

Analys av tidstrender för bekämpningsmedelsrester i urinprov hos unga män

ERIKA NORÉN 2016
MVEM12 EXAMENSARBETE FÖR MASTEREXAMEN 30 HP
MILJÖVETENSKAP | LUNDS UNIVERSITET



Analys av tidstrender för bekämpningsmedelsrester i urinprov hos unga män

Biologisk övervakning av exponeringen av
bekämpningsmedelsrester hos unga män i Skåne

Erika Norén

2016



LUNDS
UNIVERSITET

Erika Norén

MVEM12 Examensarbete för Masterexamen 30 hp, Lunds universitet

Intern handledare: Christian Lindh, Arbets- och Miljömedicin, Lunds universitet

CEC - Centrum för miljö- och klimatforskning

Lunds universitet

Lund 2016

Abstract

The increased use of synthetic chemicals in society poses possible harmful risks for the environment and human health. Evaluating these risks are difficult when it comes to predicting short-term and long-term effects, determine causalities between exposure and synergistic effects from different compounds. Biomonitoring is one way to assess these problems and to observe the level of exposure in the human population.

Agricultural pesticides are a widely used group of chemicals to which we are mainly exposed occupationally or through food. Long-term exposure to pesticides might have a negative impact on human health especially in children and foetuses due to genotoxic, neurotoxic and endocrine disrupting characteristics.

This study focuses on the exposure to 12 different residues from 20 pesticides in urine samples from young men in the south of Sweden, with emphasis on temporal trends between the years 2000 and 2013. The pesticides and their biomarkers of exposure included in the analysis were the fungicides thiabendazole (OH-T), pyrimetanil (OH-P), tebuconazole (TEB-OH), the organophosphate chlorpyrifos (TCP), several pyrethroid insecticides, which have the same corresponding biomarkers (3-PBA, 4F-3-PBA, DCCA, CFCA), the herbicides 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and 2-methyl-4-chlorophenoxyacetic acid (MCPA) and the growth regulators chlormequat (CCC) and mepiquat (MQ). The samples were collected year 2000, 2004, 2009 and 2013 (N = 864) and were analysed in 2016 with liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC/MS/MS).

The highest concentrations were found for TCP and CCC in all samples from all four years. The only significant trend was that for TCP, although the increasing gradient was fairly low ($\beta = 0,28$ and $0,29$). The concentrations of CCC decreased over the years, but not statistically significantly so. The biomarkers 3-PBA, 2,4-D, DCCA and MQ were detected above the limit of detection (LOD), but in fairly low concentrations in the majority of samples and without significant trends. The remaining residues were mainly below the LOD and could not be further statistically analysed.

Innehållsförteckning

Abstract	4
Innehållsförteckning	6
1 Inledning	8
<i>1.1 Syfte</i>	9
<i>1.2 Avgränsningar</i>	10
<i>1.3 Bakgrund</i>	10
1.3.1 Insecticider	13
1.3.2 Herbicider	14
1.3.3 Fungicider	15
1.3.4 Tillväxtregulatorer	16
2 Metod	18
<i>2.1 Empirisk data</i>	18
<i>2.2 Provupparbetning</i>	20
<i>2.3 Fastfasextraktion</i>	20
<i>2.4 Analys med LC/MS/MS</i>	21
<i>2.5 Bearbetning av mätvärden och beräkning av ADD</i>	22
<i>2.6 Sammanställning och statistisk bearbetning</i>	23
3 Resultat	24
<i>3.1 Statistisk analys</i>	24
<i>3.2 Analys för tidstrender</i>	26
<i>3.3 Beräkning av uppskattat dagligt intag</i>	33
4 Diskussion	34
<i>4.1 Kommentar till analysresultaten</i>	34
<i>4.2 Tolkning av resultaten</i>	36
5 Slutsatser	40
6 Tackord	42
7 Referenser	44
BILAGA 1	55
BILAGA 2	56

1 Inledning

Den ökade användningen av syntetiskt framställda kemikalier för olika ändamål i samhället medför en spridning av nya ämnen till miljön (Walker et al., 2012). Ämnens egenskaper och dess långsiktiga och kortsiktiga effekter på miljö och hälsa är svåra att utreda, framförallt att fastställa orsakssamband mellan exponering och utfall. Befolkningen exponeras dagligen för en kombination av en mängd olika ämnen som i studier visats ha egenskaper som skulle kunna medföra en negativ påverkan på mänsklig hälsa. Epidemiologisk forskning är därför av stor betydelse för att fortsätta utreda denna problematik.

Biologisk övervakning av halter av miljögifter i kroppsvätskor har under lång tid använts som mått på den samlade befolkningens exponering från livsmedel och miljö (Aylward & Hays, 2015). Halter i urinprov ger ett samlat mått på exponering via alla upptagsvägar. Studier av exponering för kemiska bekämpningsmedel och andra miljögifter har de senaste åren bedrivits på Arbets- och Miljömedicin (AMM) i Lund (Jönsson et al., 2010; Littorin et al., 2013). Bland dessa ingår tidstrender av persistenta organiska miljögifter och ftalater hos unga män (Jönsson et al., 2010), perfluorerade alkylsyror och ftalater hos unga män och kvinnor (Jönsson et al., 2014) samt exponering för bekämpningsmedel i olika grupper i befolkningen (Littorin et al., 2009; Littorin et al., 2011; Littorin et al., 2013)

Bekämpningsmedel används i stor skala vid produktion av livsmedel. Flera av dessa har påvisats ha både toxiska, persistenta och ackumulerbara egenskaper (Walker et al., 2012). Rester av bekämpningsmedel förekommer i både luft, vatten och mark och kan därmed påverka både organismer och hela ekosystem (Walker, 2009). Yrkesrelaterad exponering förekommer kopplat till applicering av bekämpningsmedel inom olika sektorer som bland annat jordbruk och träimpregnering. Allmänbefolkningens exponeringen sker främst via intag av odlade livsmedel som spannmål, frukt och grönsaker (Wallström et al., 2000; Lu et al., 2006) men i vissa fall även från egenanvändning (Wu et al., 2011), kanske från närliggande åkermark (Lee et al., 2011), eller möjligen via kontaminerat vatten från egen brunn (Virgin, 2012).

Kontinuerlig exponering av låga halter kan medföra negativa effekter på human hälsa (Maroni & Fait, 1993), framför allt hos barn och under fosterstadiet (Bouchard et al., 2000; Lu et al., 2001 & 2006; Bouchard et al., 2011; Engel et al., 2011; Rauh et al., 2011; Bergman et al., 2012). Studier har påvisat neurotoxiska och genotoxiska effekter samt hormon- och reproduktionsstörande egenskaper hos många pesticider (Maroni & Fait, 1993; Jamal, 1997; Betarbet et al., 2000; Bergman et al., 2012; Ki et al., 2013). Det finns starkast epidemiologiskt evidens för kopplingen mellan exponering av pesticider under graviditet och ökad risk för barnleukemi samt generell exponering kopplat till ökad risk för Parkinson's sjukdom (Ntzani et al., 2013; Gunnarsson & Bodin, 2014) och djurexperimentella studier stödjer sambanden. Andra samband har varit svårare att fastställa utifrån aktuell epidemiologisk forskning (Ntzani et al., 2013).

Genom att studera tidstrender av bekämpningsmedelsrester hos befolkningen ges en indikation på graden av exponering och hur den förändras över tid (Yusa et al., 2015). Då halter av bekämpningsmedelsrester i livsmedel ser ut att öka (Jansson et al., 2013; Wannberg et al., 2013; Jansson et al., 2015a&b) kan mätning av motsvarande exponeringsbiomarkörer visa om detta även motsvaras av högre urinhalter hos befolkningen som konsumerar dessa. Exponeringsbiomarkör används som övergripande begrepp för det ämne som analyseras i biologiska prover, antingen metaboliten av ett bekämpningsmedel eller den ursprungliga substansen om den inte bryts ned ytterligare i kroppen. Resultat från sådan övervakning av exponeringsnivåer kan användas för riskvärderingar, samt för förslag till åtgärder för att minska exponeringen (Jakubowski & Trzcinka-Ochocka, 2005).

1.1 Syfte

Studiens syfte är att bidra med kunskap om befolkningens exponering av bekämpningsmedel från olika källor över en längre tidsperiod. Fokus ligger på tidstrender för hur koncentrationen av 12 exponeringsbiomarkörer från ca 20 bekämpningsmedel i urinprov förändras vid 4 tidpunkter mellan år 2000 och 2013. Studien sammanställer och analyserar mätdata med halter av bekämpningsmedelsrester i urinprov som ett mått på exponeringen. En grov uppskattning görs även för motsvarande dagligt intag om högre halter förekommer för några ämnen med syftet att jämföra intaget med aktuella gränsvärden inom EU. Resultatet är ett led i den biologiska övervakningen av

exponering för bekämpningsmedel i Sverige och bidrar till bedömning av eventuella förändringar i exponeringen över tidsperioden.

Frågeställningar som studien ämnar besvara är:

- Vilka urinhalter av bekämpningsmedelsrester finns hos unga män?
- Förändras exponeringen mellan provtagningsåren?
- Finns någon tidstrend i urinhalter av rester från bekämpningsmedel?

1.2 Avgränsningar

Denna studie omfattar 20 bekämpningsmedel som fortfarande används i mycket stor utsträckning. De pesticider som ingår i studien är herbiciderna 2,4-D och MCPA (fenoxisyror), insekticiderna klorpyrifos och ett flertal pyretroider, fungiciderna tiabendazol, pyrimetanol och tebukanozol samt tillväxtregulatorerna klormekvat och mepikvat (tabell 3). Dataunderlag för studien är urinprov från unga män i Skåne, och sista året även för kvinnor. Provinsamlingen genomfördes vid fyra olika tillfällen mellan år 2000 och år 2013. Proverna har tagits i samband med mönstring för värnplikt och samlats i en biobank som tidigare använts i studier för tidstrender av andra miljögifter. Studien fokuserar på statistisk analys av uppmätta koncentrationer och tidstrender mellan åren. Exponeringen kan inte härledas till specifika livsmedel eller livsstil hos individerna då denna typ av kostdata inte finns dokumenterad. Risker för mänsklig hälsa utreds inte heller i denna studie, men materialet skulle kunna ligga till grund för en sådan framtida studie.

1.3 Bakgrund

Bekämpningsmedel har olika egenskaper beroende på det ändamål de används till. Inom begreppet bekämpningsmedel ingår både biocider och växtskyddsmedel. Växtskyddsmedel får användas inom jordbruk och produktion av livsmedel till skillnad från biocider som endast får användas inom andra användningsområden som träimpregnering eller mot ohyra i byggnader. Vissa ämnen kan användas för båda ändamålen, men användningen kan i vissa fall vara begränsade till ett av dessa (Tabell 1). De syntetiska bekämpningsmedel som används idag är de som är mer lättnedbrytbara jämfört med de som utvecklades tidigare under 1900-talet. Många av de ämnen som till en början användes för skadebekämpning inom jordbruk har visats ha toxiska egenskaper och är inte

längre tillåtna inom livsmedelsproduktion (Walker et al., 2012). Inom EU och nationellt i Sverige utreds kontinuerligt vilka ämnen som är tillåtna att använda vid livsmedelsproduktion samt regler för hur och i vilken utsträckning de får användas. EU tillåter generellt fler aktiva substanser än vad Sverige gör nationellt. Gränsvärden och godkänt användande för de ämnen som inkluderas i denna studie redovisas i tabell 1. Då ett ämnes godkännande upphör innebär det ett försäljningsförbud, men återförsäljning får pågå ytterligare ett år och användning är tillåtet två år efter att godkännandet upphört (Kemikalieinspektionen, 2016).

Tabell 1. Aktiva substanser och dess gränsvärden i EU samt godkännande i Sverige/EU.
Följande gränsvärden är inkluderade: ADI = Acceptable daily intake och ARfD = Acute reference dose. All information i tabellen är hämtad från EU's pesticidatabas (2016) samt Kemikalieinspektionens bekämpningsmedelsregister (2016).

Ämne	Gränsvärden (mg/kg/bw)		Godkännande			
	ADI	ARfD	SE	Kommentar	EU	Kommentar
<i>Tiabendazol</i>	0,1	0,3	Nej	Godkännande upphört år 2002	Ja	Växtskydd och biocid
<i>Pyrimetanil</i>	0,17	-	Ja	Växtskydd	Ja	Växtskydd
<i>Tebukonazol</i>	0,03	0,03	Ja	Biocid	Ja	Växtskydd och biocid
<i>Klorpyrifos</i>	0,001	0,005	Nej	Biocid. Förbud 2008.	Ja	Växtskydd
<i>Permetrin</i>	-	-	Ja	Biocid	Ja	Biocid
<i>Cypermethrin</i>	0,05	0,2	Ja	Biocid	Ja	Växtskydd och biocid
<i>Deltamethrin</i>	0,01	0,01	Ja	Biocid och växtskydd spannmålslager	Ja	Växtskydd och biocid
<i>Resmethrin</i>	0,03	-	Nej	Godkännande upphört år 2008	Nej	Godkännande upphört år 2007
<i>Fenvalerat</i>	0,013	-	Nej	Godkännande upphört år 1990	Nej	Godkännande upphört år 2003
<i>Fenitrothion</i>	0,07	-	Nej	Godkännande upphört år 1995	Nej	Godkännande upphört år 2006
<i>Cyfenotrin*</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Cyflutrin</i>	0,003	0,02	Nej	Godkännande upphört år 2012	Ja	Biocid
<i>Bifentrin</i>	0,015	0,03	Nej	Godkännande upphört år 1992	Ja	Växtskydd
<i>2,4-D</i>	0,05	0,75	Ja	Växtskydd (etylhexylester tillåten)	Ja	Växtskydd
<i>MCPA</i>	0,05	0,15	Ja	Växtskydd (tre derivat tillåtna)	Ja	Växtskydd
<i>Klormekvat</i>	0,04	0,09	Ja	Växtskydd	Ja	Växtskydd
<i>Mepikvat</i>	0,2	0,3	Ja	Växtskydd	Ja	Växtskydd

*ej registrerad i EU's pesticidatabas eller bekämpningsmedelsregistret

Årligen kontrollmäts rester av bekämpningsmedel i livsmedel inom det nationella kontrollprogram som bedrivs av Livsmedelsverket. En stor del av de bekämpningsmedelsrester som detekteras kan härledas till importerade livsmedel, som i större utsträckning innehåller halter av en eller flera pesticider (Jansson et al., 2015b). Av de bekämpningsmedel som ingår i denna studie påträffas oftast två medel, klorpyrifos och tiabendazol, som finns i importerade livsmedel (Jonsson et al., 2007). I vissa fall förekommer halter som överstiger EU-harmoniserade gränsvärden. Detta gäller främst fungicider i livsmedel producerade utanför EU (Jansson et al., 2015b). Tillfälligt har det i svenska grödor förekommit spår av pesticider i svenska grödor som inte är tillåtna vid produktion i Sverige, bland annat ämnet klormekvat i svenskodlad vete (Jansson et al., 2015b). I Livsmedelsverkets studie för år 1990 - 2005 var även tiabendazol och klormekvat två av de ämnen som oftast översteg gränsvärden i importerade grödor (Jonsson et al., 2007). De senaste mätningarna som genomförts har visat indikationer på att förekomsten av bekämpningsmedel i frukt och grönsaker har ökat (Jansson et al., 2013; Wannberg et al., 2013; Jansson et al., 2015a&b). Biologisk övervakning av befolkningens exponering för samma bekämpningsmedel under tidsperioden 1990 - 2014 finns inte, endast för perioden 2004 - 2011. Internationellt och i Sverige har studier av exponering främst gjorts för andra typer av ämnen som persistenta organiska föroreningar, inklusive äldre typer av bekämpningsmedel som exempelvis DDT och tungmetaller (Schroijen et al., 2008; Sobus et al., 2015). Utöver de studier som gjorts på Arbets- och Miljömedicin finns inga nationella studier av exponering för moderna bekämpningsmedel med hjälp av biologiska prover i allmänbefolkningen. Internationellt finns flera studier på exponeringen för pyretroider, organofosfater och andra äldre bekämpningsmedel som fortfarande används (Wessels et al., 2003; Egeghy et al., 2011; Sobus et al., 2015). I USA finns en mängd insamlad data och studier med fokus på bekämpningsmedel framför allt av NHANES (National Health and Nutrition Examination Survey) (NHANES, 2016). Dock saknas studier för de flesta moderna bekämpningsmedel som tillkommit och används idag. Dessutom finns få studier av exponering över längre tidsperioder med fokus på trender (Jakubowski & Trzcinka-Ochocka, 2005; Osrea et al., 2014).

I Sverige bedrivs idag studier av bekämpningsmedelsrester i befolkningen bedrivs främst på Arbets- och Miljömedicin i Lund. Där har exponeringen för samma bekämpningsmedel som i denna studie undersökts men inom andra urvalsgrupper av allmänbefolkningen (Littorin et al., 2009; Littorin et al., 2011; Littorin et al., 2013). Andra miljögifter har också undersökts i samma urvalsgrupp som ingår i denna studie (Jönsson et al., 2010). Spår av bekämpningsmedel som klormekvat och 2,4-diklorfenoxiättiksyra har tidigare detekterats i samtliga

ingående urinprov i liknande studierna från Arbets- och Miljömedicin i Lund (Littorin et al., 2009; Littorin et al., 2011; Lindh et al., 2011). Som tidigare nämntes har exponeringen dock sällan studerats över längre tidsperioder och halter av vissa pesticider som används idag har aldrig undersökts över tid i allmänbefolkningen tidigare (Oates & Cohen, 2011; Yusa et al., 2015). En begränsning med denna typ av studier är bristen på utarbetade analysmetoder för pesticider och vilka exponeringsbiomarkörer som ska analyseras för bedömning av exponeringen (Yusa et al., 2015). Flera aktuella analysmetoder för specifika bekämpningsmedel som 2,4-D, MCPA, 3-PBA, CCC och tiabendazol har dock utvecklats på Arbets- och Miljömedicin i Lund (Lindh et al., 2011; Ekman et al., 2013; Ekman et al., 2014).

1.3.1 Insekticider

Pyretroider är en grupp syntetiska bekämpningsmedel vars struktur utgår från de naturligt förekommande pyretrinerna i växten *Chrysanthemum cineraraefolium*. Det är en av de mest frekvent använda pesticidgrupperna mot insekter och skadedjur som kvalster inom växtodling och jordbruk (Saillenfait et al., 2015). Några av de vanligaste varianterna av pyretroider är permetrin, cypermetrin, deltametrin, resmetrin, fenvalerate, fenotrin, cyfenotrin, cyflutrin och bifenthrin. För pyretroider är framförallt effekter vid akut yrkesrelaterad exponering dokumenterade i form av neurotoxiska effekter. Dessa är främst övergående symptom som domningar och stickande känsla vilket påminner om resultat från djurtest som utöver det visat på nedsatt motorisk aktivitet (Das et al., 2001; Wolansky & Harrill, 2008). Pyretroider har en mekanism som verkar på nervsystemet hos insekter genom att interagera med natriumkanalerna i nervtrådarna vilket stör nervsignalerna (Walker, 2009). Denna mekanism ligger även bakom de akuta symptomen hos människor men effekterna är starkast på insekter. Tidigare studier på hälsoeffekter av exponeringen för de exponeringsbiomarkörer av pyretroider som ingår i denna studie har i vissa fall kunnat påvisa hormonstörande effekter hos män som resulterat i minskad spermiekvalite (Chen et al., 2002; Han et al., 2008; Meeker et al., 2009; Ji et al., 2011) samt i en studie association till ökad risk för akut leukemi hos barn (Ding et al., 2012). Vad gäller eventuella synergieffekter har exempelvis cypermetrin visats ha hormonstörande egenskaper vid exponering i kombination med andra pesticider (Kjeldsen et al., 2013). Resultaten är omdebatterade och det finns vissa studier med motsägande resultat publicerade. I dessa studier har dock endast exponeringsbiomarkören 3-PBA inkluderats som biomarkör för pyretroider och inte övriga tre (tabell 3) som ingår i denna studie (Zhang et al., 2013; Yoshinga et al., 2014). Av samtliga pyretroider är endast cypermetrin och permetrin tillåtna

inom svensk produktion (Tabell 1). Exempelvis var bifentrin tillåten i Sverige innan 1992 (WHO, 1992) men då den klassificerats som både persistent, ackumulerbar och toxisk samt i en del studier även som cancerogen ansågs användningen som en risk för mänsklig hälsa enligt bland annat EFSA (2011). Därmed omregistrerades inte det verksamma ämnet i Sverige (Agribusiness Intelligence, 1996), men brukas fortfarande till spannmål i vissa medlemsländer i EU.

Klorpyrifos tillhör gruppen organofosfater och har varit en av de mest använda insekticiderna inom jordbruket sedan 1980-talet (Richardson & Chambers, 2005). Det är en kolinesterashämmare som verkar på nervsystemet hos både skadeinsekter och däggdjur (del Pino et al., 2015). Det är välkänt att både tillfällig och långtidsexponering av organofosfater som klorpyrifos kan kopplas till neurotoxiska effekter (Ki et al., 2013). Prenatal exponering kan kopplas till nedsatt kognitiv förmåga hos barn senare i livet (Bouchard et al., 2011; Engel et al., 2011; Rauh et al., 2011) samt en eventuell ökad risk för barn att utveckla sjukdomar som ADHD (Bouchard et al., 2000). Epidemiologiska studier har påvisat en koppling mellan exponeringen för olika insekticider, bland annat klorpyrifos och permetrin, till en ökad risk för Parkinson's sjukdom (Gunnarsson & Bodin, 2014). Användning av insekticider klassades för flera år sedan av IARC, WHO:s internationella cancerinstitut i Lyon, som troligen carcinogent för människor (IARC, 1991). Insekticiderna innefattade då både organiska föreningar och pyretroider men också klororganiska föreningar. Enligt EU's pesticiddatabas är klorpyrifos tillåtet i EU och godkänt i vissa medlemsländer, men inte tillåtet som bekämpningsmedel inom svensk produktion. Den främsta exponeringen i svensk befolkning kommer troligtvis från importerade grödor som producerats utanför Sverige (Widenfalk & Fohgelberg, 2012).

1.3.2 Herbicider

Fenoxysyrorna 2,4-D och MCPA har använts för kontroll av ogräs sedan 40-talet. 2,4-D är en av de vanligaste herbiciderna och används idag i både EU och Sverige. Ämnet förbjöds dock i Sverige år 1982 då flera forskningsstudier visat en förhöjd risk för olika former av cancer kopplat till användning och exponering av olika fenoxysyror (Axelson & Sundell, 1974; Axelson et al., 1980; Hardell & Eriksson, 1988). Dessa resultat är dock tvetydiga och resultaten omdiskuterade (Ntzani et al., 2013). Den verksamma substansen 2,4-D etylhexylester introducerades igen år 2011, då en variant av 2,4-D åter tilläts för växtskydd i Sverige (Kemikalieinspektionen, 2016). Ämnet tas väl upp i magtarmkanalen

efter peroralt intag, utsöndras relativt snabbt via urin och ackumuleras inte (Sauerhoff et al., 1977). Risker och hälsorelaterade problem har utretts i ett flertal studier. Främst har neurotoxiska och reproduktionsstörande effekter påvisats men vid exponering för väldigt höga, toxiska halter (Munro et al., 1992).

Herbiciden MCPA används fortfarande i stor utsträckning i både Sverige och EU, men har numera minskad användning då den i vissa fall har ersatts av andra substanser som exempelvis glyfosat. Jämfört med ämnen som 2,4-D har hälsoeffekter av exponeringen för MCPA utretts i betydligt mindre utsträckning. Ett fåtal studier har dock påvisat att MCPA kan inducera ökade nivåer av testosteron (Orton et al., 2009) samt förhöjd risk för vissa cancersjukdomar som non-Hodgkin's lymfom (Eriksson et al., 2008). Även dessa samband är svåra att fastställa och kopplingen mellan exponering för dessa bekämpningsmedel och olika typer av cancer är inte helt utrett (Ntzani et al., 2013). Yrkesrelaterad exponering för MCPA och 2,4-D har dock visats leda till immunosuppression, vilket skulle kunna bidra till en hälsorisk eller ökad risk för cancer (Faustini et al., 1996). De tre derivaten dimetylaminsalt, isooktylester och kaliumsalt av MCPA är idag tillåtna för växtskydd i Sverige (Kemikalieinspektionen, 2016).

1.3.3 Fungicider

Tiabendazol har använts sedan 1960-talet, till en början som läkemedel mot parasiter och därefter som fungicid under odling och efter skörd av grödor som potatis och banan (Ekman et al., 2014). Den verksamma substansen används i Sverige endast som träskyddsmedel och har inte godkänts för växtskydd. Vid studier på råttor har exponering för tiabendazol visats orsaka celldöd i leverceller (Séide et al., 2015) samt vid yrkesrelaterad mänsklig exponering vid höga doser visats bidra till akuta och allvarliga leversjukdomar (Manivel et al., 1987; Roy et al., 1989; Mohi-ud-din & Lewis, 2004). Tebukonazol används främst för bekämpning mot svampangrepp på vinodlingar i utlandet. Denna misstänks ha teratogena egenskaper för människor och kan medföra reproduktionsstörande effekter vid fosterutvecklingen (Zhou et al., 2016). Den tredje fungiciden pyrimetamil har visats ha antiandrogena effekter vilket påvisats tydligare vid exponering i kombination med andra pesticider (Orton et al., 2011; Orton et al., 2012). Samtliga fungicider är tillåtna i produktion inom EU, men endast pyrimetamil är tillåten för livsmedelsproduktion i Sverige enligt EU's pesticidatabas (2016). Pyrimetamil har i USA klassats som potentiellt cancerogen för människor (US EPA, 2015) men inte i EU. De skilda bedömningarna varierar beroende på olika tolkningar av resultat från djurstudier.

1.3.4 Tillväxtregulatorer

Klormekvat (CCC) och mepikvat (MQ) används framförallt för att reducera tillväxten av spannmål som vete och råg samt för reglering av mognad av frukt och grönsaker (Littorin et al., 2013). CCC används i Sverige även för detta ändamål på prydnadsväxter som exempelvis julstjärnor, men även med syftet att förstärka blomningen. Båda är godkända för användning inom både Sverige och EU (EU's pesticiddatabas, 2016) och har tidigare detekterats i råg och vete samt i importerade päron, vindruvor och morötter (Wannberg et al., 2013; Jansson et al., 2015a).

Baserat på resthaltstudier i livsmedel bedömdes i England den aktuella exponeringen inte medföra någon hälsorisk enligt de gränsvärden som rådde då (Reynolds et al., 2004). I en dansk studie gav klormekvat reproduktionsstörande effekter på däggdjur (Sørensen & Danielsen, 2006). I detta fall var det grisar som utfodrats med grödor som behandlats med klormekvat, vilka visade försämrad reproduktion (Danielsen & Larsen, 1992). Även påverkan på möss utreddes vilket visade komplikationer främst hos hanar (Langhammer et al., 1999; Torner et al., 1999). I Båda fallen var halterna lägre än uppsatta gränsvärden för dagligt intag. Exponeringen för klormekvat har inte tidigare studerats med biologisk övervakning.

Väldigt få studier för mepikvat och dess toxicitet finns tillgängliga, men ämnet anses generellt ha mycket låg toxisk eller på annat sätt hälsofarlig potential. Utredningar av exponering har i flera fall visat att halterna är långt under de gränsvärden som finns och därmed bedöms risken för påverkan på mänsklig hälsa mycket låg (ShanShan et al., 2015; EFSA, 2008). På senare tid har observerats att mepikvat utöver användning som bekämpningsmedel även bildas som biprodukt i rostningsprocesser vid högre temperaturer i bland annat kaffe och korn (Wermann et al., 2014; Bessaie, et al., 2016). Dock är tillskottet från mepikvat från denna process fortfarande lågt i förhållande till halterna från annan exponering.

2 Metod

Nedan beskrivs analys av data i flera steg. Urinproven har tidigare samlats in i samband med andra studier och sedan sparats i en biobank som även används i denna studie. Samtliga laborativa moment utfördes av biomedicinska analytiker på Arbets- och Miljömedicin i Lund. Sammanställning av resultaten, densitetsmätning av proverna från år 2000 och år 2004 samt statistisk bearbetning utfördes av rapportskrivaren.

2.1 Empirisk data

Det analysmaterial som ligger till grund för studien är urinprov från en biobank insamlade vid fyra olika år från unga män i Skåne. Urinproverna har i första hand tagits i samband med mönstring för värnplikt då denna var obligatorisk (Tabell 2). För sista året har mätningar kompletterats med data från gymnasieelever i samma ålder. Proverna har sedan provtagning lagrats i frys i -20°C i en biobank, men har under tiden även använts för analys i andra studier.

Tabell 2. Provunderlag till studien.

Totalt antal urinprover i analysen var n = 209 från år 2000, n = 197 från år 2004, n = 254 från år 2009 samt n = 200 från både män och kvinnor som går gymnasiet från år 2013.

År	Antal prov	Kommentar
2000	209*	Män, mönstring i Skåne
2004	197	Män, mönstring i Skåne
2009	254	Män, mönstring i Skåne
2013	204	Kvinnor och män, gymnasieelever

*Antal prov varierar för CCC och MQ år 2000 till följd av att mängden i vissa prov inte räckt till de senare analyserna. För de exponeringsbiomarkörerna är N=196 istället för 209.

Varje prov har analyserats för ca 20 olika bekämpningsmedel med totalt 12 exponeringsbiomarkörer (Tabell 3). Den uppmätta koncentrationen i urinproven motsvarar utsöndringen till urinen av ett ämne som tagits upp i kroppen via alla exponeringsvägar och därmed den totala exponeringen vid provtillfället. Analysmetoderna har utvecklats eller förbättrats på Arbets- och miljömedicin i Lund.

Tabell 3. Bekämpningsmedel och motsvarande exponeringsbiomarkör i analysen.

Höger kolumn anger vilken typ av bekämpningsmedel och grupp ämnet tillhör och vad det används till. Observera att permethrin, cypermethrin och cyflutrin har två angivna exponeringsbiomarkörer.

Exponeringsbiomarkör	Bekämpningsmedel	Användning
OH-T (<i>5-hydroxi-tiabendazol</i>)	Tiabendazol	Fungicid
OH-P (<i>3-hydroxi-pyrimetanol</i>)	Pyrimetanol	
TEB-OH (<i>hydroxi-tebukonazol</i>)	Tebukonazol	
TCP (<i>trikloropyridinol</i>)	Klorpyrifos	Insekticid (Organofosfat)
3-PBA (<i>3-fenoxibensylsyra</i>)	Permethrin	Insekticid (Pyretroider)
	Cypermethrin	
	Deltamethrin	
	Resmethrin	
	Fenvalerat	
4F-3-PBA (<i>4-fluoro-3-fenoxibensylsyra</i>)	Fenitrothion	
	Cyfenotrin	
4F-3-PBA (<i>4-fluoro-3-fenoxibensylsyra</i>)	Cyflutrin	
DCCA (<i>3-(2,2-diklorovinyl)-2,2-dimetylcyclopropankarboxylsyra</i>)	Permethrin	
	Cypermethrin	
	Cyflutrin	
CFCA (<i>kloro-3,3,3-trifluoro-1-propen-1-yl-2,2-dimetylcyclopropankarboxylsyra</i>)	Bifentrin	
2,4-D (<i>2,4-diklorfenoksiättiksyra</i>)	2,4-D	Herbicid (Fenoxisyror)
MCPA (<i>4-klor-2-metylfenoksiättiksyra</i>)	MCPA	
CCC	Klormekvat	Tillväxtregulator
MQ	Mepikvat	

2.2 Provupparbetning

Upparbetning och analys av proverna utfördes av biomedicinska analytiker på Arbets- och miljömedicin. Metodiken för upparbetning och analysmetoden och validering av dessa som beskrivs nedan är baserad på två metoder. För exponeringsbiomarkörerna CCC och MQ har metoden i Lindh et al. (2011) tillämpats och för samtliga andra exponeringsbiomarkörer är metoden hämtad från Ekman et al. (2014).

Proven upparbetades i randomiserad ordning från de olika tidpunkterna i 96-håls SPE-plattor med 40 mg ENV+ packmaterial istället för 50 mg som i tidigare metod. I varje 96-hålsplatta som analyserades ingick en standardkurva med 7 prover och två kontroller med känd halt. Även kemiska blankprov ingick, som är samma kemikalier som i ett prov men där MilliQ-vatten ersätter urin. I samtliga prover tillsattes 25 µl intern standardlösning med en bestämd mängd isotopmärkta bekämpningsmedelsrester för 10 av 12 inkluderade exponeringsbiomarkörer, 10 µl β-glucoronidase/Arylsulfatase samt 150 µl 1 M ammoniumacetat. Ammoniumacetat tillsätts som buffert. Samtliga prover inkuberades i 37°C över natten. Koncentrationerna av de interna standarderna ligger ungefär i mitten av standardkurvan. Enzym β-Glucoronidase/Arylsulfatase användes för att spjälka bort sockerarten glucuronid eller sulfater för att erhålla samtliga analyter i fri form.

2.3 Fastfasextraktion

I nästa steg upparbetades proverna med fastfasextraktion i en platta i 96-hålsformat med vialer med fastfaskolonner. För fastfasextraktionen användes för metod 1 en platta med ISOLUTE-96 ENV+ 40 mg kolonner för upprensning av proverna. För metod 2 användes istället en 96-hålsplatta med Isolute HCX-Q 100 mg kolonner. Fastfaskolonnerna konditionerades med 1 ml metanol för att aktivera den fasta fasen, följt av 1 ml H₂O för att eluera lösningsmedlet (metanol). Urinproverna applicerades i fastfaskolonnerna och i första omgången fick oönskade ämnen rinna av. Därefter eluerades analyterna till en ny 2 ml platta med 1 ml Acetonitril. I denna analys sparades endast första eluatet för analys till skillnad från beskrivningen i Ekman et al. (2014), då alla ingående pesticider visades finnas med i detta. Plattan med sammanlagt ca 80 prover indunstades i 60°C för minskad volym, och löstes därefter upp i en mindre volym lösningsmedel (75 µl MeOH och 25 µl H₂O).

2.4 Analys med LC/MS/MS

Analysen av proverna utfördes med vätskekromatografi/tandemmasspektrometri (LC/MS/MS) på ett QTRAP 5500-instrument kopplad till en vätskekromatograf med två pumpar. I masspektrometern analyseras positiva eller negativa joner som motsvarar molekylvikten för varje metabolit/exponeringsbiomarkör plus eller minus en väte [H] och sedan fragmenteras jonen i en kollisioncell. Denna MS/MS-analys kallas SRM, selected reaction monitoring. Jonerna och dess produkt har valts ut baserat på vilka som givit bäst signal i tidigare studier av rena standarder.

För metod 1 beskriven av Ekman et al. (2014) separerades analyterna i proverna för positiva joner med en Poroshell 120EC-C18 kolonn (4,6x100 mm, 2,7 µm) med LC/MS/MS. De exponeringsbiomarkörer som bildar positiva joner är OH-T, OH-P och TEB-OH. I en ny omgång separerades de övriga analyterna till negativa joner med en Genesis Lightn C18-kolonn (100x2,1 mm, 4 µm) med förinställd metod på instrumentet. Exponeringsbiomarkörerna CCC och MQ analyserades enligt metod 2 beskriven av Lindh et al. (2011). Även dessa exponeringsbiomarkörer bildar positiva joner i SRM. I denna metod användes en Atlantis HILIC kolonn (150x2,1 mm, 3 µm).

Analysen utfördes i randomiserad ordning med ca 20 prov från varje år åt gången för att utesluta att skillnader mellan de olika åren hittas till följd av drifter i analysen. Samtliga prover har genomgått enkelanalys då det inte funnits tillräcklig mängd urinprov för dubbelanalys av varje prov. Analysen utvärderades efter varje körning i förvalda program för att se att rätt topp analyserats i kromatogrammet för varje prov, samt att koncentrationen är inom gränserna för standardkurvan. Koncentrationerna bestämdes utifrån kvoten i topp-arean i kromatogrammet mellan analyten och internstandard. Halten i kemblank-proven subtraheras från samtliga prover. Helt blanka urinprov går ej att erhålla, då en viss nivå av bekämpningsmedelsrester ofta förekommer. Standardkurvan subtraheras med denna halt innan kvantifiering. Detektionsgränsen för analyterna uppskattas vara 0,1 ng/ml för samtliga exponeringsbiomarkörer.

2.5 Bearbetning av mätvärden och beräkning av ADD

Den uppmätta koncentrationen i varje prov korrigerades i efterhand för densitet för att kompensera för variationen i utspädning. Densiteten för varje prov analyserades genom pipettering av 15 µl urin från varje prov till en optisk refraktometer som mäter brytningsindex, och därmed densiteten, i urinproven. Beräkningen för densitetsjusterad koncentration, C_d , av prov med uppmätt koncentration $C_{observerad}$ visas i ekvation 1

$$\frac{1.016 - 1}{\rho - 1} * C_{observerad} = C_d \text{ ng/ml} \quad (1)$$

där 1,016 användes som standarddensitet för urin, $C_{observerad}$ är den uppmätta koncentrationen av analyten i ett prov, ρ är den specifika densiteten för provet och C_d är den densitetskorrigerade koncentrationen i provet.

För att kunna relatera urinhaltarna till motsvarande dagligt intag av bekämpningsmedelshalter i enheten µg/kg/dag användes ekvation 2 nedan (van Wendel de Joode et al., 2012).

$$ADD = \frac{(C * R_{mw} * P_{cre} * CF)}{BW} * \ln\left(\frac{2}{t_{1/2}}\right) * t \quad (2)$$

I ekvationen ovan står ADD (*average daily dose*) för genomsnittlig daglig dos per kroppsvikt i enheten µg/kg/dygn, C den kreatininjusterade koncentrationen i urinprov (µg/g kreatinin), R_{mw} är en molar korrigeringsfaktor mellan bekämpningsmedlet och dess exponeringsbiomarkörer, P_{cre} är det medelvärdet för utsöndring av kreatinin per dygn, CF är korrelationsfaktorn för utsöndringen av exponeringsbiomarkören i urin efter oralt intag, BW är genomsnittlig kroppsvikt i kg, $t_{1/2}$ är halveringstid i kroppen och t det uppskattade tidsintervallet för exponering 24 h (1 dygn). Som kroppsvikt användes 73 kg baserat på pliktverkets statistik och medelvärdet för kroppsvikten hos mönstrande år 2000 (Pliktverket, 2015). För utsöndring av kreatinin (P_{cre}) användes ett värde för gravida kvinnor (1,21 g/dag) från van Wendel de Joode et al (2014), trots att detta värde kan skilja sig från icke gravida kvinnor eller unga män.

Kreatinin är en restprodukt som bildas i musklerna och extraheras vid en förhållandevis konstant hastighet, vilket medför att halten är jämförbar mellan olika individer (Barr et al., 2005). Kreatininhalten i proverna har analyserats vid

Laboratoriemedicin på SUS i Lund genom enzymatisk metod (Mazzachi et al., 2000). Justering för kreatinin har visats variera i större utsträckning mellan individer beroende på bland annat kön, vikt och kost (Suquzano et al., 2005) och användes därför inte i den statistiska analysen, endast för beräkning av dagligt intag (ADD) i ekvation 2. I beräkningen i ekvation 2 anges koncentrationen i $\mu\text{g/g}$ kreatinin. Den uppmätta kreatininhalten angavs i enheten mmol/l och räknades om till g/ml genom att multiplicera värdet med molekylvikten för kreatinin ($113,1179 \text{ g/mol}$) och 10^{-6} . Den uppmätta koncentrationen i ng/ml dividerades med 1000 för att få $\mu\text{g/ml}$. Därefter dividerades koncentrationen i $\mu\text{g/ml}$ med kreatininhalten i g/ml för att erhålla den kreatininjusterade koncentrationen i enheten $\mu\text{g/g}$ kreatinin till ekvation 2.

2.6 Sammanställning och statistisk bearbetning

Samtliga provresultat sammanställdes i Microsoft Excel med uppmätta värden och densitetsjusterade värden utifrån beräkningarna i ekvation 1. De uppmätta koncentrationerna i proven som hade värden < 0 justerades enligt standardmetod genom att ta det lägsta uppmätta värdet för det ämnet samma år dividerat med $\sqrt{2}$. All data bearbetades i statistikprogrammet R Studio. Beskrivande statistik med medelvärde, median, standardavvikelse, min och max för varje ämne och varje år sammanställdes för icke-justerade och densitetsjusterade koncentrationer. Även hur stor del av koncentrationerna som låg under detektionsgränsen beskrevs procentuellt.

Trendtest utfördes med linjär regression för de densitetskorrigerade koncentrationerna för varje ämne som beroende variabel och tidpunkt som oberoende variabel. Regression gjordes för medelvärde, median, medelvärdet viktat efter standardavvikelsen ($1/\text{std}$) samt medelvärdet för logaritmerade koncentrationer. Median och viktat medelvärde testades för att undersöka materialet med avseende på tidstrend och minskat inflytande från extremvärden på max och min. Koncentrationerna logaritmerades även för att erhålla normalfördelad data och se om en linjär trend kunde ses i detta fall.

För de ämnen där både medelvärdet och medianen av de uppmätta koncentrationerna låg under detektionsgränsen ($\text{LOD} = 0,1 \text{ ng/ml}$) gjordes inga trendtester, då värden under analysmetodens detektionsgräns är för osäkra.

3 Resultat

3.1 Statistisk analys

För varje år och ämne sammanställdes medelvärde, standardavvikelse, median, minimum och maximum för de uppmätta, icke-korrigerade koncentrationerna i enheten ng/ml för samtliga urinprov (Tabell 4). Detektionsgränsen 0,1 ng/ml gäller för ickejusterade koncentrationer. Den procentuella andelen av värdena under LOD redovisades för att se vilka ämnen som hade majoriteten av koncentrationer över detektionsgränsen och därmed kunde analyseras för tidstrender.

Tabell 4. Beskrivande statistik för koncentration i proverna från samtliga år. Uppmätta koncentrationer anges i ng/ml för varje exponeringsbiomarkör uppdelat på år. Standardavvikelsen (std) anges som \pm för medelvärdet. Andelen prov under detektionsgränsen (LOD) anges i procent (%) i högra spalten. För koncentrationer under 0,1 ng/ml skrivs istället < LOD. N år 2000 = 209, N år 2004 = 197, N år 2009 = 254, N år 2013 = 204. För CCC och MQ är N år 2000 = 196.

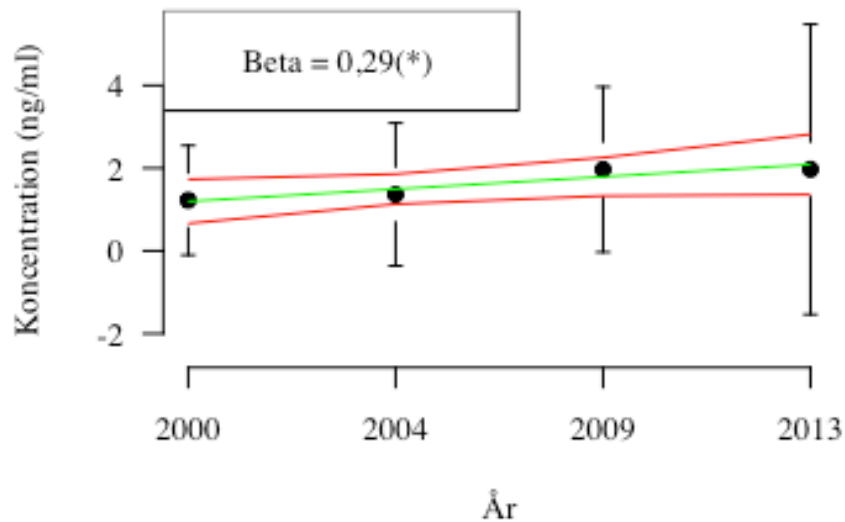
Ämne	År	Medel \pm std	Median	Min	Max	< LOD (%)
OH-T	2000	0,59 \pm 2,4	< LOD	< LOD	25	66
	2004	0,89 \pm 9,3	< LOD	< LOD	130	79
	2009	0,34 \pm 1,1	< LOD	< LOD	8,0	76
	2013	0,39 \pm 1,8	< LOD	< LOD	23	73
OH-P	2000	0,23 \pm 1,8	< LOD	< LOD	26	77
	2004	0,27 \pm 1,4	< LOD	< LOD	19	77
	2009	0,53 \pm 2,1	< LOD	< LOD	29	62
	2013	1,5 \pm 15	< LOD	< LOD	209	63
TEB-OH	2000	< LOD \pm 0,19	< LOD	< LOD	1,7	86
	2004	0,17 \pm 0,49	< LOD	< LOD	4,9	75
	2009	0,34 \pm 2,2	0,11	< LOD	34	47
	2013	0,32 \pm 0,92	0,12	< LOD	9,5	42

Ämne	År	Medel \pm std	Median	Min	Max	< LOD (%)
TCP	2000	1,6 \pm 2,1	1,0	< LOD	22	2,4
	2004	1,7 \pm 2,7	0,98	< LOD	25	2,0
	2009	2,9 \pm 3,4	1,9	0,25	33	0
	2013	2,5 \pm 3,9	1,4	< LOD	43	0,49
CFCA	2000	< LOD \pm < LOD	< LOD	< LOD	0,62	97
	2004	< LOD \pm < LOD	< LOD	< LOD	< LOD	100
	2009	< LOD \pm 0,21	< LOD	< LOD	3,1	93
	2013	< LOD \pm < LOD	< LOD	< LOD	0,60	94
3-PBA	2000	0,28 \pm 0,76	0,14	< LOD	10	41
	2004	0,22 \pm 0,40	0,10	< LOD	3,5	48
	2009	0,44 \pm 0,72	0,23	< LOD	5,2	20
	2013	0,40 \pm 1,2	0,19	< LOD	12	28
2,4-D	2000	0,24 \pm 0,36	0,13	< LOD	3,1	34
	2004	0,18 \pm 0,19	0,13	< LOD	1,1	39
	2009	0,19 \pm 0,30	0,13	< LOD	3,1	36
	2013	0,21 \pm 0,21	0,16	< LOD	1,9	27
4F-3-PBA	2000	< LOD \pm < LOD	< LOD	< LOD	0,58	99
	2004	< LOD \pm < LOD	< LOD	< LOD	< LOD	100
	2009	< LOD \pm < LOD	< LOD	< LOD	0,34	99
	2013	< LOD \pm < LOD	< LOD	< LOD	0,33	99
DCCA	2000	0,33 \pm 0,32	0,23	< LOD	1,9	22
	2004	0,39 \pm 0,73	0,21	< LOD	7,6	25
	2009	0,45 \pm 0,56	0,31	< LOD	4,6	13
	2013	0,37 \pm 0,52	0,27	< LOD	6,2	16
MCPA	2000	< LOD \pm 0,10	< LOD	< LOD	0,79	88
	2004	< LOD \pm 0,11	< LOD	< LOD	1,1	89
	2009	< LOD \pm < LOD	< LOD	< LOD	0,72	88
	2013	< LOD \pm < LOD	< LOD	< LOD	0,91	85
CCC	2000	16 \pm 43	3,7	< LOD	347	0,51
	2004	5,7 \pm 7,2	2,4	< LOD	37	1,0
	2009	16 \pm 30	5,5	< LOD	247	0,79
	2013	5,1 \pm 7,7	1,8	< LOD	51	3,4
MQ	2000	< LOD \pm 1,8	0,27	< LOD	16	35
	2004	1,6 \pm 2,2	0,73	< LOD	13	19
	2009	2,3 \pm 5,5	0,71	< LOD	59	19
	2013	1,4 \pm 5,8	0,28	< LOD	80	30

3.2 Analys för tidstrender

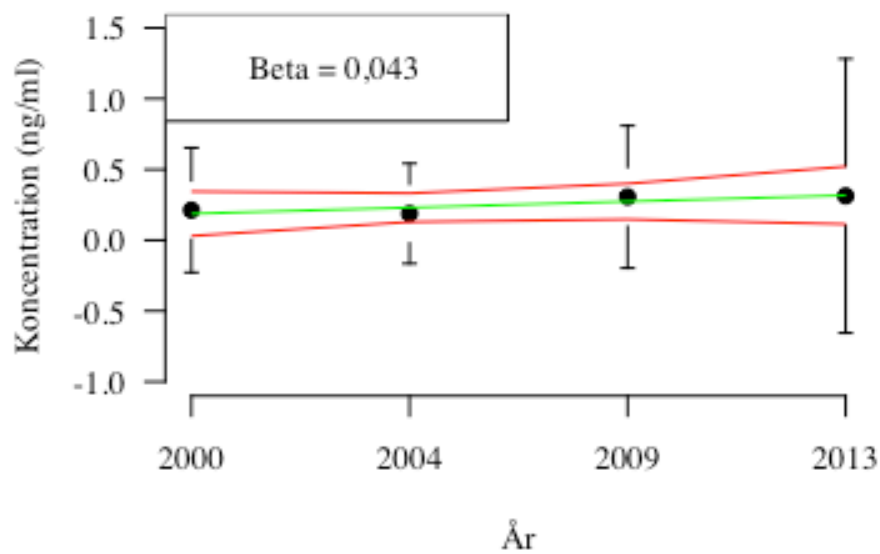
Nedan redovisas trendanalys i form av linjär regression för de exponeringsbiomarkörer som hade minst hälften av värdena samt medel och median över detektionsgränsen för de icke-korrigerade koncentrationerna. Trendanalys gjordes på densitetskorrigerade koncentrationer för TCP (Figur 1), 3-PBA (Figur 2), 2,4-D (Figur 3), DCCA (Figur 4), CCC (Figur 5) samt MQ (Figur 6). Linjär regression med tidpunkt som oberoende variabel gjordes för medelvärde, median, medelvärde viktat för standardavvikelsen ($1/\text{std}$) samt medelvärdet för logaritmerade koncentrationer vid de olika mätpunkterna år 2000, 2004, 2009 och 2013. Resultat för linjär regression redovisas i rapporten endast för viktade medelvärden, då liknande resultat erhöles oberoende av vilket mått som användes. Förändringen över tid visas grafiskt för viktat medelvärde med en färgad linje där beta-värdet anger linjens lutning. Ett positivt beta-värde anger en ökande trend över tid, medan ett negativt värde anger en minskande trend. Trendens signifikans i form av p-värde anges endast när signifikans finns där (*) = $p < 0,1$, * = $p < 0,05$ och ** = $p < 0,01$.

MEDELVÄRDE AV TCP PER ÅR VIKTAT



Figur 1. Linjär regression av halter av exponeringsbiomarkören TCP (klorpyrifos). Tidstrendsanalys av densitetsjusterade halter av TCP över tid. Linjär regression visas för medelvärdet viktat för standardavvikelsen (1/std). Svarta staplar representerar en standardavvikelse. Färgad linje i mitten representerar lutningen för förändring över tid, Beta-värdet anger linjens lutning, röda linjer visar 95 % konfidensintervall för linjen. Eventuell signifikans anges vid beta som (*) = $p < 0,1$, * = $p < 0,05$ och ** = $p < 0,01$.

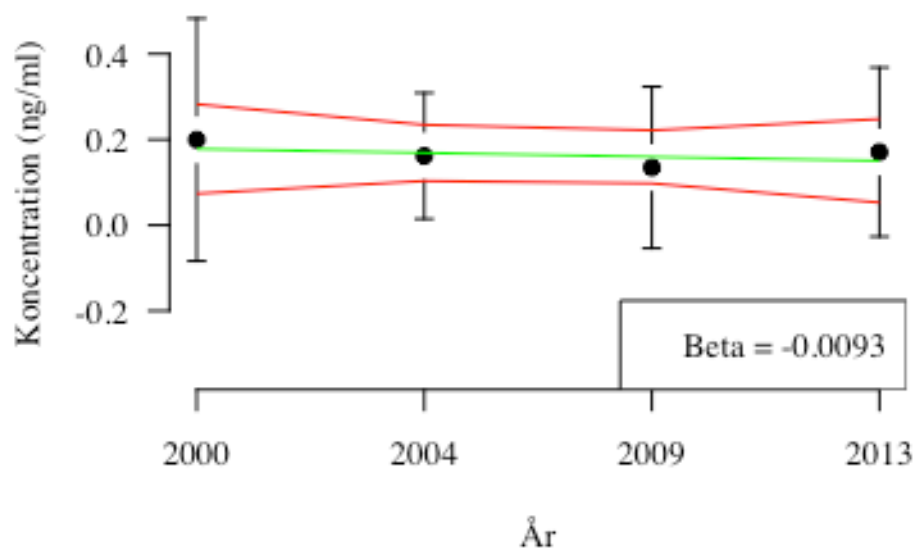
MEDELVÄRDE AV 3-PBA PER ÅR VIKTAT



Figur 2. Linjär regression av halter av exponeringsbiomarkören 3-PBA (flera pyretroider).

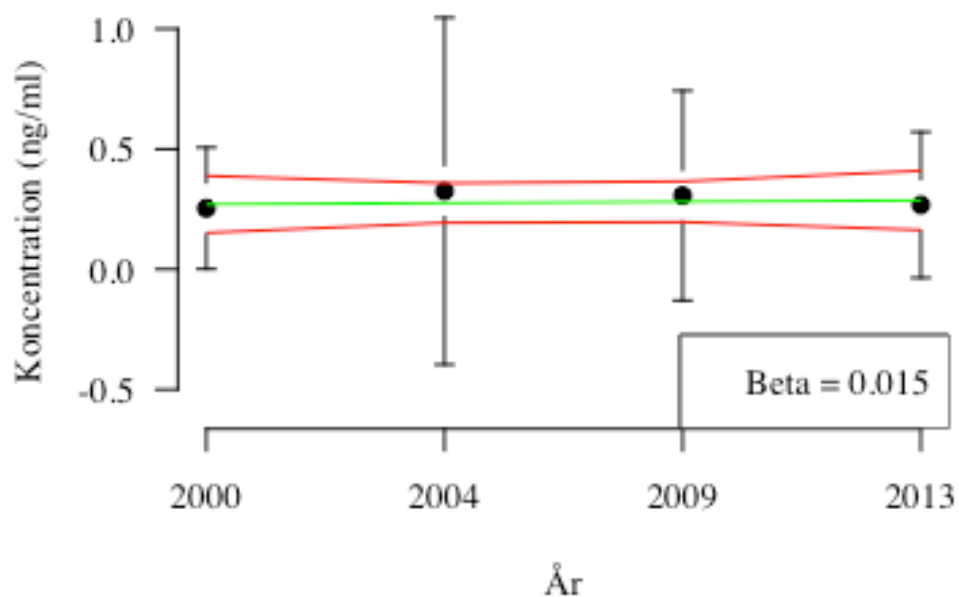
Tidstrendsanalys av densitetsjusterade halter av 3-PBA över tid. Linjär regression visas för medelvärdet viktat för standardavvikelsen (1/std). Svarta staplar representerar en standardavvikelse. Färgad linje i mitten representerar lutningen för förändring över tid, Beta-värdet anger linjens lutning, röda linjer visar 95% konfidensintervall för linjen. Ingen signifikans för $p < 0,1$ finns.

MEDELVÄRDE AV 2,4-D PER ÅR VIKTAT



Figur 3. Linjär regression av halter av exponeringsbiomarkören 2,4-D. Tidstrendsanalys av densitetsjusterade halter av 2,4-D över tid. Linjär regression visas för medelvärdet viktat för standardavvikelsen (1/std). Svarta staplar representerar en standardavvikelse. Färgad linje i mitten representerar lutningen för förändring över tid, Beta-värdet anger linjens lutning, röda linjer visar 95% konfidensintervall för linjen. Ingen signifikans för $p < 0,1$ finns.

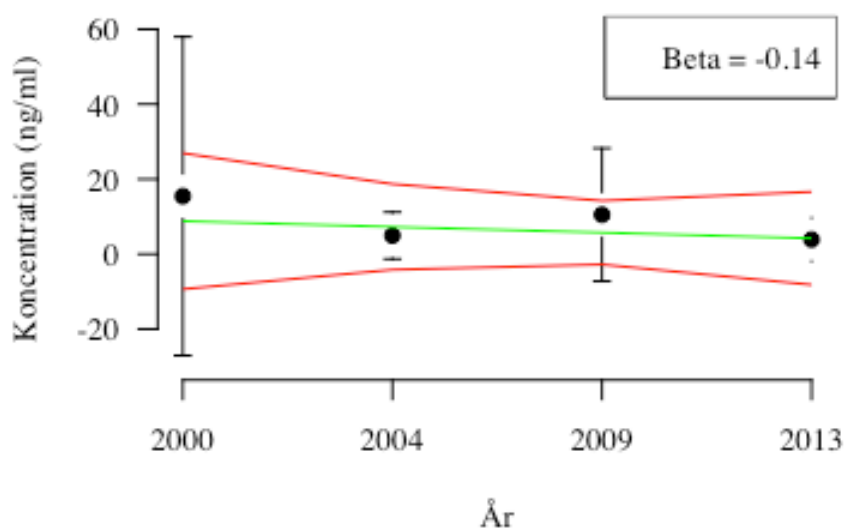
MEDELVÄRDE AV DCCA PER ÅR VIKTAT



Figur 4. Linjär regression av halter av exponeringsbiomarkören DCCA (flera pyretroider).

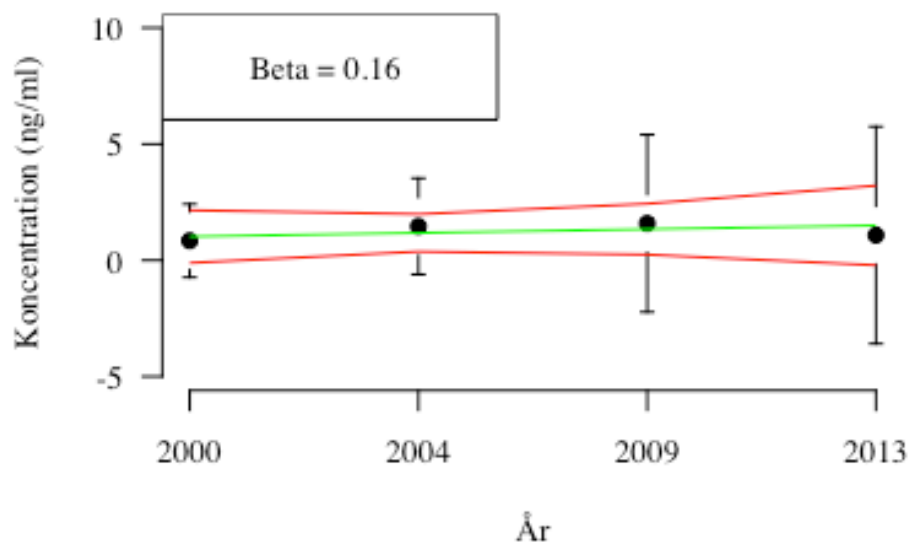
Tidstrendsanalys av densitetsjusterade halter av DCCA över tid. Linjär regression visas för medelvärdet viktat för standardavvikelsen (1/std). Svarta staplar representerar en standardavvikelse. Färgad linje i mitten representerar lutningen för förändring över tid, Beta-värdet anger linjens lutning, röda linjer visar 95% konfidensintervall för linjen. Inget signifikant samband för $p < 0,1$ finns.

MEDELVÄRDE AV CCC PER ÅR VIKTAT



Figur 5. Linjär regression av halter av exponeringsbiomarkören CCC (klormekvat). Tidstrendsanalys av densitetsjusterade halter av CCC över tid. Linjär regression visas för medelvärdet viktat för standardavvikelsen (1/std). Svarta staplar representerar en standardavvikelse. Färgad linje i mitten representerar lutningen för förändring över tid, Beta-värdet anger linjens lutning, röda linjer visar 95% konfidensintervall för linjen. Inget signifikant samband för $p < 0,1$ finns. Notera att y-axelns skala skiljer sig mellan respektive diagram.

MEDELVÄRDE AV MQ PER ÅR VIKTAT



Figur 6. Linjär regression av halter av exponeringsbiomarkören MQ (mepikvat). Tidstrendsanalys av densitetsjusterade halter av MQ över tid. Linjär regression visas för medelvärdet viktat för standardavvikelsen (1/std). Svarta staplar representerar en standardavvikelse. Färgad linje i mitten representerar lutningen för förändring över tid, Beta-värdet anger linjens lutning, röda linjer visar 95% konfidensintervall för linjen. Inget signifikant samband för $p < 0,1$ finns.

3.3 Beräkning av uppskattat dagligt intag

För de ämnen med högst mätbara koncentrationer beräknades ett uppskattat dagligt intag av ämnet utifrån den uppmätta halten i urinproven. Ekvation 2 användes för att uppskatta det dagliga intaget av klorpyrifos och klormekvat, då dessa ämnen återfanns i högst mätbara halter. I ekvationen användes kreatininjusterade koncentrationer för respektive exponeringsbiomarkör. I tabell 5 nedan visas vilka värden som använts för varje variabel för respektive bekämpningsmedel samt var dessa är hämtade. För klormekvat är halveringstiden ($t_{1/2}$) ett uppskattat snittvärde, eftersom halveringstiden förändras efter ca 13 h enligt exponeringsmätningar i Lindh et al (2011). Som koncentration valdes halten vid 70, 80, 90 och 95-percentilen för kreatininjusterade halter för respektive ämne samtliga år. Resultaten av beräkningen för respektive percentil i tabell 5 från ekvation 2 redovisas i tabell 6.

Tabell 5. Variabler för beräkning av ADD.

Värden för variablerna i ekvation 2 specifika för klorpyrifos och klormekvat för beräkning av uppskattat dagligt intag av respektive ämne.

Variabel	Klorpyrifos (TCP)	Klormekvat (CCC)
<i>C</i> 70-percentil ($\mu\text{g/g}$ kreatinin)	1,28	5,28
R_{mw}	1,77 ^b	1 ^c
<i>CF</i> (%)	70 ^a	100 ^c
$t_{1/2}$ (dygn)	1,13 (27 h) ^a	0,208 (5 h) ^c

^aNolan et al., 1984

^bvan Wendel de Joode et al., 2012

^cLindh et al., 2011

Tabell 6. Beräkning av ADD för TCP och CCC.

Beräknade värden av ADD för TCP och CCC vid olika percentiler av provens koncentrationer.

		Percentil	70	80	90	95
Klorpyrifos	<i>C</i> ($\mu\text{g/g}$ kreatinin)		1,28	1,65	2,51	3,72
	ADD ($\mu\text{g/kg/dag}$)		0,015	0,019	0,029	0,043
Klormekvat	<i>C</i> ($\mu\text{g/g}$ kreatinin)		5,28	8,39	15,8	22,6
	ADD ($\mu\text{g/kg/dag}$)		0,198	0,315	0,593	0,849

4 Diskussion

4.1 Kommentar till analysresultaten

De exponeringsbiomarkörer som hade högst mätbara halter över åren var TCP och CCC där majoriteten av koncentrationerna låg runt eller över 1 ng/ml (Tabell 4, Figur 1 & 5). Detta resultat stämmer överens med tidigare studier från Arbets- och Miljömedicin där en utbredd exponering för TCP och CCC förekommit i andra grupper från allmänbefolkningen (Littorin et al., 2011; Littorin et al., 2013). Det går därmed att konstatera att en viss exponering för dessa ämnen förekommit i denna urvalsgrupp under samtliga år då proven tagits, trots att unga män genom sina matvanor är relativt oexponerade för pesticider (Folkhälsoinstitutet, 2011; Folkhälsoinstitutet, 2012; Littorin et al., 2013).

Exponeringsbiomarkörerna 2,4-D, 3-PBA, DCCA och MQ kunde påvisas i majoriteten av proven men halterna var låga (0,1 – 1 ng/ml). En viss exponering förekommer alltså i majoriteten av urinproven, men i väldigt låga halter (Tabell 4). I tidigare studier från Arbets- och Miljömedicin som undersökt andra grupper har halterna varit betydligt högre. Inga statistiskt signifikanta trender förekom för dessa biomarkörer (Figur 2 - 4 & 6).

Övriga exponeringsbiomarkörer OH-T, OH-P, TEB-OH, CFCA, 4F-3-PBA och MCPA förekom i majoriteten av de uppmätta koncentrationerna under detektionsgränsen på 0,1 ng/ml (Tabell 4) och trender gick därmed inte att utvärdera med statistiska analyser. Samtliga av dessa ämnen förekommer alltså i så låga halter att inga slutsatser kan dras förutom att exponeringen är mycket låg eller inte förekommer i denna grupp. Trots att inga trendtester gjordes för dessa exponeringsbiomarkörer verkar halterna av TEB-OH och även OH-P ha ökat vid år 2009 och 2013 jämfört med tidigare år (Tabell 4). Både medel och median låg under LOD för exponeringsbiomarkören TEB-OH de första åren, men är detekterbar vid senare tillfällen. För OH-P gäller detta främst för medelvärdet. Exponering för dessa exponeringsbiomarkörer ser alltså ut att förekomma vid de senare mättillfällena, dock ingen statistiskt säkerställd ökning.

Förändringen över tid testades med linjär regression där det för TCP fanns en signifikant ökning över tid med en lutning (β) på 0,29 för viktade medelvärden (Figur 1) samt 0,28 för medelvärden (Bilaga 2). Detta är ingen stark signifikans, då p-värdet låg på ungefär 0,06 men ändå en ökande trend. Även om det finns en något ökande trend är det ingen stor ökning i koncentration, utan fortfarande en mycket liten förändring i exponering.

Det ser ut att vara en något ökande trend även för 3-PBA, DCCA och MQ i samtliga regressionsanalyser, dock inte statistiskt signifikant, då samtliga analyser gav ett p-värde större än 0,1 (Figur 2, 4 & 6). För MQ visade dock linjär regression för medianen en något minskande trend mellan åren. Denna figur redovisas dock ej i resultaten men tendensen syns även i Tabell 4 för de icke-justerade koncentrationerna. Vid jämförelse av medianvärden mellan åren får extremvärden mindre inflytande, vilket kan innebära att en ökande trend för medelvärden ses endast på grund av att maxvärdena för år 2009 och 2013 är mycket höga (Tabell 4). För 2,4-D och CCC ser halterna ut att minska över tid, dock inte en statistiskt signifikant minskning, då p-värdet även i dessa fall var över 0,1.

Vad gäller fördelningen av koncentrationerna och hur de förändras mellan åren går variationen av låga och höga extremvärden att utläsa i Tabell 4 samt genom standardavvikelsen i Figur 1 - 6. Även om medel och median inte förändras avsevärt över tid kan fördelningen och de antal prov som har högre värden förändras. För TCP ser antal prover i de något högre koncentrationerna ut att ha ökat år 2009 och 2013 jämfört med de tidigare åren (Tabell 4 & Figur 1). För 3-PBA verkar det finnas fler något högre koncentrationer år 2009 jämfört tidigare år, dock inte år 2013 där det dock förekommer mycket högre extremvärden än föregående år (Tabell 4). För 2,4-D ser spridningen och antalet högre koncentrationer ut att förekomma år 2000 och minska de senare tidpunkterna (Tabell 4 & Figur 3). För DCCA varierar antalet höga värden något mellan varje tidpunkt i en ganska ojämn spridning (Figur 4). För CCC förekommer flest höga koncentrationer och högst extremvärden år 2000 men flest låga värden år 2004 och 2013 (Tabell 4 & Figur 5). För MQ finns en större spridning av höga koncentrationer under år 2009 men även under år 2013 (Tabell 4 & Figur 6).

Fördelningen mellan åren är svår att jämföra statistiskt, men en ökad mängd höga värden går att urskilja för vissa ämnen över åren, bland annat TCP och 3-PBA. Detta tyder på att den ökande trenden som förekommer för TCP främst kan

förklaras av ett fåtal prover med högre värden, och inte en generell ökning hos hela urvalsgruppen (Tabell 4).

4.2 Tolkning av resultaten

Anmärkningsvärt är att de exponeringsbiomarkörer som det förekommer högst koncentrationer av generellt i urvalsgruppen är CCC och TCP. Klorpyrifos (TCP) är inte tillåtet i svensk produktion men verkar trots det vara ett av de ämnen som urvalsgruppen unga män är mest exponerade för, dock fortfarande relativt låga halter. Då hälsoproblem relaterade till organofosfater som klorpyrifos varit kända länge och aktualiserats på senare år (Bouchard et al., 2000; Bouchard et al., 2011; Engel et al., 2011; Rauh et al., 2011; Ki et al., 2013; del Pino et al., 2015;), är det intressant att detta ämne ändå förekommer i högre mätbara halter än samtliga andra exponeringsbiomarkörer, undantaget CCC, som ingår i denna studie. En delförklaring till halterna av exponeringsbiomarkören TCP kan dock också vara att denna exponeringsbiomarkör även verkar förekomma i redan nedbruten form i bland annat mat (Morgan et al., 2011). Endast en del av den halten av TCP kan kopplas till exponeringen för klorpyrifos. Resterande andel står för direkt exponering för TCP som inte bryts ner ytterligare i kroppen, utan också detekteras som TCP i urinprov. Detta försvårar bedömningen av graden av exponering för klorpyrifos självt.

Den enda signifikant ökande tidstrenden var för halten av TCP. Möjliga förklaringar till varför exponeringen för klorpyrifos verkar öka kan dels vara ett förändrat mönster i matvanor eller möjligen att sammansättningen i urvalsgruppen förändrats över tid vid de tidpunkter då proverna samlats in. Enligt Statistiska Centralbyrån (2016) har andelen pengar som läggs på att äta ute på restaurang/kafé ökat sedan 1990-talet fram till idag. Det är även visat, att den yngre delen av populationen lägger mer pengar på att äta ute än äldre personer. Restaurangernas intäkter har också ökat markant under denna tidsperiod (Björnsbacka, 2016). Restaurangmaten kan till stor del bestå av importerade livsmedel och därmed innehålla klorpyrifos. Samtidigt minskar uteätandet konsumentens eget val av livsmedel och möjlighet att kunna välja svenskproducerade eller ekologiska matvaror som inte innehåller klorpyrifos. Den andra möjliga förklaringen skulle kunna vara sammansättningen av urvalsgruppen. Om det mellan tidpunkterna tillkommit fler individer med annan matkultur eller invandrabakgrund skulle detta kunna bidra till en något högre

exponering för klorpyrifos från importerade livsmedel, vilket påvisats i en annan studie som undersökt denna urvalsgrupp (Littorin et al., 2009). Dessutom ingick kvinnor i urvalsgruppen från år 2013 till skillnad från de andra åren och kvinnor konsumerar vegetabilier och frukt i större utsträckning än män (Statens folkhälsoinstitut, 2011; Statens folkhälsoinstitut, 2012).

Högst halter förekommer för tillväxtregulatorn CCC, som alltså används vid odling av spannmål. Spannmålsprodukter är förmodligen något som den generella befolkningen är mer exponerade för via sin kost genom bland annat bröd, pasta och liknande produkter. CCC används endast i råg i Sverige men i andra länder i såväl olika typer av spannmål inklusive vete som i vegetabilier. Troligen härrör urinhaltarna av CCC till stor del från importerade produkter. Att livsmedel baserade just på spannmål och de har ett större intag av sådana produkter jämfört med andra urvalsgrupper (Statens folkhälsoinstitut, 2011). Däremot har de unga männen låga halter av bekämpningsmedelsrester som härrör från bekämpning i frukt- och grönsaksodling. I en tidigare studie från Arbets- och miljömedicin av exponering för dessa bekämpningsmedel inom urvalsgruppen medelålders kvinnor observerades relativt de unga männen högre halter av sådana resthalter (Littorin et al., 2013). Den studien inkluderade även information om vilka livsmedel varje individ konsumerat under perioden före insamling av urinprov, till skillnad från föreliggande studie.

En anledning till att halterna av klormekvat tenderar att minska kan förmodligen vara på att nya retarderare har introducerats (kloroprofam) eller att godkända produkter fått utökat användningsområde (etefon) under den här aktuella tidsperioden. Vidare har Moddus M med verksamma substansen trinexpak liksom etefon godkänts för användning på fler spannmål än klormekvat i Sverige (Kemikalieinspektionen, 2016). Dessa ämnen är dock inte inkluderade i analysen i denna studie men en ökad användning av dessa kan vara en förklaring till varför klormekvat ser ut att minska.

Uppskattningen av genomsnittligt dagligt intag (ADD) för klorpyrifos låg under EU's gränsvärden för acceptabelt dagligt intag (ADI) som är 0,001 mg/kg/kroppsvikt per dag och den akuta referensdosen (ARfD) på 0,005 mg/kg/kroppsvikt. För 90- och 95-percentilen var beräknat ADD 0,029 och 0,04 µg/kg/dygn (Tabell 6). I andra länder som USA används även ett gränsvärde för kronisk referensdos för långtidsexponering (US EPA, 2016). Detta gränsvärde från US EPA ligger på 0,3 µg/kg/dygn, vilket halterna över 95-percentilen börjar närma sig i storleksordning. Inga gränsvärden överskrids dock, och halterna

betraktas därmed som under de som anses hälsoskadliga enligt nämnda myndigheter. Gränsvärden för klormekvat är högre med ADI på 0,04 mg/kg/kroppsvikt per dygn och ARfD på 0,09 mg/kg/kroppsvikt. Beräknat ADD vid 95-percentilen är för klormekvat 0,85 µg/kg/dygn. Ingen kronisk referensdos finns för klormekvat enligt US EPA. Inget av ämnena anses därmed uppnå hälsoskadliga nivåer, dock ligger klorpyrifos närmare dessa gränsvärden än vad halterna av klormekvat gör. Dessa uppskattningar bör dock beaktas med försiktighet då beräkningen ger en väldigt grov uppskattning av det dagliga intaget och inte heller tar hänsyn till samtidig annan exponering. Det bör även uppmärksammas att denna urvalsgrupp inte är representativ för hela befolkningen då endast unga män ingår i studien.

En diskussionsfråga som väckts av bland annat Das et al (2008) är hur olika bekämpningsmedel och miljögifter utvärderas med avseende på risk för hälsopåverkan hos människor och även djur. Det finns idag standardmetoder uppsatta av olika myndigheter med vilka tester som krävs, och dessa är oftast baserade på akut toxicitet. Dock är den långsiktiga exponeringen för lägre halter som vi utsätts för dagligen något som mer och mer uppmärksammas som en potentiell risk. Trots att många av ämnena i denna studie förekommer i låga halter, i vissa fall precis vid detektionsgränsen, bör ändå observeras att denna nivå är densamma som både hormon och andra signalsubstanser i kroppen. Då flera ämnen befars vara hormon- och reproduktionsstörande och därmed verkar på samma målorgan är det inte osannolikt att det ger en fysisk påverkan (Bergman et al., 2012). Koncentrationerna i denna studie ligger långt under gränsvärden för både akut exponering och dagligt intag. Gränsvärden bör inte ses som en garanterad strikt gräns för vad som kan vara skadligt eller ej.

4.3 Metod och provunderlag

De två metoder som använts bygger på samma tillvägagångssätt. Avdelningen för Arbets- och miljömedicin i Lund är dessutom med i ett kvalitetskontrollprogram mellan olika analyslaboratorier samordnat av University of Erlangen-Nuremberg, vilket även stärker analysmetodernas kvalitet (Elfman et al., 2009).

Proverna som använts i denna studie har förvarats i frys sedan insamling. Dock går det inte att utesluta att den långa förvaringen kan ha påverkat provernas sammansättning och kvalitet. Även om proverna analyserats samtidigt år 2016 har de varit frysta under olika långa perioder vilket kan ha haft en inverkan på resultaten, framför allt vad gäller densiteten då största risken med längre förvaring är dunstning av proverna. Detta verkar dock inte ha påverkat, då jämförelse av medelvärden och median av provernas densitet mellan de olika åren inte förändras

i större utsträckning utan ligger i samma storleksordning (Bilaga 1). Även om proverna tagits fram vid enstaka tillfällen och tinats i samband med andra mätningar som gjorts så verkar densiteten alltså inte påverkats med avseende på hur länge de förvarats i frys. Tidigare studier har undersökt stabiliteten hos exponeringsbiomarkörer i urinprov som förvarats ca 5-7 månader, och efter den tidsperioden sågs ingen skillnad i koncentration (Lindh et al., 2011; Ekman et al., 2014). Dock går det inte att helt utesluta att stabiliteten hos exponeringsbiomarkörer kan ha påverkats hos proverna, då vissa lagrats i frys upp till 16 år. Studier av stabilitet hos exponeringsbiomarkörer av bekämpningsmedelsrester i biologiska prover som förvaras under så lång tid finns inte idag.

5 Slutsatser

- Exponeringen för bekämpningsmedel i urvalsgruppen unga män mellan år 2000 och 2013 var högst för exponeringsbiomarkören TCP från klorpyrifos och för klormekvat (CCC). Detta resultat stämmer överens med tidigare studier från Arbets- och Miljömedicin.
- En svagt signifikant ökande linjär trend ($p < 0,07$) fanns för TCP mellan tidpunkterna, dock en relativt låg ökning med lutningen $\beta = 0,28$ för medelvärde och $\beta = 0,29$ för viktat medelvärde (1/std).
- Detekterbara men låga halter förekom för exponeringsbiomarkörerna 2,4-D, MCPA, DCCA och MQ, dock precis ovanför detektionsgränsen för metoden.
- Anmärkningsvärt är att klorpyrifos (TCP) var ett av två ämnen som förekom i högst halter i urvalsgruppen, samt att en ökande trend fanns för exponeringen. Ämnet har sedan länge fasats ut nationellt men används fortfarande både inom EU och övriga länder.
- Klormekvat (CCC) som förekom i högst halter är tillåten i både Sverige och EU främst för spannmålsproduktion. Den högre exponeringen för detta ämne jämfört med andra exponeringsbiomarkörer kan förklaras av att urvalsgruppen unga män konsumerar relativt mycket av livsmedel som bröd, pasta och liknande men mindre av grönsaker och frukt i förhållande till andra grupper som medelålders kvinnor.
- Halterna vid 95-percentilen för klorpyrifos och klormekvat ligger under EU's uppsatta gränsvärden för dagligt rekommenderat intag (ADI) och akut referensdos (ARfD) och betraktas därmed inte som hälsoskadliga. Klorpyrifos låg närmare gränsvärdena, framförallt vad gäller den kroniska referensdosen som används i USA.

6 Tackord

Ett stort tack riktas till Christian Lindh på Arbets- och Miljömedicin som handlett arbetet och låtit mig delta i detta intressanta projekt. Även ett stort tack till Daniel Oudin Åström för all tid han lagt ner på att diskutera och handleda utformningen av de statistiska analyser och det statistikprogram som använts. Tack till Margareta Maxe, biomedicinsk analytiker på Arbets- och Miljömedicin, som analyserat alla prover som ingått i studien och som även gett inblick i analysmetoden. Jag vill även tacka Nina Reistad som handlett kursens gruppseminarier, samt de andra gruppdeltagarna för all hjälp under projektets gång. Tack till Jonatan Henriksson som hjälpt till med både beräkningar och kodning i statistikprogram. Vill även tacka Kristina Arnebrant på Biologibiblioteket för all ovärderlig hjälp och tips med olika sökmotorer och referenser. Ett extra stort tack riktas till Margareta Littorin som med både sin fördjupade kunskap och sitt stora intresse för detta ämnesområde varit till stor hjälp i arbetet!

7 Referenser

Agribusiness Intelligence. 1996. Publicerad 1996-03-01. [<https://www.agranet.com/agra/agrow/correction--bifenthrin-not-banned-in-sweden-51989.htm>] Hämtad online 2016-05-12.

Axelsson, O., Sundell, L. 1974. Herbicide exposure, mortality and tumor incidence. An epidemiologic investigation on Swedish railroad workers. *Work, Environment and Health*. 11. 21-28 pp.

Axelsson, O., Sundell, L., Andersson, K., Edling, C., Hogstedt, C., Kling, H. 1980. Herbicide exposure and tumor mortality. An updated epidemiologic investigation on Swedish railroad workers. *Scandinavian Journal of Work, Environment & Health*. 6:1. 73-79 pp.

Axmon, A., Axelsson, J., Jakobsson, K., Lindh, C., Jönsson, B. 2014. Time trends between 1987 and 2007 for perfluoralkyl acids in plasma from Swedish women. *Chemosphere* 102. 61-67 pp.

Aylward, L.L. & Hays, S.M. 2015. Interpreting biomonitoring data for 2,4-dichlorophenoxyacetic acid: Update to Biomonitoring Equivalents and population biomonitoring data. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 73:3. 765-769 pp.

Bergman, Å., Heindel, J., Jobling, S., Kidd, K. and Zoeller, R.T., 2012. State-of-the-science of endocrine disrupting chemicals, 2012. *Toxicology Letters*, 211, p. S3.

Bessaire, T., Tarres, A., Stadler, R.H., Wermann, S., Hofmann, J., Theurillat, V., Combremont, R., Delatour, T. 2016. Mepiquat: A process-induced byproduct in roasted cereal-based foodstuffs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 64:5. 1185-1190 pp.

Betarbet, R., Sherer, T.B., MacKenzie, G., Garcia-Osuna, M., Panov, A.V., Greenamyre, T.J. 2000. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nature Neuroscience*. 3:12. 1301-1306 pp.

- Björnsbacka, S. 2016. Statistiska Centralbyrån – Svenskarna äter ute mer. Publicerad 2016-04-19 [<http://www.scb.se/sv/Hitta-statistik/Artiklar/Svenskarna-ater-ute-mer/>] Hämtad 2016-05-05.
- Bouchard, M.F., Bellinger, D.C., Wright, R.O., Weisskopf, M.G. 2010. Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder and Urinary Metabolites of Organophosphate Pesticides. *Pediatrics*. 125. 1270-1277 pp.
- Bouchard, M.F., Chevrier, J., Harley, K.G., Kogut, K., Vedar, M., Calderon, N., Trujillo, C., Johnson, C., Bradman, A., Barr, D.B., Eskenazi, B. 2011. Prenatal exposure to organophosphate pesticides in IQ in 7-year-old children. *Environmental Health Perspective*. 119:8. 1189 – 1195 pp.
- Chen, H., Xiao, J., Hu, G., Zhou, J., Xiao, H., Wang, X. 2002. Estrogenicity of organophosphorus and pyrethroid pesticides. *Journal of Toxicology and Environmental Health*. 65:19. 1419-1435 pp.
- Danielsen, V. and Larsen, A.E. (1992) The Influence of Cereals Treated with CCC, Cerone or Roundup on Reproduction in Pigs. 43rd Annual Meeting of the EAAP, Abstracts Volume 2, p. 498.
- Das, R., Steege, A., Baron, S., Beckman, J., Harrison, R. 2001. Pesticide-related illness among migrant farm workers in the United States. *International Journal of Occupational Environmental Health*. 7:4. 303 – 312 pp.
- Ding, G., Shi, R., Gao, Y., Zhang, Y., Kamijima, M., Sakai, K., Wang, G., Feng, C., Tian, Y. 2012. Pyrethroid pesticide exposure and risk of childhood acute lymphocytic leukemia in Shanghai. *Environmental Science Technology*, 46. 13480–13487 pp.
- Ekman, E., Maxe, M., Littorin, M., Jönsson, B., Lindh, C. 2013. High-throughput method for the analysis of ethylenethiourea with direct injection of hydrolysed urine using online on-column extraction liquid chromatography and triple quadrupole mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*. 934. 53-59 pp.
- Ekman, E., Faniband, M.H., Littorin, M., Maxe, M., Jönsson, B., Lindh, C. 2014. Determination of 5-hydroxythiabendazole in human urine as a biomarker of exposure to thiabendazole using LC/MS/MS. *Journal of Chromatography B*. 973. 61-67 pp.

Elfman, L., Hogstedt, C., Engvall, K., Lampa, E., Lindh, C.H. 2009. Acute Health Effects on Planters of Conifer Seedlings Treated with Insecticides. *Annals of Occupational Hygiene*. 53:4. 383 – 390 pp.

Engel, S.M., Wetmur, J., Chen, J., Zhu, C., Barr, D.B., Canfield, R.L., Wolff, M.S. 2011. Prenatal exposure to Organophosphates, Paraoxonase 1, and cognitive development in childhood. *Environmental Health Perspective*. 119:8. 1182 – 1188 pp.

European Union. 2016. Pesticide database.

[<http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=homepage&language=EN>]

EFSA, European Food Safety Authority. 2008. Conclusion regarding the peer review of the pesticide risk assessment of the substance mepiquat. Rapport 146. 73 p.

EFSA, European Food Safety Authority. 2011. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance bifenthrin. *EFSA Journal* 2011. 9:5. 101 p.

Egeghy, P.P. Cohen Hubal, E.A., Tulse, N.S., Melnyk, L.J., Morgan, M.K., Fortmann, R.C., Sheldon, L.S. 2011. Review of pesticide urinary biomarker measurements from selected US EPA children's observational exposure studies. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 8:5. 1727 – 1754 pp.

Eriksson, M., Hardell, L., Carlberg, M., Akerman, M. 2008. Pesticide exposure as risk factor for non-Hodgkin lymphoma including histopathological subgroup analysis. *International Journal of Cancer*. 123. 1657 – 1663 pp.

Faustini, A., Settini, L., Pacifici, R., Fano, V., Zuccaro, P., Forastiere, F. 1996. Immunological changes among farmers exposed to phenoxy herbicides: preliminary observations. *Occupational & Environmental Medicine*. 53. 583-585 pp.

Gunnarsson, L-G. & Bodin, L. 2014. Systematiska kunskapsöversikter; 6. Epidemiologiskt påvisade samband mellan Parkinsons sjukdom och faktorer i arbetsmiljön. Göteborg: Arbets- och miljömedicin, Göteborgs Universitet.

Han, Y., Xia, Y., Han, J., Zhou, J., Wang, S., Zhu, P., Zhao, R., Jin, N., Song, L., Wang, X. 2008. The relationship of 3-PBA pyrethroids metabolite and male reproductive hormones among non-occupational exposure males. *Chemosphere*: 62. 785–790 pp.

IARC, 1991. Monographs of the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. 53. 45 – 92 pp.

Jakubowski, M & Trzcinka-Ochocka, M. 2005. Biological monitoring of exposure: trends and key developments. *Journal of Occupational Health*. 47:1. 22 – 48 pp.

Jamal, G.A. 1997. Neurological syndroms of organophosphorus compounds. *Adverse Drug Reactions and Toxicological Reviews*. 16:3. 133-170 pp.

Jansson, A., Fohgelberg, P. & Widenfalk, A. 2015a. Kontroll av bekämpningsmedelsrester i livsmedel 2013. Rapport 4 2015. Livsmedelsverket.

Jansson, A., Fohgelberg, P., Widenfalk, A. 2015b. Kontroll av bekämpningsmedelsrester i livsmedel 2014. Livsmedelsverket Rapport 19 år 2015.

Ji, GX., Xia, YK., Gu, AH., Shi, XG., Long, Y., Song, L., Wang, SL., Wang, XR. 2011. Effects of non-occupational environmental exposure to pyrethroids on semen quality and sperm DNA integrity in Chinese men. *Reproductive Toxicology*. 31:2. 171-176 pp.

Jonsson, M, Fohgelberg, P., Wallin, S., Jansson, A. 2007. Tidstrend och förändringar av bekämpningsmedelsrester I livsmedel mellan åren 1990 och 2005. Livsmedelsverket resultatrapport 2007.

Jönsson, B.A.G., Axmon, A., Lindh, C., Hydbom, A.R., Axelsson, J., Giwercman, A., Bergman, Å. 2010. Tidstrender för och halter av persistenta fluorerade, klorerade och bromerade organiska miljögifter i serum samt ftalater i urin hos unga svenska män – Resultat från den tredje uppföljningsundersökningen år 2009-2010. Rapport till Naturvårdsverket. Avdelningen för Arbets- och miljömedicin, Lunds Universitet, Lund. 37 s.

Jönsson, B.A.G., Axmon, A, Lindh, C.H. 2014. Tidstrender för och halter av perfluorerade alkylysyror (PFAAs) i serum samt ftalatmetaboliter och alkylfenoler

i urin hos unga svenska män och kvinnor – Resultat från den fjärde uppföljningsundersökningen år 2013. Rapport till Naturvårdsverket. Avdelningen för Arbets- och miljömedicin, Lunds Universitet, Lund. 33 s.

Kemikalieinspektionen. 2016. Bekämpningsmedelsregistret.

[<http://webapps.kemi.se/BkmRegistret/Kemi.Spider.Web.External/>]

Ki, Y.W., Park, J.H., Lee, J.E., Shin, I.C., Koh, H.C. 2013. JNK and p38 MAPK regulate oxidative stress and the inflammatory response in chlorpyrifos-induced apoptosis. *Toxicology Letters*. 218. 235-245 pp.

Kjeldsen, L.S., Ghisari, M., Bonefeld-Jørgensen, E.C. 2013. Currently used pesticides and their mixtures affect the function of sex hormone receptors and aromatase enzyme activity. *Toxicology and Applied Pharmacology* 272:2. 453-464 pp.

Langhammer, M., Kuhla, S., Schneider, F., Renne, U., Spitschak, M., Hagemester, H. 1999. Effects of chlorocholine chloride-treated wheat on special fertility traits in laboratory mice. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 81:4-5. 190 – 202 pp.

Lee, S.J., Mehler, L., Beckman, J., Diebolt-Brown, B., Prado, J., Lackovic, M., Waltz, J., Mulay, P., Schwartz, A., Mitchell, Y., Moraga-McHaley, S., Gergely, R., Calvert, G.M. 2011. Acute pesticide illnesses associated with off-target pesticide drift from agricultural applications: 11 states, 1998-2006. *Environmental Health Perspective*. 119:8 1162-1169 pp.

Lindh, C.H., Littorin, M., Johannesson, G., Jönsson, B. 2011. Analysis of chlormequat in human urine as a biomarker of exposure using liquid chromatography triple quadrupole mass spectrometry. *Journal of Chromatography* 879. 1551-1556 pp.

Littorin, M., Lindh, C., Amilon, Å., Johannesson, G., Assarsson, E., Jönsson, B.A.G. 2009. Uppskattning av befolkningens exponering för kemiska bekämpningsmedel 2004-2008. Rapport till Naturvårdsverket 2009.

Littorin, M., Amilon, Å., Maxe, M., Axmon, A., Jönsson, B.A.G., Lindh, C. 2011. Exponering för kemiska bekämpningsmedel hos landsbygdsbefolkning i Skåne 2010-11. Rapport till Naturvårdsverket 2011. Rapport 40 från Arbets- och miljömedicin Lund 2011.

- Littorin, M., Maxe, M., Amilon, Å., Jönsson, B., Lindh, C.H. 2013. Analyser av pesticider i urin hos skånska kvinnor 2010. Rapport 23/2013 till Naturvårdsverket. Arbets- och miljömedicin, Labmedicin Skåne, Lund & Avd för Arbets- och Miljömedicin, Inst för Laboratoriemedicin, Lunds Universitet, Lund. 27s.
- Lu, C., Knutson, D.E., Fisker-Andersen, J., Fenske, R.A. 2001. Biological monitoring survey of organophosphorus pesticide exposure among pre-school children in the Seattle metropolitan area. *Environmental Health Perspective*: 109. 299-303 pp.
- Lu, C., Toepel, K., Irish, R., Fenske, R.A., Barr, D.B., Bravo, R. 2006. Organic diets significantly lower children's dietary exposure to organophosphorus pesticides. *Environmental Health Perspective*: 114. 260-263 pp.
- Manivel, J.C., Bloomer, J.R., Snover, D.C. 1987. Progressive bile duct injury after thiabendazole administration. *Gastroenterology*, 93. 245–249 pp.
- Maroni, M. & Fait, A. 1993. Health effects in man from long-term exposure to pesticides. A review of the 1975-1991 literature. *Toxicology*. 78:1-3. 1-5 pp.
- Mazzachi, B.C., Peake, M.J., Ehrhardt, V. 2000. Reference range and method comparison studies for enzymatic and Jaffé creatinine assays in plasma and serum and early morning urine. *Clinical Laboratory* 42:1. 53-55 pp.
- Meeker, J.D., Barr, D.B., Hauser, R. 2009. Pyrethroid insecticide metabolites are associated with serum hormone levels in adult men. *Reproductive Toxicology* 27:2. 155-160 pp.
- Mohi-ud-din, R, Lewis, J.H. 2004. Drug- and chemical-induced cholestasis. *Clin. Liver Dis.*, 8, 95–132 pp.
- Morgan, M.K., Sheldon, L.S., Jones, P.A., Croghan, C.W., Chuang, J.C., Wilson, N.K. 2011. The reliability of using urinary biomarkers to estimate children's exposures to chlorpyrifos and diazinon. *Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology*. 21. 280 – 290 pp.
- Munro, I.C., Carloi, G.L., Orr, J.C., Sund, K.G., Wilson, R.M., Kennepohl, E., Lynch, B.S., Jablinske, M, & Lee, N.L. 1992. A Comprehensive, Integrated

Review and Evaluation of the Scientific Evidence Relating to the Safety of the Herbicide 2,4-D. *International Journal of Toxicology*. 11:5. 559-664 pp.

NHANES. 2016. National Health and Nutrition Examination Survey - Centers for Disease Control and Preventions. USA. [<http://www.cdc.gov/nchs/nhanes/>] Hämtad 2016-05-18.

Nolan, R.J., Rick, D.L., Frehsour, N.L., Saunders, J.H. 1984. Chlorpyrifos: pharmacokinetics in human volunteers. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 73:1. 8-15 pp.

Ntzani, E.E., Chondrogiorgi, M., Ntritsos, G., Evangelou, E., Tzoulaki, I. 2013. Literature review on epidemiological studies linking exposure to pesticides and health effects. EFSA supporting publication 2013:EN-497. 159 p.

Oates, L. & Cohen, M. 2011. Assessing Diet as a Modifiable Risk Factor for Pesticide Exposure. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 8:6. 1792-1804 pp.

Orton, F., Lutz, I., Klaos, W., Routledge, E.J. 2009. Endocrine Disrupting Effects of Herbicides and Pentachlorophenol: In Vitro and in Vivo Evidence. *Environmental Science & Technology*. 43. 2144-2150 pp.

Orton, F., Rosivatz, E., Scholze, M., Kortenkamp, A. 2011. Widely used pesticides with previously unknown endocrine activity revealed as in vitro antiandrogens. *Environmental Health Perspective*. 119:6. 794 – 800 pp.

Orton, F., Rosivatz, E., Scholze, M., Kortenkamp, A. 2012. Competitive Androgen Receptor Antagonism as a Factor Determining the Predictability of Cumulative Antiandrogenic Effects of Widely Used Pesticides. *Environmental Health Perspective*, 120:11. 1578-1584 pp.

Ostrea, E.M. Villanueva-Uy, E., Bielawski, D., Birn, S., Janisse, J.J. 2014. Trends in long term exposure to propoxur and pyrethroids in young children in the Philippines. *Environmental Research*. 131. 13 – 16 pp.

del Pino, J., Moyano, P., Anadon, M.J., García, J.M., Díaz, M.J., García, J., Frejo, M.T. 2015. Acute and long-term exposure to chlorpyrifos induces cell death of basal forebrain cholinergic neurons through AChE variants alteration. *Toxicology*. 336. 1-9pp.

Pliktverket. 2015. Statistik från 2000.

[<http://www.rekryteringsmyndigheten.se/contentassets/50cec14487104438ad9c297d084587fd/statistik2000.pdf>] Hämtad 2016-05-09.

Rauh, V., Arunajadai, S., Horton, M., Perera, F., Hoepner, L., Barr, D.B., Whyatt, R. 2011. Seven-year neurodevelopmental scores and prenatal exposure to chlorpyrifos, a common agricultural pesticide. *Environmental Health Perspective*. 119:8. 1196 – 1201 pp.

Reynolds, S.L., Hill, A.R., Thomas, M.R., Hamey, P.Y. 2004. Occurrence and risks associated with chlormequat residues in a range of foodstuffs in the UK. *Food Additives & Contaminants*. 21:5. 457 – 471 pp.

Richardson, J.R. & Chambers, J.E. 2005. Effects of repeated oral postnatal exposure to chlorpyrifos on cholinergic neurochemistry in developing rats. *Toxicological Sciences*. 84. 352–359 pp.

Roy, M.A., Nugent, F.W., Aretz, H.T. 1989. Micronodular cirrhosis after thiabendazole. *Dig Dis Sci* 34:6. 938-941 pp.

Saillenfait, A-M., Ndiaye, D., Sabaté, J-P. 2015. Pyrethroids: Exposure and health effects – An update. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. 218:3. 281-292 pp.

Sauerhoff, M.W., Braun, W.H., Blau, G.E., Gehring, P.J. 1977. The fate of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) following oral administration to man. *Toxicology*, 8, 3–11 pp.

Séide, M., Marion, M., Mateescu, M.A., Averill-Bates, D.A. 2015. The fungicide thiabendazole causes apoptosis in rat hepatocytes. *Toxicology In Vitro* 32. 232-239 pp.

Sobus, J.R., DeWoskin, R.S., Tan, Y.M., Pleil, J.D., Phillips, M.B., George, B.J., Christensen, K., Schreinmachers, D.M., Williams, M.A., Hubal, E.A., Edwards, S.W. 2015. Uses of NHANES Biomarker Data for Chemical Risk Assessment: Trends, Challenges and Opportunities. *Environmental Health Perspective*. 123:10. 919 – 927 pp.

Statens folkhälsoinstitut. 2011. Matvanor och Livsmedel. Kunskapsunderlag för Folkhälsopolitisk rapport 2010. 84 s.

Statens folkhälsoinstitut. 2012. Frukt- och grönsakskonsumtion i Sverige 2008 – 2011. 38 s.

Suwazono, Y., Akesson, A., Alfven, T., Jarup, L., Vahter, M. 2005. Creatinine versus specific gravity-adjusted urinary cadmium concentrations. *Biomarkers* 10:2-3. 117-126 pp.

Sørensen, M.T & Danielsen, V. 2006. Effects of the plant growth regulator, chlormequat, on mammalian fertility. *International Journal of Andrology*. 29:1. 129-133 pp.

Torner, H., Blottner, S., Kuhla, S., Langhammer, M., Alm, H., Tuchscherer, A. 1999. Influence of chlorocholinechloride-treated wheat on selected in vitro fertility parameters in mice. *Reproductive Toxicology*. 13:5. 399 – 404 pp.

US EPA. 2015. Chemicals Evaluated for Carcinogenic Potential Office of Pesticide Programs. U.S. Environmental Protection Agency Annual Cancer Report 2015. 31 p.

US EPA, 2016. Integrated Risk Information System. [<https://www.epa.gov/iris>]

Virgin, H. 2012. Grundvattenkvalitet i Skåne län – utvärdering av regional provtagning 2007-2010. Länsstyrelserapport 2012:12. Länsstyrelsen i Skåne 2012.

van Wendel de Joode, B., Barraza, D., Ruepert, C., Mora, A.M., Córdoba, L., Öberg, M., Wesseling, C., Mergler, D., Lindh, C.H. 2012. Indigenous children living nearby plantations with chlorpyrifos-treated bags have elevated 3,5,6-trichloro-2-pyridinol (TCPy) urinary concentrations. *Environmental Research*. 117. 17-26 pp.

van Wendel de Joode, B., Mora, A.M., Córdoba, L., Cano, J.C., Quesada, R., Faniband, M., Wesseling, C., Ruepert, C., Öberg, M., Eskenazi, B., Mergler, D., Lindh, C.H. 2014. Aerial Application of Mancozeb and Urinary Ethylene Thiourea (ETU) Concentrations among Pregnant Women in Costa Rica: The Infants' Environmental Health Study (ISA). *Environmental Health Perspectives*. 22:12. 1321 – 1328 pp.

Walker, C.H. 2009. *Organic Pollutants - An Ecotoxicological Perspective*. 2 ed. CRC Press, Boca Raton. 414 s.

- Walker, C.H., Sibly, R.M., Hopkin, S.P., Peakall, D.B. 2012. Principles of Ecotoxicology. 4e uppl. Taylor and Francis Group: Boca Raton
- Wallström, P., Wirfält, E., Janzon, L., Mattisson, I., Elmståhl, S., Johansson, U., Berglund, G. 2000. Fruit and Vegetable Consumption in Relation to Risk Factors for Cancer: A Report from the Malmö Diet and Cancer Study. *Public Health Nutrition*. 3:3. 263-271 pp.
- Wannberg, A., Jansson, A., Ericsson, B-G. 2013. Kontroll av bekämpningsmedelsrester i livsmedel 2010. Rapport 4 2013. Livsmedelsverket, Uppsala.
- Wermann, S., Theurillat, V., Verzegnassi, L., Hofmann, J., Kuchenbecker, R., Constable, A., Delatour, T., Stadler, R.H. 2014. N, N-dimethylpiperidinium (mepiquat) Part 2. Formation in roasted coffee and barley during thermal processing. *Food Additives and Contaminants Part A-Chemistry Analysis Control Exposure & Risk assessment*. 31:2. 234-241 pp.
- Wessels, D., Barr, D.B., Mendola, P. 2003. Use of biomarkers to indicate exposure of children to organophosphate pesticides: implications for longitudinal study of children's environmental health. *Environmental Health Perspective*. 111:16. 1939 – 1946 pp.
- WHO. 1992. Pesticide Residues in Food - 1992: Toxicological Evaluations; International Programme on Chemical Safety, World Health Organization: Rome, 1992. 79-101 pp.
- Widenfalk, A & Fohgelberg, P. 2012. Resthalter av bekämpningsmedel (OP) som indikator i livsmedel samt uppskattat intag och risk bland svenska konsumenter (inklusive barn). Rapport till Naturvårdsverket oktober 2012.
- Wolansky, M.J. & Harrill J.A. 2008. Neurobehavioral toxicology of pyrethroid insecticides in adult animals: a critical review. *Neurotoxicology and Teratology*. 30:2. 55 – 78 pp.
- Wu, X., Bennett, D.H., Ritz, B., Frost, J., Cassady, D., Lee, K., Hertz-Picciottot, I. 2011. Residential insecticide usage in northern California homes with young children. *Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology*, 21. 427-436 pp.

Yoshinaga, J., Imai, K., Shiraishi, H., Nozawa, S., Yoshiike, M., Mieno, M.N., Andersson, A.M., Iwamoto, T. 2014. Pyrethroid insecticide exposure and reproductive hormone levels in healthy Japanese male subjects. *Andrology*, 2. 416–420 pp.

Yusa, V., Millet, M., Coscolla, C., Roca, M. 2015. Analytical methods for human biomonitoring of pesticides. A review. *Analytica Chimica Acta*: 891. 15-31 pp.

Zhang, J., Hisada, A., Yoshinaga, J., Shiraishi, H., Shimodaira, K., Okai, T., Noda, Y., Shirakawa, M., Kato, N. 2013. Exposure to pyrethroids insecticides and serum levels of thyroid-related measures in pregnant women. *Environmental Research*, 127. 16–21 pp.

Zhou, J., Zhang, J., Li, F., Liu, J. 2016. Triazole fungicide tebuconazole disrupts human placental trophoblast cell functions. *Journal of Hazardous Material*, 308. 294-302 pp.

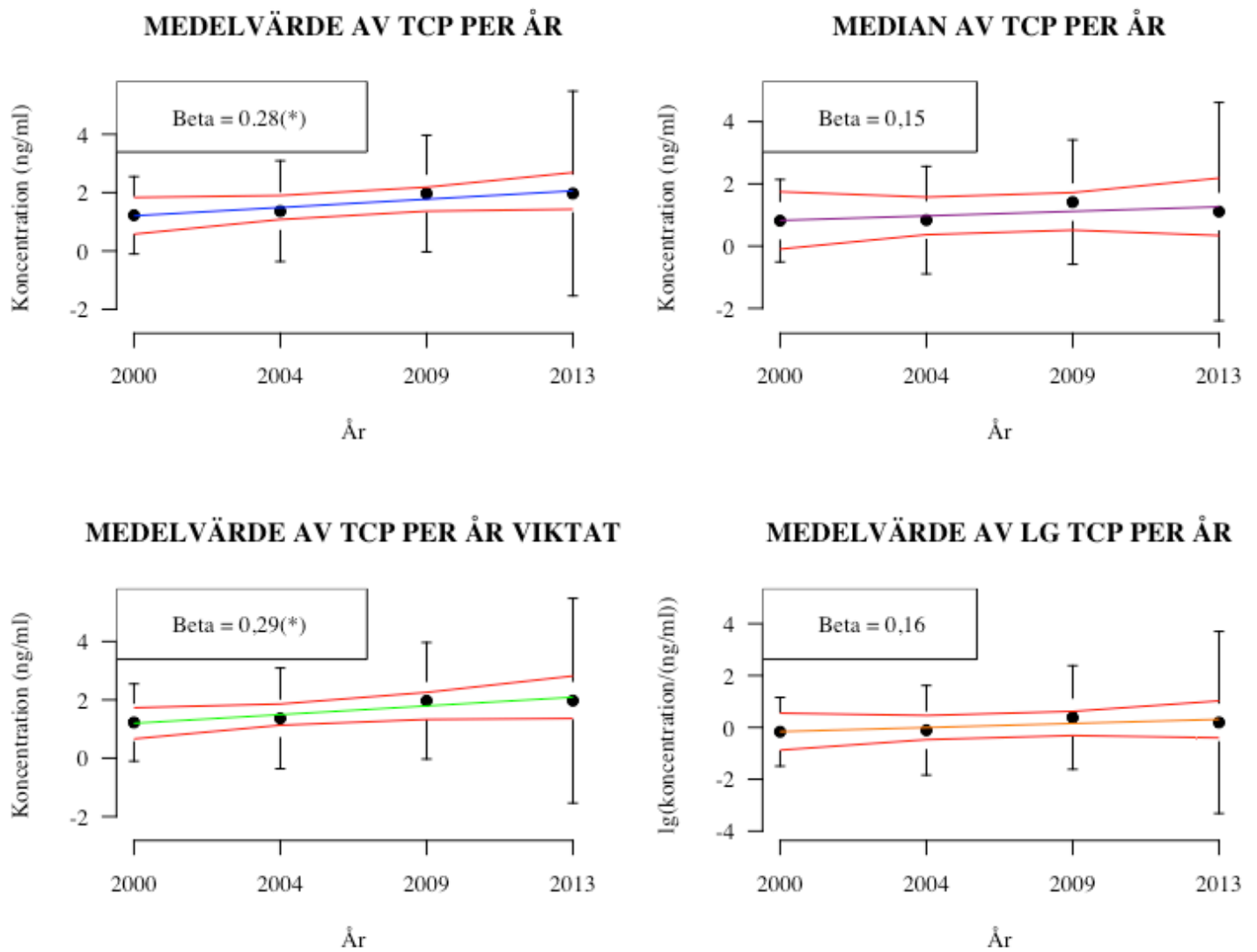
BILAGA 1

Tabell A. Jämförelse av densitet i de olika proven mellan åren.

Densitet

År	Medel	Median	N	Std	Min	Max
2000	1,019	1,021	209	,00663	1,002	1,034
2004	1,018	1,019	197	,00755	1,002	1,035
2009	1,023	1,024	254	,00629	1,004	1,037
2013	1,021	1,022	204	,00626	1,002	1,034
Total	1,022	1,022	864	,0347	1,002	1,037

BILAGA 2



Figur A. Linjär regression för flera mått av TCP (klorpyrifos).



LUNDS
UNIVERSITET

WWW.CEC.LU.SE
WWW.LU.SE

Lunds universitet

Miljövetenskaplig utbildning
Centrum för miljö- och
klimatforskning
Ekologihuset
223 62 Lund