

## **Sluttrapport for FHF - prosjektet**

# **Sjømattrygghet - Fremmedstoffer 2006**

Metode for kvantitativ bestemmelse av perfluoreerte alkylstoffer (PFAS)

FHF - Prosjektnummer 232054

Desember 2007

Stig Valdersnes og Kåre Julshamn

Nasjonalt institutt for ernærings- og sjømatforskning (NIFES)

Postboks 2029 Nordnes, 5817 Bergen

Tlf. +4755905100

[www.NIFES.no](http://www.NIFES.no)

## Innledning

Perfluorerte alkylstoffer (PFAS) er en samlebetegnelse på et stort antall forbindelser som fremstilles industrielt. Felles for alle forbindelsene som skal inkluderes i denne metoden er at de består av en perfluoralkylkjede ( $R_F$ ) bundet til en funksjonell gruppe der denne funksjonelle gruppen avgjør hvilken klasse PFAS forbindelsen tilhører (Tabell 1).

**Tabell 1: PFAS-klasser som skal bestemmes av metoden**

<i>PFAS Klasse</i>	<i>Generell struktur</i>	<i>Funksjonell gruppe</i>
Perfluoralkylsulfonsyrer	$R_F-SO_3H$	Sulfonsyre
Perfluoralkylsulfonamider	$R_F-SO_2NH_2$	Sulfonamid
Perfluoralkylkarboksylsyrer	$R_F-CO_2H$	Karboksylsyre

PFAS brukes blant annet innen impregnering og i brannslukkingsapparater på grunn av de unike egenskapene til perfluoralkylkjeden. Da de fleste PFAS er verken fett- eller vannløselige bindes de ofte til proteiner. PFAS akkumuleres i næringskjeden og er persistente. Noen PFAS har en bioakkumuleringsfaktor på mer enn 6000 i fiskelever. Forbindelsene har nå global utbredelse.

Undersøkelser har vist at PFAS har en rekke toksikologiske effekter i levende organismer. Blant annet er det vist at PFAS gir forhøyet dødsrisiko ved prostatakreft og at forbindelsene forstyrrer kjønnsormonbalansen i kroppen. I tillegg har det blitt vist at PFAS fungerer som en peroxisom proliferator i rotter og at en tredjedel av rotteavkom døde innen tre dager etter fødsel dersom moren hadde blitt foret med 1,6 mg PFOS per dag. Forbindelsene er per dags dato enda ikke klassifisert av EU, men er foreslått klassifisert som toksiske.

Det er i dag ingen grenseverdier på innholdet av PFAS i sjømatprodukter, men EU har allerede besluttet å begrense bruken av PFAS. Norge vil derfor stanse eller betraktelig redusere utslippene av PFAS innen 2010. PFOS er allerede forbudt brukt i brannskum, tekstiler og impregneringsmidler.

## Sammendrag

I dette prosjektet har det blitt utviklet en analysemetode for bestemmelse av de viktigste medlemmene av de ulike PFAS-klassene gitt i tabell 1 i de marine matrisene som er gitt i tabell 2.

**Tabell 2: Matriser som er validert for metoden**

<i>Matrise</i>	<i>Type</i>
Oppdrettslaks	Muskel (fet)
	Lever (mager)
Torsk og Sei	Muskel (mager)
	Lever (fet)
	Rogn (medium/mager)
Klappmyssel og Grønlandssel	Muskel
	Lever
	Nyre
Fôr	-

I prosessen med metodeoptimalisering ble det identifisert en rekke kritiske faktorer i både opprensning og sluttbestemmelse. Et stort problem i analyser av PFAS er bakgrunnsnivå og potensiell kontaminering av prøven i alle trinn av analysen. Blant annet er forurensning fra Teflon<sup>®</sup>-holdig analytisk utstyr og instrumentdeler et problem, og bruk av slike produkter må derfor unngås så langt det er mulig. Det er også nødvendig å unngå bruk av glassutstyr og tilsvarende plastutstyr måtte derfor skaffes til veie. Analysemetodens bestemmelsesgrense ble beregnet til 0,0015-0,003 mg/kg for de fleste analytter i de fleste matriser. Metodenes riktighet har blitt testet ved gjenvinningsforsøk, og resultatene var tilfredsstillende. Metodens måleusikkerhet målt som  $2 \times \text{RSD} (\%) \pm 20\%$  hvor RSD er intern reproducerbarhet, varierte fra 7% til 36% for PFOS avhengig av nivå og matrise. Metoden er egnet til å bestemme de utvalgte PFAS i matrisene gitt i tabell 2.

## **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, i norskprodusert mat fra havet (både oppdrettet og villfanget). Det er stort behov for utvikling av analysemetoder med økt følsomhet, samt nye metoder for diverse analytter. I tillegg er det viktig med kunnskap vedrørende toksisitet og omsetning av disse hos fisk, og alle disse faktorene har avgjørende betydning for matvaretrygghet.

Målsettingen med dette prosjektet var å etablere en pålitelig og presis metode for bestemmelse av utvalgte PFAS i forskjellige marine matriser og sjømatprodukter. Det ble tidlig klart at nivåene av disse stoffene i fiskemuskel var så lave at metodene ikke var i stand til å kvantifisere disse.

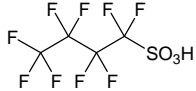
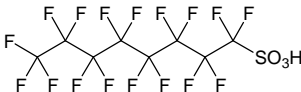

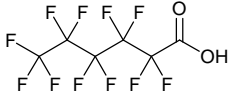
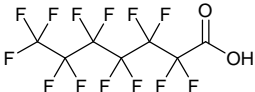


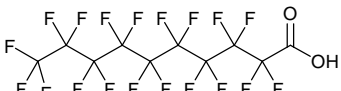


## **Eksperimentelt**

### **PFAS**

PFAS og da spesielt PFOS og PFOA (se tabell 3) er relativt nyoppdagede kontaminanter i det marine miljø. PFAS er persistente forbindelser som bioakkumulerer og har toksiske effekter. PFAS tilhører således gruppen persistente organiske kontaminanter (POPs). Det er blant annet vist tidligere at PFOA er kreftfremkallende og har reproduksjonsskadelige effekter på pattedyr. Forbindelsene har også potensial for vidtrekkende transport og dermed global spredning. Da forbindelsene er verken vann- eller fettløselige finner en de største konsentrasjonene i blod, lever og galleblære. PFOS kan også gjenfinnes i testikler og i hjernen til utsatte organismer. Analyser utført ved NIFES har også vist at forbindelsene kan finnes i kvantifiserbare mengder i fiskerogn.

Metoden som er utviklet kan kvantifisere følgende forbindelser (Tabell 3):

**Tabell 3: Forbindelser som kan kvantifiseres med metoden**

<i>Forkortelse</i>	<i>Navn</i>	<i>Struktur</i>	<i>CAS nummer</i>	<i>Summeformel</i>
PFBS	Perfluorbutyl sulfonsyre		375-73-5 (H <sup>+</sup> ) 29420-49-3 (K <sup>+</sup> )	C <sub>4</sub> HF <sub>9</sub> O <sub>3</sub> S
PFOS	Perfluoroktyl sulfonsyre		1763-23-1 (H <sup>+</sup> ) 2795-39-3 (K <sup>+</sup> )	C <sub>8</sub> HF <sub>17</sub> O <sub>3</sub> S
PFOSA	Perfluoroktyl sulfonamid		754-91-6	C <sub>8</sub> H <sub>2</sub> F <sub>17</sub> NO <sub>2</sub> S
PFHxA	Perfluorheksyl karboksylsyre		307-24-4	C <sub>6</sub> HF <sub>11</sub> O <sub>2</sub>
PFHpA	Perfluorheptyl karboksylsyre		375-85-9	C <sub>7</sub> HF <sub>13</sub> O <sub>2</sub>
PFOA	Perfluoroktyl karboksylsyre		335-67-1	C <sub>8</sub> HF <sub>15</sub> O <sub>2</sub>
PFNA	Perfluornonyl karboksylsyre		375-95-1	C <sub>9</sub> HF <sub>17</sub> O <sub>2</sub>
PFDCa	Perfluordekyl karboksylsyre		335-76-2	C <sub>10</sub> HF <sub>19</sub> O <sub>2</sub>
PFUnA	Perfluorundekyl karboksylsyre		2058-94-8	C <sub>11</sub> HF <sub>21</sub> O <sub>2</sub>
PFTeA	Perfluortetradekyl karboksylsyre		376-06-7	C <sub>14</sub> HF <sub>27</sub> O <sub>2</sub>

### Analysemetode til bestemmelse av PFAS

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 PFAS som er gitt i tabell 3:

- Testprøve tilsvarende 0,5-1 gram veies inn i et 15 ml polypropylen (PP) plastrør og tilsettes massemerkede internstandarder av PFOS og PFOA. Deretter tilsettes metanol til totalt volum er 4 ml. Kontrollprøve behandles likt med testprøver. Det anvendes samme mengde internstandard i alle prøvene. To typer blank taes med i hver serie, blank uten matriks og blank med bare internstandard. Prøvene ekstraheres i ca. 1 time på ultralydbad.
- Etter ekstraksjonen sentrifugeres prøvene og supernatanten dekanteres over i en 5 ml sprøyte og filtreres gjennom 0,45 µm nylonfilter ned i et 50 ml PP rør og tilsettes Milli-Q vann til totalt volum er ca. 35 ml.
- Ekstraktet deles så mellom to 20 ml polystyren (PS) plastrør før ASPEC (ASPEC™, XL4, Gilson, Middleton WI, USA) startes.
- På ASPEC benyttes Oasis®-WAX SPE kolonner (Waters corporation, Milford, MA, USA) til fastfase-ekstraksjon. Dette er en svak anionbytterkolonne som vil binde PFAS slik at annet uønsket innhold i prøven kan vaskes ut av kolonnen før PFAS elueres til slutt. Opprensingen tar ca. 10 minutter per prøve.
- Følgende løsemidler og mengder anvendes i ASPEC-metoden: metanol, Milli-Q vann, 1% ammoniumhydroksid i metanol og 5% maursyre i vann.
- Prøvene elueres med 1 ml 1% ammoniumhydroksid i metanol ned i et 5 ml PS-rør. Eluatene fra ASPEC suges deretter opp i 1 ml sprøyter og filtreres gjennom 0,2 µm nylonfilter ned i et Microcon® YM-3 sentrifugalfilter (Millipore, Billerica, MA, USA). Sentrifugalfiltrere settes i sentrifugen og spennes på > 10000 rpm i ca. 1 time. Deretter overføres filtratet til PP-vial for analyse på LC-MS/MS.
- Sluttbestemmelsen utføres med LC-MS/MS (Waters Acquity UPLC® – Quattro Premier™ XE MS/MS, Waters corporation, Milford, MA, USA) med negativ elektropray ionisasjon i MRM modus.

## Kvalitetskontroll av analysemetoden

### Kvantifiseringsgrense (LOQ)

Bestemmelsesgrensen for metoden er basert på signal/støy forholdet (3:1) og beregnet til 1,5-3 µg/kg prøve for de fleste PFAS i majoriteten av matrisene. Kvantifiseringsgrensen for metoden er tilfredsstillende til å kunne bestemme kvantitativt innholdet av PFAS i lever, rogn og nyre. Nivåene i fiskefôr og fiskemuskel er vanligvis for lave til at disse kan bestemmes med nåværende metodikk.

Tabell 4: Deteksjons- og bestemmelsesgrense for PFOS i ulike matriser

<i>Analytt</i>	<i>Matrise</i>	<i>Deteksjons- grense LOD (ng/g)</i>	<i>Kvantifiserings- grense LOQ (ng/g)</i>
	Laksemuskel <sup>b</sup>	1	3
	Lakselever <sup>b</sup>	0,5	1,5
	Seimuskel <sup>b</sup>	1	3
	Seilever <sup>b</sup>	0,5	1,5
	Seirogn <sup>b</sup>	1	3
	Torskemuskel <sup>a</sup>	0,5	1,5
	Torskelever <sup>b</sup>	0,5	1,5
PFOS	Torskerogn <sup>a</sup>	0,5	1,5
	Grønlandsselmuskel <sup>a</sup>	0,5	1,5
	Grønlandssellever <sup>a</sup>	1	3
	Grønlandsselnyre <sup>a</sup>	1	3
	Klappmyssmuskel <sup>a</sup>	0,5	1,5
	Klappmysslever <sup>a</sup>	1	3
	Klappmyssnyre <sup>a</sup>	1	3
	Fôr <sup>b</sup>	1	3

<sup>a)</sup> Tørr prøve; <sup>b)</sup> Våt prøve

### Presisjon

Presisjonen ved bruk av intern reproduserbarhet beregnet som RSD (%) varierte mellom 3% og 15%. Dette er en god presisjon på bakgrunn av det lave konsentrasjonsnivået i prøvene.

**Tabell 5: Konsentrasjon av PFOS i ulike prøver og intern-reproduserbarhet**

<i>Analytt</i>	<i>Matrise</i>	<i>Spike nivå</i>	<i>Konsentrasjon, ng/g</i>	<i>SD</i>	<i>RSD (%)</i>
		Uspiket	< LOQ	-	-
	Laksemuskel <sup>b</sup>	Middels	5,2	0,3	5
		Høyt	59	4,9	8
	Lakselever <sup>b</sup>	Uspiket	2,2	0,3	15
	Seimuskel <sup>b</sup>	Uspiket	< LOQ	-	-
	Seilever <sup>b</sup>	Uspiket	< LOQ	-	-
	Seirogn <sup>b</sup>	Uspiket	< LOQ	-	-
	Torskemuskel <sup>a</sup>	Uspiket	< LOQ	-	-
PFOS	Torskelever <sup>b</sup>	Uspiket	3,3	0,4	11
	Torskerogn <sup>a</sup>	Uspiket	2,6	0,1	6
	Grønlandsselmuskel <sup>a</sup>	Uspiket	10	0,5	5
	Grønlandssellever <sup>a</sup>	Uspiket	150	3,9	3
	Grønlandsselnyre <sup>a</sup>	Uspiket	32	1,6	5
	Klappmyssmuskel <sup>a</sup>	Uspiket	7,2	0,3	4
	Klappmysslever <sup>a</sup>	Uspiket	120	6,0	5
	Klappmyssnyre <sup>a</sup>	Uspiket	45	2,9	6
	Fôr <sup>b</sup>	Uspiket	< LOQ	-	-

<sup>a)</sup> Konsentrasjon gitt i tørrvekt; <sup>b)</sup> Konsentrasjon gitt i våtvekt



### Riktighet

Riktigheten til metoden ble testet ved gjentatte gjenvinningsforsøk hvor to forskjellige nivåer av de 10 PFAS-forbindelsene ble tilsatt til en laksemuskel uten kvantifiserbart innhold av PFAS. Resultatene for de ulike PFAS-forbindelsene er vist i tabell 6. Resultatene viste et gjennomsnitt av gjenfunnet PFOS og PFOA på 89%. RSD (%) var i gjennomsnitt mindre enn 20 % for alle forbindelsene. Dette er akseptabelt.

**Tabell 6: Riktighet som gjenvinning i laksemuskel, to nivå for alle de undersøkte PFAS**

<i>Analytt</i>	<i>Spike nivå</i>	<i>% gjenvinning</i>	<i>SD</i>	<i>RSD (%)</i>
PFBS	Middels	88	8	9
	Høyt	81	14	17
PFOS	Middels	78	4	6
	Høyt	99	9	9
PFOSA	Middels	47	2	5
	Høyt	60	6	9
PFHxA	Middels	90	23	25
	Høyt	94	9	10
PFHpA	Middels	79	15	19
	Høyt	103	5	5
PFOA	Middels	78	3	4
	Høyt	99	7	8
PFNA	Middels	73	4	6
	Høyt	88	6	6
PFDcA	Middels	52	5	10
	Høyt	69	4	6
PFUnA	Middels	43	5	12
	Høyt	54	4	8
PFTeA	Middels	22	2	9
	Høyt	30	4	15

### Måleusikkerhet (MU)

Metodens måleusikkerhet målt som  $2 \times \text{RSD} (\%) + 20\%$  hvor RSD er intern reproduserbarhet, varierte fra ca. 10% til ca. 40% avhengig av nivå, matrise og analytt.

**Tabell 7: Måleusikkerhet for PFOS**

<i>Analytt</i>	<i>Matrise</i>	<i>Spike nivå</i>	<i>RSD (%)</i>	<i>MU</i>
	Laksemuskel	Lavt	-	30
	Laksemuskel	Middels	5	12
	Laksemuskel	Høyt	8	19
	Lakselever	Uspiket	15	36
	Seimuskel	Uspiket	-	30
	Seilever	Uspiket	-	30
	Seirogn	Uspiket	-	30
	Torskemuskel	Uspiket	-	30
PFOS	Torskelever	Uspiket	11	26
	Torskerogn	Uspiket	6	14
	Grønlandsselmuskel	Uspiket	5	12
	Grønlandssellever	Uspiket	3	7
	Grønlandsselnyre	Uspiket	5	12
	Klappmyssmuskel	Uspiket	4	10
	Klappmysslever	Uspiket	5	12
	Klappmyssnyre	Uspiket	6	14
	Fôr	Uspiket	-	30

### **Konklusjon**

Metoden beskrevet i denne rapporten er ferdig validert og vil bli søkt akkreditert ved neste besøk fra Norsk Akkreditering (NA) i mars 2008. Metoden er allerede implementert og i bruk i rutineanalyse på laboratoriet i overvåknings- og forskningsprogrammene til NIFES. Metoden vil også bli publisert i nærmeste fremtid.

Metodearbeidet på PFAS vil bli fulgt opp i fremtidige prosjekt der vi vil implementere isotopfortynningskvantifisering i bestemmelsen av de viktigste PFAS som PFOS og PFOA. Dette er nødvendig for å oppnå god nok sensitivitet til å kunne bestemme det svært lave innholdet av disse forbindelsene i fiskemuskel.