

**Sluttrapport for FHF - prosjektet**  
**Sjømattrygghet - Fremmedstoffer 2005**

Validering av metode til bestemmelse av kjemiske former av  
pesticidene endosulfan ( $\alpha$ -endosulfan,  $\beta$ -endosulfan og  
endosulfansulfat) og toxafen (26, 32, 50 og 62)

FHF - Prosjektnummer 232024

Februar 2007

Kåre Julshamm  
Nasjonalt institutt for ernærings- og sjømatforskning (NIFES)  
Postboks 2029 Nordnes, 5817 Bergen  
Tlf. 55 90 52 00  
E-post: [kju@nifes.no](mailto:kju@nifes.no)

## Sammendrag

Endosulfan og toksafen er begge persistente klorholdige insekticider. Endosulfan har det systematiske navnet 1,4,5,6,7,7-hexachloro-1,5,5a,6,9,9a-hexahydro-6,9-methano-2,4,3-benzodioxathiepin-3-oxide. Endosulfan foreligger i tre stereoisomere former som utgjør teknisk endosulfan ( $\alpha$ -endosulfan,  $\beta$ -endosulfan og endosulfan sulfat). Disse tre stereoisomere formene har vist seg å bioakkumulere forskjellig i marine organismer. Toksafen har den kjemiske formelen  $C_{10}H_{10}Cl_8$  og er en blanding av 670 kjemikalier kalt polyklorerte terpenener. Toksafen er et kjemikalium som volder internasjonal bekymring fordi det er persistent i miljøet og fordi det kan føres over store avstander. Begge disse kjemikaliene har vært brukt hovedsakelig som insekticider i landbruket i bomullsproduksjon, men også i produksjon av korn, frukt, nøtter og grønnsaker. Toksafen har vært mye brukt som insekticid, spesielt etter at DDT ble utfaset i midten på 70-tallet. Begge stoffgruppene er utfaset i de vestlige land og USA, men konsentrasjonene i det marine miljø er fortsatt høye og konstante. Produksjonen fortsetter fremdeles i enkelte land, bl. a. Russland. Forbindelsene har høy toksisitet for fisk.

EU har på bakgrunn av endosulfanets bioakkumulerende evne i det marine miljø satt en øvre grenseverdi for dette stoffet i fôr til oppdrettsfisk til 0,005 mg/kg. Denne lave øvre grenseverdien for endosulfan i fiskefôr krever en følsom og presis analysemetoder til bestemmelse av disse forbindelsene.

I dette prosjektet har det blitt utviklet analysemetoder til bestemmelse av endosulfan ( $\alpha$ -endosulfan,  $\beta$ -endosulfan og endosulfan sulfa ) og toksafen (26, 32, 50,62) i fiskefilet og fiskefôr med GC/MS teknikk. Kravet til analysemetode til bestemmelse av endosulfan var blant annet at metodens følsomhet, uttrykt som metodens bestemmelsesgrense (LOQ), skulle være minst 1/10 part av EUs øvre grenseverdi. I prosessen med metodeoptimalisering ble det identifisert en rekke kritiske faktor i både opprensning og sluttbestemmelse som er synliggjort i metodeteksten til analysemetoden. Analysemetodens bestemmelsesgrense (LOQ) ble beregnet til 0,0003 mg/kg prøve for  $\alpha$ -endosulfan og  $\beta$ -endosulfan , og 0,0005 mg/kg prøve for endosulfan sulfat. Analysemetodens LOQ for toksafen ble beregnet til 0,0025 for toksafen 26 og 50 og 0,0015 for toksafen 32 og 62. LOQ for endosulfan oppfylte kravet i forhold til EUs øvre grenseverdi på 0,005 mg/kg prøve. Metodenes riktighet har blitt testet ved at en rekke prøver har blitt analysert ved et annet laboratorium for endosulfan og toksafen, og resultatene var tilfredsstillende. Metodens måleusikkerhet målt som 2 x RSD (%) hvor RSD

er intern reproduserbarhet, varierte mellom 20% til 40%. Metoden kan anvendes til å bestemme endosulfan og toksafen i fiskefilet, ingredienser til fiskefôr og fiskefôr.

## **Bakgrunn**

Norsk fiskerinæring er først og fremst en eksportnæring og produktene som produseres konkurrerer med en rekke andre produkter i matvaremarkedet. For å lykkes i de ulike internasjonale markedene er det en rekke faktorer som har betydning. Et viktig bidrag er at norsk sjømat er dokumenterbar trygg mat. Det betyr at det vites at nivået av fremmedstoffer i sjømat er akseptabelt ut fra for eksempel øvre grenseverdier gitt i internasjonale lovverk der det eksisterer.

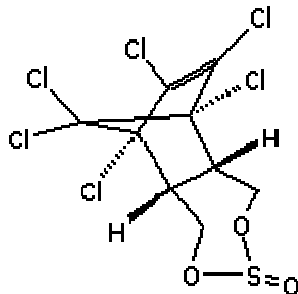
At det er avgjørende for Norge med forskning og overvåkning på fremmedstoffer i sjømat viste en artikkel i Science i 2004. I etterkant av artikkelen har det vært reist spørsmål om det er tilstrekkelig kunnskap på miljøgifter i sjømat. Artikkelen avdekket blant annet at det finnes meget begrenset informasjon om en rekke analytter, inklusiv pesticider, i norsk produsert mat fra havet (både oppdrettet og villfanget). Det er stort behov for utvikling av analysemetoder med økt følsomhet, samt nye metoder for diverse pesticider. I tillegg er det viktig med kunnskap vedrørende toksisitet og omsetning av disse hos fisk, og alle disse faktorene har avgjørende betydning for matvaretrygghet. Gjeldene EU øvre grenseverdier på pesticider, som inkluderer både toksafen og endosulfan, begrenser fôrindustriens valg av råstoffer. Disse grenseverdiene er satt på bakgrunn av meget begrenset dokumentasjon, og publisering av relevant forsknings- og overvåkningsdata er etterlyst blant annet av det Europeiske mattilsynet og Kommisjonen.

Målsettingen med dette prosjektet var å etablere pålitelige og presise metoder for bestemmelse av pesticidene endosulfan ( $\alpha$ -endosulfan,  $\beta$ -endosulfan og endosulfan sulfat) og toxafen (26, 32, 50 og 62) i forskjellige sjømatprodukter, fiskefôr og humant plasma. Kravet var at metodenes følsomhet og bestemmelsesgrense burde være betydelig lavere enn EUs øvre grenseverdi der slik grenseverdi finnes. I tillegg ville en studere overførsel av disse pesticidene fra fôr til fillet av laks. Det ble tidlig klart at nivåene av disse stoffene i humant plasma var så lave at metodene ikke var i stand til å kvantifisere disse.

## **Eksperimentelt**

### **Endosulfan**

Endosulfan er klororganiske pesticider med det systematiske navnet 1,4,5,6,7,7-hexachloro-1,5,5a,6,9,9a-hexahydro-6,9-methano-2,4,3-benzodioxathiepin-3-oxide.



Disse forbindelsene er karakterisert ved at de er persistente i miljøet og har evne til å bioakkumuleres i det marine miljø. Endosulfan tilhører således gruppen Persistente organiske kontaminanter (POPs). Klororganiske forbindelser er kjent for å være uløselig i vann, men svært løselig i fett. Det er god vitenskapelig dokumentasjon på at dette pesticidet er svært toksisk for organismer i det vandige miljø. Endosulfan tilføres det marine miljø vanligvis som en konsekvens av avrenning fra jordbruket og andre tilfeldige utslipp.

### **Analysemetode til bestemmelse av endosulfan**

Metodearbeidet har inkludert en rekke forsøk hvor hver enkelt av de kritiske parametrene i analysemetoden har blitt testet. Det gjelder spesielt forskjellige løsemidler og blandingsforhold i tilknytning til forskjellige opprensningskolonner som anvendes i metoden. Metodeutprøvingen endte ut med følgende metodebeskrivelse til bestemmelse av de tre stereoisomere formene av endosulfan. Analysemetoden kunne også brukes med visse modifikasjoner til bestemmelse av toksafen isomerene 26, 32, 50 og 62:

- \* Testprøve tilsvarende 0,5 gram fett veies inn og klargjøres for ASE-ekstraksjon (Accelerated Solvent Extractor; ASE 300<sup>TM</sup>, Dionex, USA), 33 ml celler pakkes med hydromatriks samt prøve og internstandard. Cellen fylles halvfull med hydromatriks. 100 µl internstandard (500 µg/ml) tilsettes, mer hydromatriks (ikke fullt) fylles på og prøven blandes godt med hydromatriksen. Det fylles opp med hydromatriks. Kontrollprøver spikes i tillegg med 50 µl. Standard rekke fremstilles ved å veie inn ca 0,5 olje som ”spikes” med standardoppløsning, til sammen 4 nivåer. Det anvendes

- samme mengde internstandard som i prøvene. To typer blank taes med i hver serie, blank uten matriks og prøveblank (som er olje - 0,5 g av samme olje som benyttes til standardene, Maisolje fra Mills). Heksan anvendes som ekstraksjonsmiddel.
- \* Etter ekstraksjonen konsentreres prøveløsningene ved varme og nitrogen-gass inndampning på assistert TurboVap (Turbo VapII™, Zymark, USA) (0,5 ml endepunkt). Inndampningen skjer ved hjelp av nitrogen og i varmebad ved 35 °C. Inndampningen tar ca. 45 – 60 min.
  - \* Ekstraktet overføres så til en ChemElute kolonne. TurboVap røret vaskes med 0,5 ml heksan som også overføres til ChemElute kolonnen. Kolonnen plasseres i Aspec for rensing av ekstraktet (ASPEC™, XL4, Gilson, Middleton WI, USA).
  - \* Tørring i 10 min før Aspec startes. Programmet velges alt etter hvor mange prøver som skal renses opp. Eksempel: For 1-8 prøver velges det programmet som inneholder alle opprensingstrinnene. For 9-20 prøver velges først det programmet som eluerer ChemElute kolonnen (4 eller 8 prøver om gangen). Acetonitril eluatene fra ChemElute samles opp og opprensingen skjer ved hjelp av først en C18 kolonne og dernest en Florisil (chem elut kolonne).
  - \* Følgende elueringsreagenser og mengder anvendes: acetonitril, 2% dietyleter/heksan (2:100, v/v) og 7,5) og disse kolonnene anvendes i sekvens: Chem Elut™, BondElut, C18, Bond Elut, Florisil kolonne, kolonnene er alle laget av Varian.
  - \* Eluatene fra Aspec overføres deretter til 10 ml sentrifugerør. Prøveglassene fylles med 5 ml heksan for å vaske med seg all analytt. Heksanfasen overføres til sentrifugerør. Deretter tilsettes 1 ml heksan til hvert sentrifugerør og rørene mikses på wortex. 1 ml konsentrert svovelsyre (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) tilsettes hvert sentrifugerør, og rørene mikses nok en gang på wortex. Sentrifugerørene settes i sentrifugen og spinnes på 2800 rpm i 10 minutter. Den øverste fasen overføres til reagensrør. Denne dampes inn under N<sub>2</sub> til ca. 500 µl, tilsettes 100 µl internstandard i isooktan, dampes så videre inn til ca. 100 µl før den injiseres på GC-MS.
  - \* Sluttbestemmelsen utføres med GC/MS (TRACE GC Ultra™ /DSQ™ Single Quadropol GC/MS, Thermo Finnigan, Bremen, Tyskland) med negativ kjemisk ionisasjon i SIM mode.
  - \* For kvantifisering av steroisomerene av endosulfan ble prøvene spiket med en blanding av <sup>13</sup>C merket α- og β-endosulfan som internstandard (Cambridge Isotope Laboratories)

- \* Gass-væske kromatografen var utstyrt med en silica kapillærkolonne (RTx-CLPesticide kolonne, Restek, Bellefonte, USA).

## Kvalitetskontroll av analysemetoden

### Kvantifiseringsgrense (LOQ)

Bestemmelsesgrensen for metoden er basert på signal/støy forholdet (1:3) og beregnet til henholdsvis 0,3 µg/kg prøve for α-endosulfan og β-endosulfan i fiskemuskel, lever og fôr og 0,5 µg/kg prøve for endosulfan sulfat også i fiskemuskel, lever og fôr.

### Riktighet og presisjon

Tabell 1 viser resultatene av innholdet av α-endosulfan, β-endosulfan og endosulfan sulfat i en kontrollprøve som er kjørt i forbindelse med forskjellige analyseprogrammer i 2006 og 2007. Dette gir viktig kunnskap om metodens riktighet og presisjon (interne reproduserbarhet).

Tabell 1. Innholdet av α-endosulfan, β-endosulfan og endosulfan sulfat i en kontrollprøve tatt med som kvalitets kontroll av analysemetoden i perioden.

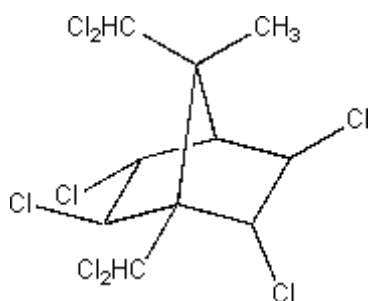
Analysedato i 2006	α-Endosulfan	β-Endosulfan	Endosulfan sulfat
	ug/kg	ug/kg	ug/kg
7. mars	18,4	22,5	17,0
30. august	18,4	22,2	18,2
30. august	19,1	23,0	19,2
9. juni	18,0	*	16,5
6. september	17,5	*	*9,6
28. november	18,5	21,3	*
17. oktober	15,4	16,1	12,2
23. oktober	14,6	17,0	20,8
1. november	21,7	14,6	16,9
22. november	20,3	21,6	27,7
24. november	19,2	20,8	11,1
1. desember	20,5	34,0	26,9
8. desember	19,8	18,9	20,8
12. desember	21,0	21,9	21,7
18. desember	20,5	23,4	15,8
20. desember	17,9	20,7	14,0
3. januar 2007	21,3	21,6	20,5
5. januar 2007	20,0	21,2	*10,6
12. januar 2007	21,2	20,0	26,1
Middelverdi	<b>19,1</b>	<b>21,2</b>	<b>19,1</b>
Standard avvik (s)	<b>1,9</b>	<b>4,1</b>	<b>4,9</b>
Middel – 2s	<b>15,3</b>	<b>13,0</b>	<b>9,2</b>
Middel + 2s	<b>23,0</b>	<b>29,4</b>	<b>28,9</b>
Sertifisert verdi	<b>19,9±0,46</b>	<b>20,3±0,48</b>	<b>20,2±0,60</b>

I perioden er kontrollprøven analysert 19 ganger og middelverdien for  $\alpha$ -endosulfan er beregnet til 19,1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  prøve, mens den sertifiserte verdien for  $\alpha$ -endosulfan er oppgitt til 19,9  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Resultatene viser at riktigheten er god for alle de tre stereoisomere formene. Tilsvarende god overensstemmelse er også funnet for  $\beta$ -endosulfan og endosulfan sulfat (tabell 1).

Presisjonen ved bruk av intern reproduserbarhet beregnet som RSD (%) er 10% for  $\alpha$ -endosulfan, 19% for  $\beta$ -endosulfan og 26% for endosulfan sulfat. Dette er god presisjon på bakgrunn av det lave konsentrasjonsnivået i prøvene.

### Toxafen

Toksafen har den kjemiske formelen  $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{Cl}_8$  og er en blanding av 670 kjemikalier er påvist i matvarer av polyklorerte terpenener. Toksafen er et kjemikalium som volder internasjonal bekymring fordi det er persistent i miljøet, bioakkumulerer og fordi det kan føres over store avstander. I dette prosjektet er følgende toksafen isomerer studert: Toksafen 26, 32, 50 og 62. Den kjemiske strukturen under viser toksafen 26.



### Analysemetode til bestemmelse av toksafen

Prosedyren til bestemmelse av toksafen er stort sett like til prosedyren for endosulfan, unntatt opprensningen med svovelsyre. Prøvematerialet (ca. 0,5 g fett) ekstraheres med heksan ved bruk av Accelerated Solvent Extractor (ASE® 300™, Dionex, USA). Deretter oppkonsentreres ekstraktet ved hjelp av nitrogen og varme (Turbovap II™ Zymark, USA). Videre renses ekstraktet ved bruk av acetonitril, 2% dietyleter i heksan og 7,5% aceton i heksan på et automatisert SPE system, ASPECT™ XL4 (Gilson, Middleton WI, USA). Tre

ulike SPE-kolonner blir brukt; først en Chem Elut™ kolonne, deretter en BondElut® C18-kolonne og til slutt en BondElut® Florisil-kolonne. Analysen blir deretter utført ved bruk av GC-MS (TRACE GC Ultra™/DSQ™ Single Quadrupole GC/MS, Thermo Finnigan, Bremen, Germany) i negativ kjemisk ionisering SIM modus. Gasskromatografen er utstyrt med en HP-5ms kolonne (Agilent J&W). For å kvantifisere innholdet av de ulike pesticidene blir prøvene tilsatt en blanding av <sup>13</sup>C merket pesticid (Cambridge Isotope Laboratories, USA) før opparbeiding.

### **Kvalitetskontroll av analysemetoden**

#### Kvantifiseringsgrense (LOQ)

Bestemmelsesgrensen for metoden er basert på støy/signal forholdet (1:6) og beregnet til henholdsvis 0,0025 mg/kg prøve for toksafen 26 og 50 og 0,0015 mg/kg for toksafen 32 og 62 (tabell2). Kvantifiseringsgrensen for metoden er tilfredsstillende til å kunne bestemme kvantitativt innholdet av toksafen i fiskefôr og fiskemuskel.

Tabell 2. Deteksjonsgrense (LOD), kvantifiseringsgrense (LOQ) og øvre kvantifiseringsgrense for toksafen 26, 32, 50 og 62.

<b>Analytt</b>	<b>LOD (mg/kg)</b>	<b>LOQ (mg/kg)</b>	<b>Øvre kvantifiserings grense</b>
Toksafen 26	0,001	0,0025	0,045
Toksafen 32	0,0005	0,0015	0,045
Toksafen 50	0,001	0,0025	0,045
Toksafen 62	0,0005	0,015	0,045

#### Riktighet uttrykt som gjenvinning

Riktigheten til metoden ble testet ved gjenvinningsforsøk hvor tre forskjellige nivåer av de fire toksafenforbindelsene ble tilsatt til en fôrprøve med kjent toksafeninnhold. Resultatene for toksafen 62 er vist i tabell 3. Resultatene viste et gjennomsnitt av gjenfunnet toksafen 62 på 94%. Det er akseptabelt.



Tabell 3. Gjenvinningsforsøk med toksafen 62 tilsatt prøver av fiskefôr. Det ble tilsatt standard på tre niær

Standard tilsatt (ng/g)	Prøve uten standard (ng/g)	Analysert verdi (ng/g)	Gjenvinning (%)
0,894	2,573	3,407	93
0,859	3,096	3,523	50
0,962	2,611	3,546	97
6,684	2,573	7,326	71
6,996	3,096	9,132	86
7,293	2,611	11,880	128
42,857	2,573	55,321	123
42,135	3,096	36,652	79
43,103	2,611	44,092	96

### Overføring av endosulfan fra fôr til fisk

Det har blitt gjennomført et fôringsforsøk med atlantisk laks. Laks ble delt i grupper og føret med forskjellige dietter basert på både marine og vegetabiliske fôringredienser. Fisk og fôr ble analysert for endosulfan. Resultatene er vist i tabell 4.

Tabell 4. Konsentrasjoner av endosulfan i fiskefôr basert på planteoljer (PO) og fiskeoljer (FO) og atlantisk laks som er føret på disse diettene over et livsløp.

Pesticid	LOQ (µg/kg)	Fôr (FO) (µg/kg)	Fôr (PO) (µg/kg)	Laks (FO) (µg/kg)	Laks (PO) (µg/kg)
α-endosulfan	0,3	0,80	0,4	<0,3	<0,3
β-endosulfan	0,3	0,87	0,5	<0,3	<0,3
Endosulfan sulfat	0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5

### Konklusjon

Metodearbeidet på toksafen som er gjennomført i dette prosjektet følges opp i et pågående FHF prosjekt "Metodeutvikling og validering av toksafen-forbindelser" (prosjektnr. 232034). I det pågående prosjektet er det analysemetode til bestemmelse av toksafen 26, 40, 41 og 42 som fokuseres, men målsettingen er å inkludere toksafen 23, 32, 50 og 62, slik at det blir en felles metode for alle de åtte toksafenisomerene.

Så fort metoden er validert vil den bli søkt akkreditert samt at metoden vil bli implementert og anvendt i de overvåknings- og forskningsprogrammene NIFES kjører.

### **Publikasjoner hvor dette metodearbeidet er inkludert**

Chris N. Glover, Dietrich Petri, Knut-Erik Tollefsen, Sonja Ylving, Nanne Jorum, Richard D. Handy, and Marc H. G. Berntssen: Assessing sensitivity of Atlantic salmon (*Salmo salar*) to dietary endosulfan exposure using tissue biochemistry and histology (submitted for publication)

Dietrich Petri, Chris N. Glover, Sonja Ylving, Kjersti Kolås, Gro Fremmersvik, Rune Waagbø, Marc H.G. Berntssen. Sensitivity of Atlantic salmon (*Salmo salar*) to dietary endosulfan as assessed by haematology, blood biochemistry, and growth parameters. *Aquatic Toxicology* 80 (2006) 2007-216