før sprøytefiltrering ga utfelling som ikke var tilstede ved 2 ml, og ga grundigere filtrering under hurtigmetoden. Det var derimot ikke tilfellet for den nedskalerte metoden, trinnet ble dermed utelatt i den endelige metoden. Forsøk som kuttet inndampingstrinnet før fettopprensing på Captiva viste bedre resultater, men ble ikke benyttet i den endelige metoden. Dette var fordi volumet oversteg Captiva-kolonnens kapasitet, og den endelige analyseprøven mest sannsynlig ville inneholde store deler vann, som eksplosivene generelt er lite løselige i.

Et validerings- og kalibreringsforsøk av endelig metode ble utført. Resultatene viste jevnt over god gjenfinning av alle eksplosiver, med laveste på 43 % for ETN og høyeste på 54 % for ISO DNP. Analysen indikerte liten grad av ionesuppresjon, med unntak av ETN, men bør videre undersøkes grunnet usikkerhet. Validering- og kalibrering av endelig metode viste tilfredsstillende resultater, med unntak av TNT og ETN hvor kalibreringskurvene måtte forkastes. Analysens presisjon og riktighet ble beregnet for de øvrige eksplosivene, og var godt innenfor akseptkravene på ± 15 %. Beregnet LOQ-1 indikerer at spormengder av de ulike eksplosivene kan kvantifiseres i området 1,29 – 2,56 ng/g prøve. Fire reelle prøver ble analysert og kvantifisert. Ett eksplosiv, PETN, ble detektert i prøve 1 og konsentrasjonen beregnet til 2,93 ng/g.

5.1 Anbefalinger for videre arbeid

Resultatene for ionesuppresjon har mye usikkerhet, da de er beregnet fra én parallell med gjenfinningsprøver. For sikrere beregning kan det være hensiktsmessig å benytte andre

metoder, for eksempel med flere paralleller med BF-S og GF. Produsenten av MS-instrumentet foreslår å direkte injisere analytten på MS og samtidig kjøre en prøve med blank matriks på LC, for å kartlegge suppressjonsregioner (30). Toksikologiske studier predikerer at PETN ikke bioakkumuleres i akvatiske organismer, grunnet lav vann-oktanol-koefisient (3). For sikker deteksjon av PETN i reell prøve 1, anbefaler vi å opparbeide og analysere flere prøver fra samme specimen.

Vi anbefaler å benytte 6 ml Captiva-kolonner i stedet for 3 ml, slik at inndampingssteget for opprensing kan kuttes ut. I følge våre resultater kan det øke effektiviteten og gi bedre gjenfinning. Det kan også være interessant å doble hastigheten på sentrifugen, noe vi planla, men ikke rakk å gjøre. En studie bruker hastigheter på 4000 rpm (31). Hvis man ønsker å videre undersøke om separering av faser kan bidra til ytterligere fettopprensing, kan det kanskje testes om tilsetning av et upolart løsemiddel som ikke er blandbart med acetonitril, for eksempel sykloheksan eller heksan, vil gi et tydeligere faseskille. Dette er kun en hypotese og ikke noe vi har gjort litteratursøk på.

Mot slutten av arbeidet ble det funnet en studie som viser interessante metoder for opparbeide og detektere TNT i fisk (31). Blant annet fryses den ferdig opparbeidede prøven for å felle ut og fryse lipider, slik at supernatant uten fett enkelt kan helles av (31). Studien viser også at TNT danner ikke-ekstraherbare rester i fiskevev, i form av ADNter og DANter, og gjør opp 83 % av fiskens TNT-innhold/inntak (31). De ikke-ekstraherbare nedbrytningsproduktene blir ekstrahert fra vevet gjennom hydrolyse med 0,1 M HCl, men dette viser seg lite effektivt. Det kan være nyttig å videreutvikle metoden med hensyn til dette.

Referanseliste

1. Johnsen A. Påvirkes fisk og skalldyr av dumpet ammunisjon? - en undersøkelse i fire dumpfelt for krigsetterlatenskaper. Rapport nr. 21/01396 [Internett]. Norge: Forsvarets forskningsinstitutt (FFI); 2021 [hentet 16. mai 2022]. Tilgjengelig fra: <https://publications.ffi.no/nb/item/asset/dspace:7168/21-01396.pdf>.
2. Beck AJ, Gledhill M, Schlosser C, Stamer B, Böttcher C, Sternheim J, et al. Spread, behavior, and ecosystem consequences of conventional munitions compounds in Coastal marine waters. *Frontiers in Marine Science* [Internett]. 2018 [hentet 16. mai 2022]; 5(141):[1-18 s.]. Tilgjengelig fra: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmars.2018.00141/full>.
3. Voie ØA. Toksikologiske og kjemiske egenskaper av sprengstoff og komponenter i ammunisjon. Rapport nr. 2005/00444 [Internett]. Norge: Forsvarets forskningsinstitutt (FFI); 2004 [hentet 10. mai 2022]. Tilgjengelig fra: <https://publications.ffi.no/nb/item/asset/dspace:3132/05-00444.pdf>.
4. Forsvarets forskningsinstitutt (FFI). Lanserer ny karttjeneste for dumpet ammunisjon [Internett]. Norge: Forsvarets forskningsinstitutt; 2018 [oppdatert 6. september 2018; hentet 18. mai 2022]. Tilgjengelig fra: <https://www.ffi.no/aktuelt/nyheter/lanserer-ny-karttjeneste-for-dumpet-ammunisjon>.
5. Tørnes JA, Blanch HH, Wedervang TI, Andersen AG, Opstad AM. Undersøkelse av skipsvrak inneholdene kjemisk ammunisjon senket i norske farvann etter annen verdenskrig. Rapport nr. 98/6007 [Internett]. Norge: Forsvarets forskningsinstitutt (FFI); 1989 [hentet 14. mai 2022]. Tilgjengelig fra: https://publications.ffi.no/nb/item/asset/dspace:2749/89-60071.pdf?fbclid=IwAR0Ynv6jBx1t-WL9RI_4MiC6uU3ukmpM1uV2mEpVyoMeyh3xr-2p4eXxK00.
6. Meidl JH. Explosive and Toxic Hazardous Materials. USA: Glencoe Press; 1970.
7. Johnsen A, Karsrud TE, Rosslund HK, Larsen A, Myran A, Longva K. Forurensninger av eksplosiver i Forsvarets skyte- og øvingsfelt: forundersøkelse av ulike baner med vekt på prøvetakingsmetoder. Rapport nr. 2008/00535 [Internett]. Norge: Forsvarets forskningsinstitutt (FFI); 2008 [hentet 10. mai 2022]. Tilgjengelig fra: <https://publications.ffi.no/nb/item/asset/dspace:3425/08-00535.pdf>.
8. Meyer R, Köhler J, Homburg A. Explosives [[Internett]]. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Company KGaA; 2015 [hentet 6. mars 2022]. Tilgjengelig fra: https://app.knovel.com/web/view/khtml/show.v/rcid:kpEE000011/cid:kt00CYAA82/viewerType:khtml/root_slug:explosives-7th-edition/url_slug:table-of-contents?&b-toc-cid=kpEE000011&b-toc-root-slug=explosives-7th-edition&b-toc-title=Explosives%20%287th%20Edition%29&b-toc-url-slug=abel-test-to-azides&promoter=federation&page=1&view=collapsed&zoom=1.

9. Appel D, Strehse JS, Martin H-Jr, Maser E. Bioaccumulation of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) and its metabolites leaking from corroded munition in transplanted blue mussels (*M. edulis*). *Mar Pollut Bull* [Internett]. 2018 [hentet 15. mai 2022]; 135:[1072-8 s.]. Tilgjengelig fra: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0025326X18305927>.
10. PubChem. PubChem Compound Summary for CID 29574, 4-Amino-2,6-dinitrotoluene [Internett]. Methesda (MD): National Center for Biotechnology Information; 2004 [oppdatert 14. mai 2022; hentet 19. mai 2022]. Tilgjengelig fra: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4-Amino-2_6-dinitrotoluene.
11. PubChem. PubChem Compound Summary for CID 6954, Picric acid [Internett]. Methesda (MD): National Center for Biotechnology Information 2004 [oppdatert 14.mai 2022; hentet 19. mai 2022]. Tilgjengelig fra: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Picric-acid>.
12. Lease N, Kay L, Chavez DE, Robbins D, Manner VW. Increased handling sensitivity of molten erythritol tetranitrate (ETN). *J Hazard Mater* [Internett]. 2019 14. mai]; 367:[546-9 s.]. Tilgjengelig fra: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304389418312597>.
13. Matyáš R, Künzel M, Růžička A, Knotek P, Vodochodský O. Characterization of Erythritol Tetranitrate Physical Properties. *Propellants, Explosives, Pyrotechnics* [Internett]. 2015 [hentet 16. mai 2022]; 40(2):[185-8 s.]. Tilgjengelig fra: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/prep.201400291>.
14. DrugBank Online. Erythrityl tetranitrate [Internett]. Canada2007 [oppdatert 21. februar 2021; hentet 21. mai 2022]. Tilgjengelig fra: <https://go.drugbank.com/drugs/DB01613>.
15. Harris DC, Lucy CA. *Quantitative chemical analysis*. 9 utg. New York, NY: Macmillan International Higher Education; 2016.
16. Rønning PO, red. *Prøvetaking og prøveopparbeiding*. Oslo: OsloMet - Storbyuniversitetet, Institutt for maskin, elektronikk og kjemi, TKD; 2021.
17. Mühlhardt C. *Molecular biology and genomics* [Internett]. Burlington, MA: Academic Press; 2007 [hentet 10. mai 2022]. Tilgjengelig fra: <https://ebookcentral-proquest-com.ezproxy.oslomet.no/lib/hioa/reader.action?docID=283964>.
18. Thermo Scientific. Savant SpeedVac Concentrators [Internett]. USA: Thermo Fisher Scientific Inc. ; 2009 [hentet 11. mai 2022]. Tilgjengelig fra: <https://uh.edu/tech/clist/documents/manuals/standalone-equipment/speedvac2.pdf>.
19. Thermo Fisher Scientific. Savant SpeedVac Refrigerated Vapor Series: Thermo Fisher Scientific; [hentet 11. mai 2022]. Tilgjengelig fra: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/RVT450-115>.

20. Biotage. Method Development Guidelines: Solid Phase Extraction Using ISOLUTE ENV+ for the Extraction of Aqueous Samples [Internett]. N/A: Biotage; 2020 [hentet 19. mai 2022]. Tilgjengelig fra:
<https://selekt.biotage.com/hubfs/ANALYTICAL/DOCUMENTS/TECHNICAL%20NOTES/VARIOUS%20ISOLUTE/TN109.V.1%20Meth%20Dev%20Guidelines%20ENV+.pdf?hsLang=en>.
21. Zhao L, Lucas D. Efficiency of Biological Fluid Matrix Removal Using Agilent Captiva EMR - Lipid Cleanup [Internett]. USA: Agilent Technologies Inc.; 2017 [hentet 9. mai 2022]. Tilgjengelig fra:
<https://www.agilent.com/cs/library/applications/5991-8006EN.pdf>.
22. Rønning PO, red. Innføring i massespektrometri. Oslo: OsloMet - Storbyuniversitetet, Institutt for maskin, elektronikk og kjemi, TKD; 2021.
23. Waters. Chapter One Instrumentation. N/A: Waters; N/A. Rapport nr.: Rev. 03411.
24. Comitee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). Guideline on Bioanalytical Method Validation [Internett]. United Kingdom: European Medicine Agency; 2015 [hentet 15. mai 2022]. Tilgjengelig fra: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation_en.pdf.
25. Thompson M, Ellison SR, Wood R. Harmonized Guidelines for Single-Laboratory Validation of Methods of Analysis. Pure Appl Chem [Internett]. 2002 [hentet 13. mai 2022]; 74(5):[835-55 s.]. Tilgjengelig fra:
https://www.researchgate.net/publication/244742566_Harmonized_guidelines_for_single-laboratory_validation_of_methods_of_analysis_IUPAC_Technical_Report.
26. Desimoni E, Brunetti B. About Estimating the Limit of Detection by the Signal to Noise Approach. Pharm Anal Acta [Internett]. 2015 [hentet 16. mai 2022]; 6(3). Tilgjengelig fra:
<https://www.walshmedicalmedia.com/open-access/about-estimating-the-limit-of-detection-by-the-signal-to-noise-approach-2153-2435-1000355.pdf>.
27. Baduel C, Mueller JF, Tsai H, Gomez Ramos MJ. Development of sample extraction and clean-up strategies for target and non-target analysis of environmental contaminants in biological matrices. J Chromatogr A [Internett]. 2015 [hentet 24. mai 2022]; 1426:[33-47 s.]. Tilgjengelig fra:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967315016684>.
28. Beck AJ, Gledhill M, Kampmeier M, Feng C, Schlosser C, Greinert J, et al. Explosives compounds from sea-dumped relic munitions accumulate in marine biota. Science of the Total Environment [Internett]. 2022 [hentet 14. mai 2022]; 806(Pt 4):[151266- s.]. Tilgjengelig fra:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969721063440>.
29. PubChem. PubChem Compound Summary for CID 1493, 2,4-Dinitrophenol [Internett]. Methesda (MD): National Center for Biotechnology Information; 2004 [oppdatert 20. mai 2022];

hentet 25. mai 2022]. Tilgjengelig fra: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2_4-Dinitrophenol.

30. Waters. Ion Supression. N/a: Waters; 2011.

31. Lotufo GR, Belden JB, Fisher JC, Chen S-F, Mowery RA, Chambliss CK, et al. Accumulation and depuration of trinitrotoluene and related extractable and nonextractable (bound) residues in marine fish and mussels. Environ Pollut [Internett]. 2016 [hentet 23. mai 2022]; 210:[129-36 s.]. Tilgjengelig fra:

https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0269749115302098?ref=pdf_download&fr=RR-2&rr=710d2aef2ed4fac0.

Bilag

Bilag A: Gjenfinningsverdier for FFI-metode og hurtigmetode

Tabell A.1. Gjenfinning av utvalgte eksplosiver og intern standarder for FFI-metoden og hurtigmetoden.

Forsøk	ISO DNP	Pikrinsyre	ISO TNT	TNT	4- ADNT	RDX	PETN	ETN
FFI-metode	51 %	50 %	20 %	28 %	58 %	51 %	30 %	4 %
Hurtigmetode	42 %	47 %	4 %	22 %	56 %	50 %	37 %	2 %

Bilag B: Gjenfinningsverdier for de ulike optimaliseringsforsøkene

Figurene i de ulike optimaliseringsforsøkene (4.3) har benyttet gjenfinningsverdiene hentet fra tabellene i dette bilaget (B.1-B.6). I enkelte tabeller har gjenfinningen fra hurtigmetoden i bilag A blitt benyttet for sammenlikning og er derfor inkludert i disse tabellene. Gjenfinning fra enkelte optimaliseringsforsøk har blitt benyttet for sammenlikning på tvers av optimaliseringsforsøk og har derfor blitt repetert på tvers av tabeller.

Tabell B.1. Gjenfinning av utvalgte eksplosiver og intern standarder for ENV+ og Captiva gf/ u/C2 (heter «Captiva» i figur 7).

Forsøk	ISO DNP	Pikrinsyre	ISO TNT	TNT	4- ADNT	RDX	PETN	ETN
ENV+	0 %	64 %	0 %	38 %	60 %	64 %	55 %	18 %
Captiva gf u/C2	0 %	52 %	0 %	48 %	57 %	54 %	42 %	11 %

Tabell B.2. Gjenfinning av utvalgte eksplosiver og intern standarder for skylleforsøk 1, skylleforsøk 2 og Captiva gf/C2 (heter «uten skylning» i figur 8).

Forsøk	ISO DNP	Pikrinsyre	ISO TNT	TNT	4- ADNT	RDX	PETN	ETN
Skylling av Captiva_1	48,2 %	38,6 %	25,0 %	22,7 %	39,4 %	40,6 %	26,1 %	9,5 %
Skylling av Captiva_2	69,3 %	63,2 %	30,7 %	32,2 %	40,4 %	62,2 %	27,3 %	8,8 %
Captiva gf u/C2	0 %	52 %	0 %	48 %	57 %	54 %	42 %	11 %

Tabell B.3. Gjenfinning av utvalgte eksplosiver og intern standarder for de eksperimentelle prøvene (E1-E3) og ENV+ (heter «standard hurtigmetode» i figur 9 og 10).

Forsøk	ISO DNP	Pikrinsyre	ISO TNT	TNT	4- ADNT	RDX	PETN	ETN
E1: 400 µL Milli Q vann	0,0 %	51,2 %	0,0 %	0,7 %	78,6 %	62,1 %	0,0 %	0,0 %
E2-1	0,0 %	46,4 %	0,1 %	43,6 %	50,0 %	56,9 %	47,0 %	21,8 %
E2-2	0,0 %	4,2 %	0,0 %	1,0 %	4,4 %	5,7 %	3,6 %	1,0 %
E3: 1 mL MilliQ vann	0,0 %	57,7 %	0,0 %	38,3 %	61,0 %	59,1 %	35,7 %	4,0 %
ENV+	0 %	64 %	0 %	38 %	60 %	64 %	55 %	18 %

Tabell B.4. Gjenfinning av utvalgte eksplosiver og intern standarder for prøver og frossen prøve opparbeidet med vakuumsentrifugering, samt. hurtigmetoden de sammenliknes med i figur 11.

Forsøk	ISO DNP	Pikrinsyre	ISO TNT	TNT	4- ADNT	RDX	PETN	ETN
Hurtigmetode	42 %	47 %	4 %	22 %	56 %	50 %	37 %	2 %
Vakuumsentrifugering (tint)	44,5 %	45,2 %	5,1 %	6,1 %	56,9 %	64,9 %	2,8 %	0,5 %
Vakuumsentrifugering (frossen)	42,0 %	44,2 %	9,2 %	4,3 %	58,4 %	63,2 %	4,4 %	0,9 %

Tabell B.5: Gjenfinning av utvalgte eksplosiver og intern standarder for hurtigmetode og inndampingsforsøk 1.

Forsøk	ISO DNP	Pikrinsyre	ISO TNT	TNT	4- ADNT	RDX	PETN	ETN
Hurtigmetode	42 %	47 %	4 %	22 %	56 %	50 %	37 %	2 %
Inndamping_1 (45 grader)	50,6 %	44,5 %	6,8 %	5,5 %	44,6 %	39,7 %	7,0 %	1,2 %

Tabell B.6: Gjenfinning av utvalgte eksplosiver og intern standarder for skylting av captiva_2 (heter «uten inndamping» i figur 13) og inndampingsforsøk_2 hvor det ble utført inndamping før sprøytefiltrering på Captiva, der opparbeidingen ble utført i likhet med «skylting av Captiva_2».

Forsøk	ISO DNP	Pikrinsyre	ISO TNT	TNT	4- ADNT	RDX	PETN	ETN
Skylling av Captiva_2	69,3 %	63,2 %	30,7 %	32,2 %	40,4 %	62,2 %	27,3 %	8,8 %
Inndamping_2 (sprøytefiltr.)	64,0 %	57,2 %	32,1 %	29,7 %	48,5 %	56,6 %	30,5 %	13,8 %

Tabell B.7: Gjenfinning av utvalgte eksplosiver og intern standarder for inndampingsforsøk 3: Captiva u/inndamping før opprensing på Captiva. I figur 14 sammenliknes dette med gjenfinning av captiva-prøver som er opparbeidet i likhet med forsøk 3, men med inndamping.

Forsøk	ISO DNP	Pikrinsyre	ISO TNT	TNT	4- ADNT	RDX	PETN	ETN
Captiva u/inndamping	55,2 %	53,1 %	40,4 %	47,5 %	47,8 %	52,3 %	44,9 %	20,1 %
Captiva m/inndamp	46,3 %	45,4 %	45,4 %	42,9 %	41,3 %	45,8 %	40,9 %	15,1 %

Tabell B.8: Gjenfinning av utvalgte eksplosiver og intern standarder for raskere bruk av ENV+ (figur 15).

Forsøk	ISO DNP	Pikrinsyre	ISO TNT	TNT	4- ADNT	RDX	PETN	ETN
Vanlig ENV+	50,5 %	54,0 %	46,9 %	52,7 %	44,2 %	59,2 %	54,7 %	22,5 %
ENV+ u/skylling	8,6 %	6,6 %	0,0 %	0,1 %	0,5 %	11,3 %	18,3 %	8,0 %
ENV+ u/skyll og inndamping	20,1 %	17,5 %	0,8 %	0,9 %	6,9 %	25,1 %	26,7 %	10,2 %

Bilag C: Sammenlikning av gjenfinning for endelig metode

Tabell C.1: Gjenfinning av utvalgte eksplosiver og intern standarder for FFI-metode og endelig metode (figur 16).

Forsøk	ISO DNP	Pikrinsyre	ISO TNT	TNT	4- ADNT	RDX	PETN	ETN
FFI-metode	51 %	50 %	20 %	28 %	58 %	51 %	30 %	4 %
Endelig metode	54 %	45 %	43 %	50 %	43 %	47 %	45 %	44 %

Bilag D: Avvikstest for outliers i forsøk for Captiva uten skylling, skylleforsøk 1 og skylleforsøk 2

Tabell D.1: Resultat fra avvikstest.

Avvikstest for outliers i forsøk Captiva uten skylling, skylleforsøk 1 og skylleforsøk 2				
Forbindelse	Prøve	STD	STD x3	Avvik fra snitt
ISO DNP	C2, u/ skylling	-	-	-
	C3, Skyll. 1	1522.05	4566.16	29101.9
	C3, Skyll. 2	981.398	2944.19	23680.1
Pikrinsyre	C2, u/ skylling	2892.07	8676.21	13377.1
	C3, Skyll. 1	783.636	2350.91	15783.7
	C3, Skyll. 2	917.049	2751.15	9092.77
ISO TNT	C2, u/ skylling	-	-	-
	C3, Skyll. 1	19.6562	58.9685	355.300
	C3, Skyll. 2	67.6546	202.964	95.7390
TNT	C2, u/ skylling	205.281	615.843	521.683
	C3, Skyll. 1	25.7373	77.2118	439.478
	C3, Skyll. 2	207.333	621.999	108.582
4-ADNT	C2, u/ skylling	859.203	2577.61	4808.93
	C3, Skyll. 1	271.134	813.403	7427.18
	C3, Skyll. 2	1149.95	3449.84	448.315
RDX	C2, u/ skylling	556.346	1669.04	2577.27
	C3, Skyll. 1	274.606	823.819	3441.98
	C3, Skyll. 2	45.8813	137.644	835.288
PETN	C2, u/ skylling	884.782	2654.35	2071.30
	C3, Skyll. 1	483.377	1450.13	2032.86
	C3, Skyll. 2	399.240	1197.72	115.264
ETN	C2, u/ skylling	18.3848	55.1543	59.3880
	C3, Skyll. 1	2.31295	6.93884	29.0805
	C3, Skyll. 2	1.25370	3.76110	5.52650