

Er kjemikalier fra bildekk en medvirkende årsak til akutt fiskedød i norske elver, f.eks. Homla 2018?

Framdriftsrapport til Miljødirektoratet, november 2021

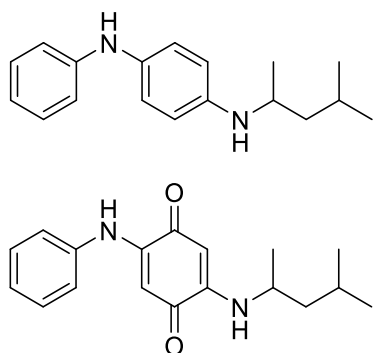
Fedor Kryuchkov, Roar Sandodden, Anders Foldvik, Silvio Uhlig

Veterinærinstituttet & Norsk institutt for naturforskning

1. Bakgrunn for prosjektet

Høsten 2018 oppsto en akutt og relativt omfattende fiskedød i laksevassdraget Homla. Det har blitt spekulert i om en rotenonbehandling lengre opp i vassdraget samme høst kunne være årsak til dette. Dette har blitt vurdert og undersøkt både teoretisk og gjennom ulike undersøkelser og målinger der både forvaltning og ulike forskningsinstitusjoner har vært involvert i. Så langt har man ikke vært i stand til å avgjøre hva som førte til fiskedøden.

Vi har senere fått kjennskap til en artikkel fra USA som beskriver en organisk forbindelse i bildekk som er knyttet til akutt fiskedød. E6 krysser Homla og det er også avrenning fra Stavsjøfjelltunnelen til Homla. Avrenning fra tunnelen etter vask har blitt lansert som en mulig faktor som kan ha bidratt til fiskedøden. Den omtalte artikkelen har knytta akutt fiskedød til et konkret kjemikalium som finnes i bildekk (Figur 1), og som når utsatt for ozon blir til et svært giftig stoff for fisk (Figur 1). Forbindelsen «6PPD» som tilsettes til bildekk i opptil 2% fungerer som antioksidant og blir oksidert til «6PPD-kinon», eller «6PPDQ» (Figur 1). Selv om ozonkonsentrasjoner antas å være små i tunneller eksisterer det mange andre stoffer i bileksos med oksidative egenskaper, som f.eks. nitrogenoksider, som kan tenkes å oksidere 6PPD. En har etablert en LC_{50} til 6PPDQ i coho-laks (*Oncorhynchus kisutch*) som er svært lav (0.8 µg/L).



Figur 1. Den kjemiske strukturen til 6PPD (øverst) og 6PPDQ (nederst).

2. Mål

- Etablere en selektiv analysemetode for kvantifisering av 6PPDQ i vann fra tunellavrenning
- Studere stabiliteten til 6PPD og 6PPDQ
- Deteksjon av andre 6PPD-nedbrytningsprodukter i prøver fra tunellavrenning

3. Modellforsøk for dannelse av 6PPDQ og andre produkter fra 6PPD

Ett g 6PPD ble oppløst i 100 ml diklormetan og blandet med 100 g silikagel (40-63 µm). Løsningsmiddelet ble deretter fjernet under redusert trykk. 6PPD, adsorbent på silikagel, ble så eksponert til ozon ved 30 °C (vannbad) under konstant blanding. Ozon ble produsert av en ozongenerator (MSPA, Norge), som ble slått på annenhver time i ti minutter. Etter 70 t, ca. 99 % av 6PPD hadde reagert og reaksjonen ble stoppet. Et aliquot av silikagelen (100 mg) ble ekstrahert i henhold til protokollen for omvendt-fase (5.1) og normal-fase (5.2) ekstraksjon.

4. Instrumentell analyse av 6PPD og 6PPDQ

Både 6PPD (kjøpt inn hos VWR), ¹³C₆-6PPDQ og 6PPDQ (kjøpt inn hos Cambridge Isotope Laboratories) absorberer UV-lys med absorpsjonsmaksima ved henholdsvis 226 nm og 258 nm. Det er derfor mulig å analysere stoffene ved HPLC koplet til en photodiodearray detektor (HPLC-PDA). Dette oppsettet ble brukt til noen modellforsøk, men ble vurdert ikke selektiv og sensitiv nok for deteksjon og kvantifisering av 6PPDQ i miljøprøver (kvantifiseringsgrensen ble estimert til cirka 100 µg/L). Til dette formålet ble en metode basert på HPLC i forbindelse med en massespektrometrisk deteksjon satt opp (HPLC-MS/MS). Instrumentet som ble benyttet til dette var et Agilent 6470 tandem kvadrupol massespektrometer. Både 6PPD og 6PPDQ viste seg å ionisere svært bra ved electrospray ionisering, og en kunne detektere kalibreringsstandarder av de to ned til 0.02 µg/L. Ved electrospray ionisering lagte de protonerte molekyler ([M+H]⁺) som ble fragmentert i MS/MS instrumentet til spesifikke produksjoner, og det er disse som ble målt for å øke selektiviteten (og sensitiviteten) til metoden (Tabell 1).

Tabell 1. MS/MS parametere for deteksjon av 6PPD, 6PPDQ og en ¹³C₆-markert isotopolog av 6PPDQ for bruk som internstandard.

6PPD		6PPDQ		¹³ C ₆ -6PPDQ	
moderion>produksjon (m/z)	CE ^a (eV)	moderion>produksjon (m/z)	CE ^a (eV)	moderion>produksjon (m/z)	CE ^a (eV)
269,2 >184,2	30	299,1>187,3	31	305,1>193,3	31
269,2 >80,2	90	299,1>77,3	77	305,1>83,3	77

^a kollisjonsenergi

Flere forskjellige typer kolonner ble testet for retensjon og separasjon av 6PPD og 6PPDQ før MS/MS deteksjon, men valget falt på en Agilent EclipsePlusC18 RRHD (3 x 50 mm, 1.8 µm) kolonne. Kolonna ble eluert med en mobilfase bestående av 0.1% maursyre i vann (som mobilfase A) og 0.1% maursyre i acetonitril (som mobilfase B), og en lineær gradient (0.6 mL/min) som startet med 20% B og ble økt til 90% B over 4 min, og til slutt holdt i et min. Kolonna ble ekvilibrert med 20% B i 1 min før injeksjon av neste prøve.

Deteksjon av andre nedbrytningsprodukter ble gjennomført på et Dionex UltiMate 3000 UHPLC System koblet til et Orbitrap Fusion HRMS/MS instrument (Thermo Fisher Scientific). Flere kromatografiske kolonner ble testet med tanke på optimal retensjon og separasjon av 6PPD nedbrytningsprodukter. Mens omvendt-fase kolonner var optimale for kromatografi av 6PPD og 6PPDQ, små reaksjons-/nedbrytningsprodukter måtte analyseres med «hydrophilic interaction chromatography». Kolonnen som ble brukt til dette formålet var en SeQuant® ZIC®-pHILIC zwitterion-kolonne (150 x 4.6 mm, 5 µm). Fraksjoner fra modellforsøk ble screenet i masseområdet m/z 100-500 og MS/MS spektrere generert vha. «data-dependent-scanning» (DDA-modus) og Orbitrap Fusion funksjonen «beste kollisjonsenergi» (15, 30 eller 60 NCE). Softwaren Compound Discoverer v3.1 ble brukt til tentativ identifisering av de 500 mest intense toppene i kromatogrammene, og MS og MS/MS spektrere ble kontrollert manuelt. Deretter ble de innsamlete vannprøvene analysert med Orbitrap Fusion HRMS

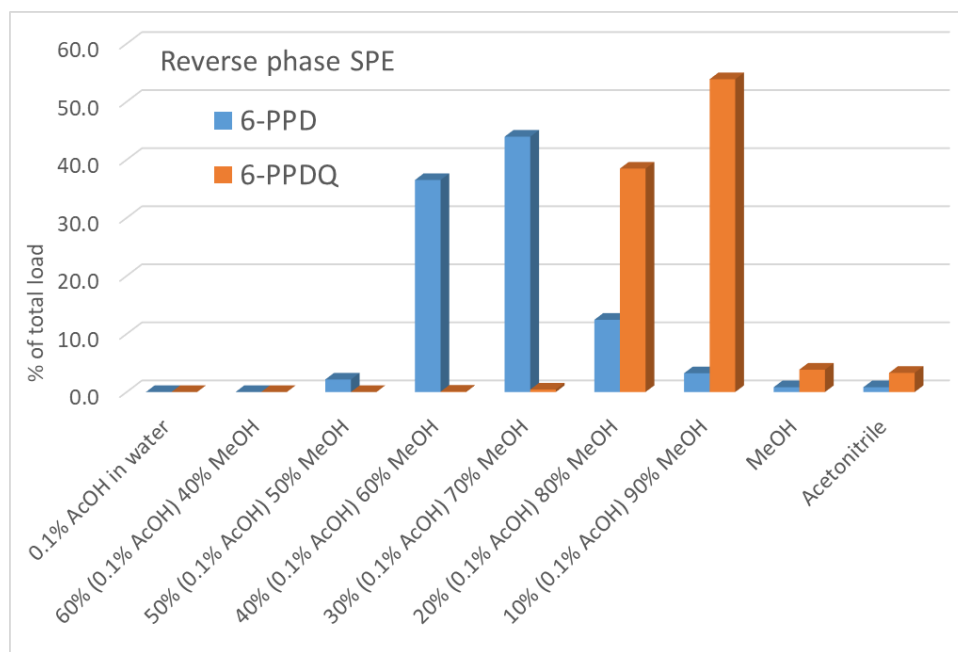
instrumentet vha. «selected ion monitoring» med tanke på 6PPD nedbrytningsprodukter som ble identifisert fra modellforsøket med ozon.

5. Ekstraksjon av 6PPD og 6PPDQ fra vannprøver og opprensing vha. fastfase-ekstraksjon

Siden begge analyttene ioniserte svært bra var en direkte analyse (dvs. uten videre prøveforberedelse) mulig. Prøvene fra tunellavrenning inneholdt imidlertid mange interfererende komponenter som undertrykte signalet til 6PPDQ, og en enkel prøveforberedelse var nødvendig. Flere strategier ble testet.

5.1. Omvendt-fase ekstraksjon

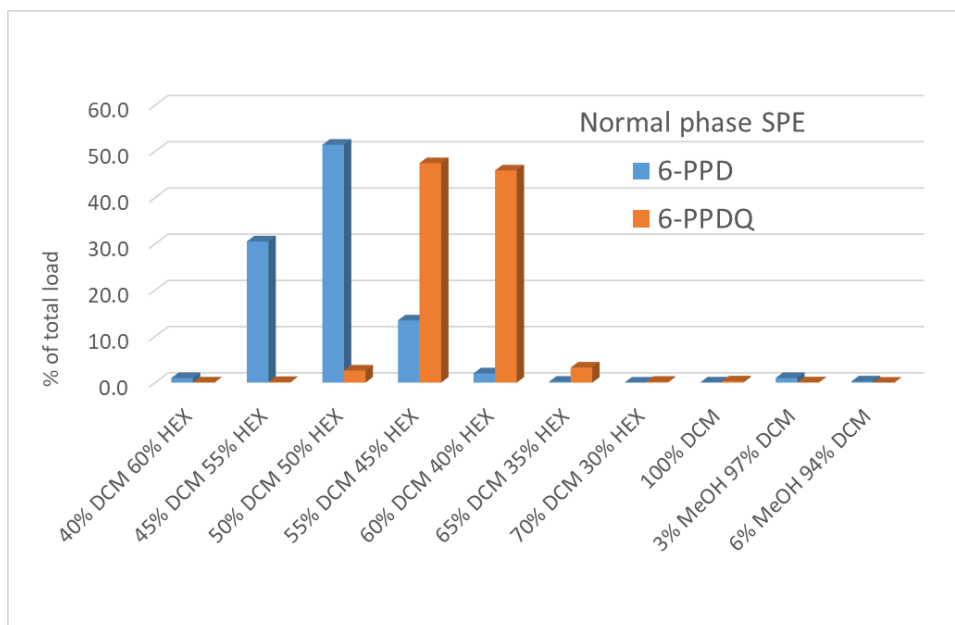
En Waters Oasis HLB kolonne (60 mg, 1 mL) ble testet for å ekstrahere kjemikaliene fra 10 mL vann, tilsatt 10 µg av 6PPD og 10 µg av 6PPDQ. Figur 2 viser elueringsprofilen fra denne kolonnen.



Figur 2. Elueringsprofilen til 6PPD og 6PPDQ fra en omvendt-fase kolonne (Waters Oasis HLB) etter påsetting av en vannprøve som ble tilsatt kjemikaliene (AcOH=eddiksyre, MeOH=metanol, SPE=»solid-phase extraction«)

5.2. Normalfase ekstraksjon

En separasjon på en normalfasekolonne forutsetter at man overfører analyttene til et organisk løsemiddel. 6PPD og 6PPDQ ble ekstrahert fra vann ved væske/væske ekstraksjon med diklormetan. Før ekstraktet ble separert på en silikagel-kolonne (Phenomenex, Strata® SI-1 Silica (55 µm, 70 Å), 100 mg / 1 mL) ble diklormetan dampet inn til tørrhet og løst opp i 60% heksan i diklormetan. Silikagel-kolonnen ble eluert med en trinnvis gradient av heksan, diklormetan og metanol (Figur 3).



Figur 3. Elueringprofilen til 6PPD og 6PPDQ fra en normalfase-kolonne (Phenomenex Si-1) etter ekstraksjon av kjemikaliene fra vann med diklormetan (HEX=n-heksan, DCM=diklormetan, MeOH=metanol).

6. Kvantifisering av 6PPD og 6PPDQ i vannprøver

De ovenfor skisserte tilnærmingene resulterte i tre analysestrategier:

- *Metode 1:* direkteanalyse fra vann ved hjelp av LC–MS/MS uten videre prøveforberedelse
- *Metode 2:* LC–MS/MS analyse etter fastfase-ekstraksjon av vannprøver
- *Metode 3:* LC–MS/MS analyse etter væske/væske ekstraksjon og normalfasekromatografi på silikagel

Metode 1

- 1) Sentrifuger vannprøvealiquoter (1.2 mL) ved 20.000 × g for 5 min
- 2) Overfør 1 mL til HPLC vial og tilsett 1 ng ¹³C₆-6PPDQ (100 µL of 10 ng/ml acetonitril løsninger) og 10 µL eddiksyre
- 3) Analyser vha. LC–MS/MS

Metode 2

- 1) Sentrifuger vannprøvealiquoter (11–12 mL) ved 4.700 × g for 20 min og overfør 10 mL til et nytt Falcon rør
- 2) Tilsett 0.1 ng ¹³C₆-6PPDQ (100 µL av 1 ng/ml acetonitril løsninger) og 100 µL eddiksyre
- 3) Påsett vannprøvene på en Oasis HLB kolonne (60 mg, 1 mL) som kondisjoneres med 1 mL metanol og 1 mL vann, og vask med 1% eddiksyre i vann for så å eluere 6PPDQ og ¹³C₆-6PPDQ med 90% metanol i vann (0.1% eddiksyre)
- 4) Damp inn prøvene ved 60 °C under nitrogen og løs opp i 1 mL acetonitril
- 5) Analyser vha. LC–MS/MS

Metode 3

- 1) Sentrifuger vannprøvealiquoter (11-12 mL) ved 4.700 × g for 20 min og overfør 10 mL til ny tube

- 2) Tilsett 0.1 ng ¹³C₆-6PPDQ (100 µL av 1 ng/mL i acetonitril) og 100 µL av 10% Na₂CO₃ i vann
- 3) Ekstraher vannprøven med 1 mL diklormetan (kun en gang) og sentrifuger kort for bedre fase-separasjon
- 4) Fortynn ekstraktene med 2 mL n-heksan og sett på en silikagel kolonne (Phenomenex Strata® Si-1 Silica (55 µm, 70 Å), 100 mg/1 mL) som kondisjoneres med diklormetan/heksan (40/60, v/v); vask kolonnen med 1 mL 40/60 diklormetan/heksan og eluer 6PPD/6PPDQ med en trinnsvis gradient bestående av 3 ml av diklormetan.
- 5) Damp inn diklormetan ved 60 °C under nitrogen og løs opp i 1 mL av acetonitril
- 6) Analyser vha. LC–MS/MS

Metode 1 er en enkel metode som kan gi et raskt analysesvar. Vi fant imidlertid ut at matrikseffektene fra sterkt forurensete vannprøver, som f.eks. prøver fra tunellvask er vesentlige og medfører en usikker analyse. For slike prøver anbefaler vi å bruke *metode 3*. Alle tre tilnærmingene resulterer i akseptable kvantifiseringsgrenser, men de er klart lavest ved bruk av *metode 3* (Tabell 2).

Tabell 2. De estimerte kvantifiserings- og deteksjonsgrensene (LOQ og LOD) for de tre tilnærmingene for kvantifisering av 6PPDQ i vann.

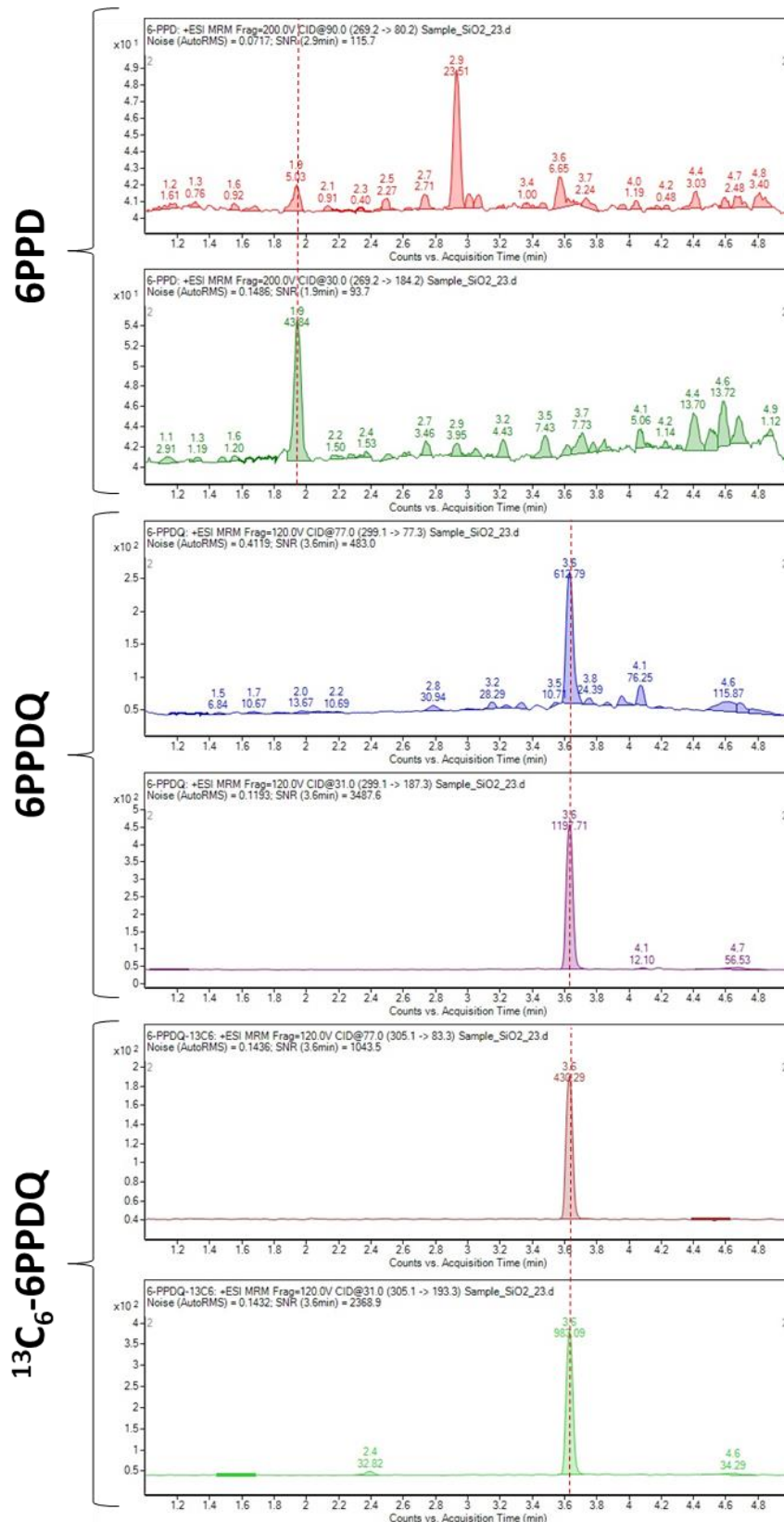
	<i>Metode 1</i>	<i>Metode 2</i>	<i>Metode 3</i>
LOQ (µg/L)	0,050	0,010	0,0050
LOD (µg/L)	0,015	0,030	0,0015

Vi har hittil analysert åtte prøver. Tre prøver ble samlet in i forbindelse med vasking av Stavsjøfjelltunellen ved elva Homla. I tillegg ble det analysert to prøver fra renseanlegget for tunellavrenning ved Soknedalstunellen, samt en prøve nedstrøms utløp av dette renseanlegget. Denne prøven er trolig en blanding av vann fra renseanlegget samt naturlig avrenning fra en bekk som går i samme kulvert. En prøve fra en vannpytt med avrenning fra kunstgressbanen på Rosenborg i Trondheim og en fersk prøve fra en vannpytt på fylkesvei 152/Kykkelsrudveien, i nærheten av Drøbak sentrum. Analyseresultatene så langt viser at 6PPDQ kan detekteres i de fleste prøvene i konsentrasjoner opp til ca. 32% av den rapporterte LD₅₀ i coho-laks (Tabell 3). Se Figur 4 for kromatogrammer fra LC–MS/MS for prøve S2.

Tabell 3. Konsentrasjonene av 6PPDQ fra analyse med *metode 1* og *metode 3* i et utvalg av vannprøver. Tallene i parentes er relativt standardavvik i % for tre tekniske replikater.

Prøve-ID	Prøvetype	Lokalitet Dato	Koordinater	konsentrasjon (µg/L), <i>metode 1</i>	konsentrasjon (µg/L), <i>metode 3</i>
S1	Vann fra tunellvask	Stavsjøfjelltunellen 16.02.2021	63°24'12.1"N 10°48'10.9"E	0,116 ^a (15%)	0,110 (11%)
S2	Vann fra tunellvask	Stavsjøfjelltunellen 16.02.2021	63°24'12.1"N 10°48'10.9"E	0,135 ^a (18%)	0,136 (8%)
S3	Vann fra tunellvask	Stavsjøfjelltunellen 16.02.2021	63°24'12.1"N 10°48'10.9"E	0,165 ^a (26%)	0,143 (2%)
S4	Renseanlegg tunell	Soknedalstunellen 01.02.2021	62°58'45.7"N 10°13'57.4"E	<LOQ	0,007 (7%)
S5	Kulvert ved renseanlegg	Bekk m utløp Sokna 01.02.2021	62°58'48.0"N 10°13'57.7"E	<LOD	<LOD
S6	Renseanlegg tunell	Soknedalstunellen 23.08.2021	62°58'45.7"N 10°13'57.4"E	<LOQ	0,023 (16%)
S7	Avrenning fra kunstgressbane	Rosenborgbanen 10.10.2021	63°25'44.6"N 10°25'12.3"E	0,166 (3%)	0,159 (8%)
S8	Vannpytt	Fylkesvei 152 05.10.2021	59°40'38.8"N 10°39'52.3"E	0,256	0,258 (5%)

^a mye interferens/matrikseffekter



Figur 4. Kromatogrammer fra LC-MS/MS analyse av prøve S2 (tunellvaskevann). Bildet viser to ionekromatogrammer for 6PPD, 6PPDQ og $^{13}\text{C}_6$ -6PPDQ som ble tilsatt vannprøven som internstandard. Kvantifiseringen var basert på moderion>produksjon overgangen som er vist i det nedre kromatogrammet for hver forbindelse, mens overgangen i det øvre kromatogrammet ble brukt til verifisering. Konsentrasjonen til internstandard, $^{13}\text{C}_6$ -6PPDQ, var 0.100 $\mu\text{g/L}$.

7. Stabilitet til 6PPD og 6PPDQ

Vi har undersøkt stabiliteten til 6PPD og 6PPDQ i vann ved forskjellige pH over 14 h (Tabell 4). Forsøkene tyder på at 6PPDQ er stabil ved de testede pH nivåene. Stabilitetstestene ble utført ved 10 °C, og i mørket.

Tabell 4. Stabilitet til 6PPD og 6PPDQ ved forskjellige pH.

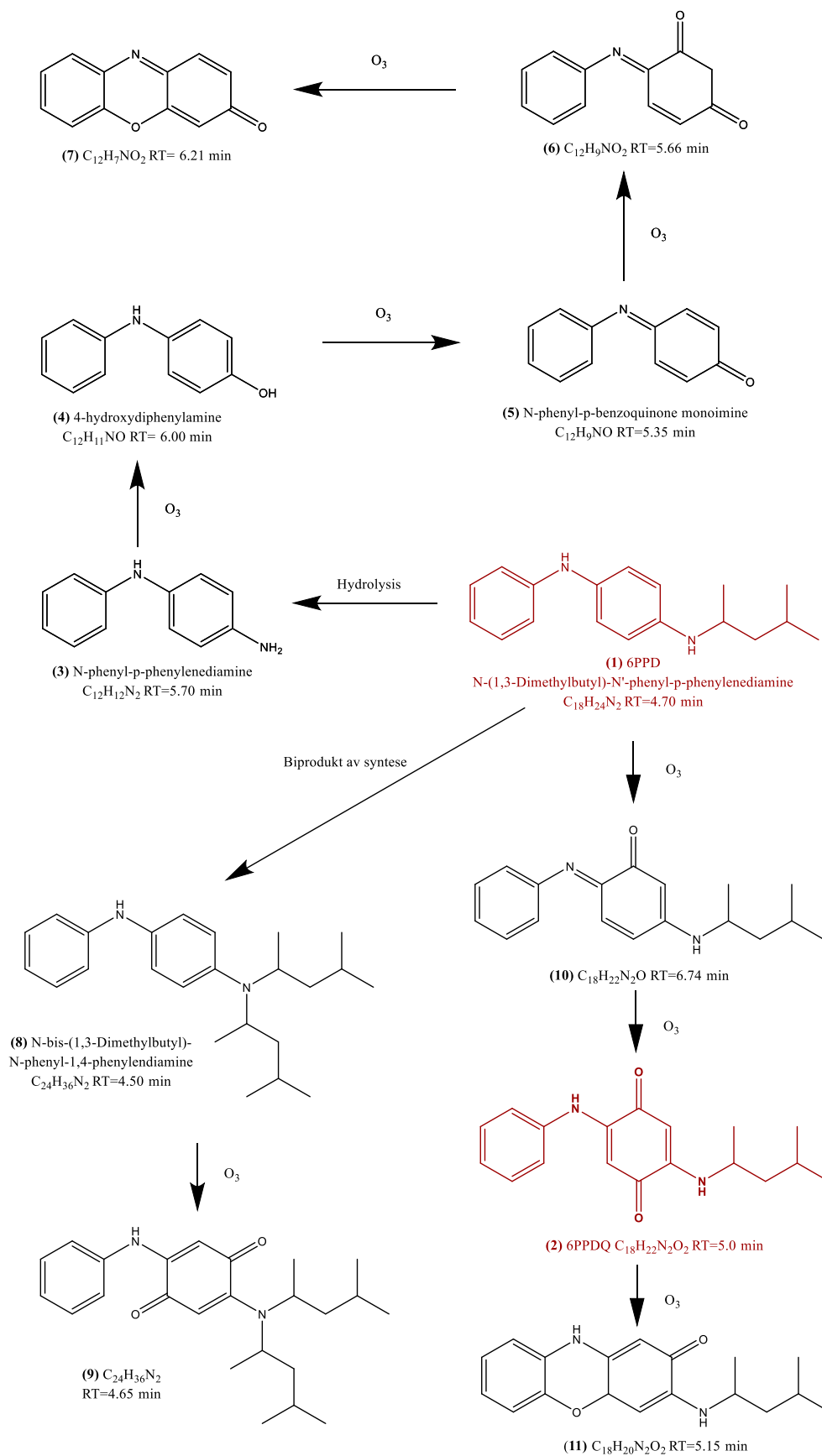
Forbindelse	Løsemiddel	pH	Halveringstid (h)
6PPD	0.5% TFA i vann	1,5	6,6
	0.5% AcOH i vann	3,1	>100
	10 mM AA i vann	6,8	<0,05
	10 mM ABC i vann	9,0	<0,05
	MQ vann	7–8 (uten buffer)	<0,05
6PPDQ	0.5% TFA i vann	1,5	>100
	0.5% AcOH i vann	3,1	>100
	10 mM AA i vann	6,8	>100
	10 mM ABC i vann	9,0	>100
	MQ vann	7–8 (uten buffer)	>100

AA – ammonium acetat, ABC – ammonium bikarbonat, TFA – trifluoreddiksyre

Acidifisering av vann med 0,5% eddiksyre ser ut til å stabilisere 6PPD.

8. Andre 6PPD-relaterte reaksjons-/nedbrytningsprodukter enn 6PPDQ

Vi har gjennomført et modellforsøk der vi adsorberte 6PPD til silikagel, tørket gelen og roterte i en kolbe som gjentatte ganger ble spylt med ozon fra en ozongenerator. I dette forsøket ble 6PPD praktisk komplett brutt ned i løpet av 70 h, men kun ca. 1.5% ble til 6PPDQ (basert på HPLC–PDA analyser). Det betyr at reaksjonen/nedbrytningen til 6PPD under de gitte forholdene hovedsakelig resulterte i andre produkter. Flere nedbrytningsprodukter har blitt rapportert, og vi kunne bekrefte deres tilstedeværelse vha. analyser utført med høytoppløsende massespektrometri (Figur 5). Ved å studere sammensetningen og fragmentionspektrene til de viktigste nedbrytningsproduktene kunne vi tentativt fastslå deres kjemiske struktur. Sammensetningen av reaksjonsblandingen var kompleks, med over 100 individuelle forbindelser, men innenfor dette prosjektet har vi kun sett på de mest dominerende produktene.



Figur 5. Tentativ identifisering av nedbrytningsprodukter til 6PPD (1, rød), hvilket inkluderer oksidasjon til et hydrokinon, 6PPDQ (2, rød).

9. Andre reaksjons-/nedbrytningsprodukter i i vannprøver

Etter at sammensetningen til den ozonbehandlede 6PPD prøven var karakterisert med tanke på de dominerende nedbrytningsproduktene, så vi etter deres tilstedeværelse i vannprøvene S1–S8. Dette ble gjort med LC–HRMS (Tabell 5).

Tabell 5. Oversikt over tilstedeværelsen til 6PPD, 6PPDQ og andre dominerende nedbrytningsprodukter av 6PPD i prøver samlet in i dette prosjektet.

Forbindelse	RT ^a (min)	<i>m/z</i> ^b	Identifikasjonsnivå	Syntetisk ^c	Prøver ^d
1 (6PPD)	4.70	269.2005	Sikker (ref.standard)	positiv	positiv
2 (6PPDQ)	5.00	299.1754	Sikker (ref.standard)	positiv	positiv
3	5.70	185.1073	Sikker (ref.standard)	positiv	positiv
4	6.00	186.0913	tentativ	positiv	positiv
5	5.35	184.0757	tentativ	positiv	positiv
6	5.66	200.0706	tentativ	positiv	negativ
7	6.21	198.0550	tentativ	positiv	positiv
8	4.50	353.2951	tentativ	positiv	positiv
9	4.65	383.2693	tentativ	positiv	positiv
10	6.74	283.1805	tentativ	positiv	negativ
11	5.15	297.1598	tentativ	positiv	negativ

^a Retensjonstid i min

^b Masse-til-ladning forhold til hovedionet i full-scan MS

^c Tilstedeværelse i 6PPD reaksjonsblanding etter ozonbehandling

^d Tilstedeværelse i innsamlete prøver