

UNIVERSITETET FOR MILJØ- OG BIOVITENSKAP



FORORD

Denne masteroppgaven er blitt utført ved Institutt for Kjemi, Bioteknologi og Matvitenskap (IKBM) ved Universitetet for Miljø- og Biovitenskap (UMB). Oppgaven er den avsluttende delen av sivilingeniørstudiet i kjemi og bioteknologi – studieretning organisk analyse, og er utført i perioden fra januar til august 2013. Alt praktisk arbeid er utført ved IKBM.

Jeg ønsker å rette en takk til min hovedveileder Roland Kallenborn for konstruktive tilbakemeldinger og hjelp til problemstillinger rundt oppgaven. Jeg ønsker også å takke min tilleggsveileder Dag Ekeberg for uvurderlig hjelp med instrumenteringen av GC-MS. Takk til Laura Röhler for tilrettelegging av prøvemateriale.

Ås, august 2013

Kristin Helmersmo

SAMMENDRAG

En metode for separering av enantiomerene til de kirale klorerte pesticidene α -HCH, *o,p'*-DDT, *cis*-klordan, *trans*-klordan og *oxy*-klordan er blitt utviklet. GC-MS ble benyttet til kvantitativ og kvalitativ analyse av enantiomeraselektiv akkumulering av pesticidene i filet av oppdrettslaks og torskelever hentet fra ulike områder i landet.

Metodeutviklingen gikk ut på å undersøke separasjonen av kirale pesticidstandarder på ulike kirale kolonner og med ulike temperaturprogram og MS-program. Separasjon av enantiomerene ble oppnådd på en BGB172-kolonne med β -cyclodextrin-stasjonærfase og med masseanalyse ved $m/z = 181, 235, 375$ og 387 . Med resultatene fra pesticidstandardene ble retensjonstid, retensjonsrekkefølge og separasjonsfaktor bestemt for enantiomerene. Det ble bestemt at (+)-enantiomeren eluerer før (-)-enantiomeren for *cis*-klordan, *trans*-klordan og *oxy*-klordan på BGB172-kolonnen. Fiskeprøvene ble analysert på den utviklede metoden, og målanalyttene ble detektert og sammenlignet med standardene. Den enantiomerspesifikke akkumuleringen av hvert pesticid ble undersøkt ved å beregne enantiomerfraksjonen til pesticidene i hver prøve.

For *cis*-klordan ble det oppnådd separasjon med god oppløsning og godt signal i forhold til støy. Det ble observert en tendens til racemisk akkumulering av *cis*-klordan, med EF-verdier nær 0,5, uavhengig av fisketype og sted. Det ble ikke detektert *trans*-klordan eller *oxy*-klordan i noen av prøvene.

For akkumuleringen av α -HCH var resultatene mer varierte, og ingen klare trender ble bestemt. Det kunne likevel observeres enantiomeraselektiv akkumulering av pesticidet i både oppdrettslaks og torskelever, da EF-verdiene avvek fra 0,5. Den kromatografiske oppløsningen av α -HCH var lav, og signalet var svært lavt i forhold til støyen, slik at resultatene inneholder en del usikkerhet.

Det ble observert at akkumuleringen av *o,p'*-DDT også skjedde enantiomeraselektivt i fiskene. En tendens til foretrukket nedbryting av (+)-*o,p'*-DDT, mens (-)-*o,p'*-DDT ble akkumulert kunne observeres, med EF-verdier under 0,5. For *o,p'*-DDT var det generelt god oppløsning, men i enkelte tilfeller var det vanskelig å bestemme enantiomertoppene, og retensjonstidene varierer fra standarden, så resultatene for *o,p'*-DDT er noe usikre.

Det behøves å analysere flere fiskeprøver for å kunne bestemme klare trender av enantiomerselektiv akkumulering av de kirale pesticidene. MS-systemet som ble benyttet var heller ikke sensitivt nok for analysen i denne oppgaven.

ABSTRACT

A method for separation of the enantiomers of the chiral chlorinated pesticides α -HCH, *o,p'*-DDT, *cis*-chlordane, *trans*-chlordane and *oxy*-chlordane has been developed. GC-MS was used for the quantitative and qualitative analysis of the enantiomer selective accumulation of the pesticides in farmed salmon and cod liver collected from different locations.

The method development was pursued by studying the separation of the chiral pesticide standards on different chiral columns and with different temperature programs and MS-programs. Separation of the enantiomers was accomplished on a BGB172 column with a β -cyclodextrin stationary phase and with mass analysis of $m/z = 181, 235, 375$ and 387 . With the results from the pesticide standards retention time, retention order and separation factor of the enantiomers were acquired. It was concluded that the (+)-enantiomer eluates quicker than the (-)-enantiomer in the case of *cis*-chlordane, *trans*-chlordane and *oxy*-chlordane on the BGB172 column. The fish samples were analyzed on the developed method and the analytes were detected and compared with the standards. The enantiomer specific accumulation of each pesticide was examined by calculation of the enantiomer fraction of the chiral pesticides in each sample.

Separation of *cis*-chlordane was achieved with good resolution and high signal-to-noise ratio. There was a tendency of racemic accumulation of *cis*-chlordane, with EF values close to 0.5, regardless of the fish type and location. The results showed no detection of *trans*-chlordane or *oxy*-chlordane in any of the samples.

The results from the analysis of α -HCH showed more variation regarding the accumulation, and no specific trends regarding fish type or location could be determined. EF values different from 0.5 was however an indicator of enantiomer selective accumulation in both farmed salmon and cod liver, with a majority of EF values below 0.5. A poor chromatographic resolution of α -HCH and a low signal-to-noise ratio has led to results of some uncertainty.

There were also observations of enantiomer selective accumulation of *o,p'*-DDT in the fish samples. The results showed preferred depletion of (+)-*o,p'*-DDT, while (-)-*o,p'*-DDT was accumulated, with EF values under 0.5. The resolution of *o,p'*-DDT was generally good, but there were difficulties regarding the determination of some of the enantiomer's maxima, and

the retention times differed slightly from the standard. Hence there exist some uncertainties within the results.

To determine specific trends of enantiomer selective accumulation of the chiral pesticides further analysis of more sample material is needed. The MS system did not perform with the sensitivity required for the analysis in this thesis.

FORKORTELSER

α	kromatografisk separasjonsfaktor
μL	mikroliter
BGB 172	kiral stasjonær fase for kapillær GC
CC	<i>cis</i> -klordan
cGC	kapillær gasskromatografi (capillary gas chromatography)
EI	elektronioniserende kilde i massespektrometer (electron ionization)
EF	enantiomerspesifikk fraksjon
ER	enantiomerforhold (enantiomer ratio)
GC	gasskromatografi/gasskromatograf (gas chromatography/chromatograph)
GLC	gass-væske-kromatografi (gas liquid chromatography)
GPC	gelfiltreringskromatografi (gel permeation chromatography)
GSC	gass-fast-stoff-kromatografi (gas solid chromatography)
HCH	heksaklorsyklusheksanisomerer, en blanding med hoveddelene α -, β -, γ -, δ -, ϵ -HCH
MS	massespektrometer
ng	nanogram
OC	<i>oxy</i> -klordan
<i>o,p'</i> -DDT	orto,para-diklordifenyltrikloreten
POP	persistente organiske miljøgifter (persistent organic pollutants),
pg	pikogram
R_s	oppløsning (resolution)
SD	standardavvik
TC	<i>trans</i> -klordan
t_r	retensjonstid
t'_r	relativ retensjonstid
USB	ultrasonisk badekstrahering (ultrasonic bath extraction)

INNHold

FORORD	i
SAMMENDRAG	ii
ABSTRACT	iv
FORKORTELSER	vi
1. INNLEDNING	1
1.1. Bakgrunn og formål med oppgaven	1
1.1.1. Persistente organiske miljøgifter, POP	1
1.2. Teori.....	2
1.2.1. Kiralitet	2
1.2.2. Enantiomerspesifikk fordeling	2
1.2.3. Kirale miljøgifters egenskaper	3
1.2.4. α -heksaklorsykloheksan (α -HCH).....	4
1.2.5. <i>o,p'</i> -diklordifenyltrikloretan (<i>o,p'</i> -DDT).....	5
1.2.6. <i>cis-/trans</i> -klordan og <i>oxy</i> -klordan	5
1.2.7. Gasskromatografi.....	6
1.2.8. Massespektrometri.....	11
1.2.9. GC-MS	13
2. MATERIALER OG METODER	14
2.1. Pesticidstandarder	14
2.2. Metodeutvikling.....	14
2.3. Endelig metode for prøveanalyse	15
2.4. Prøvemateriale	15
3. RESULTATER OG DISKUSJON	17
3.1. Metodeutvikling.....	17
3.1.1. Forsøk med β -Dex120, BGB172(a) og tandem kolonne	17
3.1.2. Metodeutvikling med BGB172(b)-kolonne	20
3.2. Analyse av prøver	23
3.2.1. α -HCH.....	24
3.2.2. <i>o,p'</i> -DDT.....	26
3.2.3. <i>cis-/trans</i> -klordan og <i>oxy</i> -klordan	28
3.2.4. Generelt	30
4. KONKLUSJON.....	32
5. PERSPEKTIVER	33

REFERANSER	34
VEDLEGG A: Innstillinger på GC	38
VEDLEGG B: Innstillinger av MS	39
VEDLEGG C: Kromatogramutsnitt av racemisk <i>cis-/trans</i> -klordan	40
VEDLEGG D: Målte verdier av pesticidstandardene	41
VEDLEGG E: Retensjonstid og ER til målanalyttene	42
VEDLEGG F: Konsentrasjon av målanalyttene i prøvene	45
VEDLEGG G: EF av racemiske standarder	46

1. INNLEDNING

1.1. Bakgrunn og formål med oppgaven

Kiralitet og enantiomerenes ulike egenskaper har blitt mye studert i legemidler i forhold til tilfellet for miljøgifter (Muller & Kohler 2004). For kirale legemidler har det blitt oppdaget at én av enantiomerene kan forårsake alvorlige bivirkninger. Et kjent tilfelle dreide seg om et beroligende middel som inneholdt racemisk thalidomid. Begge enantiomerene hadde den ønskede terapeutiske effekten, men (S)-enantiomerer hadde fosterskadelig effekt (Muller & Kohler 2004);(Smith 2009). For Prozac og Ibuprofen er kun én av enantiomerene aktiv (Wiese 2011). Det er derfor interessant å studere den biologiske akkumuleringen også av kirale miljøgifter for videre å kunne undersøke enantiomerenes effekt, da en av enantiomerene til den kirale miljøgiften kan være mer giftig enn den andre (Ali et al. 2003).

Formålet med denne oppgaven er å utvikle en metode for separasjon av enantiomerene til kirale klororganiske miljøgifter. Til separeringen og analysen benyttes en GC-MS, og målanalyttene er de kirale klorerte pesticidene α -heksaklorsykloheksan (α -HCH), *o.p'*-diklordifenyltrikloretan (*o.p'*-DDT), *cis*-klordan, *trans*-klordan og *oxy*-klordan. Prøver tatt fra torskelever og oppdrettslaks skal studeres på den utviklede metoden for å analysere opptaket av de kirale miljøgiftene i disse prøvene. Fordelingen mellom enantiomerene skal beregnes for å undersøke om opptaket av miljøgiftene skjer enantiomeraselektivt og om det finnes trender for opptak av enkelte enantiomerer avhengig av fisketype og sted.

1.1.1. Persistente organiske miljøgifter, POP

Persistente organiske miljøgifter, POP, er et samleuttrykk for miljøgifter som er tungt nedbrytbare og holdes intakt over mange år. POPs er lite vannløselige, men lett fettløselige og lagres i levende organismer, inkludert mennesker, gjennom en prosess kalt bioakkumulering, der de absorberes i fettvevet. Konsentrasjonen av POPs blir høyere, jo høyere opp man kommer i næringskjeden. Fisk, rovfugl, pattedyr og mennesker tar med seg miljøgiftene dit de forflytter seg, samtidig som miljøgiftene blir fordelt i omgivelsene gjennom naturlige prosesser i jord, vann og luft. POPs kan derfor finnes i områder der de aldri har blitt brukt, som for eksempel i Arktis (*What are POPs?*). Effekt av POPs kan være kreft, allergier, skade på nervesystemet og forstyrrelser på immunsystemet. Enkelte POPs kan også endre hormonsystemet og føre til misdannelser på avkom (*What are POPs?*). Produksjon og bruk av POPs er blitt redusert eller eliminert etter Stockholm-konvensjonen og andre initiativ (Bidleman et al. 2012).

1.2. Teori

1.2.1. Kiralitet

Kiralitet er et begrep innenfor stereoisomeri. Stereoisomerer er kjemiske forbindelser som har samme orden av binding av atomene, men forskjellig fordeling av atomene i rommet. De kirale stereoisomerene kalles enantiomerer. Enantiomerer eksisterer hvis den ene stereoisomeren er speilbildet av den andre, og speilbildene ikke er identiske hverandre. Et eksempel på kiralitet er et par hender, der speilbildet av en venstrehånd ikke er en venstrehånd, men en høyrehånd. Akirale forbindelser har stereoisomerer med identiske speilbilder (Hart et al. 2007). Kirale forbindelser mangler enten et symmetrisk senter, et symmetriplan eller symmetriakse eller en kombinasjon av disse egenskapene (Kallenborn & Hühnerfuss 2001). Eksempler på dette kan ses i figur 1.1, 1.2 og 1.3.

Et asymmetrisk senter er et karbon med fire forskjellige grupper, der ingen mesoformer (identiske speilbilder) eksisterer og kalles et kiralt senter (Hart et al. 2007). Antall enantiomerer av en forbindelse med minst ett kiralt senter kan regnes ut ved 2^n , der n er antall kirale sentre (Ali et al. 2003). Enantiomerene av kirale forbindelser uten symmetriplan skiller seg fra hverandre ved deres motsatte (R)- og (S)-konfigurasjon. Enantiomerer kan navngis med (+) og (-) og kommer av retningen polarisert lys roteres i et polarimeter når en enantiomerren løsning (eller løsning med overskudd av én enantiomer) brukes (Hart et al. 2007). Når lineært polarisert lys passerer gjennom og interagerer med en enantiomerprøve i løsning, gjennomgår lyset optisk rotasjon (Smith 2009). En optisk aktiv forbindelse roterer planpolarisert lys, i motsetning til en optisk inaktiv forbindelse. Hvis analysatoren må roteres mot høyre (med klokken), sies den optiske aktive forbindelsen å være (+) eller d (dextrorotatory, mens (-) eller l (levorotatory) indikerer rotasjon mot venstre (mot klokken) (Hart et al. 2007). En racemisk blanding inneholder et 50:50-forhold av enantiomerene og har ingen effekt på planpolarisert lys, da enantiomerenes effekt utjevner hverandre. Racemiske blandinger er derfor optisk inaktive (Hart et al. 2007).

1.2.2. Enantiomerspesifikk fordeling

I biologiske system der de kirale pesticidene er tatt opp kan fordelingen mellom enantiomerene bli ujevn avhengig av enantiomeraselektiviteten til organismen og ulik akkumulering av hver enantiomer. Fordelingen mellom enantiomerene kan uttrykkes ved enantiomerspesifikk fraksjon (EF) og enantiomerforhold (ER). Enantiomerspesifikk fraksjon beregnes etter formel 1.1 (Harner et al. 2000):

$$EF = (+)/[(+) + (-)] \text{ eller } E1/(E1 + E2), \quad (1.1)$$

Innledning

der (+) og (-) refererer til retningen av den polariserte lysrotasjonen, og E1 og E2 til rekkefølgen til de kromatografiske toppene i elueringen. Enantiomerforhold beregnes etter formel 1.2 (Bidleman & Falconer 1999):

$$ER = (+)/(-) \text{ eller } E1/E2, \quad (1.2)$$

En racemisk blanding har EF = 0,5 og ER = 1. Formel 1.3 viser sammenhengen mellom EF og ER (Bidleman et al. 2012).

$$EF = ER/(ER + 1) \quad (1.3)$$

1.2.3. Kirale miljøgifters egenskaper

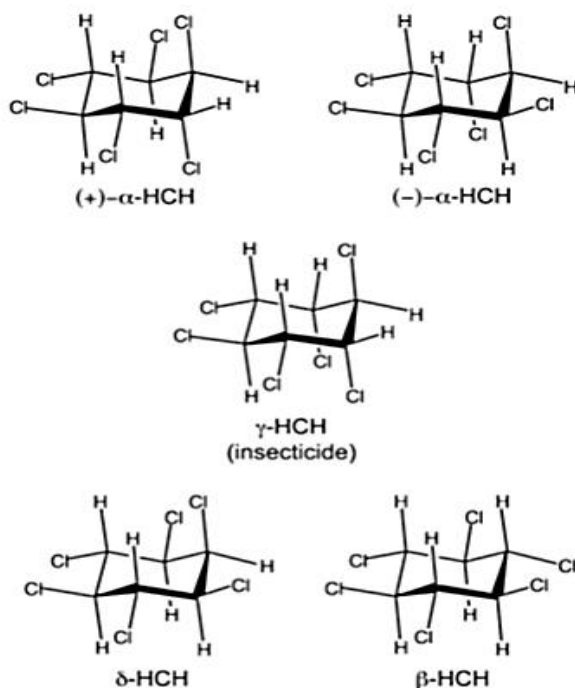
Kirale pesticider utgjør i dag rundt 25 % av alle pesticider som benyttes (Liu et al. 2005). De kirale pesticidene blir tilført miljøet i store mengder som racemiske blandinger (Muller & Kohler 2004). Mange typer miljøgifter, bl.a. insektmidler, PCB, brommerte flammehemmere, farmasøytiske produkter og produkter for personlig pleie består av kirale forbindelser (Bidleman et al. 2012).

Fysiske prosesser (f. eks. luft/vann-bytting, sorpsjon, etc.) og kjemiske prosesser (f. eks. abiotisk transformasjon) endrer ikke de enantiomerspesifikke forholdene fordi abiotiske prosesser er de samme for begge enantiomerene (Wong et al. 2002). De fleste biokjemiske prosesser er derimot enantiomerspesifikke, og siden flertallet av kirale pesticider blir påført miljøet som racemater, kan et avvik fra racemisk forhold i miljøprøver være en indikator på den biologiske aktiviteten til den gitte kirale forbindelsen (Eljarrat et al. 2008). Forskjellige enantiomerer av kirale forbindelser kan på grunn av biologiske reseptorers stereoselektivitet forårsake ulik biologisk effekt (Stanley & Brooks 2009). Små forskjeller i enzymenes aktive sete kan bestemme enantiomeraselektiviteten (Muller & Kohler 2004). Opptak, metabolisme og ekskresjon av enantiomerer kan derfor bli veldig forskjellig (Ali et al. 2003). Akkumulering av en enantiomer er avhengig av omgivelsene, artene og organet (Muller & Kohler 2004) i tillegg til kjønn (Karlsson et al. 2000) og alder på arten (Kallenborn & Hühnerfuss 2001).

Kunnskap om den stereoselektive metabolismen og enantioselektive giftigheten til kirale miljøgifter vil være nyttig i behandling av sykdommer forårsaket av kirale miljøgifter (Ali et al. 2003).

1.2.4. α -heksaklorsyklusheksan (α -HCH)

Teknisk HCH (heksaklorsyklusheksan) omfatter åtte isomerer, den kirale α - og de akirale β -, γ -, δ -, ϵ -, η -, ν - og ι -isomerene, derav kun γ -HCH (lindan) har insektdrepende egenskaper (Muller & Kohler 2004). Noen av isomerene er illustrert i figur 1.1.



© Springer-Verlag 2004

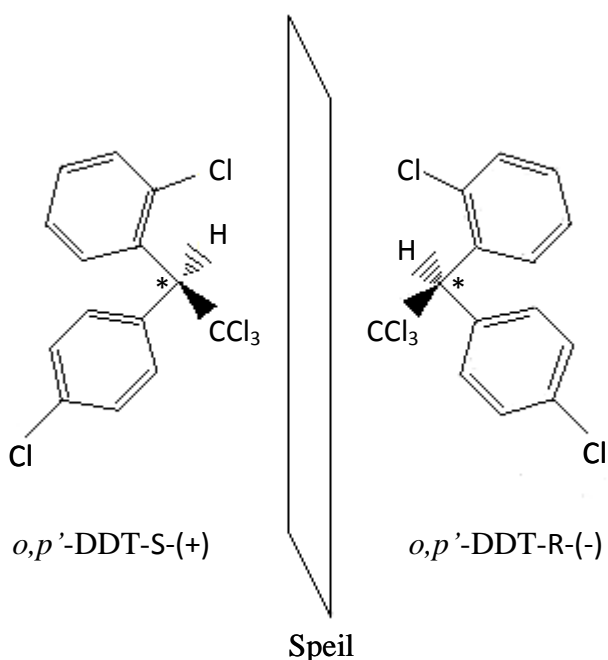
Figur 1.1. Strukturen til noen av HCH-isomerene. Øverst er de kirale α -HCH-isomerene (Muller & Kohler 2004). α -HCH mangler både et symmetrisk plan og senter samt en symmetrisk akse (Kallenborn & Hühnerfuss 2001).

HCH ble introdusert under 2. verdenskrig og ble brukt i skogbruk, jordbruk og til konservering av treverk. Den totale mengden av tilført HCH er halvert på verdensbasis, men den er fortsatt en bekymringsverdig kontaminant i flere land. Den blir transportert ved vann og luft, og i dag har HCH akkumulert i områder hvor HCH aldri har vært brukt, som i Arktis og det Baltiske hav. (Muller & Kohler 2004). HCH kan blant annet gi skader på lever, nyrer og nervesystemet og er dessuten mulig kreftfremkallende. EU godkjenner ikke plantevernmidler som inneholder HCH (*Miljøgifter...*). α -HCH produseres i dag kun som et biprodukt under produksjonen av lindan, da enkelte land fortsatt produserer lindan. α -HCH er svært tungt nedbrytbart i vann i kjøligere områder og kan bioakkumulere og spres i biota og arktiske næringskjeder (*The new POPs...*).

1.2.5. *o,p'*-diklordifenyltrikloretan (*o,p'*-DDT)

Diklordifenyltrikloretan eller DDT er forbindelser brukt som insektmiddel, spesielt mot malaria under 2. verdenskrig. DDT har blitt sprayet på avling, og flere land bruker fortsatt DDT mot malaria. Halvparten av tilført DDT kan finnes i jorden 10-15 år etter tilføringen, noe som er et tegn på miljøgiftens stabilitet. På grunn av den utbredte bruken kan spor av DDT bli funnet overalt, selv i Arktis. Mat er den største kilden til eksponering av DDT for mennesker. Eksponering over lange perioder har blitt assosiert med kroniske helseskader (*The 12 initial POPs...*).

Teknisk DDT består av den kirale isomeren *o,p'*-DDT (12-20 %) (figur 1.2) og *p,p'*-DDT (Kallenborn & Hühnerfuss 2001). Isomeren *o,p'*-DDT har fått oppmerksomhet på grunn av dens østrogenaktivitet. Det har blitt rapportert svak østrogenmimikk og hormonforstyrrelser for (-)-*o,p'*-DDT, mens (+)-*o,p'*-DDT er inaktiv (Eljarrat et al. 2008).



© 2011 Tulane/Xavier Center for Bioenvironmental Research

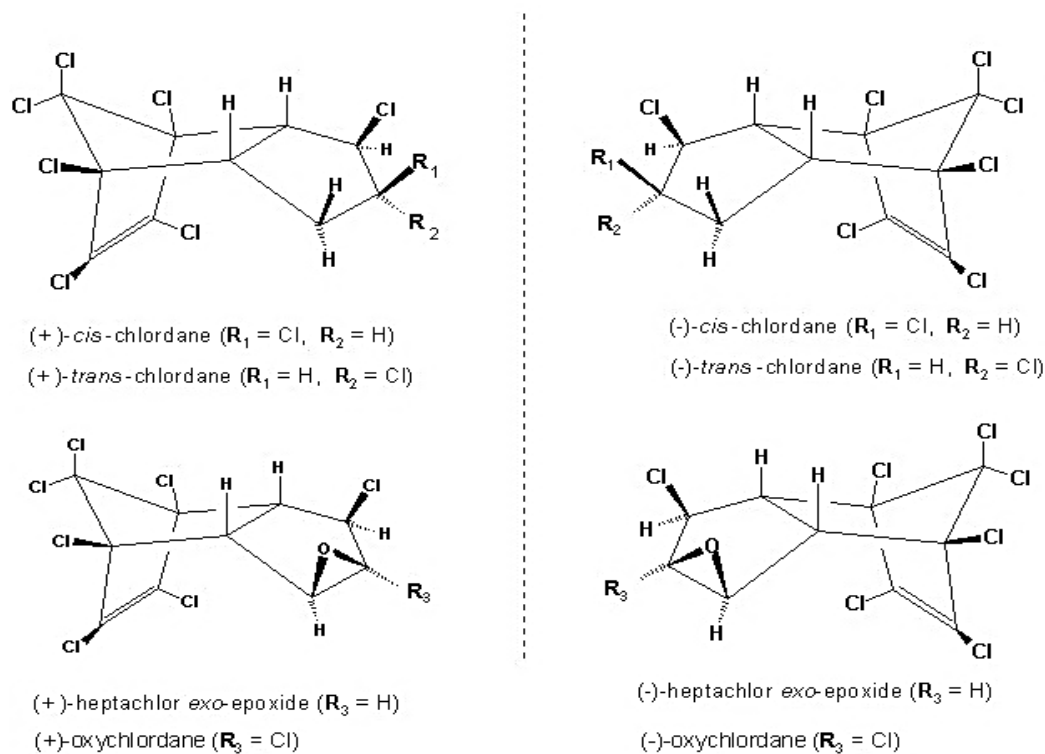
Figur 1.2. Enantiomerene til *o,p'*-DDT (Wiese 2011). *o,p'*-DDT har et asymmetrisk senter (Kallenborn & Hühnerfuss 2001), merket med *.

1.2.6. *cis*-/*trans*-klordan og *oxy*-klordan

Klordan er en annen type av klororganiske pesticider og ble mye brukt mot termitter og som insektmiddel innen jordbruk. Klordan forblir i jorden, og halveringstiden er rapportert til å være på ett år. Effekten av klordan på mennesker kan være forstyrrelser av immunsystemet og kreft, og eksponeringen forekommer hovedsakelig gjennom luften. Klordan har vist dødelig effekt på enkelte fugler og fisk (*The 12 initial POPs...*).

Innledning

Teknisk klordan består av ca. 140 forbindelser, der *cis*- og *trans*-klordan og heptakloreposid er kirale (figur 1.3), og hver enantiomer har ulike biologiske egenskaper og påvirkning på miljøet (Muller & Kohler 2004). *cis*- og *trans*-klordan blir hovedsakelig degradert til den persistente metabolitten *oxy*-klordan. Metabolitter er ofte mer giftige enn deres opphav (Eljarrat et al. 2008).



© Springer-Verlag 2002

Figur 1.3. Figuren viser strukturene til (+)- og (-)-enantiomerene av *cis*-, *trans*-, *oxy*-klordan og heptaklorexoepoxid. Den stiplede linjen er speilplanet (Hegeman & Laane 2002). Disse forbindelsene har alle et asymmetrisk senter (Kallenborn & Hühnerfuss 2001).

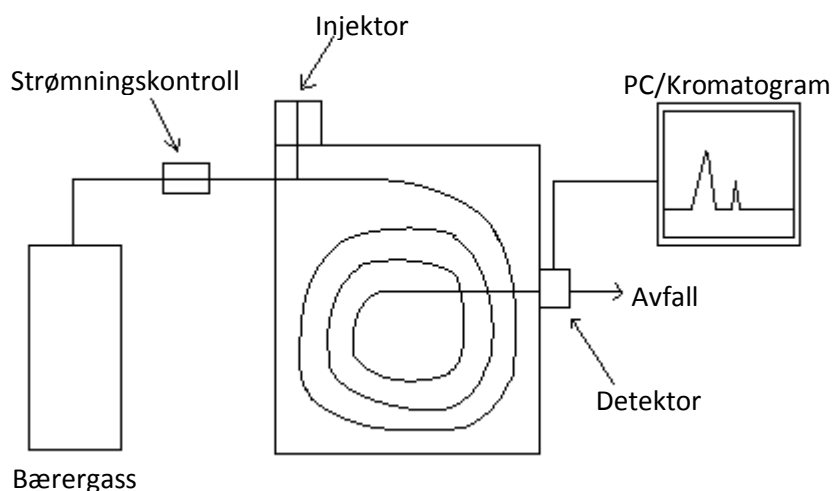
1.2.7. Gasskromatografi

Kromatografi er en fysisk metode for separasjon, der forbindelsene som skal separeres blir fordelt mellom to faser, en mobil fase og en stasjonær fase (Ahuja 2003). Den mobile fasen fører prøven gjennom en kolonne med stasjonær fase. I gasskromatografi er den mobile fasen en inert gass, gjerne helium, nitrogen eller hydrogen, som ikke forstyrrer deteksjonen av komponentene. Den stasjonære fasen kan være fast stoff (GSC) eller en væske holdt igjen på et fast materiale (GLC). Prøvekomponentene separeres med hensyn på deres relative damptrykk og ulike affinitet til den stasjonære fasen (Ahuja 2003). Tiden komponentene bruker gjennom kolonnen blir derfor forskjellig, og den blir kalt retensjonstid.

Innledning

En gasskromatograf består av en beholder med bærergass, injektor, kolonne og detektor. Hoveddelene til en gasskromatograf er illustrert i figur 1.4. Det finnes flere forskjellige kolonner og detektorer spesielt utviklet til forskjellige analytter (Harris 2007).

De viktigste parameterne i gasskromatografi er egenskapene til den stasjonære fasen og temperatur (Miller 2009a). Temperaturen i kolonnen kan programmeres slik at temperaturen stiger under separasjonen for å senke retensjonstiden til sent eluerende komponenter (Harris 2007). Initialtemperaturen til kolonnen anbefales satt til 10-20 °C under kokepunktet til løsemiddelet for å oppnå løsemiddeleffekten (PerkinElmer 1998). Gasskromatografi er metoden som foretrekkes til analyse av klordaner på grunn av flyktigheten og den termiske stabiliteten til POP-forbindelser (Seemamahannop et al. 2005).



Figur 1.4. Illustrasjon av delene i en gasskromatograf.

Retensjonstid

Retensjonstiden, t_r , for hver komponent er tiden det tar etter injeksjon av en prøveblanding på kolonnen til komponenten når detektoren. Justert retensjonstid, t'_r , er en komponents retensjonstid i forhold til mobilfasens retensjonstid, t_m , se formel 1.4 (Harris 2007).

$$t'_r = t_r - t_m \quad (1.4)$$

Kromatogram

Et kromatogram er en graf som viser detektorens respons som en funksjon av retensjonstiden (Harris 2007), og gir en illustrasjon på separasjonen av forbindelsene i prøven. De separerte forbindelsene vises som toppar i kromatogrammet langs x-aksen etter tiden det tar før de detekteres (retensjonstiden). Y-aksen viser intensiteten til toppene og er et mål på mengdeforholdet mellom forbindelsene i prøven.

Innledning

Oppløsning

Oppløsning er et mål på effektiviteten til et kromatografisk system, og definerer graden av separasjonen til to analytter eller topper. Oppløsningen av to topper, A og B, i et kromatografisk system kan regnes ut med formel 1.5.

$$R_s = \frac{d}{[(W_b)_B + (W_b)_A]/2} = \frac{2d}{[(W_b)_B + (W_b)_A]} \quad (1.5)$$

der d er avstanden mellom hver topps maksimum, og $(W_b)_A$ og $(W_b)_B$ er bunnbredden av henholdsvis topp A og B. Større oppløsning, R_s , betyr bedre separasjon. En verdi på 1,0 tilsvarer en oppløsning på ca. 98 %. Formel 1.5 gjelder strengt tatt kun når begge toppene er like høye. Oppløsning blir påvirket av asymmetriske topper og «tailing», når den ene siden av toppens maksimum strekker seg lenger enn den andre (Miller 2009a). Bredere topper tyder på dårlig separasjon og oppløsning. Separasjonen er bedre jo større avstanden er mellom toppene (Harris 2007).

Separasjonsfaktor

Separasjonsfaktoren, α , er et mål på forholdet mellom fordelingen av to analytter, A og B, på en gitt kolonne (Miller 2009a), og regnes ut etter formel 1.6 (Harris 2007).

$$\alpha = t_{rB} / t_{rA} \quad (1.6)$$

Verdien av α er $>0,1$, siden analytt B holdes igjen lenger i systemet enn analytt A (Miller 2009a).

Kolonner

Kromatografiske kolonner kan deles i to kategorier, pakke kolonner og kapillærkolonner (open tubular columns) (Harris 2007).

Pakkede kolonner har en diameter som varierer fra 3-6 mm og en lengde på 1-5 m og brukes mest i preparativ GC, da de har større prøvekapasitet enn kapillærkolonner. De gir derimot bredere topper, lengre retensjonstid og mindre oppløsning enn kapillærkolonner. Pakkede kolonner er pakket med partikler med stasjonær fase (Harris 2007).

Kapillærkolonner har en indre diameter mellom 0,10 og 0,53 mm, og de kan være opptil 100 m lange, men en lengde på 30 m er vanligst. I kapillærkolonner er de indre veggene dekket med

Innledning

stasjonær fase. (Harris 2007). Disse kolonnene er svært effektive for separering av komplekse prøver (Ahuja 2003). De mest populære typene er kolonner av smeltet silisiumdioksid, silika, siden de er svært inerte og fleksible. Utsiden av silikakolonner må dekkes med polyimid, som tåler høye temperaturer, for å forlenge levetiden og holde dem fleksible (Miller 2009a). Mindre kolonnediameter fører generelt til bedre effekt (Ahuja 2003), så kapillærkolonner fører derfor til høyere oppløsning, kortere analysetid og bedre sensitivitet enn pakkede kolonner, men har mindre prøvekapasitet. Smalere kolonner fører til høyere oppløsning, men krever høyere trykk (Harris 2007). Kolonnen gir bedre separasjon hvis temperaturen er under prøvens kokepunkt og dermed øker interaksjonen med den stasjonære fasen. Når mengden av stasjonær fase blir mindre, kan man operere ved lavere temperaturer. Kapillærkolonner kjøres derfor ved lavere temperaturer enn pakkede kolonner (Miller 2009a).

Valg av stasjonær fase er basert på regelen «likt løser likt». Upolare kolonner er best egnet for upolare forbindelser (Harris 2007).

Kirale kolonner i GC

Kirale separasjoner kan enten skje med kirale stasjonære faser eller kirale mobile faser (Miller 2009a). Enantiomerer kan vanligvis ikke skilles fra hverandre i akirale miljø som ved kromatografi med normal silikagel. De kan derimot skilles i kirale miljø som i en kiral stasjonær fase (CSP) i en kolonne. For kirale separasjoner med GC er kirale stasjonære faser det eneste valget, da det ikke er mulig å operere GC med kirale mobile faser (Miller 2009a).

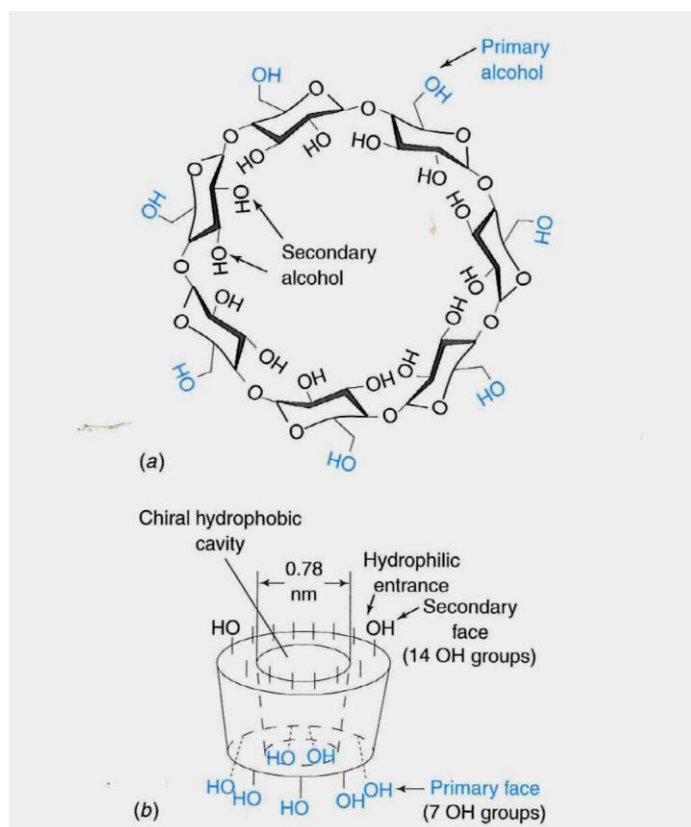
Det finnes ulike kolonner utviklet for å separere enantiomerer. Disse kolonnene har kirale stasjonære faser, som interagerer ulikt med de forskjellige enantiomerene som analyseres. Det har blant annet blitt brukt stasjonære faser av acetylerede aminosyrer og dipeptidester i kapillærkolonner av glass. Separeringen er da knyttet til hydrogenbindende interaksjon mellom enantiomerene i prøven og den kirale stasjonære fasen. En ulempe med slike faser er blant annet den lave maksimumstemperaturen på 110 °C (Kallenborn & Hühnerfuss 2001).

Kapillærkolonnene som benyttes i denne oppgaven har stasjonær fase av β -cyclodextrin. Cyclodextriner er sykliske α -(1-4)-glukoseoligomerer med seks, syv eller åtte glukoseenheter og kalles henholdsvis α -, β - og γ -cyclodextrin. β -cyclodextrin har en åpning med 0,78 nm diameter til et kiralt hydrofobisk hulrom som er illustrert i figur 1.5, mens hulrommet for α - og γ -cyclodextrin har en diameter på henholdsvis 0,57 nm og 0,96 nm (Kallenborn & Hühnerfuss 2001). Enantiomerene har ulik affinitet til cyclodextrin-hulrommet (Harris 2007). Det hydrofobiske

Innledning

hulrommet favoriserer inkludering og fanging av upolare forbindelser. Fordelen med stasjonærfaser av cyclodextrinderivater i forhold til fasene tidligere nevnt er større temperaturrekkevidde i tillegg til evnen til å separere hydrofobe forbindelser, som for eksempel flere POPs (Kallenborn & Hühnerfuss 2001).

For å oppnå maksimal separasjonseffektivitet og oppløsning blir cyclodextrinderivatene suspendert i middels polar polysiloxaner. Mekanismen til kiralt gjenkjenning er ikke kjent i detalj, så det er vanskelig å forutse hvilken cyclodextrin som gir best oppløsning. Det finnes derfor flere ulike cyclodextrinfaser (BGB-Analytik 2013).



© 2007 W. H. Freeman and Company

Figur 1.5. (a) Strukturen av β -cyclodextrin, et syklisk sukker laget av syv glukosemolekyler. (b) Primære hydroksylgrupper ligger på en side og de sekundære hydroksylgruppene ligger på motsatt side. I midten dannes et kiralt hydrofobt hulrom (Harris 2007).

Injisering av prøve

Injisering av prøven på kolonnen kan skje på flere måter som for eksempel splitt, *splitless* eller direkte på kolonnen (on column injection) (Harris 2007). Målet for alle er å få prøven på kolonnen så fort som mulig og i så lite volum som mulig. Dette oppnås som regel med «flash»-inndamping av prøven på et oppvarmet rør, som også har mulighet til å splitte prøven i to deler. Splitinjeksjon er

Innledning

den eldste og enkleste injiseringsteknikken (Miller 2009a), og velges hvis konsentrasjonen av analytten er $>0,1$ % av prøven. En fullstendig injisering inneholder for mye materiale for kolonner som er smalere enn 0,32 mm. Splittinjisering tilsetter kun 0,2-2 % av prøven til kolonnen, mens resten sendes til avfallsrør (Harris 2007).

Splitless-injeksjon brukes for sporanalyser av analytter som er mindre enn 0,01 % av hele prøven, og ca. 80 % av prøven blir applisert til kolonnen. Injektortemperaturen er lavere enn for splitt for at prøven ikke skal dekomponere, da den bruker lenger tid i injektorinngangen (Harris 2007). For denne injeksjonsmetoden er splittventilen lukket i starten. Prøven tynnes ut i løsemiddelet, og 1-5 μL blir injisert i en oppvarmet injeksjonskanal. Prøven fordampes og blir tilført sakte til en kald kolonne, der prøven og løsemiddelet kondenseres. Etter ca. 45 sekunder blir splittventilen åpnet og strømningshastigheten økes. Med et temperaturprogram for kolonnen, som starter på ved en kald temperatur, blir først det flyktige løsemiddelet fordampet og ført gjennom kolonnen, mens prøveanalyttene blir samlet i et bånd i restene av løsemiddelet. Når temperaturen øker, kan prøveanalyttene fordampe og bli separert (Miller 2009a).

Injeksjon direkte på kolonnen brukes til termisk sensitive prøver, som dekomponerer ved temperaturer over prøvenes kokepunkt og brukes helst til kvantitative analyser. Denne injeksjonstypen foretrekkes for slike prøver, da løsningen blir injisert direkte uten å føres gjennom en varm injektor. Initialtemperaturen er lav nok til å kondensere løsningene i en smal sone. Oppvarming av kolonnen fører til separering (Harris 2007). Kolonnen i dette tilfellet er bredere enn for de andre injeksjonsmetodene på grunn av behov for større volum av bærer-gass (Miller 2009a)

Detektor

Det finnes flere ulike detektorer til bruk ved gasskromatografi, blant annet termisk ledningsdetektor, flammeioniseringsdetektor, elektronfangerdetektor og massespektrometer (Harris 2007). Massespektrometer er en universal detektor mye brukt i gasskromatografi (Ahuja 2003). Massespektret er sensitivt, gir både kvalitativ og kvantitativ informasjon og kan skille mellom ulike forbindelser med samme retensjonstid (Harris 2007).

1.2.8. Massespektrometri

Massespektrometri er en teknikk for å studere massene til atomer, molekyler eller fragment av molekyler. Et massespektrometer består av en ionekilde, masseanalysator og ionedetektor. Ionekilden produserer ioner av de nøytrale analyttmolekylene i gassfase, og ionene akselereres av et elektrisk felt videre til en masseanalysator (Harris 2007). I masseanalysatoren blir ionene separert

Innledning

avhengig av deres masse-til-ladningsratio, m/z . Ionestrømmen som genereres blir detektert av ionedetektoren, og intensiteten blir plottet mot m/z -ratioene og gir et massespektrum, som kan brukes både til kvalitative og kvantitative analyser. Z-verdien til ionene er vanligvis +1, slik at m/z -ratioen er den samme som ionets masse. Ionekilder til bruk i GC-MS kan være elektronionisering (EI) eller kjemisk ionisering (CI), der EI er vanligst (Miller 2009a).

Elektronionisering, EI

EI-kilden består av et oppvarmet filament utenfor kilden som emitterer elektroner ved 70 eV som videre treffer analyttmolekylene fra GC inne i selve ionekilden. Denne kollisjonen fører til ionisering av analyttmolekylene, da disse taper et elektron, se likning (1.7), der AH representerer analyttmolekylet.



AH^+ betegner molekylionet og har den samme m/z -ratioen som molekylmassen til analytten. Molekylionet fortsetter gjennom masseanalysatoren i et elektrisk eller magnetisk felt der det kan brytes ned i mindre fragment avhengig av ionets struktur og absorberte energi. All fragmenteringen gjør at EI regnes som en *hard* ioniseringsmetode (Miller 2009a). Fragmentene detekteres og plottes i et massespektrum. Den mest intense toppen i massespekteret kalles basetoppen, og intensiteten til de andre toppene blir uttrykt som prosent av intensiteten til basetoppen (Harris 2007).

Masseanalysator

I masseanalysatoren separeres ionene som ble produsert i ionekilden. Mange av analysene med GC-MS blir blant annet utført med kvadrupol eller ionefanger som masseanalysator (Miller 2009a). En kvadrupol er en masseanalysator som bruker stabiliteten til baner i oscillerende elektriske felt til å separere ioner avhengig av deres m/z -forhold. Kvadrupolen er satt sammen av fire sylindriske staver med varierende elektrisk ladning. Stavene ligger parallelt rundt en åpen bane som fører ionene fra ionekilden til detektoren. Et positivt ion som entrer rommet mellom stavene vil bli trukket mot en negativ stav. Hvis potensialet forandrer fortegn før ionet utlader seg på denne staven, vil ionet endre retning (Hoffmann & Stroobant 2007).

I kombinasjon med kromatografiske system må analysatorene være i stand til å skanne gjennom en mengde masser på veldig kort tid, slik at minst 10 scan blir gjort for hver kromatografiske topp. Det kan kjøres scan med TIC (total ion chromatogram) eller SIR/SIM (selected ion

Innledning

recording/monitoring), der TIC skanner alle massene i et gitt intervall, mens SIR skanner kun utvalgte masser og er derfor mer sensitivt (Miller 2009a).

1.2.9. GC-MS

GC-MS er en kombinasjon av gasskromatografi med massespektrometer som detektor. Med denne kombinasjonen kan man først separere forbindelsene i en prøve og deretter kvalitativt og kvantitativt bestemme forbindelsene (Harris 2007). For optimal effekt må hver av kolonnene kondisjoneres før bruk, det vil si at bærergassen sendes gjennom kolonnen ved konstant temperatur over lengre tid uten tilkobling til ionekilden. Betingelsene for kondisjonering er avhengig av kolonnen. Nye kolonner inneholder flyktige urenheter som bærergassen tar med seg. Hvis disse urenheterne følger med til ionekilden, kan det svekke sensitiviteten (PerkinElmer 1998).

2. MATERIALER OG METODER

2.1. Pesticidstandarder

Som referansemateriale i metodeutviklingen ble det benyttet enantiomerstandarder og racemiske standarder for å undersøke henholdsvis retensjonsrekkefølgen og separasjonen til enantiomerene.

Enantiomerstandardene som ble testet var (+)-*cis*-klordan(6,11) (1ng/μL), (+)-*oxy*-klordan(6,11) (1ng/μL) og (+)-*trans*-klordan(6,11) (1ng/μL) (LGC standards, Teddington, UK). Disse standardene ble fortynnet med heksan ($\geq 99,0$ % GC, Sigma-Aldrich, Steinheim, Tyskland) til en konsentrasjon på 250 pg/μL.

Det manglet enantiomerstandarder av α -HCH og *o,p'*-DDT. Retensjonsrekkefølgen til disse forbindelsenes enantiomerer ble antatt på bakgrunn av tidligere undersøkelser (Borga & Bidleman 2005).

De racemiske standardene var ferdig løsning av *o,p'*-DDT (LGC standards, Teddington, UK) på 250 pg/μL, *trans*-klordan (99,5 %, Cerilliant[®], TX, USA), *cis*-klordan (99,5 %, ChemService Inc., West Chester, PA, USA) og α -HCH (20 μg/ml løst i metanol, Supelco, Bellefonte, PA, USA). Disse standardene ble fortynnet med heksan og testet med konsentrasjoner på 250 pg/μl og 150 pg/μl.

2.2. Metodeutvikling

All metodeutvikling ble utført med en gaskromatograf (Perkin Elmer AutoSystem XL Gas Chromatograph, Norwalk, CT, USA) koblet direkte via kolonnen til ionekilden i et massespektrometer (Perkin Elmer TurboMass Mass Spectrometer, Norwalk, CT, USA), der separasjonen av pesticidstandardene ble undersøkt med ulike kolonner og temperaturprogram. Massespektrometeret var instrumentert med en elektronioniserende kilde, som opererte i positiv mode, og med kvadrupol som masseanalysator. Innstillingene ble gjort på data med TurboMass software (Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA). Bærergassen var helium (5,0 kvalitet, AGA, Oslo, Norge) og ble stilt inn med en hastighet på 15 ml/min.

Kolonnene som ble testet var β -Dex 120 (Supelco, Bellefonte, PA, USA), to typer BGB172 (BGB Analytik AG, Boeckten, Sveits) og Rxi[®]-5Sil MS (Restek, Bellefonte, PA,

USA). Tabell 2.1 viser oversikt over kolonnene som er benyttet. Temperaturprogrammene som ble testet for hver kolonne kan ses i vedlegg A. Den akirale Rxi[®]-5Sil MS-kolonnen ble koblet sammen med en BGB172-kolonne som en tandem kolonne. Alle kolonnene ble kondisjonert før bruk.

Tabell 2.1. Kolonnene som er benyttet i oppgaven, med type stasjonærfase og dimensjoner.

Nr.	Navn	Stasjonærfase	Dimensjoner
1	β-Dex 120	20 % (β-DEX 120) heptakis-(2,3,6-tri-O-metyl)-β-cyclodextrin i SPB-35 poly(35 % difenyl/65 % dimetylsiloksan)-fase	15 m x 0,25 mm x 0,25 μm
2	BGB172 (a)	20 % heptakis-(2,3-di-O-acetyl-6-O-tert-Butyldimetylsilys)-β-cyclodextrin løst i BGB-15 (15 % fenyl-, 85 % metylpolysiloksan)	15 m x 0,25 mm x 0,25 μm
3	Rxi [®] -5Sil MS + BGB172 (a)	5 % fenyl/95 % dimetyl polysiloksan	15 m x 0,25 mm x 0,25 μm
4	BGB172 (b)	20 % heptakis-(2,3-di-O-acetyl-6-O-tert-Butyldimetylsilys)-β-cyclodextrin løst i BGB-15 (15 % fenyl-, 85 % metylpolysiloksan)	30 m x 0,25 mm x 0,18 μm

2.3. Endelig metode for prøveanalyse

Gasskromatografen ble instrumentert med kolonne nr. 4, BGB172. Prøvene ble injisert med et volum på 2 μL uten splitt og splitt ble åpnet etter ett minutt (splitless). Injektortemperaturen ble satt til 260 °C. Temperaturprogrammet for gasskromatografen var:

60 °C (hold i 2 min), 20 °C/min → 180 °C, 1 °C/min → 240 °C (hold i 6 min)

Detaljerte innstillinger for massespektrometeret finnes i vedlegg B. Tabell 2.2 inneholder de relevante *m/z*-forholdene for prøveanalysen.

Tabell 2.2. *m/z*-forholdene som ble analysert for hvert pesticid

α-HCH	<i>o,p'</i> -DDT	<i>cis-/trans</i> -klordan	<i>oxy</i> -klordan
181	235	373	387
183	237	375	389

2.4. Prøvemateriale

Analysematerialet ble mottatt ferdig opparbeidet. Prøvene var tatt fra torskelever og laksefilet fra fisk i Engersand, Husteinbukta og Etnefjorden, og de var blitt homogenisert med natriumsulfat. To paralleller av hver prøve hadde gjennomgått ekstraksjon på kald kolonne og

GPC/aluminiumoksidrensing. To paralleller av hver prøve hadde gjennomgått ekstraksjon på kald kolonne og svovelsyre/silisiumrensing. En parallell av hver prøve hadde gjennomgått ekstraksjon på ultrasonisk bad og GPC/aluminiumoksidrensing. Prøvene vil kjennetegnes henholdsvis under navngivingen GPC, syre og USB videre i oppgaven. Detaljert beskrivelse av prøveopparbeidingen og konsentrasjon av målte pesticider i prøvene finnes i A. Trolleruds masteroppgave (Trollerud 2013). De målte konsentrasjonene av målanalyttene i hver enkelt prøve kan ses i vedlegg F. Tabell 2.3 viser en oversikt over prøvenes type og opphav. Det ble i tillegg kjørt blankprøver og standard referansemateriale 1588b (*National Institute of Standards and Technology*) for torskelever (GPC SRM) på samme metode.

Tabell 2.3. Tabellen gir en oversikt over fisketype og opphav for prøvene.

Prøve	Opprinnelse	Prøvetype
2386 A	Etnefjorden	torskelever (10 stk.)
2386 B	Etnefjorden	torskelever (10 stk.)
2387 A	Husteinbukta	torskelever (16 stk.)
2387 B	Husteinbukta	torskelever (16 stk.)
2388 A	Engersand	torskelever (5 poser)
2388 B	Engersand	torskelever (5 poser)
2389 A	Oppdrettslaks	laksefilet
2389 B	Oppdrettslaks	laksefilet

3. RESULTATER OG DISKUSJON

3.1. Metodeutvikling

Det ble testet tre kolonner før endelig analysemetode ble utviklet med den fjerde kolonnen. Med de tre første kolonnene ble det kun testet med (+)-enantiomerstandardene til *cis*-, *trans*-oxy-klordan og ikke racemiske standarder. Det ble ikke oppnådd brukbar separasjon av enantiomerene med disse tre kolonnene.

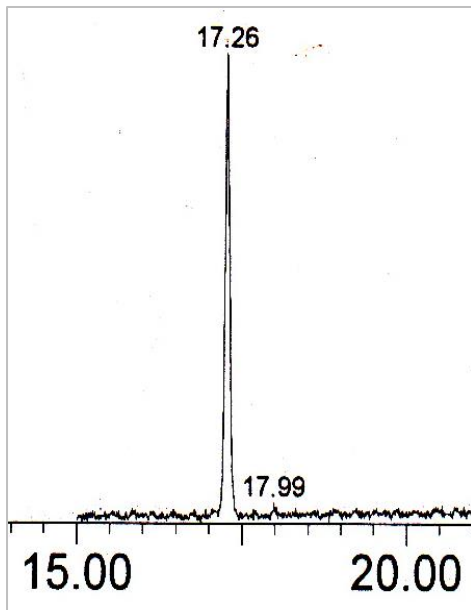
3.1.1. Forsøk med β -Dex120, BGB172(a) og tandem kolonne

Grunnet lite erfaring med bruk av GC-MS ble det kun notert temperaturprogram for bruk av kolonne 1, 2 og 3. MS-innstillingene er derfor usikre, men systemet ble kalibrert med automatisk tuning før bruk, og noen parametere er kjent. Ionekilden opererte med en energi på 70 V og med en temperatur på 150 °C. Filamentstrømmen var ca. 4,5 A. Standardene ble injisert ved splitless-injisering. Det ble utført analyse av *m/z*-forholdene 181, 183, 235, 237, 246, 248, 258, 260, 264, 266, 284, 286, 373 og 375.

β -Dex120

Det ble forsøkt én kjøring av standarder på β -Dex120-kolonnen, med temperaturprogram 1. Masseanalysen var delt i to deler, de første 15 minuttene ble det utført scan av 6 kanaler (181 – 248) og deretter scan av 8 kanaler (258 – 375) for resten av programtiden. Klordanforbindelsene kunne observeres i kromatogrammet ved masseintervallet fra 258 - 375. Kromatogrammene viste én topp for hver standard, som vist i (figur 3.1) for (+)-*cis*-klordan, men viste da ikke separasjon av enantiomerene. Enantiomerstandardene som ble benyttet hadde et overskudd av (+)-enantiomeren i forhold til (-)-enantiomeren, og de vil derfor vise noe av (-)-enantiomeren for at elureringsrekkefølgen skal kunne bestemmes.

Kromatogrammene hadde høyt signal i forhold til støy, men de ble studert med TIC, noe som kan ha bidratt til at en eventuell separasjon av enantiomerene ikke ble observert. Det er mulig at toppene hadde vært tydeligere om kromatogrammene til standardene hadde blitt studert for kun den relevante massen med SIR. Det kan være at en temperaturøkning mellom 180 °C og 250 °C på 5 °C/min var for høy, og at en separasjon av enantiomerene kunne vært observert med en temperaturøkning på 1-2 °C. β -Dex-kolonnen var gammel, slik at effekten til den stasjonære fasen kan ha blitt svekket etter bruk over flere år.

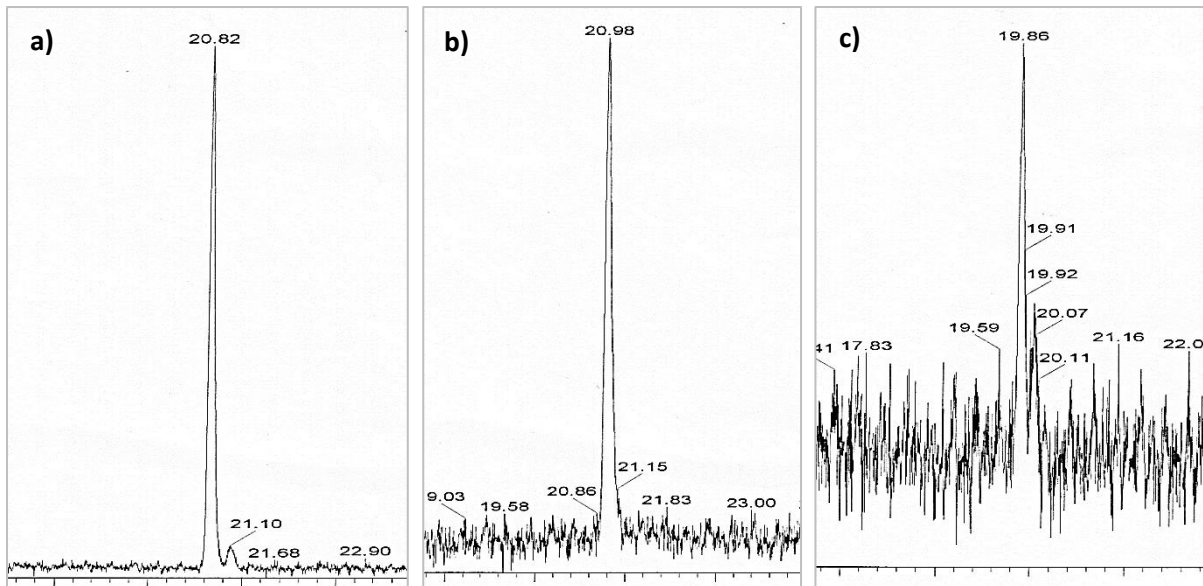


Figur 3.1. (+)-*cis*-klordan på β -Dex120-kolonne.

BGB172(a)

Med BGB172-kolonnen på 15 m ble det forsøkt fire temperaturprogram. Figur 3.2 viser separasjonen av *trans*-, *cis*- og *oxy*-klordan med temperaturprogram 1, som ga best resultat. Masseanalysen foregikk på samme måte som med β -Dex-kolonnen, todelt scan. Kromatogrammene ble studert i TIC-format og ikke ved den relevante massen til standarden. Separasjonen ble bedre på denne kolonnen sammenlignet med β -Dex-kolonnen, da man kan se noe av (-)-enantiomeren. Resultatet for *oxy*-klordan viser lite signal i forhold til støy sammenlignet med *trans*- og *cis*-klordan. Det kan forklares i ettertid med at ikke rett *m/z*-forhold ble stilt inn for *oxy*-klordan i MS-innstillingene.

Med de andre temperaturprogrammene ble ikke masseanalysen delt, men kjørt som samlet scan av alle de 14 massene. Kromatogrammene, som ble studert i TIC-format, viste mange topper, og det var ikke klart hvilken topp som tilhørte hver enkelt standard i TIC-format. Det kunne ikke observeres bedre separasjon ved endring av temperaturprogram, selv om lavere temperaturøkning per minutt burde gitt bedre separasjon. Det viser at signalene er avhengig av innstillingene til masseanalysen. Færre masser som analyseres gir mindre støy. Studering av kromatogrammene ved kun én masse avhengig av standard ville sannsynligvis gitt bedre signal.



Figur 3.2. Klordanstandardene på BGB172-kolonne og temperaturprogram 1.

a) (+)-*trans*-klordan **b)** (+)-*cis*-klordan **c)** (+)-*oxy*-klordan

Tandem kolonne

Med bruk av tandem kolonne ble standardene først kjørt gjennom Rxi[®]-5Sil MS -kolonnen og deretter gjennom BGB172-kolonnen. Hensikten med tandem kolonne er at forbindelsene i en prøve først skal separeres på en akiral stasjonær fase for så at enantiomerene til forbindelsene skal separeres på en kiral stasjonær fase (Wong et al. 2002).

Masseanalysen ble foretatt med ett scan av de 14 massene beskrevet over. Kromatogrammene med denne metoden viste kun enkelttopper av både *cis*- og *trans*-klordan, og altså ingen separasjon av enantiomerene. Det ble ikke observert noen topp for *oxy*-klordan, sannsynligvis på grunn av uriktig masseinnstilling. Også i dette tilfellet ble kromatogrammene studert i TIC-format. Signalene ble svakere etter hvert program. Det kan komme av at det ble kjørt med for høy temperatur (320 °C) i forhold til makstemperaturen for BGB172-kolonnen, som er 250 °C. På grunn av den høye temperaturen kan den stasjonære fasen ha blitt ødelagt, noe som vil føre til dårlig resultat.

Resultatene fra testingen med de tre første kolonnene kunne sannsynligvis blitt bedre hvis mer forståelse av bruk av instrumentet hadde vært til stede på det tidspunkt de ble testet. Det burde ha blitt gjort nærmere undersøkelser av hvilke *m/z*-forhold som skulle ha blitt stilt inn for masseanalysen. Kromatogrammene for hver standard burde ha blitt studert ved kun én masse tilhørende standarden for mindre støy i kromatogrammet. Mer kritisk syn på bruk av

temperaturprogram kunne også ha gitt bedre resultater. Det burde ha blitt undersøkt temperaturrekkevidde for hver kolonne og undersøkt tidligere testede temperaturprogram i litteraturen for separering av denne oppgavens standarder på de ulike kolonnene. Det er også mulig at MS-systemet burde ha blitt kalibrert jevnlig.

3.1.2. Metodeutvikling med BGB172(b)-kolonne

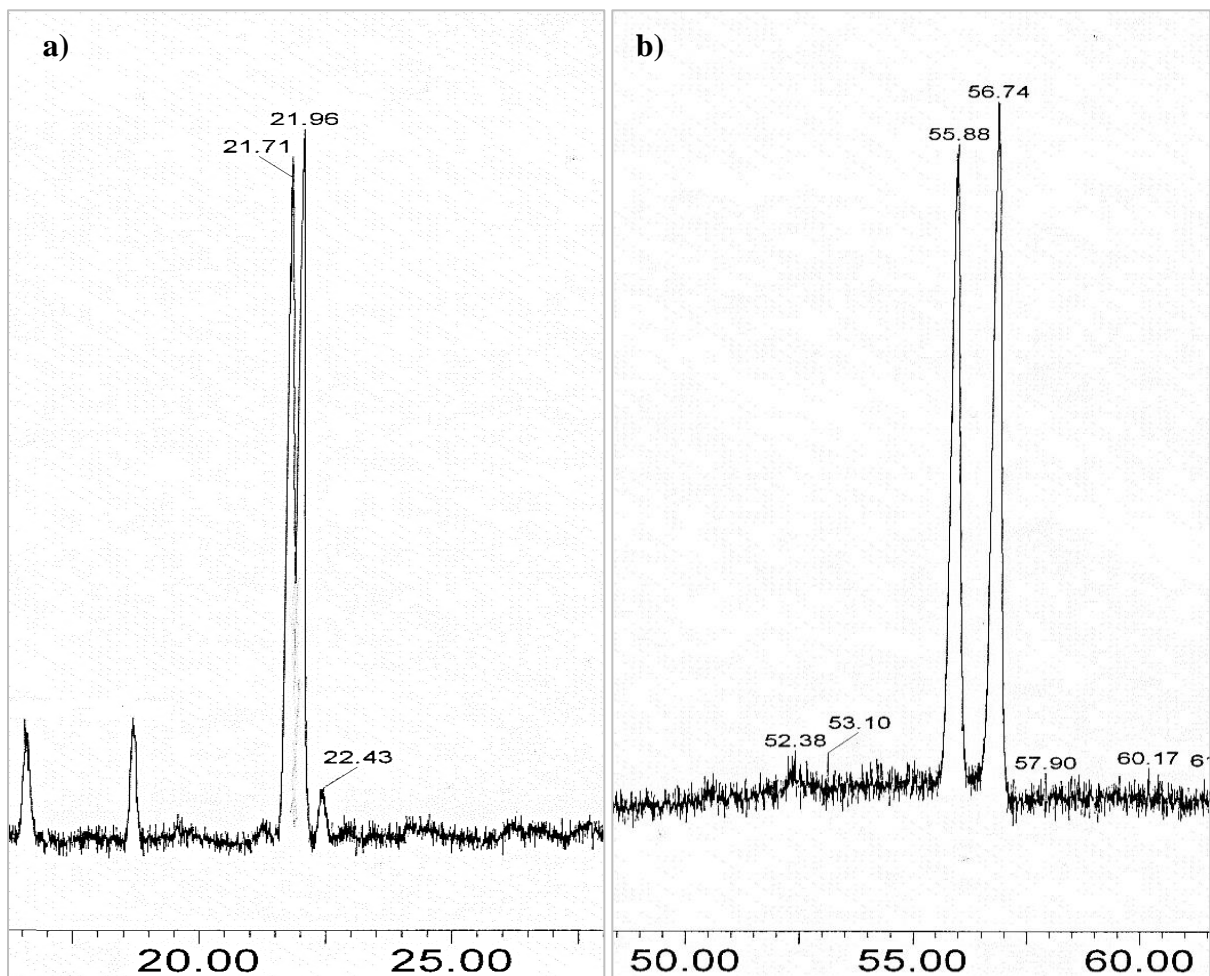
Denne kolonnen ble testet med tre temperaturprogram (vedlegg A), med MS-instillinger beskrevet i vedlegg A og med masseanalyse av m/z -forholdene i tabell 2.2. Massene ble valgt på bakgrunn av informasjon fra massespektrene til de respektive analyttene, der toppene tilsvarende de innstilte massene hadde størst intensitet. Spektrebiblioteket fra *National Institute of Standards and Technology* (NIST Chemistry WebBook 2013) ble benyttet for å finne massespektrene.

Temperaturprogrammene ble undersøkt på bakgrunn av medfølgende vedlegg til kolonnen der et temperaturprogram for testblanding av pesticider var beskrevet. Kromatogrammene til hver standard ble studert parvis med SIR med massene tilhørende standarden. Ut ifra kromatogrammene kunne man se hvilke av de to massene for hver standard som ga best signal, og det var $m/z = 181$ (α -HCH), 235 (*o,p'*-DDT), 375 (*cis/trans*-klordan) og 387 (*oxy*-klordan).

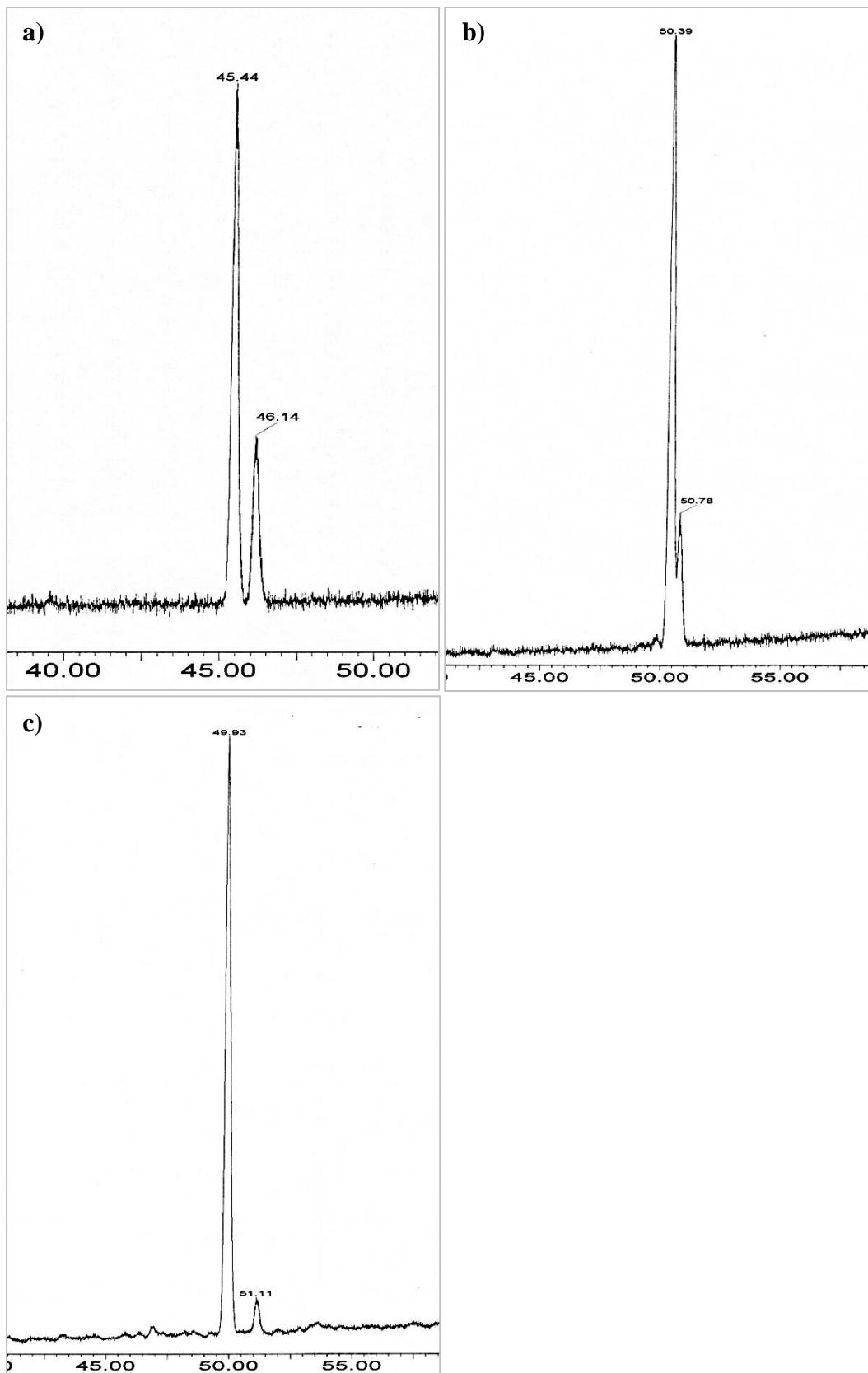
Initialtemperaturen i temperaturprogrammene ble satt til 60 °C, noe som var anbefalt når heksan var brukt som løsemiddel (PerkinElmer 1998). Temperaturprogram 7 viste at klordanforbindelsene og *o,p'*-DDT eluerte mellom 220 °C og 250 °C. Det var ikke tydelig når α -HCH eluerte, men antagelser tydet på at det var under 220 °C. Program 8 viste at α -HCH eluerte mellom 180 °C og 200 °C, men at 2 °C/min ga for dårlig separasjon. Det ble derfor forsøkt med en temperaturøkning på 1 °C/min fra 180 °C til 240 °C. Den øvre temperaturen ble justert ned, da klordanforbindelsene og *o,p'*-DDT eluerte før 240 °C. Dette ble gjort for å spare den stasjonære fasen fra for høy temperatur, som kan svekke dens effekt, samt for å redusere programtiden.

Da kromatogrammene fra program 9 og med de nevnte MS-innstillingene ga godt signal for alle standardene og tydelig separasjon av enantiomerene, ble denne metoden benyttet videre i prøveanalysen. Det ble oppnådd god oppløsning av standardene for alle injeksjonsvolum og

konsentrasjoner som ble testet, men injeksjonsvolum på 1 μL og konsentrasjon på 150 $\text{pg}/\mu\text{L}$ ga minst signal i forhold til de andre volumene og konsentrasjon på 250 $\text{pg}/\mu\text{L}$. Det ble valgt et injeksjonsvolum på 2 μL for prøveanalysen, da dette ga god oppløsning og for å spare prøvemateriale. Figur 3.3 og figur 3.4 viser utsnitt av noen av kromatogrammene for separasjonen av standardene.



Figur 3.3. a) Racemisk α -HCH (250 $\text{pg}/\mu\text{L}$) Injisert volum: 2 μL , $m/z = 181$ b) Racemisk o,p' -DDT (250 $\text{pg}/\mu\text{L}$) injisert volum: 2 μL , $m/z = 235$



Figur 3.4. a) (+)-oxy-klordan (250 pg/ μ L), injisert volum: 2 μ L, m/z = 387

b) (+)-cis-klordan (250 pg/ μ L), Injisert volum: 4 μ L, m/z = 375

c) (+)-trans-klordan (250 pg/ μ L), injisert volum: 4 μ L, m/z = 375.

Kromatogrammene til enantiomerstandardene viser at (+)-*cis*-klordan og (+)-*trans*-klordan eluerer før deres respektive (-)-enantiomerer på BGB172-kolonnen, noe som stemmer med tidligere undersøkelser (Borga & Bidleman 2005). Den samme retensjonsrekkefølgen ble også observert for *oxy*-klordan. Kromatogram av de racemiske standardene av *cis*- og *trans*-klordan kan ses i vedlegg C. Retensjonstid til enantiomerene av hver pesticidstandard ble målt, og separasjonsfaktor og oppløsning ble beregnet. Verdiene fra analysen av standardene er satt inn i tabell 3.1.

Tabell 3.1. Retensjonstid i minutter til enantiomerene, (+) og (-), gitt med gjennomsnittsverdi og standardavvik samt separasjonsfaktoren, α , og oppløsningen, R_s , for hver pesticidstandard.

Standard	t_r (+) [min]		t_r (-) [min]		α	R_s
	Gjennomsnitt	SD	Gjennomsnitt	SD		
α -HCH	22,01	0,07	21,79	0,07	1,010	1,00
<i>o,p'</i> -DDT	56,87	0,09	55,99	0,08	1,016	1,75
CC	50,28	0,09	50,66	0,10	1,008	1,00
TC	49,75	0,16	50,90	0,24	1,023	2,00
OC	45,55	0,08	46,27	0,09	1,016	1,20

Standardavviket til retensjonstiden er generelt lavt, noe som tyder på god presisjon og reproduserbarhet av systemet. Standardavviket er størst for retensjonstiden til enantiomerene til *trans*-klordan. Den racemiske standarden til *trans*-klordan viste urenheter med en ekstra topp mellom enantiomeren. Denne urenheten kan være årsak til det større standardavviket. Separasjonsfaktoren er regnet ut fra den gjennomsnittlige retensjonstiden.

Systemet ga resultater med god presisjon også med tanke på oppløsningen, da oppløsningen til hver standard var lik uavhengig av konsentrasjon og injiseringsvolum (vedlegg D).

3.2. Analyse av prøver

Alle prøvene ble analysert med metoden beskrevet i punkt 2.3. Kromatogrammene til hver prøve med hensyn på hvert relevante m/z -forhold ble sammenlignet med kromatogrammene til standardene. Målanalyttene i prøvematerialet ble gjenkjent som topper med samme retensjonstid som standardene. Separasjonsfaktoren og oppløsningen på de kirale toppene ga også en indikasjon på rett stoff sammenlignet med standarden.

Det ble ikke beregnet justert retensjonstid, da vanskeligheter med å måle løsemiddelets retensjonstid nøyaktig førte til større usikkerhet i resultatene. Analyttene kunne gjenkjennes i kromatogrammene ved samme retensjonstid som standardene uavhengig av ulikt løsemiddel.

I resultatene er det valgt å diskutere enantiomerspesifikk fraksjon fremfor enantiomerforhold. De beregnede ER-verdiene kan ses i vedlegg E.

3.2.1. α -HCH

Analysen av α -HCH i prøvene ble foretatt ved å studere prøvenes kromatogram ved $m/z = 181$. Toppene til α -HCH var generelt små og asymmetriske og noe vanskelig å tolke, med lavt signal i forhold til støy (figur 3.5a), tilsvarende kromatogrammet for SRM ved $m/z = 181$ (figur 3.5 c). Det ble i tillegg observert flere andre topper med høyere intensitet enn α -HCH. De små toppene kan forklares ved at den målte konsentrasjonen av α -HCH i alle prøvene var svært lav, fra 0,40 ng/g til 0,81 ng/g i forhold til de andre pesticidene i prøvene (Trollerud 2013). Det kunne likevel observeres ulik akkumulering av enantiomerene, og den enantiomerspesifikke fraksjonen og separasjonsfaktoren til α -HCH i prøvene kan ses i tabell 3.2.

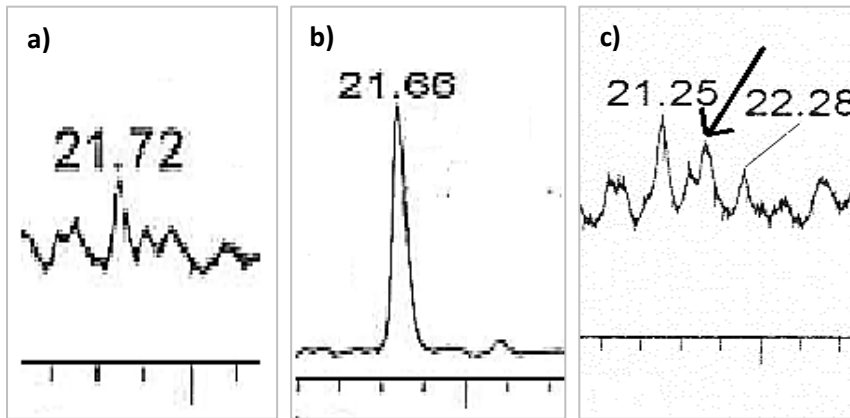
Tabell 3.2. EF-verdier av α -HCH i prøvene og separasjonsfaktoren, α . Grå felt markerer manglende prøvemateriale, og x benyttes der ingen α -HCH ble detektert.

α -HCH	GPC		USB		Syre	
	EF	α	EF	α	EF	α
2386 A	0,47	1,013	x	x	0,49	1,017
2386 B	x	x			0,46	1,018
2387 A	0,49	1,014	x	x		
2387 B	0,29	1,016			0,45	1,006
2388 A	0,36	1,014	x	x	0,34	1,016
2388 B	0,34	1,014			0,39	1,012
2389 A	<0,5*	x	0,46	1,018	0,75	1,018
2389 B	<0,5*	x			x	x

* Maksima for (+)- α -HCH kunne ikke bestemmes

Ifølge resultatene ble det detektert α -HCH i alle GPC-prøvene bortsett fra en parallell av torskelever fra Etnesfjorden. I alle tilfellene var $EF < 0,5$, noe som tilsier størst akkumulering

av (-)- α -HCH. Resultatene fra oppdrettslaks viser at kun (-)- α -HCH ble detektert (figur 3.5 b). Det vil si at (+)- α -HCH har blitt nedbrutt i fiskene.



Figur 3.5. a) GPC-prøve 2388 B, $m/z = 181$ b) GPC-prøve 2389 A, $m/z = 181$
c) SRM 1588b, $m/z = 181$, α -HCH er merket med pil.

I USB-prøvene ble det kun detektert α -HCH i oppdrettslaks. Der var $EF < 0,5$, altså størst andel av (-)- α -HCH. Det må bemerkes at signalet var svært lavt i forhold til støyen. Det dårlige resultatet fra USB-prøvene kan skyldes krysskontaminering i prøveopparbeidingen og USB-prøvene ga generelt 10-20 % lavere utbytte enn GPC-prøvene i A. Trolleruds masteroppgave (Trollerud 2013).

I syreprøvene ble det detektert α -HCH i alle prøvene bortsett fra en parallell av oppdrettslaks. Den prøven av oppdrettslaks der α -HCH ble funnet viste $EF > 0,5$, i motsetning til torskeprøvene som alle viste $EF < 0,5$ av α -HCH. Det er underlig at $EF > 0,5$ for den ene prøven, da GPC- og USB-prøvene av oppdrettslaks viste $EF < 0,5$. De andre prøvene hadde også EF -verdier under 0,5 uavhengig av prøveopparbeidelse. Det kan derfor hende at deteksjonen av α -HCH i oppdrettslaks for syreprøven ikke stemmer. EF -verdiene for 2386 A og 2388 A og B var tilnærmet like hvis man sammenlignet GPC-prøvene med syreprøvene.

Det er for få prøver og resultater til å bestemme klare trender for den enantiomeraselektive akkumuleringen med tanke på fisketype og sted, men EF -verdiene fra torskelever fra Etnefjorden viser nærmere racemisk akkumulering i forhold til resultatene fra torskelever fra Engersand og Husteinbukta, som viser større akkumulering av (-)- α -HCH. Etnefjorden ligger i Hordaland, mens Engersand og Husteinbukta ligger i Drammensfjorden. Denne relativt store forskjellen i lokasjon kan være årsak til de ulike EF -verdiene. EF -verdier under 0,5 for

akkumuleringen av α -HCH i torsk samsvarer med resultater fra analyser av torsk fra Barentshavet (Karlsson et al. 2000), mens resultater fra andre forsøk på torsk fra Arktis har vist racemisk akkumulering av α -HCH (Hoekstra et al. 2003).

Separasjonsfaktoren for α -HCH i prøvene er litt høyere enn for standarden. Det kan skyldes lavere oppløsning for α -HCH i prøvene enn standarden, da toppene var brede og maksima for toppene var vanskelig å bestemme. Retensjonstiden for alle parallellene ligger innenfor standardens resultater, som viser god nøyaktighet.

3.2.2. *o,p'*-DDT

For å analysere opptaket av *o,p'*-DDT ble prøvenes kromatogram studert ved $m/z = 235$. Toppene var av varierende intensitet avhengig av prøve. Resultatene viste ulik høyde på enantiomertoppene, som derfor tydet på enantiomeraselektiv akkumulering av enantiomerene til *o,p'*-DDT. Den enantiomerspesifikke fraksjonen og separasjonsfaktoren i hver prøve kan ses i tabell 3.3.

Tabell 3.3. EF-verdier av *o,p'*-DDT i prøvene og separasjonsfaktoren, α . Grå felt markerer manglende prøvemateriale, og x benyttes der ingen *o,p'*-DDT ble detektert og der α ikke kunne beregnes.

<i>o,p'</i> -DDT	GPC		USB		Syre	
	EF	α	EF	α	EF	α
2386 A	0,46	1,018	<0,5*	x	<0,5*	x
2386 B	0,42	1,021			<0,5*	x
2387 A	0,58	1,024	0,14	1,026		
2387 B	0,75	1,022			<0,5*	x
2388 A	0,13	1,019	<0,5*	x	<0,5*	x
2388 B	0,12	1,023			<0,5*	x
2389 A	0,16	1,023	<0,5*	x	<0,5*	x
2389 B	0,13	1,025			x	x

* Maksima for (+)-*o,p'*-DDT ble ikke detektert.

Det ble detektert *o,p'*-DDT i alle GPC-prøvene. I prøvene behandlet med syre ble det funnet *o,p'*-DDT i alle, bortsett fra en parallell av oppdrettslaks. I alle tilfellene bortsett fra GPC-prøvene fra Husteinbukta var det størst akkumulering av (-)-*o,p'*-DDT, det vil si EF < 0,5. Kromatogrammene for *o,p'*-DDT tilsvarte kromatogrammet for SRM ved $m/z = 235$

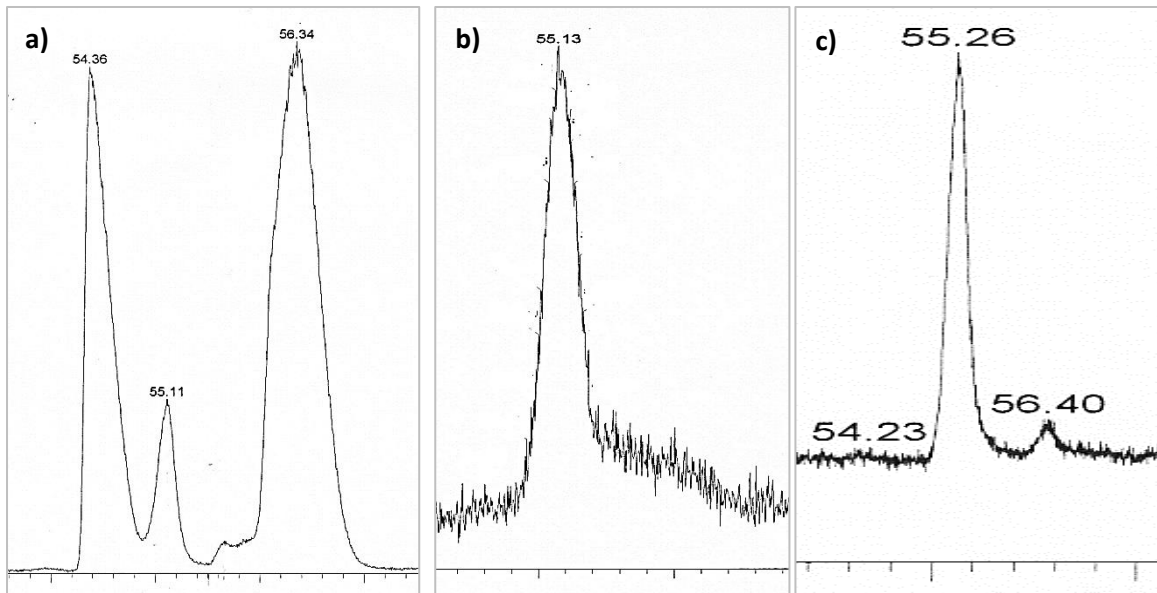
(figur 3.6 c). GPC-prøvene 2387 A og B var vanskelige å tolke, og det er noe usikkerhet om (-)-*o,p'*-DDT er riktig registrert, da det ble observert flere topper rundt retensjonstiden til *o,p'*-DDT (figur 3.6 a). Det er derfor mulig at resultatet ikke stemmer, siden resultatene fra USB- og syreprøvene ga $EF < 0,5$, men separasjonsfaktoren ligner de andre prøvene.

Toppen for *o,p'*-DDT i syreprøvene 2386 A og B hadde tendens til hale (figur 3.6 b), altså en asymmetrisk topp, så det var vanskelig å bestemme en eventuell topp for (+)-*o,p'*-DDT. Det kunne likevel observeres at $EF < 0,5$.

Resultatene viser tendens til størst akkumulering av (-)-*o,p'*-DDT uavhengig av fisketype og sted. Tidligere undersøkelser har også resultert i EF-verdier under 0,5 for akkumuleringen av *o,p'*-DDT i torskelever (Koske et al. 1999).

Retensjonstiden til *o,p'*-DDT i prøvene var generelt noe lavere enn for standarden. I kromatogrammet for standarden til *o,p'*-DDT kan det se ut som det er blitt benyttet et annet løsemiddel med noe senere retensjonstid enn heksan, som er løsemiddelet for resten av standardene, noe som mulig kan forklare avviket. Hvilket løsemiddel som er blitt benyttet er uvisst, da denne standarden ikke ble fortynnet i forbindelse med denne oppgaven.

Separasjonsfaktoren for *o,p'*-DDT i prøvene er litt høyere enn for standarden, så det kan hende at noen av toppene i enantiomerparene ikke stemmer med *o,p'*-DDT, og at den noterte retensjonstiden dermed kan være feil. Kromatogrammene viste mange topper, som kan ha forstyrret signalet av *o,p'*-DDT. Standarden til *o,p'*-DDT viste også mange andre topper, i motsetning til kromatogrammene til de andre standardene, der kun toppene til standarden ble observert. Det er mulig at *o,p'*-DDT-standardens var blitt kontaminert under fortynning, noe som kan medføre usikkerhet i resultatene.



Figur 3.6. a) *o,p'*-DDT i GPC-prøve 2387 B, $m/z = 235$ b) *o,p'*-DDT i syreprøve 2386 A, $m/z = 235$ c) SRM 1588b, $m/z = 235$

3.2.3. *cis*-/*trans*-klordan og *oxy*-klordan

For å analysere opptaket av *cis*- og *trans*-klordan i prøvene ble kromatogrammene studert ved $m/z = 375$. Det kunne ikke detekteres noen topper ved denne massen for noen av prøvene. Ved $m/z = 387$, som skulle vise opptaket av *oxy*-klordan, kunne kirale topper observeres (figur 3.7 a). Disse toppene hadde for høy retensjonstid til å kunne tilsvare *oxy*-klordan. Retensjonstiden stemte derimot bedre med *cis*-/*trans*-klordan. Toppene som kunne registreres var mest sannsynlig *cis*-klordan, da konsentrasjonen av *cis*-klordan i prøvene var generelt mye høyere enn *trans*-klordan og derfor burde gi tydeligere topper. Et annet kjennetegn på *cis*-klordan var den smale separasjonen til enantiomerene, i motsetning til *trans*-klordans brede grunnlinjeseparerte topper. Det vil si at separasjonsfaktoren og oppløsningen stemte overens med *cis*-klordan.

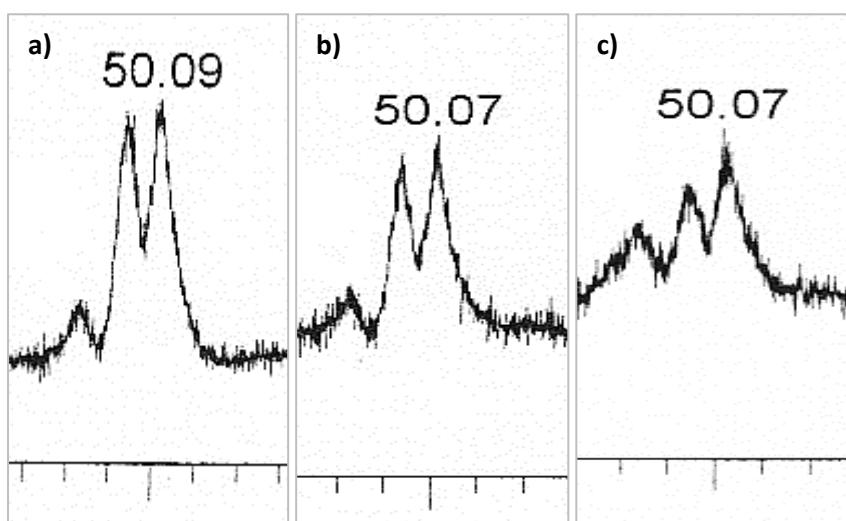
Standarden til *cis*-klordan ble kjørt på nytt med GC-metoden, men med fullt scan fra $m/z = 350$ til $m/z = 400$. MS-spekteret fra denne kjøringen viste en topp på $m/z = 387$ med halvparten av intensiteten av toppen for $m/z = 375$, som vil si at *cis*-klordan kan gi signal ved $m/z = 387$. Analysen av SRM viste overlappende topper ved $m/z = 375$ og $m/z = 387$ med retensjonstid og oppløsning i samsvar med *cis*-klordan (figur 3.7 b og c). Det kan også være en indikasjon på at *cis*-klordan kan gi signal ved $m/z = 387$. Den videre analysen av

resultatene for $m/z = 387$ ble utført med antagelsen om at toppene tilhørte *cis*-klordan. EF-verdiene kan ses i tabell 3.4.

Tabell 3.4. EF-verdier av *cis*-klordan i prøvene funnet med $m/z = 387$ rundet av til to desimaler og separasjonsfaktoren, α . Grå felt markerer manglende prøvemateriale, og x benyttes der ingen *cis*-klordan ble detektert.

<i>cis</i> -klordan	GPC		USB		Syre	
	EF	α	EF	α	EF	α
2386 A	0,53	1,008	0,52	1,007	0,50	1,008
2386 B	0,50	1,007			0,50	1,007
2387 A	0,50	1,008	0,51	1,008		
2387 B	0,32	1,011			0,50	1,008
2388 A	0,49	1,007	0,50	1,008	0,51	1,008
2388 B	0,49	1,009			0,48	1,007
2389 A	0,50	1,009	x	x	0,48	1,007
2389 B	0,49	1,008			x	x

De kirale toppene som ble observert for $m/z = 387$ så ut til å være racemiske, med unntak av GPC-prøve 2387 B. Målinger av EF viste dog at ikke alle fraksjonene var nøyaktig 0,5. EF-verdiene ble sammenlignet med den racemiske standarden av *cis*-klordan, og resultatene viste at den enantiomerspesifikke fraksjonen til standarden heller ikke var nøyaktig 0,5. Den enantiomerspesifikke fraksjonen varierte fra 0,49 til 0,52 (vedlegg G). Topper med EF-verdier innenfor dette intervallet regnes i denne oppgaven derfor som racemiske for *cis*-klordan.



Figur 3.7. a) *cis*-klordan i GPC-prøve 2388 B, $m/z = 387$. b) SRM 1588b, $m/z = 387$
c) SRM 1588b, $m/z = 375$

GPC-prøven til 2386 A hadde et lite overskudd av (+)-enantiomerer i forhold til (-)-enantiomerer. GPC-prøven til 2387 B hadde et tydelig overskudd av (-)-enantiomerer, mens parallellen 2387 A var racemisk. Syreprøvene av 2388 B og 2389 A havnet utenfor det racemiske intervallet, med et lite overskudd av (-)-enantiomerer. I den ene syreprøven av oppdrettslaks ble det ikke detektert noe *cis*-klordan, enda konsentrasjonen av *cis*-klordan i prøven var tilnærmet lik parallellen. Det ble heller ikke detektert *cis*-klordan i USB-prøven av oppdrettslaks, men der var konsentrasjonen lavere enn tilsvarende for torskeprøvene.

Det var generelt godt signal i forhold til støy for *cis*-klordan, og det kunne ikke observeres andre topper ved dette *m/z*-forholdet. Flertallet av resultatene av opptaket av *cis*-klordan tydet på ikke-enantioselektiv akkumulering av pesticidet. Det har da skjedd en abiotisk prosess i opptaket av *cis*-klordan. Resultatene fra torskeprøvene stemmer med analyser utført på Arktisk torsk, der EF-verdiene var racemiske for *cis*-klordan (Wiberg et al. 2000); (Hoekstra et al. 2003). Det er også gjort kjønnsesifikke analyser på torsk fra Barentshavet, der resultatene viste at hanntorsk akkumulerer mest (+)-*cis*-klordan, mens hunntorsk akkumulerer mest (-)-*cis*-klordan (Karlsson et al. 2000). Det er uvisst om fiskeprøvene i denne oppgaven er kjønnsesifikke eller en blanding, så det er vanskelig å sammenligne med tidligere kjønnsesifikke analyser av torsk. Baltisk laks har vist størst akkumulering av (-)-*cis*-klordan (Buser et al. 1992), men andre leveforhold for oppdrettslaks kan være avgjørende for akkumuleringen av *cis*-klordan.

3.2.4. Generelt

Hastigheten til bærerergassen ble satt til 15 ml/min. Tidligere forsøk med helium som bærerergass på BGB172-kolonnen har benyttet en hastighet på ca. 1-2 ml/min (Liu & Gan 2004); (Wiberg et al. 1998), men erfaring med bruk av dette GC-MS-instrumentet viste at en hastighet på 15 ml/min førte til at løsemiddelet eluerte ved ønskelig tidspunkt tilsvarende en hastighet rundt 1-2 ml/min. Dette avviket kan komme av ukjente grunninnstillinger av instrumentet, og den virkelige strømningshastigheten burde ha blitt testet med et flowmeter.

Kromatogrammene til prøvene ble sammenlignet med kromatogrammene til blankprøver der det fantes. Toppene som ble bestemt å tilhøre målanalyttene ble ikke detektert i blankprøvene. Det betyr at det er blitt detektert pesticid i prøvene.

Resultater og diskusjon

Det finnes usikkerhet i EF-verdiene, da målingene måtte utføres for hånd og ikke med dataprogram, men det kunne observeres om EF var større eller mindre enn 0,5. Der det var svært vanskelig å måle ble det brukt $>0,5$ -notasjon.

Syreprøvene viste generelt lavere signal i forhold til støy sammenlignet med de andre prøvene. Bruk av svovelsyre i prøveopparbeidingen kan ha degenerert og ødelagt de klorerte pesticidene (Trollerud 2013).

For prøvemateriale var det ikke oppgitt alder og kjønn på fisken. Hver av de ulike prøvene besto av blanding fra flere fisk. Det kan være en årsak til varierende EF innenfor parallellene, da det tidligere er gjort observasjoner av enantiomeraselektiv akkumulering avhengig av kjønn og alder på fisk.

Oppløsning ble regnet ut etter formel 1.5 kun for standardene. Formelen kunne ikke brukes for prøvene på grunn av ulik høyde på toppene og vanskeligheter med å bestemme maksimum for hver enkelt topp. Oppløsning for prøvene ble derfor sammenlignet med definerte R_s -verdier for figurer av utvalgte topper tilrettelagt av L.R. Snyder (Miller 2009b) eller sammenlignet med standardene. Separasjonsfaktoren var et mer nøyaktig mål for separasjonen på grunn av målte retensjonstider. I enkelte prøver ble kun én av enantiomerene detektert, så i disse tilfellene kunne ikke oppløsning eller separasjonsfaktor diskuteres.

Selv om ikke alle målanalyttene ble detektert i alle prøvene, vites det at prøvene inneholdt disse pesticidene (vedlegg F) i tillegg til mange andre pesticider (Trollerud 2013). Det kan derfor antas at denne metoden ikke er sensitiv nok for analyse av denne typen. Det kan hende at andre m/z -forhold i MS-innstillingene kunne gitt bedre resultater, da lignende analyser med de samme målanalyttene er blitt utført med andre m/z -forhold (Borga & Bidleman 2005).

4. KONKLUSJON

Separasjon av de kirale målanalyttene ble oppnådd på den utviklede GC-MS-metoden med en BGB172-kolonne, slik at retensjonsrekkefølge kunne observeres og enantiomerspesifikk fraksjon kunne beregnes. Det ble bestemt at (+)-enantiomerer eluerer før (-)-enantiomerer for *cis*- og *trans*-klordan og *oxy*-klordan på BGB172-kolonnen.

Ifølge resultatene kan det antas at *cis*-klordan gjennomgår en abiotisk prosess under akkumuleringen i torskelever og oppdrettslaks, da EF-verdiene lå rundt 0,5. Det ble ikke detektert *trans*-klordan eller *oxy*-klordan i noen av prøvene med den utviklede metoden. α -HCH og *o,p'*-DDT ble detektert i prøvene, og det ble observert at akkumuleringen skjedde enantiomerselektivt for disse pesticidene i fiskeprøvene. EF-verdiene viste at akkumuleringen av enantiomerene kan være avhengig av prøvens opphav, men det kunne ikke bestemmes klare trender.

De varierende EF-verdiene viser at det bør gjøres flere forsøk på enantioselektiv akkumulering i biologisk materiale. For å bestemme klare trender for akkumulering av enantiomerene til de ulike pesticidene behøves det å teste flere paralleller fra hver fisketype og sted. Det bør også spesifiseres hvilket kjønn fisken har og fiskens alder for mer nøyaktige resultater.

5. VIDERE ARBEID

Det bør utføres flere analyser med andre kolonner, som β -Dex og tandem kolonne, da svakheter i metodeutviklingen var skyld i lite tilfredsstillende resultater med disse kolonnene. Med en utviklet metode med disse kolonnene kan man utføre en lignende prøveanalyse og sammenligne resultatene fra BGB172-kolonnen. Man kan da undersøke om EF-verdiene er avhengig av kolonnen. I tillegg kan annet løsemiddel benyttes for å undersøke om det påvirker retensjonstiden til analyttene, noe som kan være avgjørende når man sammenligner standarder og prøver fortynnet med ulikt løsemiddel.

Separasjon av klororganiske miljøgifter har tidligere blitt utført med HPLC (Champion et al. 2004). Det kan derfor være aktuelt å analysere prøvematerialet med HPLC for å sammenligne resultatene med tilsvarende resultater fra GC-MS.

Det er blitt sett at innstillingene av massespektrometeret er avgjørende med tanke på deteksjonen av målanalyttene i en prøve. Det bør derfor blant annet testes ut andre m/z -innstillinger for masseanalysen.

For å bestemme enantiomeraselektive trender for akkumulering av kirale klorerte miljøgifter i torskelever og laks må det tas flere prøver fra flere områder. Det bør også gjøres flere analyser av den enantiomeraselektive akkumuleringen lenger opp i næringskjeden. Da det er vist at bioakkumuleringen av flere kirale klorerte miljøgifter skjer enantiomeraselektivt, bør det undersøkes om de enkelte enantiomerene har ulik effekt i forhold til hverandre.

REFERANSER

- The 12 initial POPs under the Stockholm Convention*. Stockholm Convention. Châtelaine, Switzerland: Secretariat of the Stockholm Convention. Tilgjengelig fra: <http://chm.pops.int/Convention/ThePOPs/The12InitialPOPs/tabid/296/Default.aspx> (lest 04.08.2013).
- Ahuja, S. (2003). *Chromatography and Separation Science*. Separation Science and Technology, b. 4: Academic Press.
- Ali, I., Gupta, V. K. & Aboul-Enein, H. Y. (2003). Chirality: A challenge for the environmental scientists. *Current Science*, 84 (2): 152-156.
- BGB-Analytik. (2013). *Chiral GC Columns for the separation of enantiomers*: BGB Analytik AG. Tilgjengelig fra: <https://www.bgb-shop.de/home.php?cat=5036> (lest 9.4.2013).
- Bidleman, T. F. & Falconer, R. L. (1999). Enantiomer ratios for apportioning two sources of chiral compounds. *Environmental Science & Technology*, 33 (13): 2299-2301.
- Bidleman, T. F., Jantunen, L. M., Kurt-Karakus, P. B. & Wong, F. (2012). Chiral persistent organic pollutants as tracers of atmospheric sources and fate: review and prospects for investigating climate change influences. *Atmospheric Pollution Research*, 3 (4): 371-382.
- Borga, K. & Bidleman, T. F. (2005). Enantiomer fractions of organic chlorinated pesticides in arctic marine lee fauna, zooplankton, and benthos. *Environmental Science & Technology*, 39 (10): 3464-3473.
- Buser, H. R., Muller, M. D. & Rappe, C. (1992). Enantioselective determination of chlordane components using chiral high-resolution gas-chromatography mass-spectrometry with application to environmental-samples. *Environmental Science & Technology*, 26 (8): 1533-1540.
- Champion, W. L., Lee, J., Garrison, A. W., DiMarco, J. C., Matabe, A. & Prickett, K. B. (2004). Liquid chromatographic separation of the enantiomers of trans-chlordane, cis-chlordane, heptachlor, heptachlor epoxide and alpha-hexachlorocyclohexane with application to small-scale preparative separation. *Journal of Chromatography A*, 1024 (1-2): 55-62.
- Eljarrat, E., Guerra, P. & Barcelo, D. (2008). Enantiomeric determination of chiral persistent organic pollutants and their metabolites. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 27 (10): 847-861.

- Harner, T., Wiberg, K. & Norstrom, R. (2000). Enantiomer fractions are preferred to enantiomer ratios for describing chiral signatures in environmental analysis. *Environmental Science & Technology*, 34 (1): 218-220.
- Harris, D. C. (2007). *Quantitative chemical analysis*. New York: Freeman. XVII, 663, [136] s. : ill. s.
- Hart, H., Craine, L. E., Hart, D. J. & Hadad, C. M. (2007). *Organic Chemistry: A Short Course*. Boston: Houghton Mifflin Company.
- Hegeman, W. J. M. & Laane, R. (2002). Enantiomeric enrichment of chiral pesticides in the environment. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology, Vol 173*, 173: 85-116.
- Hoekstra, P. F., O'Hara, T. M., Karlsson, H., Solomon, K. R. & Muir, D. C. G. (2003). Enantiomer-specific biomagnification of alpha-hexachlorocyclohexane and selected chiral chlordane-related compounds within an arctic marine food web. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 22 (10): 2482-2491.
- Hoffmann, E. d. & Stroobant, V. (2007). *Mass spectrometry: principles and applications*. Chichester: Wiley. XII, 489 s. : ill. s.
- Kallenborn, R. & Hühnerfuss, H. (2001). *Chiral environmental pollutants: trace analysis and ecotoxicology*. Berlin: Springer. XVII, 209 s. : ill. s.
- Karlsson, H., Oehme, M., Skopp, S. & Burkow, I. C. (2000). Enantiomer ratios of chlordane congeners are gender specific in cod (*Gadus morhua*) from the Barents Sea. *Environmental Science & Technology*, 34 (11): 2126-2130.
- Koske, G., Leupold, G., Angerhofer, D. & Parlar, H. (1999). Multidimensional gas chromatographic enantiomer quantification of some chlorinated xenobiotics in cod liver and fish oils. *Chemosphere*, 39 (4): 683-688.
- Liu, W. P. & Gan, J. J. (2004). Separation and analysis of diastereomers and enantiomers of cypermethrin and cyfluthrin by gas chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 (4): 755-761.
- Liu, W. P., Gan, J. Y., Schlenk, D. & Jury, W. A. (2005). Enantioselectivity in environmental safety of current chiral insecticides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102 (3): 701-706.
- Miller, J. M. (2009a). *Chromatography: Concepts and Contrasts*. 2. utg. Hoboken, N.J.: Wiley.
- Miller, J. M. (2009b). *Chromatography: Concepts and Contrasts*. I, s. 59. Hoboken, N.J.: Wiley.

- Muller, T. A. & Kohler, H. P. E. (2004). Chirality of pollutants - effects on metabolism and fate. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64 (3): 300-316.
- National Institute of Standards and Technology. Material Details: SRM 1588b - Organics in Cod Liver Oil utg. Tilgjengelig fra: https://www-s.nist.gov/srmors/view_detail.cfm?srm=1588b (lest 08.08.2013).
- The new POPs under the Stockholm Convention*. Stockholm Convention. Châtelaine, Switzerland: Secretariat of the Stockholm Convention. Tilgjengelig fra: <http://chm.pops.int/Convention/ThePOPs/TheNewPOPs/tabid/2511/Default.aspx> (lest 04.08.2013).
- NIST Chemistry WebBook. (2013). NIST National Institute of Standards and Technology online database (NIST Standard Reference Database Number 69). Tilgjengelig fra: <http://webbook.nist.gov/chemistry/> (lest 16.06.2013).
- PerkinElmer. (1998). *TurboMass GC Mass Spectrometer User's Tutorial*. Gas Chromatography: Perkin Elmer.
- Seemamahannop, R., Berthod, A., Maples, M., Kapila, S. & Armstrong, D. W. (2005). Uptake and enantio selective elimination of chlordane compounds by common carp (*Cyprinus carpio*, L.). *Chemosphere*, 59 (4): 493-500.
- Smith, S. W. (2009). Chiral Toxicology: It's the Same Thing...Only Different. *Toxicological Sciences*, 110 (1): 4-30.
- Stanley, J. K. & Brooks, B. W. (2009). Perspectives on Ecological Risk Assessment of Chiral Compounds. *Integrated Environmental Assessment and Management*: 364-373.
- Søppel og miljøgifter – en ny utfordring*. Det Arktiske System: Norsk Polarinstitut. Tilgjengelig fra: <http://www.arcticsystem.no/no/outsideworld/toxins/index.html> (lest 26.04.2013).
- Trollerud, A. (2013). *POPs and lipids - an environmental toxicology method comparison and a correlation study between a fatty acid lipid profile and POPs*. Masteroppgave. Ås: Universitetet for miljø- og biovitenskap.
- What are POPs?* Stockholm Convention. Châtelaine, Switzerland: Secretariat of the Stockholm Convention. Tilgjengelig fra: <http://chm.pops.int/Convention/ThePOPs/tabid/673/Default.aspx> (lest 30.07.2013).
- Wiberg, K., Letcher, R., Sandau, C., Duffe, J., Norstrom, R., Haglund, P. & Bidleman, T. (1998). Enantioselective gas chromatography mass spectrometry of methylsulfonyl PCBs with application to arctic marine mammals. *Analytical Chemistry*, 70 (18): 3845-3852.

- Wiberg, K., Letcher, R. J., Sandau, C. D., Norstrom, R. J., Tysklind, M. & Bidleman, T. F. (2000). The enantioselective bioaccumulation of chiral chlordane and alpha-HCH contaminants in the polar bear food chain. *Environmental Science & Technology*, 34 (13): 2668-2674.
- Wiese, T. E. (2011). Mirror, Mirror in the Environment... Considering the Hormone Activity of Chiral Environmental Chemicals. *e.hormone: your gateway to environmental signaling*. Tilgjengelig fra: <http://e.hormone.tulane.edu/ViewsArchives/200202-Wiese.html> (lest 26.07.2013).
- Wong, C. S., Hoestra, P. F., Karlsson, H., Backus, S. M., Mabury, S. A. & Muir, D. C. G. (2002). Enantiomer fractions of chiral organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in standard and certified reference materials. *Chemosphere*, 49 (10): 1339-1347.

VEDLEGG A: Innstillinger på GC**Tabell A1.** Temperaturprogram testet for hver kolonne

Nr.	Temperaturprogram	Kolonne
1	70 °C (3 min), 15 °/min → 180 °C, 5 °C/min → 250 °C (6 min)	β-dex 120 BGB172 (15 m)
2	70 °C (2 min), 10 °/min → 180 °C, 2 °C/min → 280 °C (5 min)	BGB172 (15 m)
3	70 °C (2 min), 10 °/min → 180 °C, 2 °C/min → 215 °C (5 min), 10 °C/min → 300 °C (1 min)	BGB172 (15 m)
4	70 °C (2 min), 20 °/min → 180 °C (10 min), 1 °C/min → 215 °C, 10 °C/min → 300 °C (10 min)	BGB172 (15 m)
5	60 °C (2 min), 10 °/min → 190 °C, 2 °C/min → 280 °C (2 min), 10 °C/min → 320 °C (5 min)	Tandem kolonne
6	60 °C (2 min), 10 °/min → 190 °C, 4 °C/min → 320 °C (5 min)	Tandem kolonne
7	60 °C (2 min), 20 °/min → 180 °C (2 min), 2 °C/min → 220 °C (3 min), 1 °C/min til 250 °C (2 min)	BGB172 (30 m)
8	60 °C (2 min), 20 °/min → 180 °C, 2 °C/min → 200 °C, 1 °C/min → 250 °C (2 min)	BGB172 (30 m)
9	60 °C (2 min), 20 °/min → 180 °C, 1 °C/min → 240 °C (6 min)	BGB172 (30 m)

Tabell A2. Konsentrasjon og injiseringsvolum av standarder

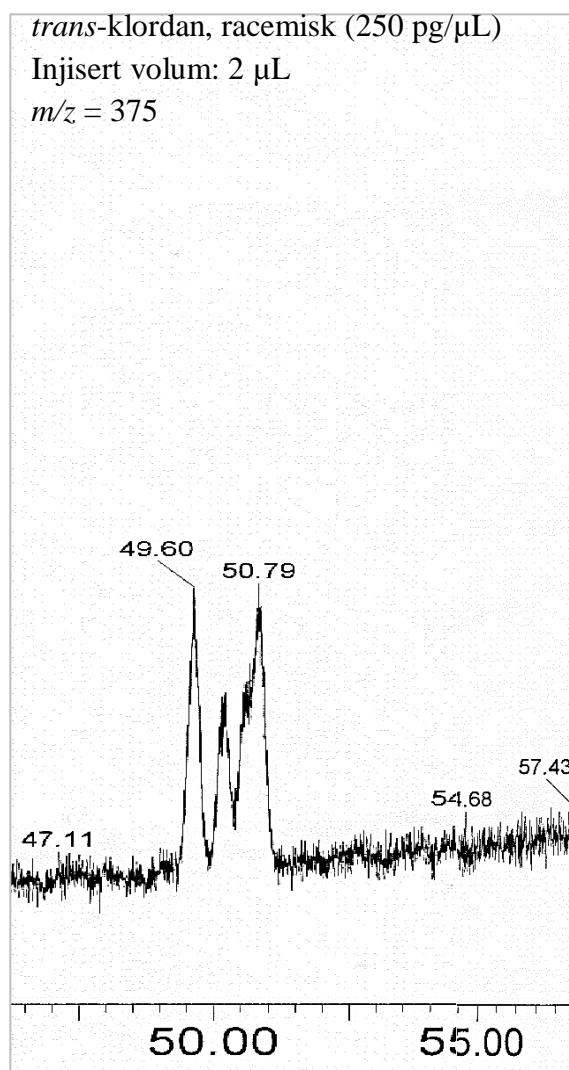
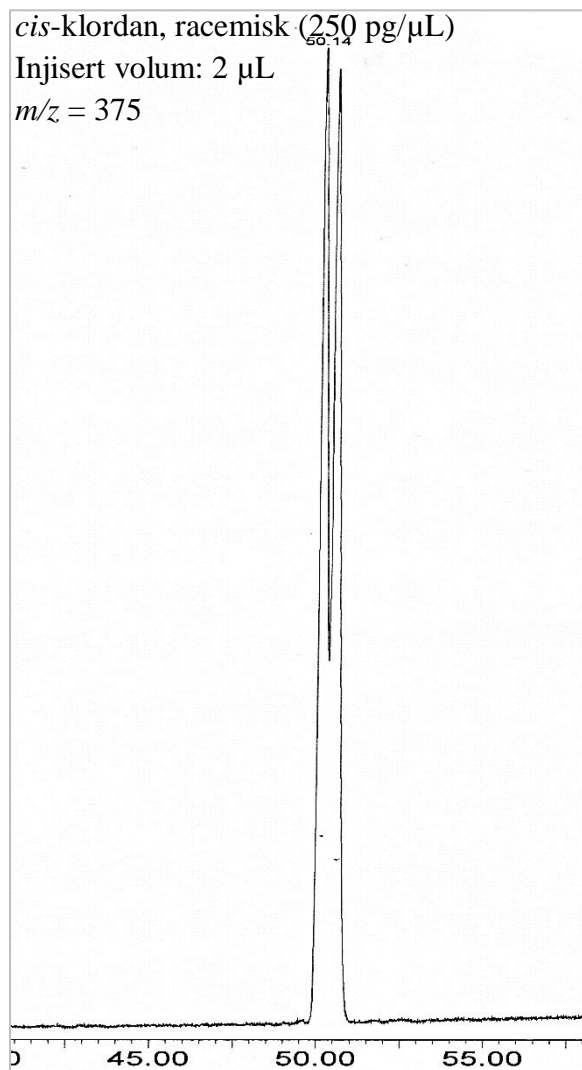
på de ulike kolonnene.

Nr.	Kolonne	Konsentrasjon	Volum
1	β-Dex 120	250 pg/μL	4 μL
2	BGB172 (a)	250 pg/μL	4 μL
3	Rxi [®] -5Sil MS + BGB172 (a)	250 pg/μL	4 μL
4	BGB172 (b)	250 pg/μL	4 μL
		250 pg/μL	2 μL
		250 pg/μL	1 μL
		150 pg/μL	2 μL

VEDLEGG B: Innstillinger av MS**Tabell B1.** Innstilte parametere for MS-tuning etter kalibrering av systemet

Source				MS	
Energy	-70 V	Source temperature	150 °C	LM res	12,3
Emission	203	Filament current	≈4,5 A	HM res	11,0
Repeller	7,5	Source current	850 A	Ion energy	6,0
Lens 1	-11	Multiplier	630	IE	6,0
Lens 2	107				

VEDLEGG C: Kromatogramutsnitt av racemisk *cis*-/*trans*-klordan



VEDLEGG D: Målte verdier av pesticidstandardene

Tabell D1. Tabellen viser pesticidstandardenes retensjonstid i minutter og omtrentlig oppløsning, R_s , med hensyn på konsentrasjon og injiseringsvolum. Ikke-målbare verdier er markert med x.

Pesticid	Konsentrasjon	Volum	t_r (+)	t_r (-)	R_s
α -HCH	150 pg/ μ l	2 μ l	21,98	21,75	1,00
α -HCH	250 pg/ μ l	1 μ l	x	21,79	1,00
α -HCH	250 pg/ μ l	2 μ l	21,96	21,73	1,00
α -HCH	250 pg/ μ l	4 μ l	22,10	21,90	1,00
CC	150 pg/ μ l	2 μ l	50,22	50,60	1,00
CC	250 pg/ μ l	1 μ l	50,32	50,71	1,00
CC	250 pg/ μ l	2 μ l	50,14	50,49	1,00
CC	250 pg/ μ l	4 μ l	50,33	50,71	1,00
CC (+)	250 pg/ μ l	4 μ l	50,39	50,78	1,00
TC	150 pg/ μ l	2 μ l	49,54	50,50	2,00
TC	250 pg/ μ l	1 μ l	49,76	50,98	2,00
TC	250 pg/ μ l	2 μ l	49,60	50,79	2,00
TC	250 pg/ μ l	4 μ l	49,91	51,13	2,00
TC (+)	250 pg/ μ l	4 μ l	49,93	51,13	2,00
OC (+)	250 pg/ μ l	1 μ l	45,59	46,32	1,20
OC (+)	250 pg/ μ l	2 μ l	45,44	46,14	1,20
OC (+)	250 pg/ μ l	4 μ l	45,61	46,34	1,20
<i>o,p'</i> -DDT	150 pg/ μ l	2 μ l	56,84	55,94	1,75
<i>o,p'</i> -DDT	250 pg/ μ l	1 μ l	56,93	56,03	1,75
<i>o,p'</i> -DDT	250 pg/ μ l	2 μ l	56,74	55,88	1,75
<i>o,p'</i> -DDT	250 pg/ μ l	4 μ l	56,97	56,09	1,75

VEDLEGG E: Retensjonstid og ER til målanalyttene **α -HCH**

Tabell E1. Retensjonstiden (t_r) i minutter til (+)/(-)-enantiomerene og ER-verdier for α -HCH i GPC-, USB- og syre-prøvene. x brukes der det ikke ble detektert α -HCH. Prøve 2387 A manglet blant syreprøvene.

Prøve	t_r (+) [min]	t_r (-)[min]	ER
2386 A	22,03	21,74	0,895
2386 B	x	x	x
2387 A	22,03	21,73	0,950
2387 B	22,07	21,73	0,404
2388 A	22,04	21,74	0,551
2388 B	22,02	21,72	0,505
2389 A	x	21,66	≈ 0
2389 B	x	21,61	≈ 0
Gjennomsnitt	22,04	21,70	
Standardavvik	0,017	0,046	
Prøve	t_r (+)[min]	t_r (-)[min]	ER
2386	x	x	x
2387	x	x	x
2388	x	x	x
2389	22,03	21,64	0,836
Prøve	t_r (+)[min]	t_r (-)[min]	ER
2386 A	22,00	21,63	0,960
2386 B	22,03	21,64	0,836
2387 A			
2387 B	22,04	21,91	0,832
2388 A	22,02	21,67	0,510
2388 B	22,01	21,75	0,628
2389 A	22,08	21,68	2,925
2389 B	x	x	x
Gjennomsnitt	22,03	21,73	
Standardavvik	0,026	0,096	

***o,p'*-DDT**

Tabell E2. Retensjonstiden (t_r) i minutter til (+)/(-)-enantiomerene og ER-verdier for *o,p'*-DDT i GPC-, USB- og syre-prøvene. x brukes der det ikke ble detektert *o,p'*-DDT. Prøve 2387 A manglet blant syreprøvene.

Prøve	t_r (+)[min]	t_r (-)[min]	ER
2386 A	56,29	55,32	0,860
2386 B	56,62	55,47	0,737
2387 A	56,69	55,35	1,371
2387 B	56,34	55,11	3,063
2388 A	56,42	55,37	0,143
2388 B	56,51	55,26	0,138
2389 A	56,66	55,36	0,184
2389 B	56,64	55,26	0,143
Gjennomsnitt	56,52	55,31	
Standardavvik	0,145	0,099	
Prøve	t_r (+)[min]	t_r (-)[min]	ER
2386	x	55,39	≈0,0
2387	56,82	55,38	0,163
2388	x	55,39	≈0,0
2389	x	55,23	≈0,0
Gjennomsnitt		55,35	
Standardavvik		0,068	
Prøve	t_r (+)[min]	t_r (-)[min]	ER
2386 A	x	55,13	≈0,0
2386 B	x	55,23	≈0,0
2387 A			
2387 B	x	55,24	≈0,0
2388 A	x	55,20	≈0,0
2388 B	x	55,24	≈0,0
2389 A	x	55,26	≈0,0
2389 B	x	x	x
Gjennomsnitt	x	55,22	
Standardavvik	x	0,043	

cis-klordan

Tabell E3. Retensjonstiden (t_r) i minutter til (+)/(-)-enantiomerene og ER-verdier for *cis*-klordan i GPC-, USB- og syre-prøvene. x brukes der det ikke ble detektert *cis*-klordan. Prøve 2387 A manglet blant syreprøvene.

Prøve	t_r (+) [min]	t_r (-) [min]	ER
2386 A	49,66	50,05	1,13
2386 B	49,96	50,31	1
2387 A	49,77	50,16	1
2387 B	48,99	49,52	0,471
2388 A	49,80	50,17	0,967
2388 B	49,66	50,09	0,964
2389 A	49,78	50,22	0,990
2389 B	49,68	50,07	0,971
Gjennomsnitt	49,66	50,07	
Standardavvik	0,27	0,22	
Prøve	t_r (+) [min]	t_r (-) [min]	ER
2386	49,83	50,20	1,08
2387	49,80	50,20	1,025
2388	49,84	50,22	1
2389	x	x	x
Gjennomsnitt	49,82	50,21	
Standardavvik	0,017	0,0094	
Prøve	t_r (+) [min]	t_r (-) [min]	ER
2386 A	49,54	49,93	0,980
2386 B	49,64	50,01	0,987
2387 A			
2387 B	49,68	50,07	1,014
2388 A	49,60	50,01	1,025
2388 B	49,63	50,00	0,929
2389 A	49,69	50,04	0,935
2389 B	x	x	x
Gjennomsnitt	49,63	50,01	
Standardavvik	0,050	0,043	

VEDLEGG F: Konsentrasjon av målanalyttene i prøvene**Tabell F1.** Oppgitt konsentrasjon i ng/g av α -HCH, *o,p'*-DDT, *cis/trans*-klordan og *oxy*-klordan i GPC-, USB- og syre-prøvene. Prøve 2387 A manglet blant syreprøvene.

GPC		Konsentrasjon (ng/g)			
Prøve	α -HCH	<i>o,p'</i> -DDT	<i>cis</i> -klordan	<i>trans</i> -klordan	<i>oxy</i> -klordan
2386 A	0,63	1,27	6,38	0,69	4,94
2386 B	0,67	1,42	5,97	0,68	5,23
2387 A	0,44	0,11	4,33	0,54	3,00
2387 B	0,40	0,18	4,78	0,63	3,02
2388 A	0,43	0,31	3,53	0,54	2,73
2388 B	0,47	0,25	3,61	0,52	2,34
2389 A	0,81	1,05	3,59	0,52	1,05
2389 B	0,81	0,96	3,63	0,54	1,03
USB		Konsentrasjon (ng/g)			
Prøve	α -HCH	<i>o,p'</i> -DDT	<i>cis</i> -klordan	<i>trans</i> -klordan	<i>oxy</i> -klordan
2386	0,64	1,20	5,57	0,62	4,58
2387	0,50	2,08	4,84	0,64	3,07
2388	0,53	0,98	4,80	0,54	3,87
2389	0,65	0,7	2,90	0,45	0,84
Syre		Konsentrasjon (ng/g)			
Prøve	α -HCH	<i>o,p'</i> -DDT	<i>cis</i> -klordan	<i>trans</i> -klordan	<i>oxy</i> -klordan
2386 A	0,62	1,14	5,53	0,66	4,35
2386 B	0,58	1,13	5,30	0,63	4,14
2387 A					
2387 B	0,53	1,08	5,28	0,71	3,27
2388 A	0,52	0,55	3,63	0,56	2,40
2388 B	0,43	1,17	3,12	0,48	2,16
2389 A	0,79	0,84	3,21	0,49	0,85
2389 B	0,79	0,76	3,27	0,51	0,93

VEDLEGG G: EF av racemiske standarder

Tabell E1. EF-verdier til de racemiske standardene av α -HCH, *o,p'*-DDT, *cis*-klordan og *trans*-klordan

Pesticid	EF	SD
α -HCH	0,501	0,007
<i>o,p'</i> -DDT	0,510	0,004
<i>cis</i> -klordan	0,507	0,009
<i>trans</i> -klordan	0,497	0,004