



Luspengymnasiet
2000-09-24

Flamskyddsmedel i grindval, vitval och isbjörn



Johanna Lillbäck
NvF 3
Mikael Rombe

Abstract

During the middle of the last century persistent organic substances that was produced and used by humans was found in the environment. These substances were bioaccumulating and had toxic effects on different kinds of organisms. The first organic pollutants discovered were PCB and DDT. Among the organic pollutants found in the environment since then are the polybrominated diphenyl ethers, PBDEs.

PBDEs are used in electronic equipment as flame retardants. Since the 1970s the computer industry has grown rapidly and that combined with more strict laws about fire security has resulted in a growing use of flame retardants. Since PBDEs were first discovered in the environment it has been found in different places and types of organisms. The knowledge about the effects of PBDEs on the environment are very limited, but it has shown to be bioaccumulating.

I took part in research about PBDEs in pilot whale, beluga whale and polarbear. The purpose of the study was to analyse how high the levels of PBDEs were in the mentioned animals and by that be able to do some conclusions about if PBDEs have spread to the Arctic environment. Another purpose was to find an extraction method for this kind of samples when using SFE, which is a fast and solvent saving extraction technique.

If there are lipids from the sample in the extract, that creates a problem during GC/MS analyses. By varying the extraction time and temperature and the amount of lipid used for each extraction, an extraction method for samples from the species earlier mentioned were found.

Analyses of the samples were made using GC/MS. We analysed the whale samples for the levels of PBDE and the polarbear samples for the levels of PBDE, PCB and p, p- DDE. The highest levels of PBDE were found in the pilot whale samples. The levels of PBDE were surprisingly low in polar bear, maybe caused by metabolism of these substances, while the levels of especially PCB were high. The result when looking at the differences between individuals of a certain species is that the lowest levels of PBDE were found in the samples from adult females. The explanation to that is probably that the females get rid of some of the toxic substances during lactation, and that is also the explanation to why the levels of pollutants are so high in the young animals. It's a little hard to say if that applies to the polar bears since I haven't got any knowledge about the ages of the animals used for this study.

More research about the effects of PBDEs on the environment and living organisms, and also research to find other substances that is better from an environmental view is recommended.

Keywords flamskyddsmedel, bromerade flamskyddsmedel, miljögifter, PBDE, DDT, PCB isbjörn, vitval, grindval, Superkritisk vätske- extraktion, SFE

FLAMSKYDDSMEDEL I GRINDVAL, VITVAL OCH ISBJÖRN

1. INLEDNING	4
1.1 UPPTÄCKTEN AV MILJÖGIFTER	4
1.2 VANLIGA EGENSKAPER SOM GÖR ÄMNEN TILL MILJÖGIFTER	4
1.3 MILJÖGIFTERNAS INVERKAN PÅ LEVANDE ORGANISMER	5
1.4 BROMERADE FLAMSKYDDSMEDEL	5
1.5 SYFTE	6
1.6 FAKTA OM DJURARTERNA	6
1.6.1 Vitval, Delphinapterus leucas	6
1.6.2 Grindval, Globicephala melas	7
1.6.3 Isbjörn, Ursus maritimus	7
1.6.4 Gemensamma egenskaper	7
2. METOD	7
2.1 EXTRAKTION MED SFE	7
2.2 METODUTVECKLING	8
2.3 ANALYS MED GC/MS – SEPARERING I TID OCH MASSA	9
2.4 STANDARDER	10
3. RESULTAT	11
4. DISKUSSION	12
4.1 RESULTATDISKUSSION	12
4.2 METODDISKUSSION	13
4.3 VÄRDERING	13
5. KÄLL- OCH LITTERATURFÖRTECKNING	14
6. BILAGA: RESULTATTABELLER	15

1. INLEDNING

1.1 Upptäckten av miljögifter

Under nittonhundratalet har den kemiska industrin ökat kraftigt. Massor med kemikalier som aldrig tidigare förekommit på jorden framställdes av människan och togs i bruk.¹ På 1950-talet påträffades döda eller döende fåglar allt oftare på åkrarna i Syd- och Mellansverige.² Vissa rovfågelsarter hade också på kort tid decimerats kraftigt på grund av problem med häckningen. Detta uppmärksammades i början på 60-talet och de analyser som gjordes av döda fåglar och okläckbara rovfågelsägg avslöjade mycket höga halter av DDT och kvicksilver, båda ämnen som användes inom det svenska jordbruket. När kvicksilver också påträffades i jordbruksprodukter, såsom i ägg och kött, och dessutom i fisk så började allmänheten bli orolig. Föroreningarna fanns inte bara på vissa ställen i naturen utan även i maten man ställde på bordet. Ordet miljögift blev känt för gemene man.³

Eftersom miljögifterna börjat förekomma på många platser i naturen och dessutom visade tydliga tecken på att ha negativa effekter, så behövde man undersöka spridningen av gifterna och deras effekter. I arbetet med att kartlägga förekomsten av DDT i naturen och hos den svenska befolkningen kunde man så småningom identifiera ett ämne som man gång på gång stött på under provanalysernas gång, nämligen PCB. Efter ett par års arbete med att kartlägga förekomsten av PCB i den svenska miljön och den följande rapporten om höga halter av ämnet i Östersjöfaunan började forskare världen över att analysera PCB-halterna i olika typer av prover från olika miljöer och geografiska områden. Man fann ämnet i princip överallt.

PCB hade många användningsområden, men användes mest i slutna system. Till skillnad från bekämpningsmedlet DDT hade det alltså inte avsiktligt spridits i naturen, men likväl fanns det där i lika höga halter som de mest använda bekämpningsmedlen.

1.2 Vanliga egenskaper som gör ämnen till miljögifter

Alla toxiska ämnen som kommer ut i naturen kan betecknas som miljögifter. Hur mycket skada de kan göra beror på flera saker. Ämnen som är stabila och därför långlivade (persistenta), men som ändå kan delta i biokemiska processer kan göra skada även i låga doser, eftersom de kan verka under lång tid. Detta innebär också att dessa ämnen hinner spridas över stora områden innan de bryts ned. En annan faktor som har betydelse för ett ämnes förmåga att åstadkomma biologiska effekter är ämnets förmåga att tas upp (dess biotillgänglighet) och lagras (bioackumuleras) i levande vävnader. Fettlöslighet brukar innebära förmåga till bioackumulering för stabila organiska ämnen. Rovdjur kan lagra betydligt högre halter av miljögifter än bytesdjuren (biomagnifikation). En ansamling sker av miljögifterna högre upp i näringskedjan. De högsta halterna av miljögifter brukar påträffas i landlevande däggdjur och fåglar som livnär sig på fisk eller andra djur i vattenmiljö. Landlevande djur saknar fiskarnas möjlighet att göra sig av med en del av miljögifterna via gälarna och huden.

Många aromatiska kolväteföreningar är både långlivade och fettlösliga. Om dessa föreningar halogeneras⁴ så brukar både fettlösligheten och stabiliteten öka. I en del fall ökar också toxiciteten. Större delen kända organiska miljögifter är således halogenerade aromatiska kolväten. De tidigare nämnda PCB och DDT är två av dem.⁵

¹ Bernes, C. *Organiska miljögifter Ett svenskt perspektiv på ett internationellt problem*. Värnamo???: Naturvårdsverket förlag, ???, 10-12.

² Ibid., 132.

³ Ibid., 9.

⁴ ”Halogen: Grundämnen i grupp 7 i periodiska systemet, fluor, klor, brom, jod och astat, kallas halogener.” Mackenzie Miall, L. Sharp, D W A. *Lexikon i kemi*. Malmö, Gleerups Förlag, 1996, 228.

⁵ ?? Ibid., 132-133.

1.3 Miljögifternas inverkan på levande organismer

Forskningen om de organiska miljögifternas verkan på levande organismer är komplicerad. Detta beroende på att det finns så många sådana ämnen och att de kan påverka organismer på så många olika sätt. Olika ämnens effekter kan förstärka eller motverka varandra och känsligheten för ett visst ämne kan variera mycket från art till art. Även ämnen som är mycket lika varandra (kongener⁶) kan ha vitt skilda biologiska effekter. Alla djur och människor har en förmåga att omvandla (metabolisera) gifter till mindre skadliga ämnen. Det är dock inte alltid som produkterna av omvandlingen (metaboliterna) är ofarliga. Ibland är metaboliterna till och med skadligare och/ eller mer långlivade än ursprungssämnet. Att organismer omvandlar ämnen till andra ämnen vars verkningar måste tas med i beräkningen och undersökas är ännu en sak som komplicerar forskningen om miljögifternas verkningar.

Många miljögifter, ex. PCB, stör omsättningen av hormoner och liknande signalsubstanter i organismen och därmed störs den reglering av livsfunktionerna som hormonerna styr. Flera miljögifter påminner om könshormoner och kan om de tillförs i ett tidigt levnadsskede störa könsutvecklingen.

Dioxiner⁷ och dioxinlika ämnen (däribland vissa PCB- kongener) kan åstadkomma många skadeverkningar såsom immunpåverkan, rubbad leverfunktion, hudförändringar, och störd A-vitaminomsättning. Dioxiner är akut dödliga redan i låga doser för flera djurarter, och ännu lägre doser räcker för att dioxinerna skall medverka till uppkomsten av tumörer.

Genom djurförsök har man visat att DDT och vissa PCB- och PBDE- kongener redan i mycket låga doser kan skada det centrala nervsystemets utveckling hos unga individer vilket leder till livslånga beteenderubbningar.

Att hitta miljögiftseffekter av det slag som framkallats hos försöksdjur i fauna och befolkning är svårt, eftersom de utsätts för så många olika miljögifter, oftast i låga halter. De utsätts dessutom för annan påverkan, förutom miljögifterna, som kan vara svåra att kontrollera. Man har dock kunnat visa att svensk fauna tagit skada av miljögifter. Problem med fortplantningen på grund av PCB har påvisats hos vissa fiskätande däggdjur såsom säl, utter och mink. Genom påverkan av DDT har skalen hos rovfågelsäg blivit så tunna att de ofta krossats under ruvningen.

Människor som tagit uppenbar skada av organiska miljögifter har oftast utsatts för sådana ämnen genom olyckor, olämplig arbetsmiljö eller speciella kostvanor. Koppling mellan exponering för miljögifter och cancer och fruktbarhetsproblem har vare sig uteslutits eller kunnat bevisas. Indikationer finns på att organiska miljögifter försenar utvecklingen hos barn, men det är inte heller bevisat.⁸

1.4 Bromerade flamskyddsmedel

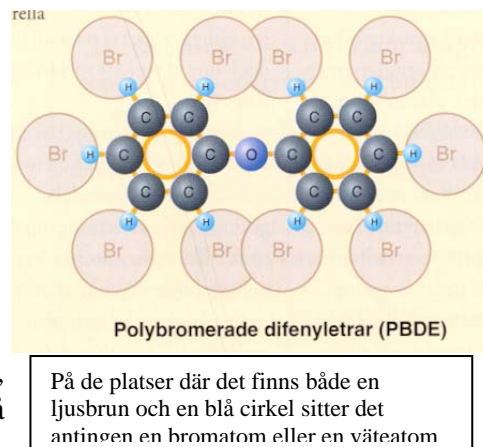
Ett miljögift som upptäckts ”på senare tid” är PBDE. PBDE används som flamskyddsmedel, främst inom elektronikindustrin. Det tillsätts i stora mängder i plaster som används för till exempel höljen till datorer och i kretskort. På grund av en (sedan 1970- talet) snabbt ökande användning av datorer i kombination med skärpta krav på brandsäkerhet så har användningen av flamskyddsmedel ökat kraftigt. PBDE, särskilt de kongener som har fyra respektive fem

⁶ Kongener: ”medlemmar av en grupp halogenerade organiska ämnen med samma grundläggande molekylstruktur men olika halogeneringsgrad och/eller olika placering av halogenerna.” Bernes, C. *Organiska miljögifter Ett svenskt perspektiv på ett internationellt problem*. Värnamo???: Naturvårdsverket förlag, ???, 24.

⁷ Dioxiner: PCDD och PCDF. Klorerade organiska ämnen som ofta uppträder som föroreningar i klorhaltiga produkter. De kan även bildas vid förbränning av klorhaltigt material. Bernes, C. *Organiska miljögifter Ett svenskt perspektiv på ett internationellt problem*. Värnamo???: Naturvårdsverket förlag, ???, 38-39.

⁸ Bernes, C. *Organiska miljögifter Ett svenskt perspektiv på ett internationellt problem*. Värnamo???: Naturvårdsverket förlag, ???, 135-138.

bromatomer, har visat sig vara bioackumulerande.⁹ Flamskyddsmedel har hittats i prover från luft, sediment, fåglar, ägg, fisk, landlevande och vattenlevande däggdjur, och även i prover från människa. Halterna har stigit sedan 1970-talet. I vissa typer av prover har halterna av flamskyddsmedel börjat sjunka under 1990-talet, men i andra provtyper har halterna fortsatt att stiga.¹⁰ Mycket kunskap saknas fortfarande vad gäller giftigheten hos de bromerade flamskyddsmedlen. Den akuta toxiciteten är låg men flamskyddsmedlen lagras i människor och djur och vad det på lång sikt kan leda till vet man inte.¹¹ Användandet av PBDE håller i Sverige på att minska på frivillig basis.¹² Och i Tyskland har de stora kemiföretagen avvecklat PBDE som resultat av bland annat en studie som visade att arbetare som utsattes för ämnet hade mycket höga halter av det i blodet.¹³ Ännu har man dock ingen lämplig ersättare för de bromerade flamskyddsmedlen och eftersom eventuella miljöeffekter bedöms väga lättare än den ökade brandrisk, som uppstår om man inte använder flamskyddsmedel, så kommer man nog att fortsätta använda dessa ett tag till.¹⁴



1.5 Syfte

Syftet med forskningsprojektet jag deltagit i var att med hjälp av SFE (förklaras längre fram i texten) ta reda på halterna av (i första hand) flamskyddsmedlet PBDE i vitval, grindval och isbjörn. (Syftet med mitt deltagande var, förutom att medverka till att forskningsprojektets syfte uppfylldes, att jag skulle få en inblick i hur forskningsarbete fungerar.)

Huvudfrågeställningarna för forskningsprojektet var alltså:

- ◆ Hur höga är halterna av flamskyddsmedlet PBDE i isbjörn, grindval och vitval?
- ◆ Vilka är de lämpligaste extraktionsförhållandena för prover från dessa djurarter vid användande av SFE?

Jag har valt att inte i detalj gå in på metoden vi använde. Detta eftersom sådana detaljer i första hand är av intresse för sådana som arbetar inom forskningen.

I och med att det jag kommer att redogöra för är mitt *deltagande* i ett forskningsprojekt på avdelningen för miljökemi på Umeå, så har valet av metod för hur vi skall komma fram till det vi ville ha svar på inte varit mitt.

1.6 Fakta om djurarterna

1.6.1 Vitval, *Delphinapterus leucas*

Vitvalen lever i de subarktiska och arktiska vattnen, ofta nära kusterna. Ibland simmar den också uppför floder. Den 3-5 meter långa och 0.4-1.5 ton tunga valen är mycket social och

⁹ Bernes, C. *Organiska miljögifter Ett svenskt perspektiv på ett internationellt problem*. Värnamo???: Naturvårdsverket förlag, ???, 33.

¹⁰ de Wit, C A. *Brominated flame retardants in the environment – an overview*. Organohalogen compounds vol. 40 1999 sid. 329-331.

¹¹ Hedemalm, P. *Mot miljövänligare elektronik – avveckling av bly och bromerade flamskyddsmedel*. Institutet för verkstadsteknisk forskning. 1991. Sid. 15.

¹² Bernes, C. *Organiska miljögifter Ett svenskt perspektiv på ett internationellt problem*. Värnamo???: Naturvårdsverket förlag, ???, 34.

¹³ Hedemalm, P. *Mot miljövänligare elektronik – avveckling av bly och bromerade flamskyddsmedel*. Institutet för verkstadsteknisk forskning. 1991. Sid. 15.

¹⁴ Bernes, C. *Organiska miljögifter Ett svenskt perspektiv på ett internationellt problem*. Värnamo???: Naturvårdsverket förlag, ???, 34.

lever i grupper på mellan 5 och 20 djur. Det finns mellan 50 000 och 70 000 vitvalar. De äter vanligen fisk men ibland även bläckfisk och skaldjur.¹⁵ Vitvalen lever ca 25-30 år och honan får vanligen en unge vart tredje år efter att ha blivit köns mogen vid ca 5 års ålder. På senare tid har nedsmutsning av miljön blivit ett hot mot vitvalen. Man har hittat höga halter av miljögifter som PCB och DDT i späck från vitvalar.¹⁶

1.6.2 Grindval, *Globicephala melas*

Grindvalen lever på södra halvklotet och i norra atlanten. Dess huvudsakliga föda är bläckfisk men förutom bläckfisk äter den även fisk. Grindvalen är ca 4-6 meter lång och väger mellan 1.8 och 3.5 ton. Den lever i grupper bestående av 10-50 djur. Populationens storlek är okänd men arten antas vara vanlig.¹⁷

1.6.3 Isbjörn, *Ursus maritimus*

Isbjörnen finns i hela det arktiska drivisområdet. Den årliga förflyttningen varierar mycket: Man har uppskattat att de kan röra sig över områden på 10 000-350 000 km². Isbjörnen äter huvudsakligen säl, men någon enstaka gång också vitval och valross. Dräktiga honor tillbringar vintern i ide. Ungarna, vanligtvis två, föds vid jultid.¹⁸ Det är enbart de dräktiga honorna som går i ide, hannar och honor som inte är dräktiga gör det inte.

Det finns mellan 25 000 och 40 000 isbjörnar. Sedan 1968 har man funnit miljögifter i vävnad från isbjörn.¹⁹

1.6.4 Gemensamma egenskaper

Det dessa tre djurarter har gemensamt är att de helt eller delvis lever i de arktiska områdena, Att de är däggdjur och lever i eller i nära kontakt med havet (de är marina) och äter "icke-vegetarisk" föda som också är marina. Vi vet att bromerade flamskyddsmedel används i den industrialiserade världen men vi ville kontrollera om bromdifenyletrarna spridits till polarområdena. Våra grindvalsprover kom från Färöarna. Isbjörns- och vitvalsproverna kom från Svalbard.

2. METOD

2.1 Extraktion med SFE

För att mäta halterna av flamskyddsmedel i proverna behövde vi först extrahera ut analyterna (de ämnen vi är intresserade av att mäta halterna av) ur själva provet. Syftet med detta är att kunna få ämnena i en sådan koncentration att halterna är detekterbara (dvs finns i sådana mängder att det är möjligt för instrumenten att "känna av" dem)²⁰ och att få bort de störningar som skulle kunna uppstå om man försökte analysera hela provet och därmed försvåra detekteringen av de ämnen vi är intresserade av. Vid analys med GC/MS (förklaras längre fram i texten) är det inte heller tekniskt möjligt att analysera ett prov som ej är i vätskeform.

Före extraktionen homogeniserar (finfördelar) man som regel biologiska prover för att fetterna (merparten av de organiska miljögifterna finns normalt lösta i fetter) i provet skall bli

¹⁵ Carwardine, M. *Whales Dolphins and Porpoises*. ???: Dorling Kindersley Publishing Inc, 1995, 92-95.

¹⁶ Norris, K S. *Beluga: white whale of the north*. National Geographic nr 6/1994, 4-30.

¹⁷ Carwardine, M. *Whales Dolphins and Porpoises*. ???: Dorling Kindersley Publishing Inc, 1995, 150-151.

¹⁸ AMAP Assessment Report: Arctic Pollution Issues, Oslo, Arctic Monitoring and Assessment Programme, 1998, 134-135

¹⁹ Eliot, J L. *Polar bears: stalkers of the high Arctic*. National Geographic, nr 1 /1998, 52-70

²⁰ Bernes, C. *Organiska miljögifter Ett svenskt perspektiv på ett internationellt problem*. Värnamo???: Naturvårdsverket förlag, ???, 17.

åtkomliga för fortsatt behandling.²¹ Det finns flera sätt att göra extraktionen på, men vi gjorde den med hjälp av SFE. SFE är en förkortning för Supercritical Fluid Extraction, på svenska superkritisk vätske- extraktion. Som framgår av namnet så är SFE extraktion som utförs med *superkritisk vätska*. Ett ämne blir en superkritisk vätska när både dess tryck och temperatur överskrider den för ämnet kritiska punkten. Koldioxid är en av de oftast använda substanserna vid SFE. Dess kritiska temperatur är 31°C och det kritiska trycket är 73 atm. Den superkritiska vätskan har då densitet som är jämförbar med densiteten för motsvarande vätska men genom sina molekylers stora rörlighet liknar den mer gaser än vätskor. SFE- tekniken kombinerar således de bästa extraktionsegenskaperna hos gaser och vätskor: lösningsförmåga lik vätskornas kombinerat med transportkapacitet lik gasernas.

Före extraheringen packas provet i en behållare av rostfritt stål som tål ett högt tryck. Upp till 10-20 gram prov kan extraheras åt gången. Provbehållaren fylls eller genomströmmas av en superkritisk vätska. Efter avslutat extraktion lämnar den superkritiska vätskan med de upplösta komponenterna (analyterna) extraktionskammaren. Vid atmosfärstryck övergår den superkritiska vätskan i gasfas och provkomponenterna samlas upp antingen på en fast adsorbent, ”fälla”, eller genom att låta den expanderande superkritiska vätskan bubbla ner i en liten behållare med lösningsmedel. Genom att variera den superkritiska vätskans tryck och temperatur och därmed dess densitet så kan man välja att extrahera ut olika typer av provkomponenter.

Extraktion med superkritisk vätska görs av ett ”instrument” som är helautomatiskt och styrs av en dator där man programmerar in extraktionstid mm. SFE av ett prov, inklusive provpreparering, kan ofta ske på en timme jämfört med t. ex. 24 timmar för en soxhletextraktion (en annan extraktionsmetod). Provextrakt från SFE är i regel betydligt renare än efter en klassisk extraktion eftersom extraktionsselektiviteten (valet av ämnen man vill skall extraheras ut) kan kontrolleras noggrannare. Den efterföljande provprepareringen kan förenklas och kostnaden för provprepareringen minskas pga lägre tidsåtgång och mindre kostnader för lösningsmedel. Koldioxid av SFE- kvalitet är också betydligt billigare och miljövänligare än lösningsmedel.²² För att få ut analyterna ur fällan för vidare behandling så sköljs den igenom med små mängder lösningsmedel som samlas upp i små burkar. En ytterst liten mängd av ett lösningsmedel (innehållande standard, förklaring kommer längre fram) som inte är så lättflyktigt tillsätts och lösningsmedlet som redan fanns i burkarna får dunsta bort.

Ovanstående förklaring framstår eventuellt som komplicerad. Enklaste sättet att beskriva metoden är att konstatera att man tar en köttbit, som ju innehåller en hel massa ämnen och använder en metod som så att säga plockar ut ämnena man vill analysera ur köttbiten. Enklare än så kan det inte uttryckas.

2.2 Metodutveckling

För att få så bra resultat som möjligt av extraktionen kan man behöva använda olika extraktionsbetingelser t ex olika extraktionstid för olika typer av prover eller typ av ämnen man vill extrahera ut. För att analysen med GC/MS skall lyckas är det önskvärt att så lite fett som möjligt extraheras ut, gärna inget alls. Desto kortare extraktionstid, desto mindre är risken att fettet också extraheras ut ur provet. Ju kortare extraktionstiden är, desto större är risken att alla analyter inte hinner extraheras ut, men eftersom en mindre del av internstandarderna då också bör ha extraherats ut, så kompenseras det för detta (förutsatt att internstandarderna och analyterna extraheras ut på ungefär samma sätt). Däremot kan det bli problem om halterna av de aktuella analyterna är så låga i provet att de är på gränsen till vad

²¹ Bernes, C. *Organiska miljögifter Ett svenskt perspektiv på ett internationellt problem*. Värnamo???: Naturvårdsverket förlag, ???, 17.

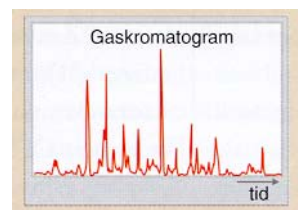
²² Steffenrud, S. Warman, K. *Superkritisk Fluid Extraktion: Kan ersätta traditionell extraktion*. Kemisk Tidskrift/Kemivärlden 15/93.

som är detekterbart. Därför kan det vara önskvärt att ha så lång extraktionstid man kan ha utan att fett börjar extraheras ut. Av samma anledning som man vill ha en någorlunda lång extraktionstid vill man också att mängden prov som extraheras inte skall vara alltför liten. Hur stor mängd prov man kan extrahera på en gång begränsas förstås av storleken på extraktionskärlet, men också av behovet av att sätta till ett ämne (AlOx, aluminiumoxid) som hindrar fett från att extraheras ut. Används mindre av det ämnet finns det risk för att fett börjar extraheras ut snabbare. När proverna finfördelas tillsätts också ett ämne som binder vätska och "slår sönder" cellväggarna i provet (Na₂SO₄, natriumsulfat), och hur mycket som tillsätts av detta per volymenhet prov begränsar förstås också hur stor provmängd som får plats i extraktionskärlet och kan extraheras på en gång.

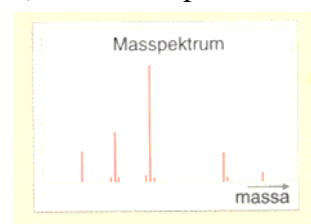
Genom att variera 1) extraktionstid, 2) mängden prov som packas i extraktionskärlet (och därmed mängden AlOx), och 3) andelarna prov/Na₂SO₄ och kontrollera hur mycket fett som extraherades ut så kom vi fram till vilka extraktionsbetingelser vi skulle använda till de prover som skulle analyseras.

2.3 Analys med GC/MS – Separering i tid och massa

Gaskromatografi (GC) är ett sätt att separera ämnen. Kromatografikolonnen är ett 10-100 meter långt kapillär rör (inre diameter ca 0,3 mm). På rørets innerväggar sitter en separerande vätska som en tunn hinna (stationära fasen). I början av kolonnen sitter en insprutningskammare (injektor). Temperaturen i insprutningskammaren är så hög att blandningen som innehåller de ämnen som skall analyseras förgasas. En icke-reaktionsbenägen gas (den rörliga fasen) pressas genom kolonnen och för ämnena i blandningen framåt. Hur snabbt analyterna når slutet av kolonnen beror på deras flyktighet och/ eller löslighet i den stationära fasen. De olika ämnena fördelas därför på olika sätt mellan den stationära fasen och gasfasen och vandrar därför olika snabbt genom kolonnen. Ett enskilt ämne vandrar med samma hastighet (i alla fall under ideala förhållanden). Det ämne som är flyktigast och / eller minst lösligt vandrar alltså snabbast. I slutet av kolonnen finns en detektor som "märker" när en komponent i blandningen passerar och ger en signal till en registrerande apparat. Signalerna ritas upp som toppar och arean under en topp ger ett mått på mängden av ämnet.



Gaskromatografen kan kombineras med en masspektrometer (MS). I en masspektrometer överförs analytmolekylerna till positiva joner i en jonisationskammare. Jonerna accelereras sedan till hög hastighet med hjälp av ett elektriskt fält och kommer sedan in i ett starkt magnetiskt fält. En stråle elektriskt laddade partiklar avböjs i ett magnetiskt fält som är vinkelrätt mot partiklarnas rörelseriktning enligt kvoten m/Z där m är jonens massa och Z dess laddning (Z är oftast lika med 1). Därför delas en partikelstråle som innehåller partiklar med olika massor i flera olika strålar. I slutet av masspektrometern finns en detektor som registrerar strålarnas avböjning och intensitet. (Intensiteten är proportionell mot partiklarnas relativa förekomst i blandningen.) Beräkningen av m/Z görs av en dator och resultatet (massorna på de partiklar som detekterats) visas som ett masspektrum.²³



Maskinerna beskrivna ovan mäter alltså hur lång tid det tar för olika substanser att "ta sig" genom kromatografi- "røret", visar ett mått på mängden substans som passerat detta efter en viss tid och mäter molekylvikten på ämnena.

²³ Andersson, S. Sonesson, A. Tullberg, A. Rydén, L. *Gymnasiekemi 3*. Stockholm: Liber Utbildning AB?, 1996, 119-121.

2.4 Standarder

För att få ett absolut mått på halten av analyterna räcker det inte att ha arean på GC- topparna. Man måste analysera bestämda halter av kända ämnen av samma slag som analyterna. På det viset kan man jämföra storleken och retentionstiden på topparna med kända mängder av ett visst ämne med storleken och retentionstiden på de toppar som visar hur mycket det finns av en viss substans i ens prov.

$(A_{\text{nativ prov}} / A_{\text{IS prov}}) * (A_{\text{IS std}} / A_{\text{nativ std}} * M_{\text{nativ std}}) / M_{\text{prov}} = \text{mängd av det aktuella ämnet i provet som analyseras i ng/g fettvikt eller våtvikt.}$

$(A_{\text{IS prov}} / A_{\text{RS prov}}) / (A_{\text{IS std}} / A_{\text{RS std}}) = \text{Recovery, återfinningsgraden av internstandarderna i \%}$.

- ◆ A nativ prov = arean på den topp i kromatogrammet som representerar en viss analyt i provet.
- ◆ A IS prov = arean på den topp som representerar ett ämne i internstandarderna i provet.
- ◆ A IS std och A nativ std står för de toppar som representerar internstandarderna respektive de nativa föreningarna i kvantifieringsstandarderna.
- ◆ M nativ std står för massan av de nativa föreningarna i kvantifieringsstandarderna och M prov står för massan av det aktuella provet.
- ◆ A RS prov och A RS std står för arean på de toppar som representerar recoverystandarderna i provet respektive i kvantifieringsstandarderna.

Internstandarderna, IS, är kol-13- märkt och kan därför skiljas från naturligt förekommande ämnen av samma slag med hjälp av masspektrometern. Den används för att räkna ut halterna av analyterna. Man tillsätter en bestämd mängd IS till provet innan man gör extraktionen och kan, eftersom man vet vilken mängd som tillsätts, ”kompensera” (dvs räkna ut hur stor del av standarderna som försvunnit under extraktion och uppämbning. Lika många procent av analyterna bör också ha försvunnit under extraktion mm) för eventuell förlust av en del av analyterna under extraktionen.

Recoverystandarderna, RS, är också kol-13- märkt men tillsätts till provet efter extraheringen, innan analysen. Den används för att beräkna återfinningsgraden för internstandarderna.

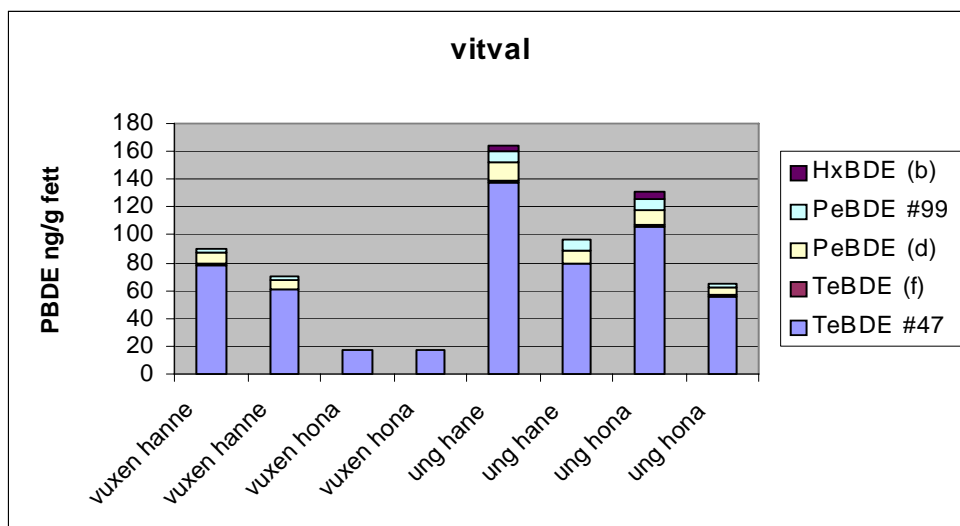
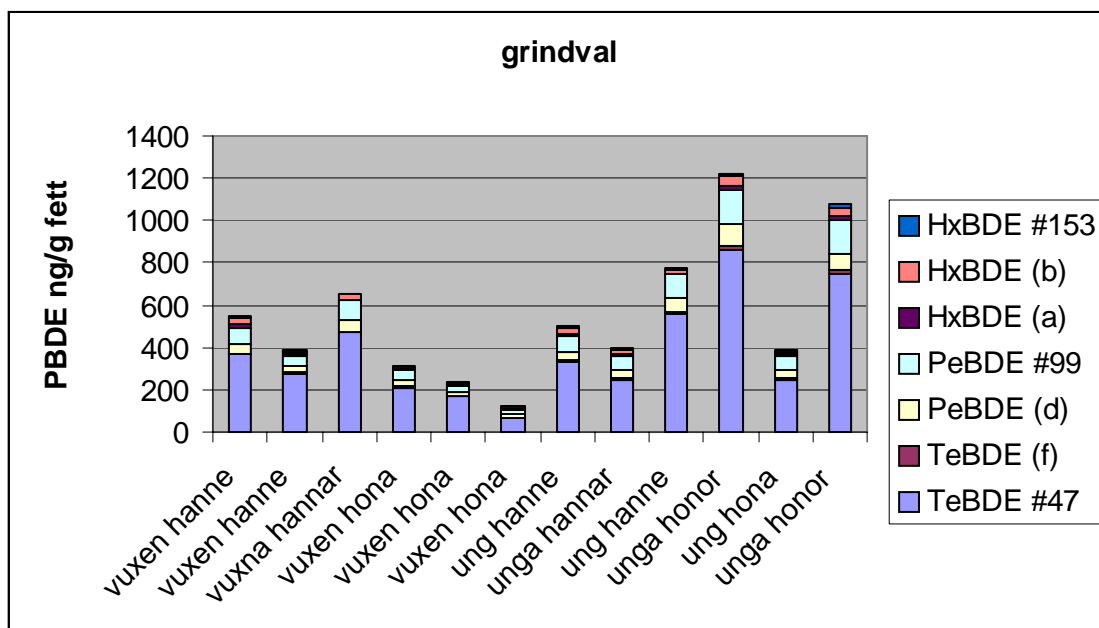
Förutom att man analyserar provanalyterna med GC/MS så gör man också en eller flera analyser av en kvantifieringsstandard, en ”mix” som bara innehåller is, rs och nativa föreningar, dvs föreningar som innehåller kol-12 precis som analyterna i proven. Kvantifieringsstandarderna används sedan när man räknar ut halterna av provanalyterna.

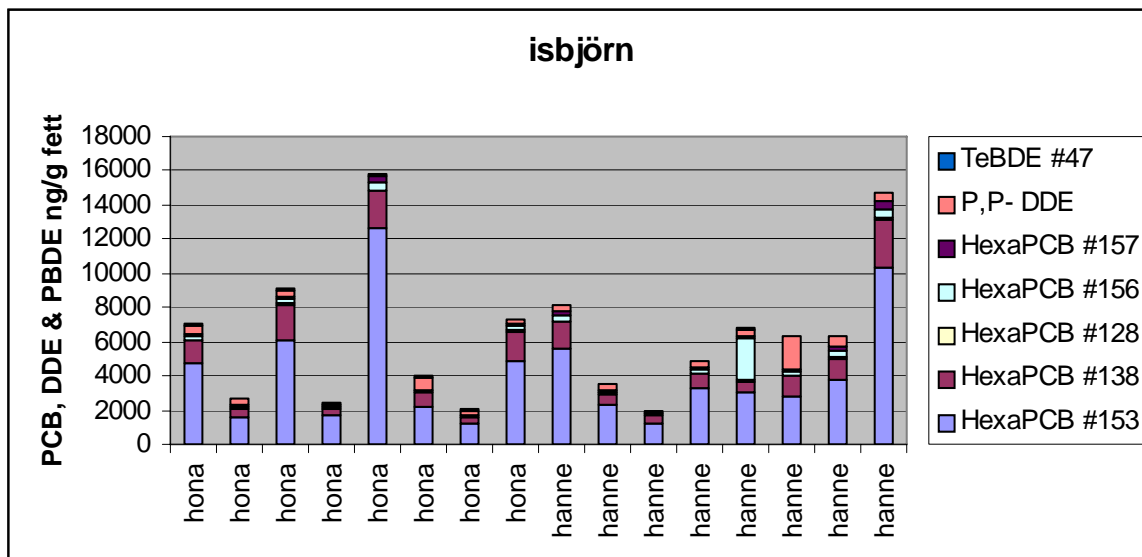
För beräkningen av halterna behöver man dessutom veta mängden prov (för att beräkna halten i förhållande till våtvikten) alternativt mängden fett i det aktuella provet (för att beräkna halten i förhållande till fettvikten). För att kunna göra det senare måste man kontrollera hur stor del av det aktuella provet som består av fett, vilket man gör genom att med hjälp av lösningsmedel extrahera ut fett ur en liten del av provet och väga detta.

3. RESULTAT

Några förklaringar till diagrammen: Staplarna visar den totala mängden av 1) PBDE-kongener och 2) för isbjörnsproverna också PCB-kongener och p, p- DDE som är en metabolit av DDT, i varje enskilt prov. Observera dock att alla ämnen respektive kongener som detekterades inte är medtagna här, ej heller är resultaten från alla prover medtagna. Te (Tetra, 4), Pe (Penta, 5) och Hx (Hexa, 6) före namnet på ämnet (ex. BDE) står för antalet brom- eller kloratomer - fyra, fem, respektive sex stycken - som finns i den aktuella kongenen. Tecknet # följt av en siffra, t ex #47 är numret på en specifik kongen. Står det istället för ett nummer en bokstav inom parentes efter namnet på kongenen beror det på att man inte vet vilken kongen det är. Vissa prov består av en "blandning" (den gjordes redan innan vi fick proverna) av prover från flera individer, vilket syns i benämningen av det aktuella provet.

I diagrammen ser man att TeBDE #47 är den BDE-kongen som det finns överlägset mest av i proverna. Detta gäller för alla arterna. De vuxna honorna är de som har lägsta halter medan de unga djuren har de högsta halterna. Vitvalsproverna uppvisar lägre halter än grindvalsproverna. Den enda BDE-kongen som kunde detekteras i isbjörnsproverna var TeBDE #47. Däremot var halterna av PCB och DDT höga i isbjörnsproverna. De sistnämnda ämnena kontrollerade vi inte i valproverna.





4. DISKUSSION

4.1 Resultatdiskussion

Huvudfrågeställningarna för forskningsarbetet (som jag uppfattat dem) var alltså:

- ◆ Hur höga är halterna av flamskyddsmedlet PBDE i isbjörn, grindval och vitval?
- ◆ Vilka är de lämpligaste extraktionsförhållandena för prover från dessa djurarter vid användande av SFE?

Svaret på den första frågeställningen (eller delar av svaret eftersom alla resultat inte finns medtagna här) finns i tabellerna under ”resultat” och även i en bilaga i slutet av det här arbetet. Det exakta svaret på den andra frågeställningen har jag av inte tagit med här. Men metoden finns beskriven av dem som ansvarat för denna forskning.²⁴

Vi förväntade oss relativt höga halter av bromerade flamskyddsmedel i de prover vi undersökte. Grindvalsproverna hade högst halter, medan vitvalsproverna innehöll halter som var jämförbara med isbjörnsproverna vad gäller Tetra- BDE #47, den BDE- kongen som övervägande uppträder i högst halter i proverna. Haltvariationerna mellan de olika kongenerna visar tydligt hur olika förmågan att lagras i organismer är för olika kongener. Att BDE #47 var den enda av bromdifenyletrarna som över huvudtaget var detekterbar i isbjörnsproverna (annat än sporadiskt) var däremot lite förvånande. Halterna av andra miljögifter, såsom PCB och DDE var ju höga, vilket syns på tabellen och även halterna PBDE förväntades vara höga. En möjlig förklaring är att isbjörnen bryter ner (metaboliserar) bromdifenyletrarna till andra bromerade föreningar som vad jag vet inte identifierats än. Jämför man halterna mellan individer respektive grupper av olika kön och ålder, så är den tydligaste tendensen att de vuxna honorna har lägst halter. Detta beror med högsta sannolikhet på att honor ”för över” sina miljögifter till sina ungar via mjölken när de diar. Man ser också vissa tendenser till att de unga djuren, både hanar och honor har högre halter än de vuxna hannarna. Förklaringen till detta ligger kanske i metaboliseringen av miljögifterna. Vad gäller isbjörnsproverna varierar halterna ganska mycket för både honor och hannar, och eftersom jag inte vet vilka som är unga respektive vuxna så vet jag inte om tendenserna gäller även här.

²⁴ ”Supercritical Fluid Extraction of Polybrominated Diphenyl Ethers, PBDEs, From Long-finned Pilot Whale (*Globisephalo Melas*) From The Atlantic” av Bert van Bavel Erika Sundelin m fl. Artikeln finns med i Organohalogen Compounds Vol. 40 1999.

Det skulle vara intressant att veta hur höga halterna av organiska miljögifter är i dessa arters mjölk.

Syftet att jag skulle få inblick i forskningsarbetet uppfylldes på ett enligt mig mycket tillfredställande sätt.

4.2 Metoddiskussion

Det finns möjliga felkällor även här. Standarder tillsätts för att kunna räkna ut halterna av analyterna och kompensera för eventuella förluster av analyter under upparbetningens och analysens gång. Möjligheten finns förstås att standarden som tillsätts till provet inte extraheras ut på samma sätt som analyterna, som ju hamnat i provet långt tidigare och på ett annat vis. Hur mycket man vet om detta är jag inte så insatt i, och kan därför inte säga vilka och hur stora riskerna är.

När man homogeniserar ett prov med Na_2SO_4 så är det inte alltid så lätt att verkligen få blandningen helt homogen. När man sedan tar en del av det homogeniserade provet och använder till extraktion och en annan del till fettviktsbestämningen - vilken man använder för att beräkna hur många procent av provet som består av fett - så är det inte helt säkert att förhållandet mellan prov och Na_2SO_4 är precis detsamma i de olika delarna av provet. Man vet alltså inte helt säkert den exakta mängden prov i den del av homogenisatet man extraherar, bara den mängd prov man använde till homogenisering och hur mycket homogenisat man sedan använder till extraktion. Jag har inte så mycket kunskap om huruvida felet kan bli så stora att det spelar någon roll, men ett sätt att kompensera för eventuella fel borde vara att analysera många prover. Sedan är det ju förstås också så att halterna varierar från individ till individ och att man av den anledningen måste göra ganska många analyser för att kunna säga säkert att halterna av ett visst ämne bör ligga på en viss nivå hos den typ av prover man analyserat.

Givetvis blir det ibland problem med apparaturen, problem som kan påverka resultaten. Men är konsekvenserna stora upptäcks felet. Risken för korskontaminering²⁵ vid hanteringen av proverna och genom att man använder apparaturen till många prover med analyter av samma slag är man medveten om och har vissa rutiner för att minska riskerna. Man är nog noggare med att mellan varje prov noggrant rengöra kärl och dylikt som används till flera prover.

4.3 Värdering

Miljögifter är ett globalt problem eftersom många av substanserna inte stannar inom det område där de släppts ut utan sprids över större områden, ibland hela världen, med hjälp av luft, vatten och organismer som tar upp dem. I vissa fall upptäcks inte att ett ämne spridits förrän man märker att någonting i miljön är fel och undersöker varför. I andra fall upptäcks spridningen före man vet så mycket, om ens något, om konsekvenserna. Ibland är spridningen medveten, som med bekämpningsmedel, ibland är den omedveten, som med ämnen som huvudsakligen används i slutna system. Faktum är i alla händelser att substanser som inte hör hemma i miljön och i levande organismer har spridits och sprids över jorden. Jag anser att kunskapen om halterna av miljögifter såsom flamskyddsmedel i naturen är till liten nytta om inte kunskapen leder till forskning om konsekvenserna av detta och om man inte börjar arbeta för att hitta en miljövänligare ersättning till dessa substanser. Spridningen av ämnen som PCB och DDT upptäcktes inte förrän halterna i miljön var så höga att det redan fått skadliga konsekvenser. Sedan dess har många andra miljögifter upptäckts. Det vore önskvärt om man tog lärdom av historien och blev försiktigare och mer förutseende i användandet av nya substanser vars effekter man inte känner till så att historien inte behöver återupprepas.

²⁵ Korskontaminering innebär att ämnen från ett prov genom kontakt med kärl man använder till proverna eller genom att analyter blir kvar i apparaturen smutsar ner ett annat prov så att beräkningen av halterna blir felaktiga.

5. KÄLL- OCH LITTERATURFÖRTECKNING

- Bernes, C. *Organiska miljögifter Ett svenskt perspektiv på ett internationellt problem*. Värnamo???: Naturvårdsverket förlag, ???.
- Mackenzie Miall, L. Sharp, D W A. *Lexikon i kemi*. Malmö, Gleerups Förlag, 1996.
- de Wit, C A. *Brominated flame retardants in the environment – an overview*. Organohalogen compounds vol. 40, 1999.
- Hedemalm, P. *Mot miljövänligare elektronik – avveckling av bly och bromerade flamskyddsmedel*. Institutet för verkstadsteknisk forskning. 1991.
- Carwardine, M. *Whales Dolphins and Porpoises*. ???: Dorling Kindersley Publishing Inc, 1995.
- Norris, K S. *Beluga: white whale of the north*. National Geographic nr 6/1994.
- AMAP Assessment Report: Arctic Pollution Issues*, Oslo, Arctic Monitoring and Assessment Programme, 1998.
- Eliot, J L. *Polar bears: stalkers of the high Arctic*. National Geographic, nr 1 /1998.
- Steffenrud, S. Warman, K. *Superkritisk Fluid Extraktion: Kan ersätta traditionell extraktion*. Kemisk Tidskrift/Kemivärlden 15/1993.
- Andersson, S. Sonesson, A. Tullberg, A. Rydén, L. *Gymnasiekemi 3*. Stockholm: Liber Utbildning AB?, 1996.
- Bert van Bavel Erika Sundelin m fl. *Supercritical Fluid Extraction of Polybrominated Diphenyl Ethers, PBDEs, From Long-finned Pilot Whale (Globisephalo Melas) From The Atlantic*, Organohalogen Compounds Vol. 40 1999.

6. Bilaga: Resultattabeller

Här nedanför kommer tre tabeller som visar halterna av flamskyddsmedel i grindval, vitval och isbjörn (även PCB & DDE) i nanogram per gram fett. Alla ämnen som detekterades är inte medtagna här, ej heller är resultaten från alla prover medtagna.

grindval PBDE ng/g fett. ND = Not Detected, ämnet ej detekterat i provet.

	Vuxna hanar			Vuxna honor			Unga hanar			Unga honor		
TeBDE #47	366,4	271,0	468,6	211,7	166,9	66,0	332,3	249,4	557,1	864,2	247,1	749,1
TeBDE (f)	7,1	9,6	8,1	7,8	6,5	3,2	8,2	5,9	15,0	17,5	11,0	14,4
PeBDE (d)	45,4	28,2	50,4	26,0	16,5	12,4	42,2	34,0	59,9	97,7	33,5	82,8
PeBDE #99	74,8	54,5	92,9	51,1	31,6	23,9	72,0	67,1	112,5	169,3	67,3	159,5
HxBDE (a)	13,4	4,2	7,1	4,7	2,7	3,4	10,1	10,0	4,5	17,3	5,9	16,3
HxBDE (b)	35,0	14,9	22,7	11,8	6,9	9,8	24,6	25,9	20,3	42,4	16,5	39,9
HxBDE #153	10,9	4,7	6,4	3,7	2,1	3,0	8,3	9,7	5,3	13,5	6,5	12,6

vitval PBDE ng/g fett

	Vuxen hane	Vuxen hane	Vuxen hona	Vuxen hona	Ung hane	Ung hane	Ung hona	Ung hona
TeBDE #47	78,39	60,85	17,53	16,74	137,43	79,94	106,21	56,19
TeBDE (f) 22.3	0,84	ND	ND	ND	1,33	ND	1,17	1,14
PeBDE (d)	7,52	7,02	ND	ND	12,91	9,04	10,35	4,89
PeBDE #99	3,34	2,58	ND	ND	9,11	7,29	7,77	3,24
HxBDE (b)	ND	ND	ND	ND	3,48	ND	5,15	ND

isbjörn PCB, DDE & TeBDE ng/g fett

	hona	hona	hona	hona	hona	hona	hona	hona	hane	hane	hane	hane	hane	hane	hane	
HexaPCB #153	4698	1629	6055	1695	12651	2175	1165	4857	5621	2274	1196	3245	3000	2775	3757	10285
HexaPCB #138	1338	475	2099	374	2179	854	406	1765	1495	593	500	840	697	1202	1286	2833
HexaPCB #128	48	20	87	12	31	36	8	51	57	25	49	26	22	76	54	122
HexaPCB #156	191	92	232	117	440	95	68	273	331	112	92	217	2423	156	321	553
HexaPCB #157	147	49	140	80	358	44	29	126	290	157	76	164	227	172	349	390
P,P- DDE	570	395	433	154	71	734	324	205	368	316	ND	370	372	1942	502	509
TeBDE #47	45	22	76	14	68	38	18	76	30	22	ND	38	42	34	35	80