

Mastergradsoppg. 2010

ENKEL BESTEMMELSE AV METYLKVIKKSØLV I EKSTRAHERTE  
OG DEKOMPONERTE BIOLOGISKE PRØVETYPEN VED BRUK  
AV KALDDAMP ATOMABSORPSJONSSPEKTROKOPI

SIMPLE DETERMINATION OF METHYLMERCURY IN EXTRACTED  
AND DIGESTED BIOLOGICAL MATRICES USING COLD VAPOUR  
ATOMIC ABSORPTIONSPECTROSCOPY

LOGANA MOHANATHAS

Wkat



UNIVERSITETET FOR MILJØ- OG BIOVITTENSKAP  
INSTITUTT FOR PLANTE- OG MILJØVITTENSKAP  
MASTEROPPGAVE 60 STP. 2010





## Sammendrag

Hensikten med dette arbeidet var å utvikle en enkel metode for bestemmelse av metylkvikksølv (MeHg) i biologiske prøvetyper som blod, urin og hår. For å utvikle denne metoden ble det tatt i bruk tilgjengelige instrumenter ved Institutt for plante- og miljøvitenskap, UMB. Totalkvikksølv (T-Hg) bestemmes i dag ved hjelp av kalddamp atomabsorpsjonsspektroskopi (CVAAS). Bestemmelse av MeHg ved bruk av CVAAS, krever en forutgående separasjon av kvikksølvspecier og oksidasjon av MeHg til  $\text{Hg}^{2+}$ . Hydrogenbromid (HBr) ble brukt for frigjøring av kvikksølv fra prøvematriksen. Separasjon av MeHg fra andre former for kvikksølv ble oppnådd ved bruk av toluen. Til sist kommer L-cystein trinnet som kompleksbinder MeHg fra toluen. L-cystein fasen ble dekomponert i UltraClave.  $\text{Hg}^{2+}$ -formen ble så bestemt på CVAAS, hvor  $\text{Hg}^{2+}$  ble redusert med tinnklorid til  $\text{Hg}^0$  og absorpsjon målt ved 253,7 nm.

Siden dette er en indirekte metode for bestemmelse av MeHg, ble selektivitet bestemt ved å tilsette en spiket mengde av  $\text{Hg}^{2+}$  til referansemateriale sertifisert for MeHg (DORM-2). Selektiviteten for organisk bundet kvikksølv var tilfredstillende. For å verifisere selektiviteten for MeHg er det i videre arbeid ønskelig å sammenligne mot analyse på en kromatografisk teknikk.

Ved bestemmelse av kvikksølv i DORM-2 (fiskemuskel), DOLT-4 (fiskelever) og IAEA-086 (hår) ble metodens nøyaktighet vurdert som tilfredstillende.

Presisjonen i metoden for hårprøve ble bestemt som tilfredstillende med en RSD på 9%.

Metodens måleområde for hår er tilfredsstillende for å kvantifisere MeHg i den generelle befolkning, mens MeHg i urin ikke kan kvantifiseres. Kvantifiseringsgrensen (LOQ) for blod beregnet til 0,0089 mg/L ved et blodvolum på 1 mL er ikke tilstrekkelig lav. For å kunne måle MeHg i blod for den generelle befolkningen må kvantifiseringsgrensen forbedres. Med tanke på at instrumentets LOD er 0,0055  $\mu\text{g/L}$  er det mulig å få en bedre LOQ for metoden. Det ble detektert varierende forurensning av kvikksølv i oppsluttet blank. Kvikksølv henger igjen i teflonrør som benyttes ved oppslutning i UltraClave. Bidragene av kvikksølv i rørene varierte så mye at det ikke var mulig å korrigere for dette.

Det ble funnet at kvarts (glass) fint kan brukes. Bruk av kvarts (glass) bør vurderes for prøvetyper med lavt innhold av MeHg.

En forurensning av blank som skyldes forurenset reagens er også observert. Det er foreslått å erstatte L-cystein med en annen kompleksbinder. Et alternativ kan også være å rense L-cystein.

## Summary

The purpose of this work was to develop a simple method for determination of methyl mercury (MeHg) in biological sample matrices such as blood, urine and hair. Instruments available at the Department of Plant and Environmental Sciences, UMB, were used in the method development. Total mercury (T-Hg) is currently determined by use of cold vapour atomic absorption spectroscopy (CVAAS). Determination of MeHg using CVAAS, requires separation of the mercury species prior to oxidation of MeHg to  $\text{Hg}^{2+}$  and subsequent detection.

Hydrobromic acid (HBr) was used to dissolve mercury from sample matrices. Separation of MeHg from other forms of mercury, were achieved by using toluene. Finally comes the L-cysteine complex step that binds MeHg from toluene. L-cysteine phase was acid digested using UltraClave.  $\text{Hg}^{2+}$  form was then determined by CVAAS where  $\text{Hg}^{2+}$  was reduced by tin (II)chloride ( $\text{SnCl}_2$ ) to  $\text{Hg}^0$  and absorption measured at 253.7 nm.

Since this is an indirect method for the determination of MeHg, the selectivity was determined by adding a spiked amount of  $\text{Hg}^{2+}$  to reference material certified for content of MeHg (DORM-2). Selectivity for organic bound mercury was satisfactorily. To verify the selectivity of MeHg, it is required in the further work to compare the analysis with results from a chromatographic technique.

Method's accuracy was checked by determination of MeHg in the DORM-2 (fish muscle), DOLT-4 (fishliver) and IAEA-086 (hair), and was considered to be satisfactorily.

The precision of the method was determined by analysis of hair samples, and an RSD of 9% was approved.

Method measure range of hair was adequate to quantify MeHg in the general population, while MeHg in urine could not be quantified. Quantification (LOQ) of blood estimated to be 0.0089 mg/L at a blood volume of 1 mL was not sufficiently low. In order to measure MeHg in blood for population in general, the limit of quantification must be improved. Given that the instrument LOD is 0.0055 mg/L, it is possible to achieve a better method LOQ. It was detected varying levels of contamination of mercury in digested blank. Mercury attaches to the surface of in Teflon tubes, which were used for digestion in UltraClave. The contribution of mercury in the tubes varied to an extent that mathematical correction was impossible.

It was found that quartz (glass) can be used instead of Teflon tubes. The use of quartz tubes should be considered for the sample matrices with low levels of MeHg.

The contamination of the blank caused by contaminated reagent is also observed. It is suggested to replace L-cysteine with another complex binder. An alternative solution may be to purify L-cysteine.

## Forord

Denne masteroppgaven ble utført ved universitetet for miljø og biovitenskap (UMB), institutt for plante og miljøvitenskap (IPM), Ås.

Problemstillingen til denne oppgaven ble foreslått av overingeniør Karl Andreas Jensen og førsteamanuensis Elin Gjengedal, UMB, med et ønske om å utvikle en enkel metode for metylkvikksølvbestemmelse i biologiske prøvetyper ved bruk av instrumentering tilgjengelige ved eget institutt, henholdsvis CVAAS og UltraClave. Hensikten bak utvikling av denne metoden baserer seg på human eksponering for kvikksølv fra kosmetikkprodukter kjøpt i utenlandske butikker i Norge. Finansiering for et forprosjekt (prosjektleder Elin Gjengedal) for å kartlegge betydningen av kosmetikkprodukter som kilde for kvikksølv er innvilget og vil starte i august.

Jeg vil rette en stor takk til min veileder Elin Gjengedal for meget god veiledning, god støtte under arbeidet og en spennende oppgave. Jeg vil også rette en stor takk til Karl Andreas Jensen og Solfrid Lohne (ansatt ved UMB) for god støtte og veiledning under arbeidet. Jeg vil også rette en stor takk til mastergradsstudent Berit Glomstad for et godt samarbeid til det innledende arbeidet i denne oppgaven. En stor takk rettes også til Inger-Marie Sørvaag for korrekturlesing av oppgaven.

Jeg vil også takke min familie og venner som har vært til uvurderlig støtte og hjelp i denne studietiden.

UMB, Ås, mai 2010

Logana Mohanathas

# Innholdsfortegnelse

|   |    |
|---|----|
| 1 Innledning.....   | 8  |
| 2 Teori .....   | 9  |
| 2.1 Kvikksølv .....   | 9  |
| 2.2 Kilder.....   | 9  |
| 2.2.1 Antropogene kilder.....   | 9  |
| 2.2.2 Naturlige kilder .....  | 11 |
| 2.3 Tilstandsformer .....   | 11 |
| 2.3.1 Elementært kvikksølv ( $\text{Hg}^0$ ).....   | 12 |
| 2.3.2 Uorganisk kvikksølv ( $\text{Hg}^{2+}$ ).....   | 13 |
| 2.3.3 Organisk kvikksølv (MeHg).....  | 13 |
| 2.4 Kvikksølv og kosmetikk.....   | 15 |
| 2.4.1 Hår.....  | 16 |
| 2.4.2 Blod .....  | 17 |
| 2.4.3 Urin.....   | 17 |
| 2.5 Grenseverdier .....   | 18 |
| 2.6 Metoder for kvikksølvbestemmelse .....  | 18 |
| 2.7 Metoder introduksjon .....  | 19 |
| 2.7.1 Dekomponering av prøver ved UltraClave og Multiwave .....   | 20 |
| 2.7.2 Generelt om kalddamp atomabsorpsjonsspektrometri (CVAAS).....   | 21 |
| 2.7.3 Instrumentering .....   | 22 |
| 3 Materialer og Metode .....  | 24 |
| 3.1 Materialer .....  | 24 |
| 3.2 Metode.....   | 26 |
| 3.2.1 Utprøving av metoden med hensyn til selektivitet.....   | 26 |
| 3.2.2 Utprøving av enkel ekstraksjon.....   | 28 |
| 3.2.3 Holdbarhet av MeHg standard .....   | 30 |
| 3.2.4 Forbehandling av biologiske prøvetyper.....   | 30 |
| 3.2.5 T-Hg og MeHg i blod, hår og urin .....  | 30 |
| 3.2.6 Helse, miljø og sikkerhet.....  | 31 |
| 4 Resultat og Diskusjon.....  | 32 |
| 4.1 Utprøving av metoden med hensyn til selektivitet.....   | 32 |
| 4.2 Utprøving av enkel ekstraksjon.....   | 33 |
| 4.3 Lagring og stabilitet .....   | 34 |
| 4.4 Opprinnelig metode sammenlignet med endret metode.....  | 36 |
| 4.5 Deteksjonsgrense (LOD) og kvantifiseringsgrense (LOQ).....  | 37 |
| 4.6 Utprøving av metode på spikede prøver og SRM .....  | 39 |
| 4.7 Utprøving av metode på reelle prøver.....   | 40 |
| 4.8 Kontaminering av teflonrør .....  | 42 |
| 5 Konklusjon og videre arbeid .....   | 43 |
| 6 Referanse:.....   | 45 |
| <br>  |    |
| Vedlegg 1: Måledata og innvekter for beregning og forenklet figur av metoden.....   | 53 |
| Vedlegg 2: Tillaging av ulike løsninger til forsøket .....  | 56 |
| Vedlegg 3: Poster presentation for miljøkonferansen på Svalbard, NECC2010, <i>Simple determination of methylmercury in sediment and biota</i> ..... | 57 |
| Vedlegg 4: Måledata for beregning av gjennfinning av MeHg.....  | 59 |
| Vedlegg 5: Måledata og innvekter for beregning av SRM, reelle og spikede prøver.....  | 61 |
| Vedlegg 6: Måledata for teflonrør.....  | 64 |



# 1 Innledning

Kvikksølv er et grunnstoff som eksisterer i flere former i miljøet, hvor metylkvikksølv er en av de giftigste tilstandsformene (Fok et.al 2007; Rodrigues et.al 2010) . Eksponering av kvikksølv er en utbredt helserisiko i verden i dag. Kvikksølvkontaminering kan forekomme som et resultat av naturlige eller antropogene kilder (Ortiz et.al 2002). De ulike formene for kvikksølv har flere eksponeringsruter. Den viktigste (Barbosa et.al 2004; Fakour et.al 2010; Rodrigues et.al 2010) kilden for menneskelig eksponering av organisk kvikksølv er gjennom kontaminert mat, primært gjennom fisk, mens metallisk kvikksølv går veien gjennom amalgamfyllinger og frigir kvikksølv damp og  $Hg^{2+}$  i vev. Eksponering for uorganisk kvikksølv skjer også ved bruk av Hg-baserte hudkremer, som for eksempel blekemiddelkremer (Counter & Buchanan 2004).

Kjente metoder for bestemmelse av metylkvikksølv basert på kromatografi er direkte metoder for speciering av kvikksølv, for eksempel LC-ICP-MS, GC-AFS, GC-AES og GC-ECD (Rodrigues et.al 2010; Diez&Bayona 2002, Morton et.al 2002; Ubillus et.al 2002; Diez et.al 2008). De ulike kromatografiske metodene muliggjør separering av de ulike formene for kvikksølv. Vårt laboratorium har ikke tilgang til slike instrumenteringer, derfor ønsket vi å utvikle en metode ved bruk av tilgjengelig utstyr som CVAAS og UltraClave. Vår metode er en indirekte metode for MeHg analyse siden CVAAS kun måler på  $Hg^{2+}$ . For å få MeHg på  $Hg^{2+}$  form må prøvene dekomponeres på UltraClave.

Målet med denne oppgaven var å utvikle en enkel metode for metylkvikksølvbestemmelse i biologiske prøver. Som nevnt i forordet, var eksponering av kvikksølv via kosmetikkprodukter grunnlag for valg av matriks.

Som en innledning i denne metoden er det blitt tatt utgangspunkt i en metode publisert av Maggi et.al (2009). Deres metode gikk ut på å bestemme metylkvikksølv ved hjelp av direct mercury analyser (DMA-80). I denne oppgaven gikk forsøket ut på å undersøke om CVAAS er en egnet analysemetode for bestemmelse av MeHg i blod, urin og hår.

## 2 Teori

Dette kapittelet handler om kvikksølv og dets syklus og hvordan eksponeringen av kvikksølv skjer i mennesker og miljø. Her nevnes det også ulike grenseverdier for kvikksølvinntak. Videre kommer det litt teori om tidligere metoder brukt for kvikksølvanalyse i biota og prinsippet bak metoden som utvikles i dette arbeidet.

### 2.1 Kvikksølv

En av miljøforvaltningens prioriterte miljøgifter er kvikksølv (Hg). Dette er et av de stoffene som har fått mest oppmerksomhet her til lands de senere år på grunn av dens toksiske egenskaper, akkumuleringsevne og flyktighet ved enkelte former.

Kvikksølv finnes i flere tilstandsformer og med en stor variasjon av egenskaper som bestemmer dets komplekse fordeling og det biologiske mangfoldet (Leermakers et. al 2005). Eksponering av toksisk kvikksølv er en utbredt helserisiko i verden i dag. Nyere studier viser at eksponering av kvikksølv forekommer i miljøet og stadig oftere i hjem og på arbeidsplasser (Counter & Buchanan, 2004).

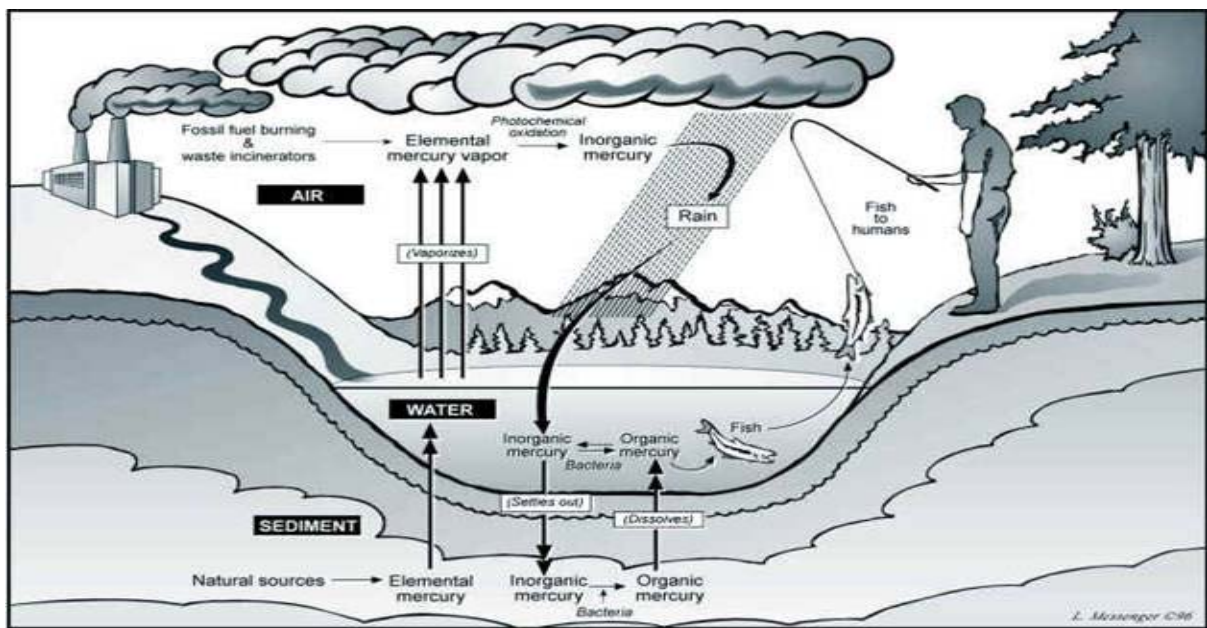
### 2.2 Kilder

Emisjoner av kvikksølv kommer fra kalking med sulfidmalmer, fossilt brensel samt forbrenning og oppvarming av andre materialer som inneholder kvikksølv. Kilder til kvikksølv deles gjerne inn i tre kategorier: menneskeskapte, naturlige og remobilisering av tidligere avsatt kvikksølv (Sanchez Uria & Sanz-Medel, 1998). Figur 2.1 viser en oversikt over den globale kvikksølvsyklusen.

#### 2.2.1 Antropogene kilder

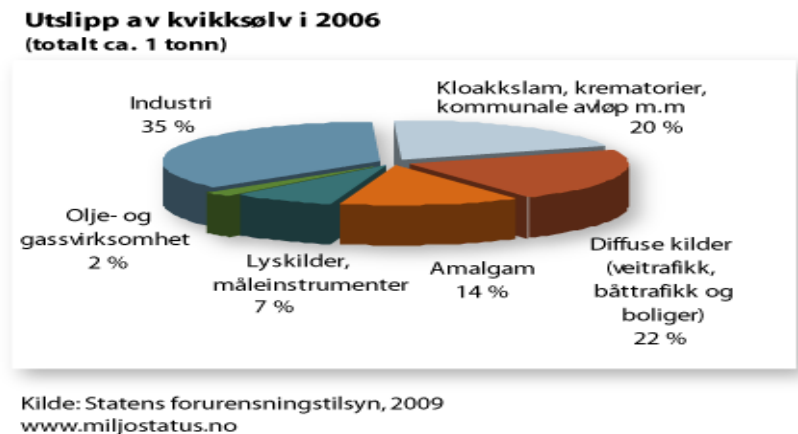
Hovedkildene til antropogent Hg-utslipp globalt er først og fremst kullkraftverk og forbrenning av kull, der nest største er søppelforbrenning og utslipp fra metallsmelteindustri (Pirrone et al 2001; Fjeld & Rognerud, 2003). ). Figur 2.2 viser fordelingen av ulike utslippskilder i Norge i 2006.

En stor del av kvikksølvet som eksisterer i atmosfæren i dag, er et resultat av mange års utslipp fra menneskelige aktiviteter. Selv om det er noe naturlig utslipp av kvikksølv fra jordskorpen, er antropogene kilder de viktigste bidragsyterne til utslipp av kvikksølv til atmosfære, vann og jord. Kvikksølvet som kommer fra antropogene kilder er stort sett på elementær form, men noe er også på uorganisk ioneform.



Figur 2.1 Oversikt over kvikksølvsyklusen og kilder til naturlige og antropogene kilder. [http://www.mercury.utah.gov/atmospheric\\_transport.htm](http://www.mercury.utah.gov/atmospheric_transport.htm) (2010)

Den elementære formen er inert og reagerer i liten grad med andre komponenter i atmosfæren. Dette gjør den til en persistent miljøgift som langtransporteres med luftstrømmer over store geografiske områder (UNEP, 2002). En undersøkelse gjort av Munthe et al. (2001) har vist at menneskelig aktivitet har tredoblet det totale kvikksølvnivået i atmosfæren.



Figur 2.2: En oversikt over utslipp av kvikksølv i Norge i 2006, hvor de største kildene er industri, kloakkslam, diffuse kilder og amalgam.

<http://www.miljostatus.no/Tema/Kjemikalier/Noen-farlige-kjemikalier/Kvikksolv/> (2010)

De siste tiårene har antropogene utslipp fra en rekke store kilder blitt redusert i Nord-Amerika og Europa på grunn av myndighetenes krav til utslippsreduksjoner. Det totale antropogene utslippet til luft er også redusert i noen utviklede land som for eksempel Canada de siste tiårene (UNEP, 2002).

### **2.2.2 Naturlige kilder**

Naturlige kilder inkluderer vulkanutslipp, samt fordamping fra jord- og vannoverflater gjennom reduksjon av uorganisk kvikksølv til elementært kvikksølv. I tillegg kommer nedbryting av mineraler, skogbranner og geologisk materiale (HgS) med naturlig lave konsentrasjoner av kvikksølv (UNEP, 2002).

Utslipp av kvikksølv fra jord- og vannoverflater i dag er ikke bare en naturlig kilde, men også betydelig påvirket av tidligere avsetning av kvikksølv fra antropogene kilder. Derfor er det vanskelig å fastslå det faktiske kvikksølvutslippet. Et samlet anslag over remobilisering fra jord- og vannoverflater i Europa finnes, men dette inkluderer kvikksølv som både stammer fra naturlige og antropogene utslipp (Pirrone et. al 2001).

## **2.3 Tilstandsformer**

Kvikksølv er et metall som forekommer naturlig og som finnes i miljøet i ulike former: elementær, uorganisk og organisk. Den elementære formen er generelt brukt i amalgamfyllinger og termometre. Den uorganiske formen er brukt i hudpleie- og medisinske produkter, mens den organiske finnes i soppdrepende midler, maling og næringsmidler (Al-Saleh et.al 2005). Myndighetene har blant annet innført forbud mot eller strenge begrensninger mot bruk av kvikksølv eller kvikksølvforbindelser for kvikksølvtermometre, begroingshindrende middel, impregnering, importerte biler, batterier og elektroniske produkter med unntak av for eksempel lyskilder. I visse typer knappcellebatterier er det kun tillatt med det visst kvikksølvinnhold, hvor det skal merkes om dette.

Myndighetene har også innført krav om rensing av amalgamholdig tannfyllingsmateriale til avløp og til utslipp av kvikksølv fra krematorier (MD, 2005).

Elementært kvikksølv er stabilt, men når det går over i andre former, vil det gjennomgå mange kjemiske, biologiske og fotokjemiske reaksjoner. Uorganiske former kan gå over til organiske former ved biologisk transformasjon (for eksempel metyl- og etylkvikksølv). Den enverdige formen er en sjelden form og ikke stabil.

Den er som oftest oksidert eller redusert, hvor egenskaper og forekomst av Hg kommer an på både oksidasjonsstatus og kjemisk form (Cattani et. al 2008). Tabell 2.1 viser en oversikt over de ulike spesiene av kvikksølv i miljøet, hvor de vanligste kvikksølvspesiene i biota og miljøet er  $\text{Hg}^0$ ,  $\text{Hg}^{2+}$  og  $\text{MeHg}^+$ .

Tabell 2.1 : De ulike kvikksølvspesiene som finnes i miljøet og biota (UNEP, 2002)

|                     |                  |                  |
|---------------------|------------------|------------------|
| Elementær kvikksølv |                  | $\text{Hg}^0$    |
| Uorganisk kvikksølv | Enverdig ion     | $\text{Hg}^+$    |
|                     | Toverdig ion     | $\text{Hg}^{2+}$ |
|                     | Kvikksølvulfid   | $\text{HgS}$     |
|                     | Kvikksølvoksid   | $\text{HgO}$     |
|                     | Kvikksølvklorid  | $\text{HgCl}_2$  |
| Organisk kvikksølv  | Metylkvikksølv   | $\text{MeHg}^+$  |
|                     | Etylkvikksølv    | $\text{EtHg}^+$  |
|                     | Fenylkvikksølv   | $\text{PhHg}^+$  |
|                     | Dimetylkvikksølv | $\text{DMHg}$    |

### 2.3.1 Elementært kvikksølv ( $\text{Hg}^0$ )

Elementært kvikksølv (metallisk kvikksølv) er en naturlig form for kvikksølv som finnes i atmosfæren. Elementært kvikksølv er den mest flyktige formen. Den har et damptrykk på 0,3 Pa ved 25 °C og forandrer seg til væskefase ved romtemperatur (WHO, 2003).

Kvikksølv damp er fargeløs og luktfri. Jo høyere temperaturen er, desto mer damp vil bli avgitt fra flytende metallisk kvikksølv (USDHHS, 1999).

Kvikksølv som er i flytende form er relativt ufarlig, men dampen som avgis er farlig fordi den absorberes fullstendig i de alveolære membraner grunnet sin lipofilitet. Ved hjelp av enzymet catalase i blod blir noe av  $\text{Hg}^0$  oksidert til  $\text{Hg}^{2+}$  etter absorpsjonen, mens det som ikke blir oksidert til  $\text{Hg}^{2+}$ , blir transportert som metallisk kvikksølv til mer distale vev, i hovedsak hjernen og kan dermed krysse blod-hjerne barrieren (Klaassen, 2001).

Amalgamfyllinger som kilde til metallisk kvikksølv damp er den viktigste kilden for den generelle befolkningen, men yrkeseksponering av kvikksølv damp kan i noen tilfeller overstige amalgamkilden (UNEP, 2002).

### **2.3.2 Uorganisk kvikksølv ( $\text{Hg}^{2+}$ )**

Uorganisk kvikksølv blir dannet som salter av dets divalente og monovalente kationiske former (WHO,2003). De fleste kvikksølvforbindelser er hvitt pulver eller krystaller, med unntak av kvikksølv sulfid (kjent som sinober) som er rødt og blir svart etter eksponering for lys (USDHHS, 1999).

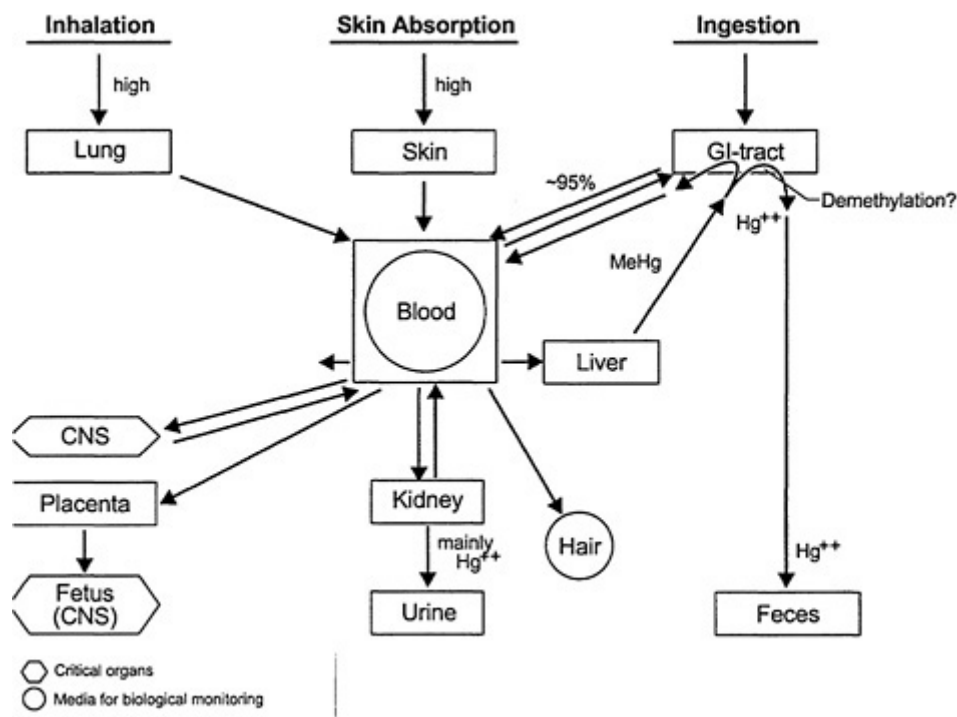
Til forskjell fra elementært kvikksølv, har uorganisk kvikksølv og organiske kvikksølvspesier stor affinitet til ligander som svovel, fosfor, oksygen, nitrogen, halogener og karbon (Stumm & Morgan 1996). Hydroksid, klorid, sulfid og oppløst organisk materiale (DOC) er de dominerende ligandene i vann (Balogh et. al 2008). For uorganisk kvikksølvforbindelser er kosthold den viktigste kilden for majoriteten av befolkningen. En annen kilde til eksponering av uorganisk kvikksølv for en viss gruppe, er blekemiddelkremer- og såper som inneholder kvikksølv (UNEP, 2002).

### **2.3.3 Organisk kvikksølv (MeHg)**

Dannelsen av metylkvikksølv skjer ved biotiske eller abiotiske prosesser hvor uorganisk kvikksølv blir omdannet til metylkvikksølv. Alle former for kvikksølv er farlig, men den organiske formen er mer giftig enn den uorganiske (Ubullus et.al 2000). Sulfatreduserende bakterier er de viktigste metyleringsorganismene, mens potensialet for biometylering er høyest under anaerobe forhold (Zizek et.al 2007)

På grunn av langtransporterte atmosfæriske utslipp og transport via havstrømmer, er metylkvikksølv også tilstede i miljø som er langt fra lokale kilder. Dette fører til at populasjonsgrupper som er avhengig av marine kosthold, slike som inuitter som lever i Arktis, eller de som spiser ferskvannsfisk er spesielt utsatt på grunn av metylkvikksølv eksponering (UNEP, 2002).

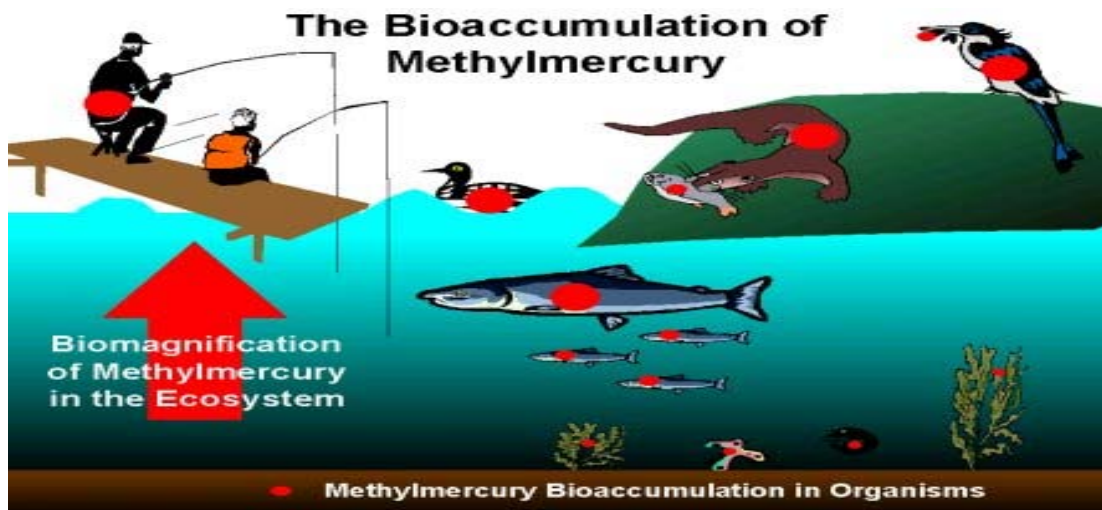
Figur 2.4 viser en oversikt over metylkvikksølvets kinetikk i menneskets kropp.



Figur 2.3: En oversikt som viser de forskjellige formene for kvikksølv i kroppen og hvor i kroppen man finner de forskjellige formene (Committee on the Toxicological Effects of Methylmercury, 2000).

I fisk foreligger Hg primært som MeHg, mens det i vann utgjør mindre enn 2% av den totale Hg-konsentrasjonen. En av egenskapene til MeHg er at den kan oppkonsentreres kraftig i næringskjeden (Se figur 2.4 for bioakkumulering av MeHg).

Den organiske formen er en svært farlig nervegift som kan forstyrre utviklingen av sentralnervesystemet. Siden MeHg kan krysse blodbanene i morkaken eller overføres med brystmelken kan fostre eller barn være særlig utsatt for MeHg (Fjeld & Rognerud 2003). Derfor er eksponering av metylkvikksølv en stor bekymring under graviditet. Noen studier viser også at selv liten økning i metylkvikksølv eksponering kan forårsake negative effekter på det kardiovaskulære systemet, og dermed føre til dødsfall. Den klart største kilden for metylkvikksølv eksponering er kosthold, spesielt fisk og annen sjømat (UNEP, 2002).



Figur 2.4: Bioakkumulering av metylkvikksølv i naturen. (kilde: USGS <http://www.ec.gc.ca/MERCURY/EN/bf.cfm>)

Selv om mekanismen for metylkvikksølv sin toksisitet har blitt studert i mange år, er det fremdeles ukjent om det er selve metylkvikksølv eller frigjorte  $\text{Hg}^{2+}$ -ioner som er årsaken til den toksikologiske effekten. Selv om  $\text{Hg}^{2+}$  er sterkt bundet til SH-grupper, er det ikke kjent at MeHg vil føre til celledød ved binding til SH-gruppene (Klaassen, 2001). Metylkvikksølv er mellom 10 og 100 ganger mer toksisk enn uorganisk kvikksølv (Cattani et.al 2008).

## 2.4 Kvikksølv og kosmetikk

En annen kilde til kvikksølvforgiftning er blekemiddelkremer som inneholder kvikksølv. Kvikksølv er i stand til å inntre menneskets kropp ved svelging, inhalering og absorpsjon gjennom hud. Ved kronisk kvikksølvforgiftning vil det påvirke nyrer og det sentrale nervesystemet. Kvikksølvforgiftning forårsaker vanligvis nevrotisk syndrom (Tang et.al 2006). Tabell 2.2 viser en oversikt over de toksiske effektene av de vanligste kvikksølvspeciene. Det er gjort undersøkelser om eksponering for kvikksølv via hud basert på kosmetikkprodukter av for eksempel Harada et.al 2001; Harada et.al 1999 og Sin & Tsang, 2003, men det som skjer med de ulike speciene som kommer inn i kroppen ved bruk av kvikksølvinnholdende kosmetikk er lite kjent i litteraturen.

Det har vært vanlig å bruke kvikksølvholdige preparater til hud i århundrer. Organiske former som fenylkvikksølvacetat er noen ganger brukt som konserveringsmiddel i kosmetiske produkter, mens uorganiske former, slik som kvikksølv tilsatt ammoniakk er aktive ingredienser i blekemiddelkremer (USDHHS, 1999; Al-Saleh et.al 2005).



Kvikksølv absorbert gjennom huden konsentreres i nyrene, hovedsaklig i tubular regionen (Al-Saleh et.al 2005).

Målinger av kvikksølv i både blod, hår og urin brukes til å bestemme hvilke helseeffekter som sannsynligvis vil oppstå ved en eventuell kvikksølveksponering (Rodrigues et.al 2010; Gill et.al 2004).

Tabell 2.2: En oversikt over de mest vanlige kvikksølvspecier og deres toksisitet (UNEP, 2002; Diez et.al 2008; Erkek et.al 2010; Gundersen & Mowe, 1977).

| Specie            | Eksponerings inntak  | Toksisitet  | Normalverdi   |
|-------------------|--|---|---|
| Hg <sup>0</sup>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Inhalering av kvikksølv damp</li> <li>- Hg<sup>0</sup> kan bli oksidert i hudvev til uorganisk divalent form</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- 80% av inhalert Hg<sup>0</sup> blir absorbert av lungevev</li> <li>- Penetrerer blod/hjerne barrieren</li> <li>- Nevrotoksisk</li> </ul> | T-Hg: <ul style="list-style-type: none"> <li>- 1-59 µg/L i blod</li> <li>- 0,5-10µg/g i hår</li> <li>- 0,1- 20 µg/L i urin</li> </ul> |
| Hg <sup>2+</sup>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Næringsmiddel</li> <li>- Blekemiddelkremer og såper</li> <li>- Vaksiner</li> </ul>                                      | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Nevrotoksiske effekter (for eksempel skjelving)</li> <li>- Effekter i nyrene</li> </ul>  | T-Hg: <ul style="list-style-type: none"> <li>- 1-59 µg/L i blod</li> <li>- 0,5-10µg/g i hår</li> <li>- 0,1- 20 µg/L i urin</li> </ul> |
| MeHg <sup>+</sup> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Inntak via kontaminert fisk og marine pattedyr</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Nervesystemet er MeHg<sup>+</sup> sitt hovedvev</li> <li>- Kraftig nevrotoksisk</li> </ul>   | T-Hg: <ul style="list-style-type: none"> <li>- 1-59 µg/L i blod</li> <li>- 0,5-10µg/g i hår</li> <li>- 0,1- 20 µg/L i urin</li> </ul> |

### 2.4.1 Hår

Håret reflekterer eksponering av kvikksølv både i historisk og nyere tid (tidsbasert eksponering av 1-2 år fra individer med langt hår) (Gill et.al, 2004). Håret er derfor en egnet indikator for overvåking av menneskelig eksponering av kvikksølv, og reflekterer kvikksølvnivåer i organ samt kostholdsinnntak. Innholdet av kvikksølv i hår representerer også den akkumulerende eksponeringen fra arbeidsmiljø (Diez & Bayona, 2002).

Kvikksølv i håret korrelerer med kvikksølv i hjernen, hvor MeHg utgjør ca 70-80% av T-Hg i håret. Undersøkelser av kvikksølveksponering og postnatal nevrotutvikling har i stor grad støttet seg på konsentrasjoner i mors hår.

Det antas at kvikksølvnivåer i barns hår reflekterer den samme eksponeringen (Freire et.al 2010).

Dersom innholdet av total kvikksølvkonsentrasjon i hår er større enn 50 µg/g, regnes det som toksisk for mennesket (Ferrua et.al 2007). Den laveste terskelverdi definert av WHO for metylkvikksølv i håret er 50 mg/g, mens amerikanske EPA anslår laveste terskelverdi som 10 mg/g (Diez & Bayona, 2002).

#### **2.4.2 Blod**

Blod gir et øyeblikksbilde av nylig eksponering (halveringstid på 45 dager) (Gill et.al 2004; Wilhelm et.al 1996). Innholdet av kvikksølv-specier i blod kan representere en akkumulerende eksponering fra det daglige kostholdsinntaket og fra yrkesmiljø. Selv om forskjellen i toksisitet er relatert til de forskjellige formene for kvikksølv, er det som regel den totale kvikksølv-konsentrasjonen som blir brukt til å fastslå resultater etter kvikksølv-eksponering. Andelen av de kjemiske formene av kvikksølv i blod kan variere fra individ til individ. En analytisk metode er derfor nødvendig for å kunne skille mellom de kjemiske formene i blodet for deretter å kunne vurdere risikoen for giftmengde (Rodrigues et.al 2010).

#### **2.4.3 Urin**

Urin gir et mål på yrkesmessig eksponering av uorganisk kvikksølv via inhalasjon. Derfor er utvikling av pålitelige analytiske metoder for kvikksølv-bestemmelse i biologiske media som blod, urin og hår av stor betydning for menneskets helse (Gill et.al 2004).

Airey (1983) mener at kvikksølv-konsentrasjonen i urin samsvarer med langtidseksponering, men studier av Wilhelm et.al (1996) og Barregard (1993) viser at ikke bare blod, men også urin kan brukes for å vurdere nylig eksponering av kvikksølv. Kvikksølvnivå i urin er mye brukt til vurdering av eksponering for uorganisk Hg. Den reflekterer Hg i nyrene og den totale påvirkningen i kroppen av uorganisk Hg. MeHg kan også demetilere seg til uorganisk Hg, noe som kan forårsake høyere Hg-nivåer i urin (Dunn et.al 2008).

## 2.5 Grenseverdier

JECFA (ekspertgruppe under WHO og FAO) har definert det tolerable ukentlige inntaket av kvikksølv for en voksen, ikke-gravid person, til å være 5 µg/kg kroppsvekt, hvor av høyst 3,3µg må være organisk kvikksølv (MeHg). I følge EU's regelverk skal Hg-nivået i fiskeprodukter som omsettes gjennomsnittlig ikke overstige 0,5 mg/kg. For arter som det konsumeres mindre av, for eksempel gjedde, er nivået satt til 1 mg/kg (Fjeld & Rognerud, 2003).

## 2.6 Metoder for kvikksølvbestemmelse

Forskjellige metoder basert på kromatografi har vært mest vanlig å bruke for separering av ulike kvikksølvspecier (Wan et.al 1997). De mest brukte analytiske metoder for dette er GC-AFS, gasskromatografi med atomfluorescenspektrometri, GC-AES, gasskromatografi med atomemisjonsspektrometri og voltametriske teknikker (Rodrigues et.al 2010; Diez & Bayona, 2002).

Konvensjonelle metoder for metylkvikksølv ekstraksjon involverer væske-væske ekstraksjon med farlige organiske løsemidler (eksempelvis benzen eller toluen) og endelig bestemmelse ved for eksempel gasskromatografi med elektron-fangst deteksjon (GC-ECD), GC med atomfluorescenspektrometri (AFS), GC med atomabsorpsjonspektrometri (AAS) og mikrobølgeovn-indusert plasma (MIP) (Diez et.al 2002).

I tabell 2.3 vises de mest brukte teknikker for kvikksølvbestemmelse i blod, urin og hår. Her oppgis også de viktigste reagenser som er brukt og deteksjonsgrensene for de ulike prøvetypene.

Tabell 2.3 Skjematisk oversikt over tidligere metoder utført av forskjellige forfattere for biologiske prøvetyper samt de mest brukte teknikkene for metylkvikksølvbestemmelse.

| Forfatter                | Detektor        | CV/*<br>HG | LOD  | Brukte reagenser og instrument for T-Hg og MeHg før deteksjon  | Prøvetype |
|--------------------------|-----------------|------------|--|--|-----------|
| Rodrigues et.al, 2010    | LC-ICP-MS       | Nei        | Hg <sup>2+</sup> : 0,25µg/L<br>MeHg <sup>+</sup> : 0,1µg/L | Hg <sup>2+</sup> :<br>Mikrobølgeopplutning<br>MeHg <sup>+</sup> : HCl/L-cystein/<br>2-mercaptoetanol             | Blod      |
| Montuori et.al, 2004     | GC-AFS          | CV         | MeHg <sup>+</sup> : 40ng/g                                 | MeHg <sup>+</sup> : SPME/ NaBet4   | Hår       |
| Torres et.al, 2009       | AAS             | CV         | Hg <sup>2+</sup> : 0,02ng/g                                | Hg <sup>2+</sup> og MeHg <sup>+</sup> :<br>Mikrobølgeopplutning/<br>TMAH/HNO <sub>3</sub>                        | Blod      |
| Diez & Bayona, 2002      | GC-AFS          | CV         | Hg <sup>2+</sup> : 80ng/g<br>MeHg <sup>+</sup> : 50ng/g    | Hg <sup>2+</sup> og MeHg <sup>+</sup> : :<br>HCl/SPME/ NaBet <sub>4</sub>  | Hår       |
| Diez et.al, 2008         | GF-AAS          | Nei        | T-Hg: 50ng/g   | T-Hg og MeHg <sup>+</sup><br>HNO <sub>3</sub> /<br>Mikrobølgeopplutning/<br>2,3-dimerccaptopropan-<br>1-sulfonat | Hår       |
| Morton et.al, 2002       | HPLC-<br>ICP-MS | Nei        | T-Hg: 0,5µg/g  | T-Hg og MeHg <sup>+</sup><br>Mikrobølgeopplutning/<br>HNO <sub>3</sub> /H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>            | Hår       |
| Korolczuk & Rutyna, 2008 | ASV             | Nei        | MeHg <sup>+</sup> :<br>2,3*10 <sup>-9</sup> mol/L          | CH <sub>3</sub> COOH/<br>ethanesulfonic acid/<br>NaOH  | Hår       |

\*: Kalddamp/Hydridgenerering

## 2.7 Metoder introduksjon

Selv om det finnes mange forskjellige teknikker og metoder for kvikksølvbestemmelse, har de fleste spesieringsmetodene for kvikksølv noen fellestrekk. Avhengig av prøvetype og kvikksølvnivå trenger de fleste metodene en ekstraksjon av kvikksølvspesiene fra matriks, oppkonsentrering, separasjon, introduksjon til detektor og deteksjon av de ulike speciene. Som nevnt under punkt 2.6 er de fleste metoder for separasjon og detektering av kvikksølv basert på kromatografiske teknikker (Hashempur et.al, 2008). I denne oppgaven blir det benyttet CVAAS teknikk for metylkvikksølvbestemmelse.

I tidligere metoder er det blitt brukt og anbefalt en variasjon med kombinasjoner av sterke syrer (HCl, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, HNO<sub>3</sub>), oksidasjonsmidler (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, KMnO<sub>4</sub>, K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>), høy temperatur, UV-stråling og mikrobølgestråling (Torres et.al 2009; Ubullus et.al 2000). I denne oppgaven ble det benyttet HBr (hydrogenbromid) for å frigjøre MeHg . Frigjøringen av MeHg skjer ved at når det tilsettes HBr (halogenert syre) til prøven vil det dannes halogener (HgBr<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>HgBr) i prøvematriksen (Simpson, 1961). Separasjonen av MeHg fra uorganisk kvikksølv blir oppnådd ved å ekstrahere kvikksølvhalogenene med et organisk løsemiddel. I dette forsøket ble det brukt toluen. Siden likt løser likt vil toluen kun separere MeHg (Leermakers et.al 2005). Etter separeringen vil MeHg ligge i organisk-fase. Ved bruk av sterke kompleksbindere som for eksempel 2-merkaptoetanol, APDC, tiol-gruppe inneholdende reagenser og L-cystein vil kvikksølv bli bundet. Til denne oppgaven ble det benyttet L-cystein på grunn av dens egenskap som ligand og tendens til å danne sterk kompleks til de fleste former for kvikksølv (Margetinova et.al 2008). Når MeHg er blitt separert ut til L-cystein vil det bli dannet en vandig-fase. Med dette kan prøven dekomponeres på UltraClave.

### **2.7.1 Dekomponering av prøver ved UltraClave og Multiwave**

Det er nødvendig å dekomponere prøven fra organisk form til ionisk form fordi instrumentet som benyttes i dette forsøket er et automatisert kvikksølvsystem som kun måler Hg<sup>2+</sup>.

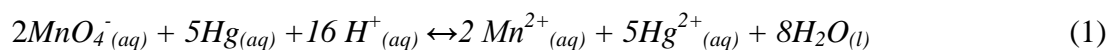
Dekomponering av prøver baserer seg på mikrobølgeteknikk. Under denne oppgaven ble det benyttet UltraClave for dekomponering av prøver. Multiwave ble kun benyttet ved et tilfelle der UltraClave sviktet (i påvente av service etter instrumenthavari).

Her trenger mikrobølgene igjennom prøvebeholderne (kvarts eller teflon), og oppvarmingen foregår direkte i prøveløsningen på grunn av vekselvirkningen mellom mikrobølgene og prøveløsningens ioner og polare forbindelser. Fordelen ved bruk av lukkede systemer er at man oppnår høyere temperatur, og at flyktige prøvekomponenter ikke går tapt under dekomponeringen (Torres et.al, 2009).

Prøven dekomponeres i en oksiderende blanding av salpetersyre (HNO<sub>3</sub>) og hydrogenperoksid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Syre i vannbad som finnes i UltraClave absorberer energien i mikrobølgene, og hydrogenperoksid i vannbadet reagerer med nitrøse gasser (Jensen, 2009). Ved bruk av UltraClave gir det samme temperatur og trykk i alle beholderne og det forblir lite organisk rest i prøven. I UltraClave gir det høyt trykk både inne i og utenfor beholderne. Disse faktorene er med på å gi analysen en god presisjon og god nøyaktighet (Gjengedal, 2009). I Multiwave derimot eksisterer det ikke noe vannbad med syre. Dette fører til at det ikke oppnås samme temperatur og trykk i alle prøvebeholderne. Ved bruk av Multiwave oppnås det kun høy trykk inni beholderne. Disse faktorene vil kunne påvirke presisjonen og nøyaktigheten (Paar, 1998).

Etter dekomponering av prøven er det viktig at kvikksølv alltid foreligger på ioneform (Hg<sup>2+</sup>) for å hindre fordampning av Hg<sup>0</sup> og tap av analytt. Dette oppnås ved å tilsette et sterkt oksidasjonsmiddel som for eksempel KMnO<sub>4</sub> eller K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> i 2% HNO<sub>3</sub>. I dette forsøket ble det benyttet kaliumpermanganat.

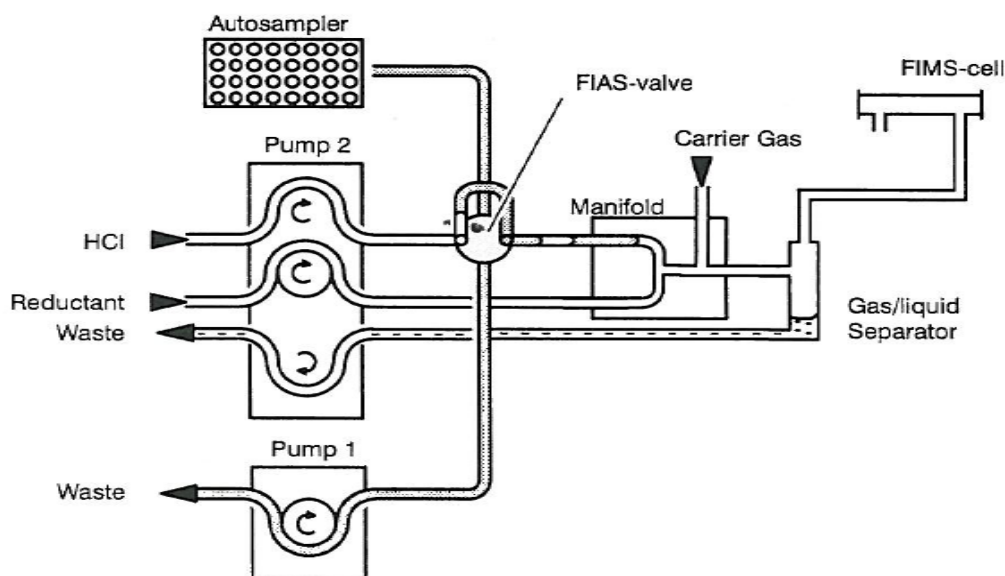
Likning 1 viser hvordan kaliumpermanganat hindrer tap av Hg ved fordampning, ved å hindre dannelse av Hg(0).



### 2.7.2 Generelt om kalddamp atomabsorpsjonsspektrometri (CVAAS)

En mye brukt metode for bestemmelse av total kvikksølv er kalddampgenerering fulgt av atomabsorpsjonsspektrometri (figur 2.4). Kvikksølv er det eneste metalliske grunnstoffet som har et brukbart damptrykk ved romtemperatur (Skoog et.al 2007). Kalddampgenerering var først rapportert i 1968 av Hatch og Ott. Kalddamp-atomabsorpsjonsspektrometri (CVAAS) er en allment akseptert teknikk for bestemmelse av kvikksølv på grunn av sin enkelhet og høye følsomhet. Den er forholdsvis fri for interferenser, har lave driftskostnader, rask og klar aksept av flytende prøver (Ashkenani et.al 2009).

Ved spesifikke bølgelengder, vil alle grunnstoff absorbere og sende ut stråling, noe som gir grunnlaget for AAS. Basert på Beer-Lambert's lov kan mengden av grunnstoff måles som nedgang av intensitet i lysstrålen ved å velge en bølgelengde der en vet at kvikksølv absorberer lys (253.7nm).



Figur 2.4: Et oppsett over systemet for kalddampgenerering av kvikksølv (Perkin Elmer, 1994)

### 2.7.3 Instrumentering

Instrumentet som benyttes i denne øvelsen er en Perkin Elmer FIMS 400 som består av prøveveksler, to uavhengige peristaltiske pumper, ventiler med slanger og reaksjonskveiler, gasseparator og en kvartscelle for måling av absorpsjon.

Instrumentet består av et FIA-system hvor kvikksølv blir redusert fra  $\text{Hg(II)}$  til  $\text{Hg(0)}$  med enten tinnklorid(II) eller natriumborhydrid. Det er viktig at kvikksølvet er i ioneform for å kunne redusere det til  $\text{Hg}^0$  ved tilstedeværelse av et egnet reduksjonsmiddel. Organiske kvikksølv forbindelser blir ikke redusert til  $\text{Hg}^0$  med tinnklorid, men natriumborohydrid ( $\text{NaBH}_4$ ) kan redusere organiske kvikksølvforbindelser. En fullstendig reduksjon vil ikke kunne skje (Torres et.al, 2009). I dette forsøket blir det benyttet tinnklorid(II). I væske-gasseparator blir flyktig elementært kvikksølv separert og blåst ut av en løsning med en bæregass (argon). Gassen blir så ført inn i et rør og absorpsjonen blir målt ved 253,7nm (Perkin Elmer, 1994).

For å hindre at reduksjonsmiddelet (tinn(II)klorid eller natriumborhydrid) i analysen skal bli forbrukt, må man rett før analysen av kvikksølv fjerne overskudd av oksidasjonsmiddel. Uten å redusere  $\text{Hg(II)}$  vil de kraftige oksidasjonsmidlene reduseres ved tilsetning av oksalsyre eller hydroksylamin,  $\text{NH}_2\text{OH}$ . Her kan det også benyttes høye konsentrasjoner av tinn(II)klorid (10% (w/V)) hvis overskudd oksidasjonsmiddel ikke fjernes (Lohne, 2009).

I metoden benyttet i dette arbeidet ble kvikksølv redusert med tinnklorid etter likning 2



Ved bruk av CVAAS-teknikk fjernes analytten fra matriks og interferenser reduseres.

Et problem kan være flyktige nitrogenoksider som kan interferere med målingen. Under oppslutning av prøver med  $\text{HNO}_3$  vil det blant annet dannes forbindelser som  $\text{NO}_2$ ,  $\text{NO}$  og  $\text{N}_2\text{O}_4$ . For å unngå dannelsen av nitrøse gasser bør det tilsettes et oksidasjonsmiddel som  $\text{H}_2\text{O}_2$  i prøvene, slik at de nitrøse gassene blir oksidert (Lohne et.al 2009)



## 3 Materialer og Metode

### 3.1 Materialer

Nedenfor vises en oversikt over brukt utstyr og instrument, kjemikalier og gasser samt sertifiserte referansematerialer og standarder i henholdsvis tabell 3.1, 3.2 , 3.3

Tabell 3.1: Utstyr og instrumenter som ble benyttet under arbeidet

| <b>Utstyr</b>                                   | <b>Leverandør</b>         |
|---|---------------------------|
| Toppvekt (Sartorius)                            | Kebo lab as               |
| Analysevekt (Sartorius)                         | Kebo lab as               |
| Automatisk pipette                              | Biohit                    |
| 50 mL polypropylen rør                          | VWR                       |
| Målekolbe i glass (50 ml og 100 mL)             | Kebo lab as               |
| Saks  | Stanless steel, China     |
| MilliQ-vann (Ultrapure), 18-M $\Omega$ minimum* | Barnstead                 |
| Tørkeskap                                       | Termaks                   |
| Mekanisk vertikal mikser                        | Houm as                   |
| Sentrifuge (Labofuge)                           | Houm as                   |
| <b>Instrument</b>                               | <b>Leverandør</b>         |
| FIMS 400  | Perkin Elmer              |
| UltraClave 3                                    | Milestone                 |
| Kompressor (junior II)                          | Bauer                     |
| Prøveveksler, AS90                              | Perkin Elmer              |
| Multiwave (mikrobølgesystem)                    | Anton Paar (Perkin Elmer) |

\* Vannet er rensset med rensesanlegg fra Barnstead

Tabell 3.2 Oversikt over kjemikalier brukt til forsøket

| Kjemikalie                      | Leverandør    | Analysekvalitet     | Empirisk formel  |
|---------------------------------|---------------|---------------------|--|
| Salpetersyre (Minimum 65%)V/V   | UMB*          | Ultrapure           | HNO <sub>3</sub>   |
| Hydrogenperoksid (33%)V/V       | Merck         | Pro analysi         | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>                                      |
| Kaliumpermanganat (5%)          | Merck         | Pro analysi         | KMnO <sub>4</sub>  |
| Metylkvikksølvklorid            | Sigma-Aldrich | Analytisk           | CH <sub>3</sub> HgCl   |
| Tinnkloriddihydrat (10%)        | Merck         | Pro analysi         | SnCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O                               |
| Svovelsyre (konsentrert)        | Merck         | Pro analysi         | H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>                                     |
| Saltsyre (Minimum 37%)V/V       | UMB*          | Ultrapure           | HCl  |
| Toluen                          | Merck         | For analyse         | C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CH <sub>3</sub>                      |
| L-cystein klorid (1%)           | Merck         | For biokjemisk bruk | C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> CINO <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O |
| Natriumacetat, vannfri (0,775%) | Merck         | Pro analysi         | CH <sub>3</sub> COONa*3H <sub>2</sub> O                            |
| Natriumsulfat, vannfri (12,5%)  | Merck         | Pro analysi         | Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>                                    |
| Natriumtiosulfat                | VWR (ProLabo) | Ikke kjent          | Na <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S <sub>2</sub> *5H <sub>2</sub> O   |
| Hydrogenbromid (47%)            | Merck         | Pro analysi         | HBr  |
| Etanol (95%)                    | Vinmonopolet  | Teknisk             | CH <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH                                  |
| Triton-X 100                    | Riedel-deHäen | Pro analysi         | C <sub>34</sub> H <sub>62</sub> O <sub>11</sub>                    |
| Nitrogen                        | Yara          | 2,5                 | N  |
| Argon                           | Yara          | 5,0                 | Ar   |

\* Syrer av pro analysi kvalitet produsert av Merck, UMB har destillert syrene til ultrapure-kvalitet.

Tabell 3.3: Oversikt over sertifiserte referansematerialer og standarder brukt til forsøket

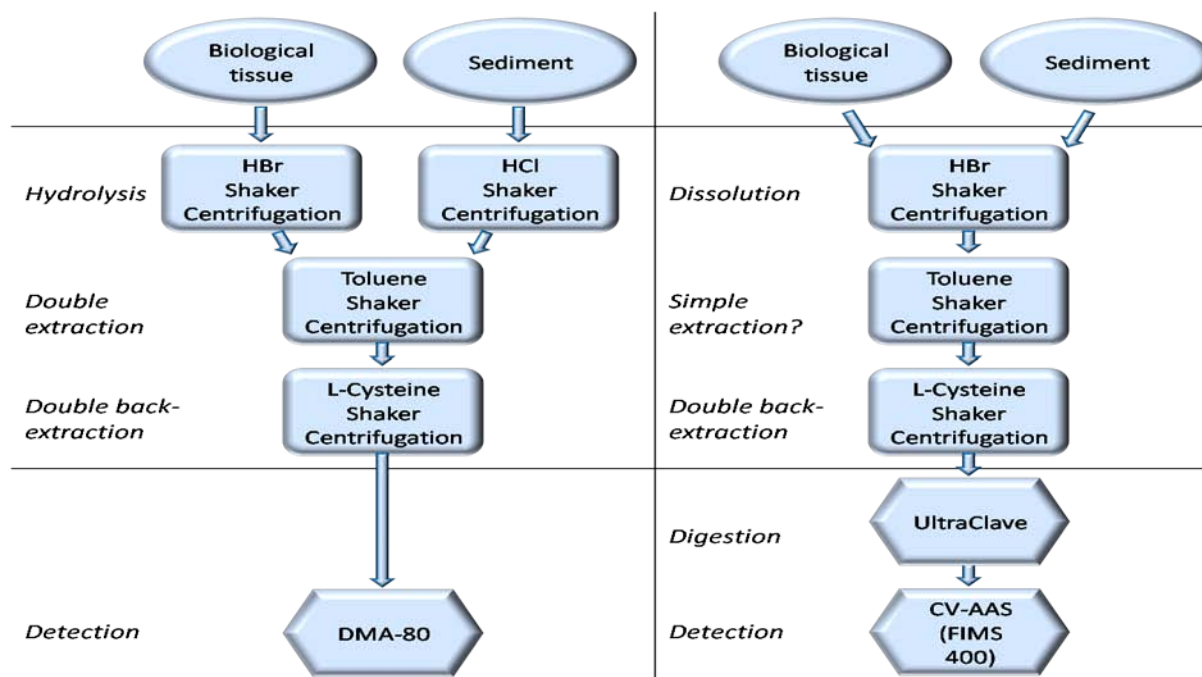
| Materialer                     | Sertifisert område Tot Hg | Sertifisert område MeHg | Leverandør  |
|--------------------------------|---------------------------|-------------------------|---|
| DORM-2 Dogfish Muscle          | 4,64 ± 0,26               | 4,47 ± 0,32             | National Research Council Canada  |
| DOLT-4 Dogfish Liver           | 2,58 ± 0,22               | 1,33 ± 0,12             | National Research Council Canada  |
| IAEA-086 Human hair            | 0,573 ± 0,039             | 0,258 ± 0,021           | International Atomic Energy Agency  |
| ERM-CC580 Estuarine sediment   | 132 ± 3                   | 0,075 ± 0,004           | National Research Council Canada  |
| Certified Standard Hg          | 1000 ± 3 µg/mL            |                         | Spectrapure standard  |
| SERONORM, Whole blood, level 1 | 2µg/L*                    | ----                    | National Institute of Occupational Health, Oslo, Norway and SGAB Analytica, Sweeden |
| SERONORM, Whole blood, level 2 | 8,2µg/L*                  | ----                    | National Institute of Occupational Health, Oslo, Norway and SGAB Analytica, Sweeden |

\* Verdier bestemt av kun to laboratorier, ikke sertifisert verdi

## 3.2 Metode

### 3.2.1 Utprøving av metoden med hensyn til selektivitet

Utgangspunktet for metodeutviklingen utført i denne mastergradsoppgaven var ekstraksjon av MeHg slik den ble utført (figur 3.1) i Maggi et.al (2009) Som mål på nøyaktighet i metoden ble det også benyttet like sertifiserte referansematerialer (DORM-2 og DOLT-4) som i Maggi et.al.



Figur 3.1: En skjematisk oversikt som viser den opprinnelige metoden foreslått av Maggi et.al (2009) til venstre og endret metode til høyre. Se vedlegg 3

Ved utprøving av denne metoden ble det tatt i bruk SRM av fiskemuskel. Her ble DORM-2 prøver både tilsatt en kjent mengde  $\text{Hg}^{2+}$  og ikke tilsatt noe  $\text{Hg}^{2+}$  valgt for analyse. Hensikten med å tilsette en kjent mengde av  $\text{Hg}^{2+}$  var for å kontrollere at det ikke detekteres  $\text{Hg}^{2+}$  i denne metoden. Dersom det ikke blir funnet igjen på noe av den tilsatte mengden  $\text{Hg}^{2+}$ , vil metoden vise seg å være selektiv for organisk bundet kvikksølv. For å bestemme nøyaktighet i metoden må det analyseres på SRM med sertifisert område for MeHg.

Det ble veid inn 5 paralleller av DORM-2 og 2 paralleller av DOLT-4. Tre av parallellene av DORM-2 ble ”spiket” med 0,3 mL av  $\text{Hg}^{2+}$  (10 mg/L).

Tabell V.1 i vedlegg 1 viser nøyaktig innveid mengde av DORM-2 samt spikede mengder  $\text{Hg}^{2+}$  og måledata for beregning av funnet verdi.

De veide prøvene og blankprøver ble tilsatt 10 mL HBr. Prøvene ble så ristet i 5 min på en vertikal mekanisk rister. Deretter ble prøvene sentrifugert ved 3000 rpm i 10 min. Så ble prøvene av DORM-2 og DOLT-4 samt blankprøvene tilsatt 20 mL toluen. Ved tilsetning av toluen til DOLT-4 prøvene ble det observert dannelse av emulsjon, slik som nevnt i artikkelen av Maggi et.al (2009). Det ble også gjort i stand 3 paralleller med 0,3 mL av MeHg (10 mg/L) standard ”spiket” i 10mL HBr og 3 paralleller med 0,3 mL av MeHg (10 mg/L) standard ”spiket” i 20 mL toluen uten tilsetning av HBr og 3 paralleller med 0,3 mL av MeHg (10mg/L) ”spiket” i 10 mL HBr og 20 mL toluen.

Etter tilsetning av 20 mL toluen ble alle prøvene og standardene satt på 20 min risting på vertikal mikser. Så ble DORM-2 prøvene sentrifugert ved 2400 rpm i 20 min. Etter sentrifugeringen ble supernatanten som inneholdt organisk kvikksølv (toluen fasen) overført til nye polypropylenrør. Prosessen med tolueutilsetning ble gjentatt på bunnfallet, det vil si HBr fasen, men denne gang med 15 mL toluen på alle prøvene. Alle prøver og standarder ble ristet i 20min og sentrifugert ved 2400 rpm i 20min. Det organiske ekstraktet ble så overført til polypropylenrøret som allerede hadde et organisk ekstrakt fra første omgang. I dette røret ble det så tilsatt 6 mL L-cystein for tilbakeekstraksjon(se tabell V.3 i vedlegg 2 for tillaging av 1% L-Cystein løsning). Denne blandingen ble ristet i 20 min og sentrifugert ved 2400 rpm i 5 min. Tilbakeekstraksjonen ble utført to ganger slik at mest mulig av MeHg gikk over til L-cysteinfasen. Ved hver tilbakeekstraksjon ble all L-cystein (bunnfasen) overført til et nytt polypropylenrør.

Her ble det også laget 3 nye paralleller med 0,3 mL MeHg (10mg/L) ”spiket” i 12 mL L-cystein. Hensikten med MeHg-standardene var å se hvor i trinnet det eventuelt var tap av MeHg. Deretter ble det tatt ut 2,5 mL av hver prøve i teflonrør og tilsatt 1,5 mL  $\text{HNO}_3$ . Så ble alle prøvene satt på UltraClave for dekomponering siden kvikksølv foreligger som MeHg. For analyse på CVAAS må kvikksølv foreligge som  $\text{Hg}^{2+}$ .

Etter at dekomponeringen av prøvene var ferdig ble prøvene tatt ut og overført til nye polypropylenrør og fortynnet til 15 mL.

Av de 15 mL ble det så tatt ut nye 3 mL og tilsatt en dråpe  $\text{KMnO}_4$  og fortynnet til 15 mL.

Videre ble alt som skulle analyseres overført til polypropylenrør og plassert i autosampleren.

### **Tillaging av standarder og løsninger**

Det ble laget standarder som hadde samme syrekonsentrasjon som de dekomponerte, fortynnede prøvene.

Det ble laget en kalibreringstandard på 0 µg/L, 0,1, 0,2, 0,5 µg/L, 1 µg/L, 5 µg/L og 10 µg/L og tilsatt en dråpe KMnO<sub>4</sub> og 1,7 mL HNO<sub>3</sub> (ca.samme syrekonsentrasjon som prøvene) og fortynnet til 50 mL. Det ble også laget reduksjonsmiddel og en carrier- ("bære")løsning for analysen. De ble laget to kalibreringsrekker. En høy kalibreringsrekke fra 0,5 µg/L til 10 µg/L for prøvematrikser med høyt kvikksølvinnhold og en lav kalibreringsrekke fra 0,1 µg/L til 5 µg/L for prøvematrikser med lavere kvikksølvinnhold.

Se tabell V.4 i vedlegg 2 for beregning av kalibreringstandard, carrier og reduksjonsmiddel.

#### **3.2.2 Utprøving av enkel ekstraksjon**

Som nevnt over tok den opprinnelige metoden tid. Av den grunn ble det derfor bestemt å endre litt på metoden. I første omgang ble det bestemt å gjøre om fra dobbel ekstraksjon til enkel ekstraksjon.

Det ble veid inn 6 paralleller av DORM-2 og 6 paralleller av DOLT-4. Alle disse parallellene og 3 blanke ble tilsatt 10 mL HBr og ristet på vertikal mikser i 5 min. Deretter ble DORM- og DOLT-prøver sentrifugert ved 2400 rpm i 10 min. For en parallell av DORM-2 og en parallell av DOLT-4 ble HBr-fasen fjernet før tilsetning av toluen. Disse to ble sentrifugert i 20 min ved 3000 rpm.

Blankene ble tilsatt 20 mL toluen og ristet i 20 min ved vertikal mikser. For prøvene av DORM-2 og DOLT-4 ble det bestemt at det bare skulle ha enkel toluenekstraksjon. Disse ble tilsatt 25 mL toluen hvor to paralleller ble ristet i 20 min og 2 paralleller ble ristet i 40 min. Deretter ble alle prøvene sentrifugert i 20 min ved 2400 rpm. Parallellene hvor HBr-fasen ble fjernet ble tilsatt 20 mL toluen, og det samme ble gjort med parallellene hvor HBr fasen ikke ble fjernet. Til disse parallellene ble det vanlige med dobbel toluenekstraksjon utført (se punkt 3.2.1). Parallellene med enkel toluenekstraksjon (DORM-2) ble etter sentrifugeringen overført til nye polypropylenrør, hvor mest mulig av toluenfasen ble overført. Dette ble så tilsatt 5 mL L-cystein i to omganger og ristet i 20 min og sentrifugert i 5 min ved 2400 rpm ved hver tilsetning. De andre parallellene ble ristet i 20 min og sentrifugert ved 3000 rpm i 20 min. Så ble L-cystein-fasen etter endt sentrifugering overført til 15 mL polypropylenrør.

Av dette ble det tatt ut 2,5 mL av prøvene og tilsatt 1 mL HNO<sub>3</sub> i teflonrør for dekomponering på UltraClave. Tabell V.2 i vedlegg 1 viser nøyaktig innveid mengde og måledata for beregning, og figur V.1 i vedlegg 1 viser en skjematisk oversikt over hvordan metoden ble utført med tanke på ristetid og sentrofugeringstid og mengde volum som ble tilsatt/overført.

### **Nøyaktighet ved enkel ekstraksjon**

Det ble veid inn 4 paralleller av DORM-2 som skulle ha enkel ekstraksjon og 6 paralleller DORM-2 som ble spiket med 0,3 mL Hg<sup>2+</sup> (10 mg/L). Til disse prøvene og 3 blankprøver ble det deretter tilsatt 10 mL HBr. Det ble også veid 3 paralleller av DORM-2 for å undersøke nøyaktigheten i metoden ved å benytte HCl istedenfor HBr. Alle prøvene ble ristet i vertikal mikser i 10 min og sentrifugert ved 2400 rpm i 5 min.

Det ble "spiket" med 0,3 mL av Hg<sup>2+</sup> (10 mg/L) til 10 mL HBr for 3 DORM-2 paralleller for å kontrollere selektiviteten i metoden ved enkel ekstraksjon.

Deretter ble prøvene og 3 blankprøver tilsatt 25 mL toluen og mikset kraftig i vortex mikser og deretter ristet i vertikal mikser i 20 min før det ble sentrifugert ved 2400 rpm i 20 min. Det ble antatt at MeHg er homogent fordelt i toluen. Derfor ble det tatt ut 20 mL toluen fra alle prøver bortsett fra DOLT-4 prøven. Her ble det tatt ut 15 mL toluen på grunn av emulsjonen. Så ble alle prøvene tilsatt 6 mL L-cystein i to omganger hvor det ble ristet i 20 min og sentrifugert i 5 min ved hver omgang. Arbeidet med DOLT-4 ble utført av Berit Glomstad og er beskrevet i Glomstad (2010).

For to av parallellene som ble spiket med 0,3 mL Hg<sup>2+</sup> ble det kun gjort enkel tilbakeekstraksjon, dette for å måle på gjenfinning ved enkel tilbakeekstraksjon.

Etter at alle prøvene ble overført til 15 mL polypropylenrør ble det tatt ut 2,5 mL av hver prøve til nye teflonrør og tilsatt 1,5 mL HNO<sub>3</sub> for opplutning på UltraClave. Det ble tatt ut 2,5 mL av 3 paralleller av DORM-2 med enkel ekstraksjon og 3 paralleller av 0,3 mL MeHg i HBr og overført til teflonrør for opplutning.

Etter endt dekomponering ble prøvene overført til 15 mL polypropylenrør og fortynnet til 15 mL. Av disse 15 mL ble det tatt ut 3 mL til nye polypropylenrør og tilsatt 1 dråpe KMnO<sub>4</sub> og fortynnet til 15 mL. Så ble kalibreringstandarder laget med samme syrekonsentrasjon som nevnt under punkt 3.2.1. Prøver og standarder ble så analysert på FIMS.

### 3.2.3 Holdbarhet av MeHg standard

Det ble utført et lagringsforsøk på MeHg standarden på 10 mg/L for å se hvor lenge metylkvikksølvet var stabilt og om den holdt seg på MeHg-form. MeHg-standarder ble lagret kjølig (4°C) og mørkt i 1 mnd, 1 uke og 1 dag. Samme prosess som beskrevet under punkt 3.2.2 ble også fulgt for disse ''spikede'' MeHg-standardprøvene. Ved første gangs lagringsforsøk ble det unnlatt å riste prøven ved tilsetning av MeHg til 10 mL HBr. De andre gangene forsøket foregikk, ble prøven ristet i 10 min ved tilsetning av MeHg til 10mL HBr. Problemet med stabilitet oppsto etter hvert. En mulig hypotese foreslått av Glomstad (2010) var at metylkvikksølvet setter seg fast i veggene i polypropylenrøret innen den tiden det blir satt på risting etter tilsetting av HBr. Glomstad (2010) utførte nok et lagringsforsøk av metylkvikksølvstandarder, men uten risting ved MeHg tilsatt i 10 mL HBr.

Det ble også testet på metylkvikksølv standarden direkte uten å gå veien via ekstraksjon og dekomponering for å se om standarden fortsatt var i MeHg form og ikke hadde omdannet til  $Hg^{2+}$ . Siden instrumentet kun måler på  $Hg^{2+}$  var det mulig å se om det ble noen topp på standarden eller ikke.

### 3.2.4 Forbehandling av biologiske prøvetyper

Urin og blod trengte ingen forbehandling for verken T-Hg eller MeHg. Håret derimot trengte en forbehandling.

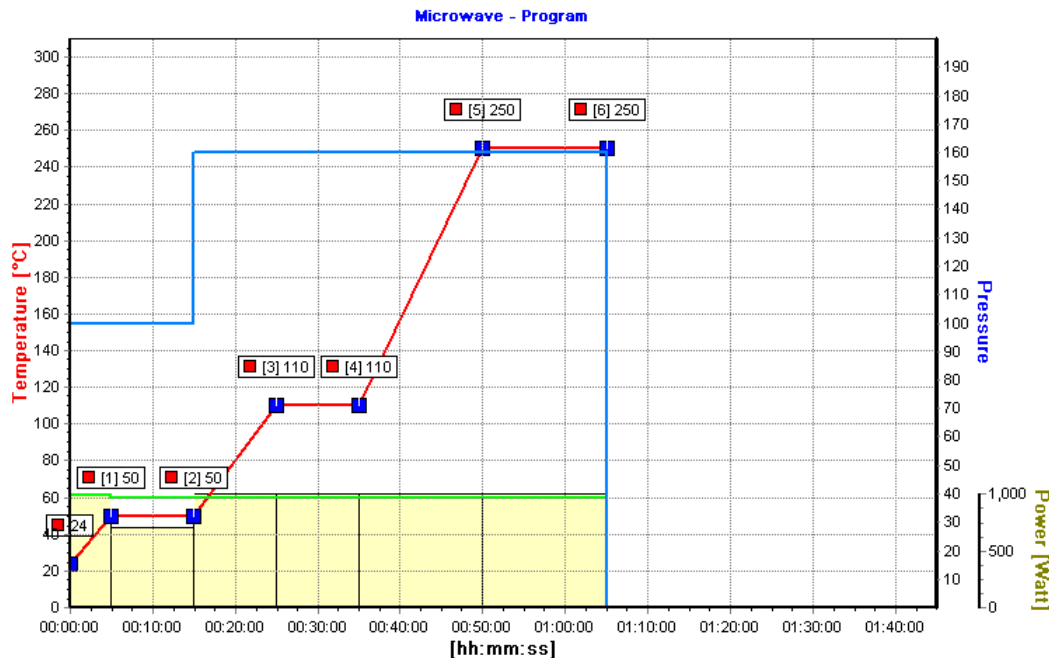
Hårprøver ble lagret og fryst ned i plastposer før forbehandling, mens urin og blod ble lagret mørkt og kjølig ved 4°C. Hårprøver ble forbehandlet på følgende måte: Først ble de klippet i små biter ved hjelp av en ren saks. Deretter ble hårprøvene vasket med 1% triton-X 100 for å fjerne eventuelle partikler og støv. Så ble prøvene skylt tre ganger med ionebyttet vann og satt til tørk i tørkeskap ved 54°C. Prøvene sto til tørk i 2 dager før de ble lagret mørkt og kjølig.

### 3.2.5 T-Hg og MeHg i blod, hår og urin

For videre metodeutvikling ble det nå benyttet menneskeblod og hesteblood som prøvematriks for bestemmelse av MeHg. Konsentrasjon av MeHg kan ikke overstige T-Hg, derfor ble bestemmelse av T-Hg også inkludert i arbeidet.

For T-Hg analyse ble 2 paralleller av hver på 1 ml av henholdsvis urin og blod overført til teflonrør og tilsatt 1,5 mL  $HNO_3$  og 1 mL  $H_2O_2$ . Av hårprøver ble 2 paralleller på 0,100 g veid direkte i teflonrør og tilsatt samme syremengde som i blod og urin. For bestemmelse av THg ble det tatt utgangspunkt i en intern metode utviklet for bestemmelse av THg i fiskemuskel.

Siden all Hg må være på ioneform for analyse på CVAAS ble prøvene dekomponert i UltraClave. For dekomponeringen ble prøven tilsatt 1,5 mL HNO<sub>3</sub> og 1 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fulgt av opplutningstrinn som vist i figur 3.2. Etter endt dekomponering ble prøvene overført til 15 mL polypropylenrør og fortynnet til 15 mL med ionebyttet vann.



Figur 3.2: De ulike trinnene i "pyseopplutnings" programmet for biologiske prøver på UltraClave.

For å bestemme MeHg i blod, hår og urin ble fremgangsmåten gjort på samme måte som beskrevet under punkt 3.2.2. Her ble det brukt 3 paralleller av prøvetype blod og urin og 6 paralleller av prøvetype hår og 3 blanke for analyse.

### 3.2.6 Helse, miljø og sikkerhet

Ved arbeid med kvikksølv ble det tatt hensyn til at kvikksølvet også kan tas opp i kroppen ved inhalasjon og absorpsjon gjennom huden.

Den ekstremt toksiske organiske kvikksølvforbindelsen kan forårsake nevrologiske skader.

Direkte kontakt med huden kan forårsake døden (Sigma-Aldrich; Sanz et.al, 2003). Under

hele prosessen med metodeutviklingen ble det benyttet egnede hansker, briller og klær. Alt

arbeid foregikk under avtrekk siden det organiske løsemiddelet toluen kan forårsake alvorlige helseskader ved langvarig eksponering gjennom innånding.



## 4 Resultat og Diskusjon

### 4.1 Utprøving av metoden med hensyn til selektivitet

Det ble gjort innledende forsøk med referansemateriale av fisk, DORM-2 og DOLT-4 for kontrollere for selektiviteten og nøyaktigheten i metoden. Ved utprøving av DORM-2 samsvarte de målte verdiene med sertifiserte verdier, mens DOLT-4 ga et emulsjonsproblem som nevnt i Maggi et.al (2009). Emulsjonen dannes muligens på grunn av høyt fettinnhold i referansematerialet (se figur 4.1). Emulsjonen ble løst ved å tilsette et par dråper etanol. Videre utprøving av metoden ble gjort på DORM-2.



*Figur 4.1:*

*Figuren viser dannelse av emulsjon ved tilsetning av toluen til hydrogenbromid for DOLT-4.*

Resultatet fra tabell 4.1 viser at den funne verdien av MeHg er nesten i samsvar med det sertifiserte området for DORM-2. Dette er resultater basert på opprinnelig ekstraksjonsmetode, det vil si ingen endring i selve ekstraksjonen av MeHg, men for å muliggjøre deteksjon ved bruk av CVAAS-teknikk ble ekstraktene dekomponert før analyse på FIMS 400, se punkt 2.7.6.

*Tabell 4.1: Resultater for utprøving av metode for bestemmelse av MeHg. Nøyaktighet i metoden er bestemt ved analyse av DORM-2.*

| Type  | Målt konsentrasjon MeHg (mg/kg $\pm$ STD) | Sertifisert område MeHg (mg/kg $\pm$ STD) |
|---|---|---|
| DORM-2, (n=3)                                     | 3,92 $\pm$ 0,192                          | 4,47 $\pm$ 0,32                           |
| DORM-2, (n=3), 30 $\mu$ L Hg <sup>2+</sup> spiket | 4,00 $\pm$ 0,052                          | 4,47 $\pm$ 0,32                           |

Her ble også  $\text{Hg}^{2+}$  spiket til DORM-2 før tilsetning av HBr. Dersom  $\text{Hg}^{2+}$  også ble med videre i prosessen, ville funnet verdi overstegte den sertifiserte verdien. For å bekrefte at uorganiske former ikke følger med i ekstraksjonsmetoden var det derfor nødvendig å prøve ut dette ved å tilsette en kjent mengde  $\text{Hg}^{2+}$ . Ved spiking av  $\text{Hg}^{2+}$  skulle det ha gitt økt signal ved analyse dersom andre former for uorganisk kvikksølv ble med i ekstraksjonen. Ekstraksjonsmetoden var selektiv for MeHg som vist i tabell 4.1.

## 4.2 Utprøving av enkel ekstraksjon

Før endring av den opprinnelige metoden foregikk ble det først bekreftet at den opprinnelige metoden virket, se punkt 4.1 for omtale av dette.

Deretter ble følgende endring i selve ekstraksjonsmetoden utført. Siden prosessen med ekstraksjon var tidkrevende ble det valgt å prøve ut metoden med enkel ekstraksjon, hvor det ble antatt at MeHg er homogent fordelt i toluen og at man dermed kunne ta ut et bestemt volum og regne tilbake på dette. Det ble også prøvd enkel tilbakeekstraksjon i stede for dobbel tilbakeekstraksjon. Det ble også foretatt bytte av syre for oppløsning av materialet. Se tabell 4.2 for resultatet av de endrede trinnene i metoden.

Tabell 4.2: Resultatet for endret metode med enkel ekstraksjon, syrebytte og enkel tilbakeekstraksjon.

| Prøvematriks (n antall replikate)           | Målt konsentrasjon MeHg (mg/kg $\pm$ STD) | Sertifisert område MeHg (mg/kg $\pm$ STD) |
|---|---|---|
| DORM-2 (n=8)                                | 4,21 $\pm$ 0,119                          | 4,47 $\pm$ 0,32                           |
| DORM-2, 0,3mL $\text{Hg}^{2+}$ spiket (n=4) | 4,13 $\pm$ 0,011                          |   |
| DOLT-4 (n=6)                                | 1,35 $\pm$ 0,026                          | 1,33 $\pm$ 0,12                           |
| DORM-2, enkel tilbakeekstraksjon (n=1)      | 3,96                                      | 4,47 $\pm$ 0,32                           |
| DORM-2, enkel tilbakeekstraksjon (n=1)      | 3,99                                      |   |
| DORM-2, HCl istedenfor HBr (n=3)            | 3,71 $\pm$ 0,139                          |   |

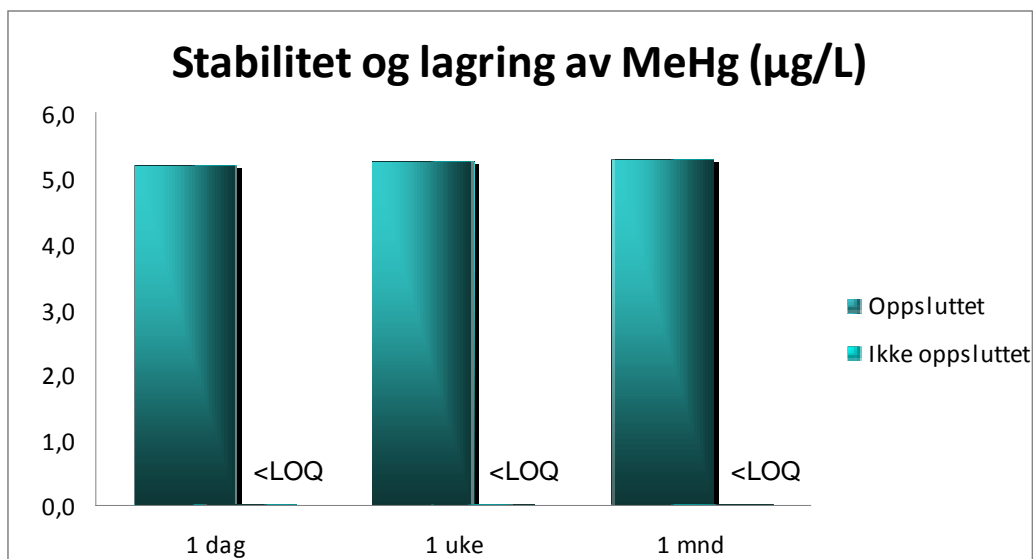
Metodens nøyaktighet viste seg å være god for DORM-2 og DOLT-4. I tabell 4.2 kan man se at den funne verdien kom godt innenfor det sertifiserte område for DORM-2 og DOLT-4. En mulig årsak til at nøyaktigheten ble bedre på enkel ekstraksjon enn dobbel ekstraksjon kan være at det ved enkel ekstraksjon benyttes et mindre volum ved uttak av toluen. Som nevnt tidligere er det antatt at MeHg i toluen-fasen er homogent fordelt. På den måten kan man unngå å få med seg forurensning fra syrefasen.

Ved å benytte dobbel ekstraksjon ble det viktig å få med seg all toluen-fasen videre i trinnet, men samtidig ble det vanskeligere å unngå å få med seg syrefasen i den organiske fasen. Det er viktig å ikke få med seg syrefasen videre i prosessen siden den sterke kompleksbinderen L-cystein eventuelt kan binde til seg andre former for kvikksølv. Syren løser opp mange former for kvikksølv, men det er kun MeHg det er ønskelig å ha med videre. Ved tilsetning av toluen antas det at toluen løser opp den organiske formen for kvikksølv fra syrefasen. Overføring av uorganiske former for kvikksølv i syrefasen videre i prosessen vil være et problem siden deteksjon ved bruk av CVAAS er en indirekte metode. Ved spiking av  $\text{Hg}^{2+}$  til DORM-2 ble den funne verdi beregnet til å være innenfor sertifisert område. Ingen gjenfinning av spiket mengde viser at ekstraksjonsmetoden var selektiv for organisk bundet kvikksølv som vist i tabell 4.2.

Det ble også prøvd med enkel tilbakeekstraksjon for å kunne spare mest mulig tid. For å kunne si noe om presisjonen i metoden med enkel tilbakeekstraksjon må det flere replikater til, men siden de to målingene er relativt like vil dobbel tilbakeekstraksjon være nødvendig for å oppnå tilfredsstillende nøyaktighet. I den endrede metoden ble 47% HBr erstattet med ca 12 M HCl. Resultatet for dette viste at den funne verdien på DORM-2 var mindre enn den sertifiserte verdien for DORM-2 ved bruk av HCl. Dette tilsier at det frigjøres mer MeHg ved bruk av HBr enn ved bruk av HCl.

### **4.3 Lagring og stabilitet**

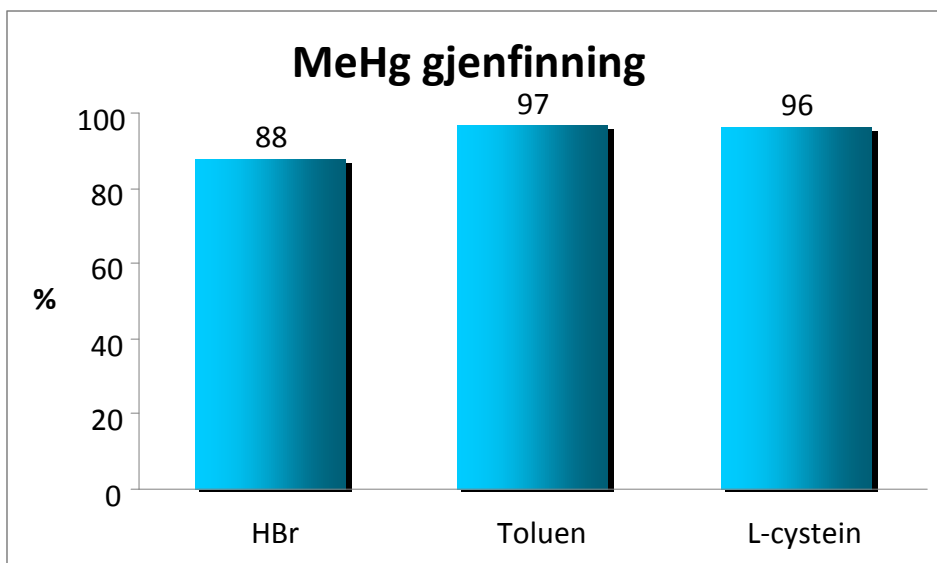
Det ble utført analyser på lagring og stabilitet av MeHg standard som ble oppbevart kjølig ( $4^{\circ}\text{C}$ ) og mørkt. Analysen ble utført på standarder som ble lagret i 1 måned, 1 uke og 1 dag. Resultatet viste at standarden var stabil og holdt seg over disse periodene. Figur 4.3 viser en oversikt over gjenfinningen av MeHg standarden dekomponert på UltraClave og gjenfinning av  $\text{Hg}^{2+}$  uten dekomponering på UltraClave. Formålet med analyse av ikke-dekomponert standard var å teste om metylkvikksølvstandarden holdt seg i dens form og ikke ble omdannet til  $\text{Hg}^{2+}$  ved lagring.



*Figur 4.3: En oversikt over metylkvikksølvstandard oppsluttet og ikke oppsluttet. Standarden som ble analysert ble lagret i 1 mnd, 1 uke og 1 dag.*

Resultatet viste at standarden er stabil opptil 1 mnd ved oppbevaring mørkt med en temperatur på 4°C. Den mulige hypotesen foreslått av Glomstad (2010) om ikke å riste standarden ved tilsetning av HBr ble bekreftet ved funn av den tilsatte mengden MeHg standard. Dette resultatet er av stor betydning for å forsøke å redusere forbruket av denne høyst toksiske standarden. Tabell V5 i vedlegg 4 viser en oversikt over måledata og beregnet konsentrasjon på MeHg standard ved tilsetning av et kjent volum.

Det ble også foretatt forsøk på hvilket trinn som er mest kritisk med hensyn til tap av analytt. Figur 4.2 viser den oversikten at HBr-fasen er den mest kritiske fasen med tanke på tap av analytt. Se tabell V6 i vedlegg 4 for måledata og beregnet gjenfinning.



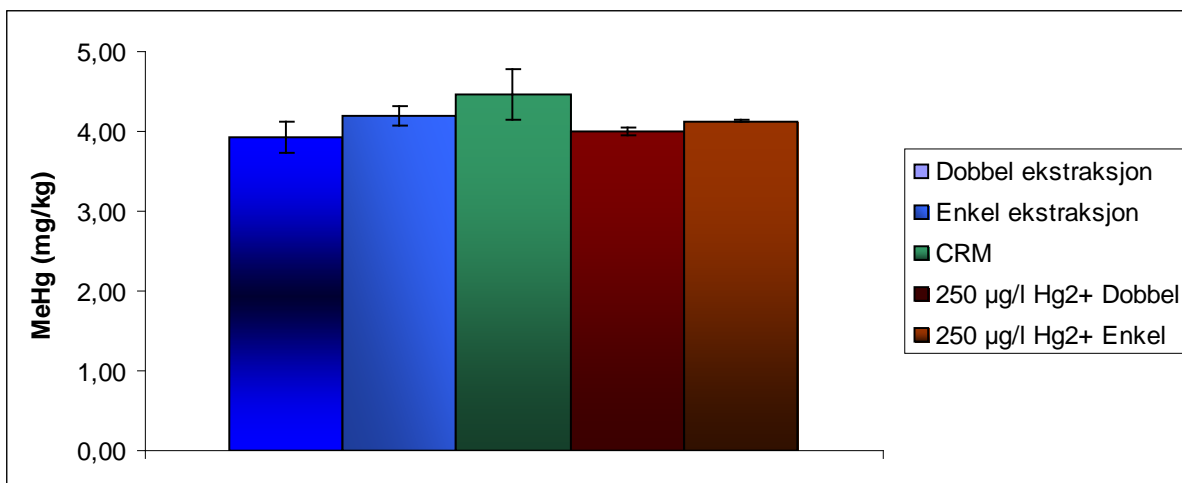
Figur 4.2: En oversikt som viser hvor i ekstraksjonstrinnet det er mest kritisk for tap av analytt.

Her mistenkes det at tap av MeHg ved HBr fase er relatert til den karakteristiske tendensen som kvikksølv har til å henge seg fast til overflaten på emballasje (polypropylenrøret).

#### 4.4 Opprinnelig metode sammenlignet med endret metode.

Den opprinnelige metoden ble først utprøvd for å se om metoden fungerte. Videre ble den opprinnelige metoden endret fra dobbel ekstraksjon til enkel ekstraksjon. Dette gjorde at det ble spart tid ved ekstraksjonsprosessen. Figur 4.4 viser resultat for analyse av sertifisert referansemateriale, DORM-2 med dobbel ekstraksjon og enkel ekstraksjon. Ytterst til høyre i figuren ser man også den funne verdien til den spikede mengden  $\text{Hg}^{2+}$  i både dobbel og enkel ekstraksjon. Her er det ikke funnet mer kvikksølv enn den sertifiserte verdien selv om prøven ble spiket med  $\text{Hg}^{2+}$ . Se punkt 4.1 for omtale av dette.

Resultater (tabell 4.1 og 4.2) viser at arbeidstiden kan bli redusert ved å benytte enkel ekstraksjon i stedet for dobbel ekstraksjon.



Figur 4.4: Viser en sammenligning av funnet mengde av sertifisert referansemateriale og oppgitt mengde hvor metoden ble utført med både enkel og dobbel ekstraksjon.

#### 4.5 Deteksjonsgrense (LOD) og kvantifiseringsgrense (LOQ)

Deteksjonsgrensen og kvantifiseringsgrensen ble beregnet ved hjelp av henholdsvis ligning 2 og 3, og resultatet er vist i tabell 4.3.

$$\text{LOD} = 3x \text{SD}_{\text{Blank}} \quad (2)$$

$$\text{LOQ} = 10x \text{SD}_{\text{Blank}} \quad (3)$$

Standardavviket av målt syntetisk blankløsning ble benyttet for å bestemme LOD for instrumentet, mens standardavviket for blanke prøver som fulgte alle trinn i prosessen ble benyttet for å bestemme LOQ for metoden.

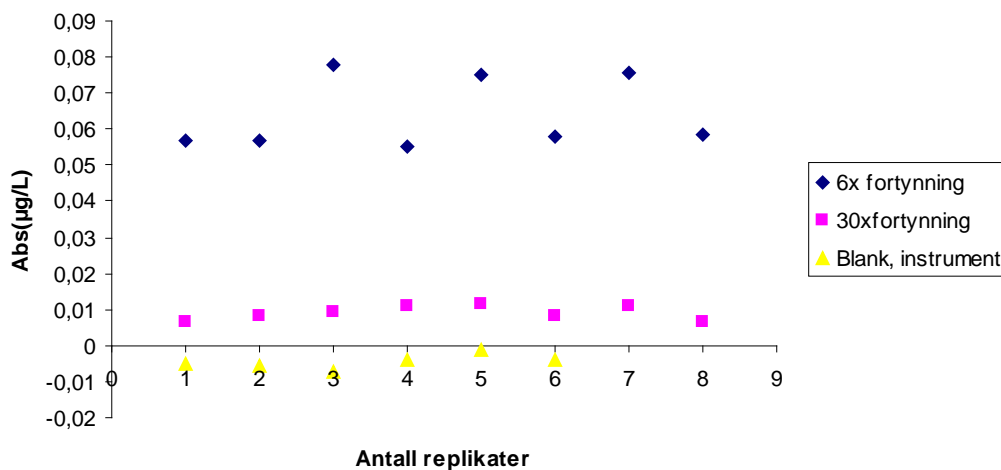
Alle blankene gikk gjennom samme prosess som prøver og SRM. Det vil si også samme fortynninger som prøver og SRM. I tabell 4.3 er det vist fortynninger på 6 og 30 ganger. Disse fortynningene var nødvendige i prøver for å komme innenfor kalibreringskurven på instrumentet.

Tabell 4.3: Oversikt over estimert LOD (deteksjonsgrense) og LOQ (kvantifiseringsgrense) for metoden (n=8). Antatt innvekt på 0, 1 g innveid prøve og antatt volum tilsatt på 1 mL

| Fortynning | Blank         |               | Hår            |                | Blod           |                |
|------------|---------------|---------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
|            | LOD<br>(µg/L) | LOQ<br>(µg/L) | LOD<br>(mg/kg) | LOQ<br>(mg/kg) | LOD<br>(µg/mL) | LOQ<br>(µg/mL) |
| 6          | 0,030         | 0,100         | 0,027          | 0,090          | 0,0027         | 0,009          |
| 30         | 0,006         | 0,020         | 0,027          | 0,089          | 0,013          | 0,045          |

Instrumentets LOD ble bestemt ved hjelp av syntetiske blankprøver som kun ble tilsatt HNO<sub>3</sub> i ionebyttet vann for å oppnå samme syrekonsentrasjon som kalibreringsstandardene på instrumentet. Dette resulterte i en LOD på 0,0055 µg/L. For T-Hg ble LOQ bestemt til å være 0,02 µg/L (n=3).

Ved bestemmelse av metodens deteksjonsgrense og kvantifiseringsgrense ble det oppdaget at en av løsningene som blir brukt i denne metoden er forurenset. Som tabell 4.3 viser er det relativ stor forskjell på instrumentets LOD sammenlignet med metodens LOD. Dette viser at dersom det var rene nok løsninger, ville metodens LOD og LOQ blitt mye lavere. Figur 4.5 viser en oversikt over målte verdier av blankprøver ved hver replikat og instrumentets målte verdier.



Figur 4.5: En oversikt over målte replikater av metodeblank med 6x og 30x fortynning samt en syntetisk blankløsning som ikke har vært gjennom ekstraksjon og oppløsning. Her kan man se et tydelig tegn på en systematisk feil.

Det forelå ingen opplysninger om renhet av L-cystein med hensyn til kvikksølv. For å undersøke om L-cystein kunne være kilde for forurening ble denne erstattet med natriumtiosulfat. Det forelå heller ingen opplysninger om renhet av natriumtiosulfat. Siden UltraClave var i ustand ble prøver oppsluttet i Anton Paar Multiwave (Perkin Elmer). Til dette ble det tatt i bruk kvartsglass istedenfor teflonrør. ERM-CC580 (estuarine sediment) og 6 blankprøver ble dekomponert i henholdsvis L-cystein og natriumtiosulfat.

Resultater viste ingen forskjell mellom natriumtiosulfatløsningen og L-cystein. Dette viser at det kreves en kompleksbinder av renere kvalitet for å få en bedre deteksjonsgrense.

## 4.6 Utprøving av metode på spikede prøver og SRM

Som nevnt i innledning er det nødvendig å ha en metode for metylkvikksølvbestemmelse i biologiske prøvetyper som blod, urin og hår for måle kvikksølveksponering via hud basert på kosmetikkprodukter.

Ved utprøving av metoden på biologiske prøvetyper ble sertifiserte referansematerialer i hår og spikede prøver i urin og blod analysert. For å finne andelen av MeHg i de reelle prøvene var det nødvendig å måle T-Hg.

Tabell 4.4 viser en oversikt over benyttede referansematerialer og spikede prøver og gjenfinningen av de spikede prøvene. For rådata og nøyaktige innvekter se tabell V.8, V.9 og V.10 i vedlegg 5.

Tabell 4.4: Viser en oversikt over målte verdier og sertifisert område for MeHg og T-Hg i SRM av hår, målte verdier i spikede prøver av urin, og målte, spikede og oppgitte verdier i blod.

| Prøvetype                                 | Målt T-Hg<br>± SD<br>(n=2) | Oppgitt/beregnet<br>T-Hg | Målt MeHg<br>± SD<br>(n=3) | Oppgitt/beregnet<br>MeHg |
|---|----------------------------|--------------------------|----------------------------|--------------------------|
| <b>Hår (mg/kg)</b><br>IAEA-086            | 0,570                      | 0,573 ± 0,039            | 0,280 ± 0,035              | 0,258 ± 0,021            |
| <b>Urin (µg/L)</b><br>Spiket <sup>a</sup> | 12 ± 0,202                 | 12                       | ikke analysert             | ikke kjent               |
| <b>Blod (µg/L)</b><br>Seronorm,nivå 1     | 2,3                        | 2                        | ikke analysert             | ikke kjent               |
| Seronorm,nivå 2                           | 8,6                        | 8,2                      | ikke analysert             | ikke kjent               |
| Spiket <sup>b</sup>                       | Ikke analysert             | Ikke kjent               | 4,93 ± 0,30                | 2,5                      |

<sup>a</sup>spiket 30 µL av 1 mg/L Hg<sup>2+</sup> standard, n = 3

<sup>b</sup>spiket 30µL av 1 mg/L MeHg standard i hesteblood, n = 6 , prøver oppsluttet i Anton Paar Multiwave (Perkin Elmer)

Av tabell 4.4 kan man se at målte verdier i SRM i hår stemte godt overens med sertifisert område i både T-Hg og MeHg. Dette viser at nøyaktighet i metoden er tilfredstillende for hår. Da SRM for blod og urin ikke var tilgjengelig, ble reelle prøver spiket med en kjent mengde MeHg for å se om det ble funnet igjen.

For urin ble en reell prøve spiket med kjent volum for analyse av T-Hg. Den spikede mengden gav en gjenfinning på 103% for T-Hg. I litteraturen er det sagt at det meste av kvikksølvet i urin finnes som Hg<sup>2+</sup> (Dunn et.al, 2008).

For analyse av blod ble to (seronorm, nivå 1 og 2) prøvetyper med kjent innhold av T-Hg brukt for å bestemmelse av T-Hg. Dette er prøvetyper som er analysert av to laboratorier i Norge, altså ikke en sertifisert verdi.



Ved analyse av disse prøvetypene ble målt verdi av total kvikksølv funnet å være godt innenfor den oppgitte verdien. I en spiket blodprøve fra hest ble det funnet en gjenfinning på 82 % for MeHg. Ved tilsetning av toluen til blodprøven ble det oppdaget emulsjon. Emulsjonen ble løst ved å tilsette 1 mL etanol. Av funnet mengde i spiket blodprøve sier at det er tap av MeHg ved ett eller flere trinn i metoden. Det er sagt at MeHg er mer stabil i blodmatriks enn syrematriks (Gundersen, 2010). Videre er det ikke kjent hvor vidt HBr er effektiv for frigjøring av MeHg fra prøvematriksen. Dette kan undersøkes ved bruk av andre syrer som for eksempel HCl (en mye benyttet syre for frigjøring av MeHg).

#### **4.7 Utprøving av metode på reelle prøver**

Blod fra menneske og dyr, urin fra menneske og hår fra mennesker ble brukt for videre utvikling av denne metoden. Hensikten med å måle på reelle prøver er å undersøke om kvikksølvnivået i befolkningen kommer innen metodens måleområde. Videre arbeid ved undersøkelse i blod, urin og hår vil gå på å måle opptak av kvikksølv fra kosmetikk. Siden prøver for dette ikke var tilgjengelig i den tiden arbeidet foregikk ble det valgt å måle opptak av kvikksølv fra fiskespisere. Det ble både bestemt T-Hg og MeHg i de ulike prøvetypene. I tabell 4.5 kan man se resultatet på utprøving av metoden på reelle prøver. Ved hjelp av hår, blod og urin-prøver ble det mulig å gjøre disse forsøkene. For blod ble det også tatt i bruk blodprøver fra hest.

Tabell 4.5: Estimert mengde T-Hg og MeHg i henholdsvis hår, blod og urin fra mennesker og andelen av MeHg i forhold til T-Hg.

| <b>Hår</b>      |       |                 |   |                   |                            |                |
|-----------------|-------|-----------------|---|-------------------|----------------------------|----------------|
| Alder           | Kjønn | Amalgam fylling | Inntak ferskvann/saltvann fisk (pr.mnd) | T-Hg, n=2 (mg/kg) | MeHg ± SD, n=3 (mg/kg)     | Andel MeHg (%) |
| 24              | K     | Nei             | 1/1                                     | 0,45              | 0,353 ± 0,03               | 78             |
| 36              | K     | Nei             | 1/6                                     | 1,7               | 1,357 ± 0,058              | 80             |
| 50              | K     | 5               | 2/0,5                                   | 0,67              | 0,500 ± 0,11               | 75             |
| 36              | M     | 3 ikke kjent    | 1/6                                     | 1,4               | 1,297 ± 0,076              | 91             |
| 40              | M     |                 | 4/8                                     | 2,0               | 2,117 ± 0,201              | 103            |
| 56              | M     | 9               | 10/10                                   | 6,6               | 5,930 ± 0,534              | 89             |
| <b>Blod</b>     |       |                 |   | T-Hg, n=2 (µg/L)  | MeHg n=3 (µg/L)            |                |
| 50              | K     | 5               | 2/0,5                                   | 2,08              | 0,01 <sup>a</sup>          | Ikke beregnet  |
| 6 <sup>b</sup>  | M     | Ingen           | Ingen                                   | 0,197             | Ikke beregnet <sup>a</sup> | 0,45           |
| <b>Urin</b>     |       |                 |   |                   |                            |                |
| 24 <sup>c</sup> | K     | 0               | 1/1                                     | 0,95 ± 0,013      | Ikke beregnet              | Ikke beregnet  |
| 36 <sup>c</sup> | M     | 3               | 1/6                                     | 2,82 ± 0,029      | Ikke beregnet              | Ikke beregnet  |

<sup>a</sup> Resultatet er korrigert for blankverdi.

<sup>b</sup> Blod fra hest, kaldblodstraver med en vekt på 680kg.

<sup>c</sup> Prøver oppsluttet i Anton Paar Multiwave (Perkin Elmer)

Som tabellen viser har det blitt målt på ulike prøvetyper fra mennesker og hest. Ved bestemmelse av kvikksølv i hår ble fem frivillige personer testet. Av disse personene er det satt opp en oversikt i tabellen som sier noe om deres alder, kjønn, hvor mange amalgamfyllinger personen har og antall fisk som spises fra henholdsvis ferskvann og saltvann per måned. Av tabellen ser man at kvikksølvnivået i hår er størst for de som spiser mest fisk. Ved beregnet andel av MeHg fra T-Hg kan man se at mesteparten av kvikksølvet i håret ligger som MeHg. Dette bekrefter teorien om at ved målt T-Hg i hår vil 70-80 % foreligge som MeHg. Betydningen av bidraget til kvikksølv fra amalgamfyllinger kan heller ikke utelukkes i en slik undersøkelse (Zimmer et.al, 2002).

Det ble brukt syv paralleller av hår fra personen som hadde mest kvikksølv i håret for å vurdere presisjon i metoden. Ved hjelp av Q-testen som vist i tabell V.7 i vedlegg 4 ble det bekreftet at det ikke var noen uteliggere. SD og RSD for de syv parallellene ble bestemt til å være henholdsvis 0,534 mg/kg og 9,0 %, noe som indikerer en god presisjon i metoden.

Ved bestemmelse av blod ble det benyttet prøver fra hest og menneske. Teorien under punkt 2.4.2 sier at den tilstanden kvikksølvet befinner seg i blodet, er forskjellig fra person til person. Det vil si at den kan eksistere som organisk og uorganisk form.

Det hadde vært ønskelig å analysere blod og urin fra de personene som hadde MeHg i håret, men dette var ikke mulig i den perioden arbeidet foregikk.

Her ville det også blitt sett om amalgamfyllingen bidrar til et økt nivå av kvikksølv i blod eller urin. Resultater viser at metoden er egnet for analyse av MeHg i blod og hår og T-Hg i urin. For den foreløpige LOD og LOQ er det vanskelig å måle MeHg i urin.

#### **4.8 Kontaminering av teflonrør**

I denne metoden benyttes UltraClave, en høytrykks mikrobølgeovn for dekomponering av prøver. Beholderne som ble brukt for oppslutning i UltraClave var teflonrør. Det ble påvist ved å måle T-Hg på vaskevannet i ulike teflonrør at kvikksølv henger igjen på teflonoverflaten. Teflonrørene ble analysert både før og etter syrevask i UltraClave. Rør som ble testet før syrevask ble antatt å ha ligget i syrebad i minst 12 timer før tørking. Disse rørene ble brukt av studenter på instituttet som ikke analyserer på spormengder av kvikksølv. Ved funn av kvikksølv i rørene viste det at ingen rør var rene nok. Siden bidraget av kvikksølv varierer fra rør til rør var det ikke mulig å korrigere for dette. Rørene ble så syrevasket i UltraClave før analyse. En mulig løsning kan være å ta i bruk kvarts (glass) for kvikksølvanalyse siden det har blitt undersøkt at kvikksølv ikke henger igjen i kvarts (glass). Se tabell V.11 og V.12 i vedlegg 6 for henholdsvis rør testet før syrevask og rør testet etter syrevask. Se tabell V.13 i vedlegg 6 for resultatet av målt kvikksølv i kvarts (glass).

## 5 Konklusjon og videre arbeid

Ved å ”spike” DORM-2 med  $\text{Hg}^{2+}$  ble det kontrollert for selektivitet i metoden. Det ble funnet at metoden er selektiv for organisk bundet kvikksølv. For å verifisere selektivitet for MeHg kan en analysere prøver på denne metoden og en kromatografisk teknikk. Dette har ikke vært mulig i den tiden arbeidet foregikk. Dette anbefales gjort som et videre arbeid.

Ved utviklingen av denne metoden gikk man over fra dobbel ekstraksjon til enkel ekstraksjon. Det ble funnet at metodens nøyaktighet var bedre med enkel ekstraksjon enn dobbel ekstraksjon.

Ved analyse av sertifiserte referansematerialer som DOLT-4 (fiskelever) og DORM-2 (fiskemuskel) og IAEA-086 (hår) ble det vist en god overensstemmelse mellom målte verdier og sertifisert område. Dette tyder på at metodens nøyaktighet er god. DOLT-4 og DORM-2 er ikke det prøvematerialet som var interessant for dette arbeidet, men for å kunne undersøke selektivitet og nøyaktighet i metoden egner disse prøvematerialene seg godt.

I metodeutviklingen har det blitt analysert på sertifiserte referansematerialer og virkelige prøver som blod, urin og hår. For hårprøver ble det ikke målt verdier av MeHg ned mot LOQ. Innhold av MeHg i blod- og urinprøver er lavere enn metodens kvantifiseringsgrense. I videre arbeid på blod og urin bør det undersøkes nærmere om et større volum av prøve for analyse og mindre fortykning kan gi kvantitative målinger. Nøyaktigheten i analyse av blod ble undersøkt ved å tilsette kjent mengde MeHg (spike). En gjenfinning på 82 % viste å være tilfredsstillende for å bestemme MeHg i blod. For urin vil metodens LOQ være utfordrende siden kvikksølvformen i urin vil stort sett foreligge som  $\text{Hg}^{2+}$ .

Utfordringen i metoden ligger i kvantifiseringsgrensen. For å kunne måle MeHg på lavt nivå er det nødvendig å forbedre deteksjonsgrensen.

L-cysteinkloriden som blir brukt i dette forsøket var ikke av reneste kvalitet. For å oppnå lavere kvantifiseringsgrense kan det være en mulig løsning å finne en renere L-cysteinklorid, rense L-cysteing eller bytte ut L-cystein med for eksempel en ren tiosulfatløsning eller tiol bestående reagenser som Leermakers et.al (2005) har nevnt. Bruk av APDC som kompleksbinder har også blitt gjort ved for eksempel Qvarnström et.al (2000).

Det er blitt nevnt av Sanz et.al (2003) at beste materiale for lagring og analyse er Pyrex, silika (kvarts) glass og Teflon (PTFE/FEP).

Plast som polypropylen er ikke anbefalt siden disse materialene enten kan forårsake kontaminering eller føre til tap av kvikksølv via absorpsjon til veggene på røret. Usikkerhet ved bruk av teflonrør har blitt undersøkt. Det har blitt målt varierende innhold av kvikksølv i blank oppsluttet i brukte teflonrør. Resultatet viser at kvikksølv henger igjen i teflonrør, og siden bidraget er varierende er det ikke mulig å korrigere for dette.

Det har blitt undersøkt om det samme tilfellet gjelder kvarts (glass). Her er det ikke funnet noe kvikksølv, noe som sier at det vil være mulig å ta i bruk kvarts (glass) i stede for teflonrør.

Av hensyn til helse, miljø og sikkerhet bør det vurderes å bytte ut løsemiddelet toluen med noe mindre helsefarlig som for eksempel Dithiozone. I denne metoden er mengden av toluen som brukes relativ stor.

## 6 Referanse

Airey.D (1983). Total mercury concentrations in human hair from 13 countries in relation to fish consumption and location. *Sci. Total Environ.* (31): 157-180

Al-Saleh.I, El-Doush.I, Shinwari.N, Al-Baradei.R, Khogali.F, Al-Amodi.M (2005) Does low mercury containing skin-lightening cream(fair&lovely) affect the kidney, liver and brain of female mice?. *Cutaneous and Ocular Toxicology.* (24): 11-29

Ashkenani.H, Dadfarnia.S, Mohammad.A, Shabani.H ,Jaffari.A.A, Behjat.A, 2008; ''Preconcentration, speciation and determination of ultra trace amounts of mercury by modified octadecyl silica membrane disk/electron beam irradiation and cold vapor atomic absorption spectrometry'', *Journal of Hazardous Materials.* (161): 276–280

Balogh, S. J. Swain, E. B. & Nollet, Y. H. (2008). Characteristics of mercury speciation in Minnesota rivers and streams. *Environmental pollution.* (154): 3-11

Barbosa Jr.F, Palmer.C.D, Krug.J.F, Parsons.P.J (2004). Determination of total mercury in whole blood by flow injection cold vapor atomic absorption spectrometry with room temperature digestion using tetramethylammonium hydroxide. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry.* (19):1000-1005

Barregard.L (1993). Biological monitoring of exposure to mercury vapour. *Scand. J.Work Environ. Health* 19, suppl. (1):45-49

Cattani,I, Spalla,S, Beone,G,M, Del Re,A,A,M, Boccelli,R, Trevisan,M (2008) Characterization of mercury species in soils by HPLC–ICP-MS and measurement of fraction removed by diffusive gradient in thin films.*Talanta*;74:1520-1526

Committee on the Toxicological Effects of Methylmercury, Board on Environmental Studies and Toxicology, National Research Council (2000), *Chemistry, exposure, toxicokinetics and toxicodynamics.* National academy press, Washington, DC. 31-71

Counter.S.A, Buchanan.L.H (2004) Mercury exposure in children:a review.*Toxicology And Applied Pharmacology*;198:209-230

- Diez.S, Bayona.J.M (2002), Determination of methylmercury in human hair by ethylation followed by headspace solid-phase microextraction gaschromatography–cold-vapour atomic fluorescence spectrometry, *Journal of Chromatography A*, **963**; **345–351**
- Diez.S, Montuori.P, Pagano.A, Sarnacchiaro.P, Bayona.J.M, Triassi.M (2008). Hair mercury levels in an urban population from southern Italy: Fish consumption as a determinant of exposure. *Environment International*: **34**; **162-167**
- Dunn.J.E, Trachtenberg.F.L, Barregard.L, Bellinger.D, McKinlay.S (2008). Scalp hair and urine mercury content of children in the Northeast United States: The New England Children’s Amalgam Trial. *Environmental Research*. **107**: **79-88**
- Erkek.N, Senel.S, Sarac.A, Ertan.U, Karacan.C.D (2010). Being alive after a severe inorganic mercury intoxication. *Eur J Pediatr*; **169**:**625–628**
- Evjen, C (2010), *Universitetet i Blindern, Masterstudent i human toksikologi, Personlig Meddelelse.*
- Fakour.H, Esmaili-Sari.A, Zayeri.F (2010). Mercury exposure assessment in Iranian women's hair of a port town with respect to fish consumption and amalgam fillings. *Science of the Total Environment*; **408**:**1538–1543**
- Ferrua.N, Cerutti.S, Salonia.J.A, Olsina.R.A, Martinez.L.D (2007). On-line preconcentration and determination of mercury in biological and environmental samples by cold vapor-atomic absorption spectrometry. *Journal of Hazardous Materials*. **141**: **693–699**
- Fjeld.E, Rognerud.S (2004), Kvikksølv i ferskvannsfisk fra Sør-Norge i 1998 – 2002, nivåer og tidsmessig utvikling, Rapport **893/03**, **58pp**
- Fok.T , Lam.H.S , Ng.P.C , Yip.S.K.A , Sin.N.C , Chan.I.H.S , Gu.J.S.G, So.K.H , Wong.E.M.C , Lam.C.W.K (2007) Fetal methylmercury exposure as measured by cord blood mercury concentrations in a mother–infant cohort in Hong Kong. *Environment International* ;**33**: **84–92**
- Freire.C , Ramos.R, Lopez-Espinosa.M-J, Diez.S,Vioque.J, Ballester.F, Fernandez.M-F (2010), Hair mercury levels, fish consumption, and cognitive development in preschool children from Granada, Spain; *Environmental Research* , **110** ; **96–104**

Gill.U, Bigras.L, Schwartz.H (2004). Routine, automated determination of inorganic and total mercury in multimedia using cold vapour atomic absorption spectrometry.

*Chemosphere* .**56** :1097–1103

Gjengedal.E,2009, ''Prøvetaking,forbehandling,oppslutning''(power point presentasjon), KJM340, *Universitetet for miljø og biovitenskap, Institutt for plante og miljøvitenskap, Ås*, 22pp

Glomstad, B (2010). Utvikling av metode for bestemmelse av metylkvikksølv I ekstraherte og oppsluttede prøver av sediment og biota ved hjelp av kalddamp atomabsorpsjonsspektrometri. *Universitetet for miljø og biovitenskap, Institutt for plante og miljøvitenskap, Ås. pp.71*

Glomstad.B, Mohanathas.L, Jensen.K.A, Lohne.S, Gjengedal.E (2010). Simple Determination of Methylmercury in Sediment and Biota( poster presentation). *Universitetet for miljø og biovitenskap, Institutt for plante og miljøvitenskap, Ås*

Gundersen.P.O.M (2010), Avdeling for klinisk farmakologi, St Olavs Hospital, Universitetssykehuset i Trøndelag, *Personlig meddelelse*.

Gundersen.N, Mowe.G ( 1977). Analyse av kvikksølv i biologiske prøver som eksponeringskontroll. Yrkeshygienisk institutt ( HD 708/77).

Haradaa.M, Nakachib.S, Tasakac.K, Sakashitad.S, Mutae.K, Yanagidaf.K, Doig.R, Kizakih.T, Ohnoh.H (2001). Wide use of skin-lightening soap may cause mercury poisoning in Kenya, *The Science of the Total Environment*; **269**: 183-187.

Haradaa.M, Nakachib.S, Cheuc.T, Hamadac.H, Onod.Y, Tsudae.T, Yanagidaf.K, Kizakig.K, Ohnog.H (1999). Monitoring of mercury pollution in Tanzania: relation between head hair mercury and health. *The Science of the Total Environment*; **227**: 249-256.

Hashempur, T. Rofouei, M. K. Khorrami, A. R. (2008). Speciation analysis of mercury contaminants in water samples by RP-HPLC after solid phase extraction on modified C18 extraction disks with 1,3-bis (2-cyanobenzene)triazene. *Microchemical Journal*. Doi: 10.1016/j.microc.2008.01.004



IAEA-086. (2000). *Methylmercury, Total Mercury and Other Trace Elements in Human Hair*. International Atomic Energy Agency, Austria, Vienna. **pp. 4**.

Jensen.K.A,2009, ''Laboratorieøving;lukket dekomponering med UltraClave'',KJM340,*Universitetet for miljø og biovitenskap,Institutt for plante og miljøvitenskap*, Ås, 3pp

Klaassen, C. D. (2001). *Casarett & Doulls: Toxicology, the basic science of poisons*. 6. ed. McGraw-Hill. New York. USA. **ISBN: 0-07-112453-5**

Korolczuk.M, Rutyna.I (2008), New methodology for anodic stripping voltammetric determination of methylmercury. *Electrochemistry Communications*; **10: 1024—1026**.

Leermakers,M. Bayens,W. Quevauviller,P. Horvat,P.(2005). Mercury in environmental samples ;speciation, artifacts and validation. *Trends in analytical chemistry*;**24:5**.

Lohne.S, 2009, ''Laboratorieøving CVAAS''KJM340, *Universitet for miljø og biovitenskap, Institutt for plante og miljøvitenskap*, Ås,4pp

Maggi, C., M.T. Berducci, J. Bianchi, M. Giani, L. Campanella (2009) Methylmercury determination in marine sediment and organisms by Direct Mercury Analyser. *Analytica Chimica Acta* **641, 32-36**.

Margetinová, J. Houserová-Pelcova, P. & Kuban, V. (2008). Speciation analysis of mercury in sediments, zoobenthos and river water samples by high-performance liquid chromatography hyphenated to atomic fluorescence spectrometry following preconcentration by solid phase extraction. *Analytica chimica acta*. (615): 115-123.

Miljøverndepartementet (MD) (2005). Handlingsplan for å redusere utslipp av kvikksølv, pp. 16

Montouri.P, Jover.E, Alzaga.R, Diez.S, Bayona.J.M (2004). Improvements in the methylmercury extraction from human hair by headspace solid-phase microextraction followed by gas-chromatography cold-vapour atomic fluorescence spectrometry. *Journal of Chromatography A*; **1025: 71–75**

Morton.J, Carolan.V.A, Gardiner.P.H.E (2002). The speciation of inorganic and methylmercury in human hair by high-performance liquid chromatography coupled with inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal Analytical Atomic Spectrometry*. **17:377-381**.

Munthe.J, Wängberg.I, Iverfeldt.Å, Petersen.G, Ebinghaus.R, Schmolke.S, Bahlmann.E, Lindquist.O, Strömberg.D, Sommar.J, Gårdfeldt.K, Feng.X, Larjava.K, Siemens.V (2001): Mercury species over Europe (MOE). Relative importance of depositional methylmercury fluxes to various ecosystems. *Final report for the European Commission, Directorate General XII*.

NRC-CNRC. (1993). *Dogfish Muscle Certified Reference Material for Trace Metals*. National Research Council Canada. Ottawa. Canada. **pp. 4**.

NRC-CNRC. (2008). *Dogfish Liver Certified Reference Material for Trace Metals*. National Research Council Canada. Ottawa. Canada. **pp. 4**.

Ortiz.A.I.C, Albarra'n.Y.M, Rica.C.C (2002). Evaluation of different sample pre-treatment and extraction procedures for mercury speciation in fish samples. *J. Anal. At. Spectrom*; **17:1595–1601**.

Paar.A (1998). Multiwave Microwave Sample Preparation System, Instruction Handbook, *Graz, Austria*. pp.**145**

Palmer.C.D, Lewis jr.M.E, Geraghty.C.M, Barbosa Jr.F, Parsons.P.J (2006) Determination of lead, cadmium and mercury in for assessment of environmental exposure: A comparison between inductively coupled plasma-mass spectrometry and atomic absorption spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy* **61(8):980-990**

Perkin-Elmer, 1994. Setting up and performing analyses. FIMS; Flow injection mercury system. Ueberlingen, Perkin-Elmer GmbH. 76 pp.

Pirrone, N., Costa, P., Pacyna, J. M., Ferrara, R., (2001), *Mercury emissions to the atmosphere from natural and anthropogenic sources in the Mediterranean region*. *Atmos. Environ.***35: 2997-3006**.

Quarnstrom.J, Tu.Q, Frech.W, Ludke.C (2000). Flow injection-liquid chromatography-cold

vapour atomic absorption spectrometry for rapid determination of methyl and inorganic mercury. *The Analyst*. **125: 1193-1197**.

Rodrigues.J.L, de Souza.S.S, de Oliveira.S.V.C, Barbosa Jr.F (2010) Methylmercury and inorganic mercury determination in blood by using liquid chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometry and a fast sample preparation procedure. *Talanta*;**80:1158–1163**

Sanchez Uria.J.E, Sanz-Medel.A (1998), Inorganic and methylmercury speciation in environmental samples. *Talanta*; **47:509-524**

Sanz.J, de Diego.A, Raposo.J.C, Madariaga.J.M (2003). Routine analysis of mercury species using commercially available instrumentation: chemometric optimisation of the instrumental variables. *Analytica Chimica Acta* .**486; 255–267**

Sigma-Aldrich (2009). HMS-Datablad for Methylmercury(II) chloride. Sigma-Aldrich Norway AS, Oslo

Sin.K.W & Tsang.H.F (2003). Large-scale mercury exposure due to a cream cosmetic: community-wide case series. *Hong Kong Med J*; 9: 329-34

Simpson.R.B (1961). Association Constants of Methylmercury with Sulfhydryl and Other Bases. *Journal of the American Chemical Society*; 83; 4711–4717

Skoog, D.A., D.M. West & F.J. Holler, 1996. *Fundamentals of Analytical Chemistry*, 6<sup>th</sup> Ed., Saunders College Publishing, New York. 870 pp.

Stumm, M. & Morgan, J.J. (1996). *Aquatic chemistry: chemical equilibria and rates in natural waters*. 3. ed. Wiley. New York. ISBN: 0-471-51185-4

Spectrapure standard ,2008 ;Certified standard Hg( $1000 \pm 3 \mu\text{g/mL}$ ), Spectrapure standard as, p.Box 190 Manglerud

Spectrapure standard ,2008 ;Certified standard MeHg( $1000 \pm 3 \mu\text{g/mL}$ ), Spectrapure standard as, p.Box 190 Manglerud

Tang.HL, Chu.KH, Mak.YF, Lee.W, Cheuk.A, Yim.KF, Fung.KS, Chan.HWH, Tong.KL (2006) Minimal change disease following exposure to mercury-containing skin lightening cream.*Hong Kong Medical Journal*; **12:316-8**

Torres.D.P, Frescura.V.L.A, Curtius.A.J (2009). Simple mercury fractionation in biological samples by CV AAS following microwave-assisted acid digestion or TMAH pre-treatment. *Microchemical Journal*; **93: 206–210**

Ubillus.F, Alegria.A, Barbera.R, Farre.R, Lagarda.M.J (2000). Methylmercury and inorganic mercury determination in fish by cold vapour generation atomic absorption spectrometry. *Food Chemistry*; **71: 529 – 533**.

UNEP (2002), United Nations Environmental Programme Chemicals, *Global Mercury Assessment*, Geneva, Switzerland.

U.S. Department Of Health And Human Services (1999), *Toxicological Profile for Mercury*, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, **pp. 676**

Wan.C-C, Chen.C-S, Jiang.S-J (1997), Determination of mercury compounds in water samples by liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry with an in situ nebulizer/vapor generator, *Journal of analytical atomic Spectrometry*, **12:683-687**

Willhelm.M, Muller.F, Idel.H (1996). Biological monitoring of mercury vapour exposure by scalp hair analysis in comparison to blood and urine. *Toxicology Letters*. **88: 221-226**

World Health Organization, 2003, *Elemental mercury and inorganic mercury compounds:human health aspects*, Concise international chemical assessment document 50, Geneva. 60pp.

Zimmer.H, Ludwig.H, Bader.M, Bailer.J, Eickholz.P, Staehle.H.J, Triebig.G (2002). Determination of mercury in blood, urine and saliva for the biological monitoring of an exposure from amalgam fillings in a group with self-reported adverse health effects. *Int. J. Hyg. Environ. Health*. **205; 205 - 211**

Žižek.S , Horvat.M , Gibicar.D, Fajon.V , Toman.M.J (2007), Bioaccumulation of mercury in benthic communities of a river ecosystem affected by mercury mining *Science of the Total Environment*; **377:407–415**

## **Internett referanser**

<http://www.ec.gc.ca/MERCURY/EN/bf.cfm>,

*sist åpnet; 16/03/10*

<http://www.miljostatus.no/Tema/Kjemikalier/Noen-farlige-kjemikalier/Kvikksolv/>

*Sist åpnet: 02/04/10*

[http://www.mercury.utah.gov/atmospheric\\_transport.htm](http://www.mercury.utah.gov/atmospheric_transport.htm),

*Sist åpnet: 20/05/10*

[http://www.chem.uoa.gr/applets/AppletQtest/Text\\_Qtest2.htm](http://www.chem.uoa.gr/applets/AppletQtest/Text_Qtest2.htm),

*Sist åpnet: 21/05/10*

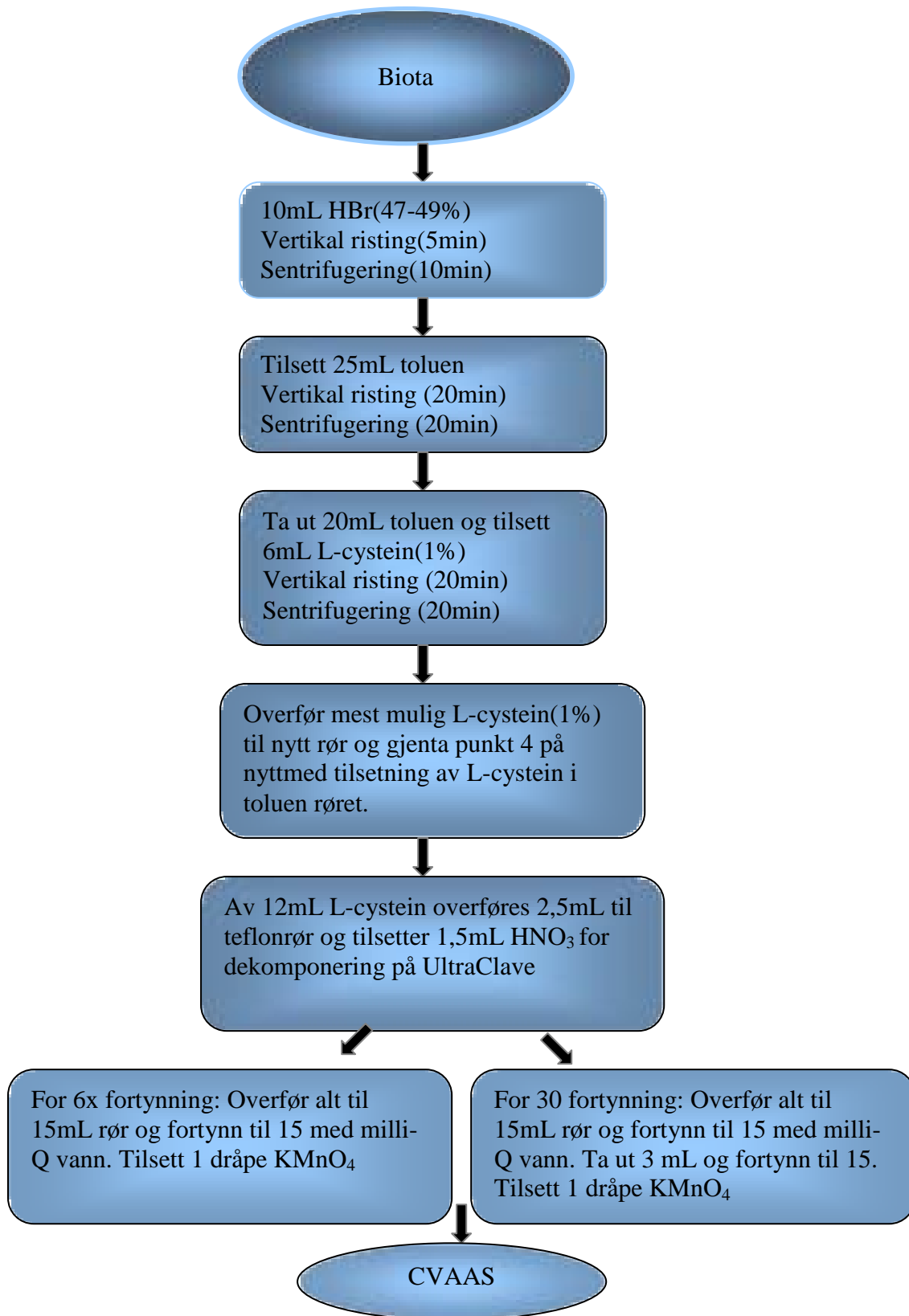
### Vedlegg 1: Måledata og innvekter for beregning og forenklet figur av metoden

Tabell V.1: Målte verdier og innvekter på dobbel ekstraksjon for kontroll av selektivitet i metoden ved å spike DORM-2 med en kjent mengde og se om det gav en endring i målt konsentrasjon. Etter oppslutning ble prøvene fortynnet 30 ganger. Her ble all toluen tatt ut.

| Ekstraksjonstype | Hg ( $\mu\text{g/l}$ ) | Innhold                                     | Innvekt | Fortynning | Hg (mg/kg) |
|------------------|------------------------|---|---------|------------|------------|
| 1                | 1,13298                | DORM-2                                      | 0,0987  | 30         | 4,13       |
| 2                | 7,59826                | DORM-2                                      | 0,7042  | 30         | 3,88       |
| 3                | 5,21000                | DORM-2                                      | 0,4995  | 30         | 3,75       |
| 1                | 7,94371                | DORM-2, spiket med 30 $\mu\text{L Hg}^{2+}$ | 0,7046  | 30         | 4,06       |
| 2                | 7,76591                | DORM-2, spiket med 30 $\mu\text{L Hg}^{2+}$ | 0,7002  | 30         | 3,99       |
| 3                | 7,70021                | DORM-2, spiket med 30 $\mu\text{L Hg}^{2+}$ | 0,7009  | 30         | 3,96       |

Tabell V.2: Målte verdier og innvekter på enkel ekstraksjon for kontroll av nøyaktighet i enkel ekstraksjon og selektivitet i metoden ved å spike DORM-2 med en kjent mengde og se om det gav en endring i målt konsentrasjon. Etter opplutning ble prøvene fortynnet 18 og 30 ganger. Her ble 25/20 mL toluen tatt ut av alle DORM-2 prøvene og DOLT-4 prøvene ble tilsatt etanol. Etanol er blandbar med toluen. I parallell 1-3 ble det tilsatt 3 mL etanol, og i parallell 4-6 ble det tilsatt 4 mL etanol. Her ble det også målt enkel tilbakeekstraksjon og bytte av syre på DORM-2 prøver. Til disse prøvene ble det også foretatt enkel ekstraksjon med 25/20 mL uttak av toluen.

| Ekstraksjonstype | Hg (µg/l) | Innhold                                | Innvekt (g) | Fortynning | Hg (mg/kg) |
|------------------|-----------|--|-------------|------------|------------|
| 1                | 1,699731  | DOLT-4                                 | 0,5041      | 18         | 1,36       |
| 2                | 1,652062  | DOLT-4                                 | 0,5013      | 18         | 1,33       |
| 3                | 1,151933  | DOLT-4                                 | 0,5295      | 18         | 1,32       |
| 4                | 1,642967  | DOLT-4                                 | 0,5087      | 18         | 1,35       |
| 5                | 1,624238  | DOLT-4                                 | 0,4929      | 18         | 1,38       |
| 6                | 1,645157  | DOLT-4                                 | 0,4978      | 18         | 1,38       |
| 1                | 6,13000   | DORM-2                                 | 0,5006      | 30         | 4,41       |
| 2                | 5,97000   | DORM-2                                 | 0,5065      | 30         | 4,24       |
| 3                | 6,00000   | DORM-2                                 | 0,5012      | 30         | 4,31       |
| 4                | 5,72000   | DORM-2                                 | 0,5016      | 30         | 4,11       |
| 5                | 4,70303   | DORM-2                                 | 0,4969      | 30         | 4,26       |
| 6                | 4,67095   | DORM-2                                 | 0,5041      | 30         | 4,17       |
| 7                | 4,57010   | DORM-2                                 | 0,5056      | 30         | 4,07       |
| 8                | 4,56432   | DORM-2                                 | 0,5016      | 30         | 4,09       |
| 1                | 4,58817   | DORM-2, spiket 0,3 mL Hg <sup>2+</sup> | 0,4983      | 30         | 4,14       |
| 2                | 4,59673   | DORM-2, spiket 0,3 mL Hg <sup>2+</sup> | 0,5019      | 30         | 4,12       |
| 3                | 4,60019   | DORM-2, spiket 0,3 mL Hg <sup>2+</sup> | 0,5008      | 30         | 4,13       |
| 4                | 4,58459   | DORM-2, spiket 0,3 mL Hg <sup>2+</sup> | 0,5007      | 30         | 4,12       |
| 1                | 8,87027   | DORM-2, enkel tilbakeekstraksjon       | 0,5006      | 30         | 3,99       |
| 2                | 8,78391   | DORM-2, enkel tilbakeekstraksjon       | 0,4989      | 30         | 3,96       |
| 1                | 4,31096   | DORM-2, HCl istedenfor HBr             | 0,5011      | 30         | 3,87       |
| 2                | 4,08199   | DORM-2, HCl istedenfor HBr             | 0,5026      | 30         | 3,65       |
| 3                | 4,00252   | DORM-2, HCl istedenfor HBr             | 0,4985      | 30         | 3,61       |



Figur V.1: En skjematisk oversikt over den endrede metoden som viser tid brukt på risting og sentrifugering. Figuren viser også mengden av reagenser som ble brukt samt hvordan fortyninger ble foretatt etter dekomponering. Tilslutt vises deteksjon på CVAAS.



## Vedlegg 2: Tillaging av ulike løsninger til forsøket

### Tillaging av 1%(v/w) L-cystein til 1 L løsning

Tabell V.3: Beregnet mengde for tillaging av 1% L-cystein løsning

| Kjemikalie                     | Innvekt(g) |
|--------------------------------|------------|
| 1 % L-cysteiniumklorid         | 10         |
| 12,5 % Natriumsulfat, vannfri  | 125        |
| 0,775 % Natriumacetat, vannfri | 7,75       |

### Tillaging av kalibreringsløsninger til analyse

Metylkvikksølvstandarden på 1000 mg/L ble laget ved å veie 108,680 mg av  $\text{CH}_3\text{HgCl}$  og løse det i 86,85 g vann og tilsette 0,8 mL HCl.

For tillaging av 10 mg/L standard ble det tatt utgangspunkt i 1000 mg/L kvikksølvstandard.

Fortynninger av denne ble gjort etter fortynningsloven.

$$C_1V_1 = C_2V_2 \quad V(1)$$

Det ble laget en løsning på 10 mg/L av kvikksølvstandard ved å ta ut 0,5 mL av 1000 mg/L av kvikksølvstandarden og tilsette 1 mL  $\text{HNO}_3$  og fortynne til 50 mL.

Denne 10 mg/L løsningen ble brukt videre for tillaging av kalibreringsløsninger som dekket konsentrasjonsområdet til prøvene. For å pipettere ut noen hensiktsmessige volum ble det tillaget en mellomstandard av 10 mg/L kvikksølvstandard ved å ta ut 1 mL og fortynne til 50 mL.

Tabell V.4: Beregnet kalibreringsløsninger fortynnet i 50 mL målekolbe

| Standard | Konsentrasjon( $\mu\text{g/L}$ ) | Uttak i volum(mL) | Fortynning(mL) |
|----------|----------------------------------|-------------------|----------------|
| 1        | 0                                | 0                 | 50             |
| 2        | 0,1                              | 0,5 <sup>a</sup>  | 50             |
| 3        | 0,2                              | 1 <sup>a</sup>    | 50             |
| 4        | 0,5                              | 2,5 <sup>b</sup>  | 50             |
| 5        | 1                                | 0,25              | 50             |
| 6        | 5                                | 1,25              | 50             |
| 7        | 10                               | 2,5               | 50             |

<sup>a</sup>Uttak fra standard på 5  $\mu\text{g/L}$

<sup>b</sup>Uttak fra standard på 10  $\mu\text{g/L}$

- Ved tillaging av reduksjonsmiddel(  $\text{SnCl}_2$ , 10%) ble 100g Tinnkloriddihydrat (10%) veid opp. Tilsatte deretter 85mL HCl og fortynnet til 1 L med destillert vann.
- Ved tillaging av HCl(10%) ble en 1 L målekolbe tilsatt 85 mL HCl og fortynnet til 1 L med destillert vann.

**Vedlegg 3: Poster presentation for miljøkonferansen på Svalbard, NECC2010, *Simple determination of methylmercury in sediment and biota.***



#### Vedlegg 4: Måledata for beregning av gjenfinning av MeHg

Tabell V5: Måledata for MeHg standard analysert med oppslutning uten oppslutning med et utgangsvolum på 40 µL med en konsentrasjon på 10 mg/L samt gjenfinningen av den tilsatte mengden. I tabellen kan man også se den beregnede verdien på 5,33 µg/L av tilsatt mengde MeHg.

| Tid   | Oppsluttet (µg/L) | Beregnet verdi (µg/L) | Ikke oppsluttet | Gjenfinning (%) |
|-------|-------------------|-----------------------|-----------------|-----------------|
| 1 dag | 5,21              | 5,33                  | 0,094           | 98              |
| 1 uke | 5,26              | 5,33                  | -0,006          | 99              |
| 1 mnd | 5,31              | 5,33                  | 0,020           | 100             |

Tabell V6: Måledata for blank spiket med 0,3 mL MeHg standard med en konsentrasjon på 10 mg/L. En teoretisk verdi av "spiket" mengde ble beregnet til 250 µg/L. Med målt verdi og beregnet verdi ble gjenfinningen i de forskjellige trinnene beregnet.

| Målt (µg/L) | Beregnet (µg/l) | Gjenfinning % | Fortynning | Beregnet verdi (g/L) | Merknad          |
|-------------|-----------------|---------------|------------|----------------------|------------------|
| 7,398       | 221,93          | 89            | 30         | 250                  | MeHg i HBr       |
| 7,214       | 216,42          | 87            | 30         | 250                  | MeHg i HBr       |
| 7,278       | 218,35          | 87            | 30         | 250                  | MeHg i HBr       |
| 8,161       | 244,82          | 98            | 30         | 250                  | MeHg i toluen    |
| 7,997       | 239,90          | 96            | 30         | 250                  | MeHg i toluen    |
| 8,075       | 242,24          | 97            | 30         | 250                  | MeHg i toluen    |
| 8,025       | 240,75          | 96            | 30         | 250                  | MeHg i L-cystein |
| 8,035       | 241,06          | 96            | 30         | 250                  | MeHg i L-cystein |
| 8,053       | 241,58          | 97            | 30         | 250                  | MeHg i L-cystein |

Tabell V.7: Gitt data for kritisk Q ved hhv 90%, 95% og 99% konfidensintervall

| Antall paralleller | 90 %  | 95 %  | 99 %  |
|--------------------|-------|-------|-------|
| 3                  | 0,941 | 0,97  | 0,994 |
| 4                  | 0,765 | 0,829 | 0,926 |
| 5                  | 0,642 | 0,710 | 0,821 |
| 6                  | 0,560 | 0,625 | 0,740 |
| 7                  | 0,507 | 0,568 | 0,68  |
| 8                  | 0,468 | 0,526 | 0,634 |
| 9                  | 0,437 | 0,493 | 0,598 |
| 10                 | 0,412 | 0,466 | 0,568 |

Ved hjelp av ligning V.2 ble det beregnet Q.

$$Q = \frac{\bar{X}_n - X_l}{X_o - X_p} \quad (\text{V.2})$$

Hvor  $X_n$ = Verdien som skal undersøkes,  $X_1$ = nærmeste verdien til  $X_n$ ,  $X_o$ =høyeste verdi,  $X_p$ = laveste verdi.

De målte verdiene settes opp i rekkefølge og beregner dermed ut Q ved hjelp av formel V.2  
5.027, 5.411, 5.965, 6.114, 6.152, 6.242, 6.597.

Ved å undersøke tallet 6,597 ble det ikke funnet noen indikasjon på noen uteliggere i målingen. Dermed ble alle målinger fra alle paralleller benyttet for utregning av presisjon i metoden.

**Vedlegg 5: Måledata og innvekter for beregning av SRM, reelle og spikede prøver.**

Tabell V.8: Målt Verdi av analysert SRM og spiket prøve i blod, urin og hår med brukte fortynninger for T-Hg og MeHg. Ved hjelp av målt verdi, fortynning og uttak av prøvemateriale ble det mulig med endelig beregning

| <b>Blod målt (µg/L)</b> | <b>Merknad</b>               | <b>Fortynning</b> | <b>Tilsatt volum (mL)</b> | <b>Endelig beregning (µg/L)</b>  |
|-------------------------|------------------------------|-------------------|---------------------------|----------------------------------|
| <b>MeHg</b>             |                              |                   |                           |                                  |
| 0,249476                | spiket med 30µl MeHg(1mg/L)  | 6                 | 5                         | 4,6702                           |
| 0,281261                | spiket med 30µl MeHg(1mg/L)  | 6                 | 5                         | 5,2652                           |
| 0,271871                | spiket med 30µl MeHg(1mg/L)  | 6                 | 5                         | 5,0854                           |
| 0,239315                | spiket med 30µl MeHg(1mg/L)  | 6                 | 5                         | 4,4800                           |
| 0,275683                | spiket med 30µl MeHg(1mg/L)  | 6                 | 5                         | 5,1608                           |
| 0,263936                | spiket med 30µl MeHg(1mg/L)  | 6                 | 5                         | 4,9409                           |
| <b>Total Hg</b>         |                              |                   |                           |                                  |
| 0,159661                | Nivå 1, Seronorm             | 15                | 1                         | 2,394921                         |
| 0,145008                | Nivå 1, Seronorm             | 15                | 1                         | 2,175113                         |
| 0,568139                | Nivå 2, Seronorm             | 15                | 1                         | 8,522082                         |
| 0,577664                | Nivå 2, Seronorm             | 15                | 1                         | 8,664964                         |
| <b>Hår</b>              |                              |                   |                           |                                  |
| <b>MeHg</b>             | <b>Merknad</b>               | <b>Fortynning</b> | <b>Innveid (g)</b>        | <b>Endelig beregning (mg/kg)</b> |
| 0,385893                | IAEA-86                      | 6                 | 0,145                     | 0,23952                          |
| 0,641990                | IAEA-86                      | 6                 | 0,192                     | 0,30093                          |
| 0,513454                | IAEA-86                      | 6                 | 0,154                     | 0,30007                          |
| Total Hg                |                              |                   |                           |                                  |
| 4,038092                | IAEA-86                      | 15                | 0,106                     | 0,57143                          |
| 4,279717                | IAEA-86                      | 15                | 0,113                     | 0,56810                          |
| <b>Urin</b>             | <b>Merknad</b>               | <b>Fortynning</b> |                           | <b>Endelig beregning (µg/L)</b>  |
| <b>Total Hg</b>         |                              |                   | <b>Tilsatt volum (mL)</b> |                                  |
| 2,029339                | 30µL Hg <sup>2+</sup> spiket | 15                | 2,5                       | 12,176036                        |
| 2,088964                | 30µL Hg <sup>2+</sup> spiket | 15                | 2,5                       | 12,533782                        |
| 2,086408                | 30µL Hg <sup>2+</sup> spiket | 15                | 2,5                       | 12,518446                        |

Eksempel på beregning av spiket MeHg.

Skal finne (µg/L). Tar utgangspunkt i MeHg standard på 1 mg/L

$1000 \mu\text{g/L} * 0,03 \text{ mL} = X * 5 \text{ mL}$

$X = 6 \mu\text{g/L}$

Funnet ( $\mu\text{g/L}$ ).

$$\text{Parallel 1: } \frac{0,249476 \mu\text{g/L} * 15 \text{ mL} * 26 \text{ mL} * 12 \text{ mL}}{2,5 \text{ mL} * 20 \text{ mL} * 5 \text{ mL}} = 4,67$$

Tabell V.9: Målt data for reelle prøver fra hår, blod og urin med benyttede fortyndinger og beregnet T-Hg

| <b>Hår</b>    |                   |   |                          |  |
|---------------|-------------------|---|--------------------------|--|
| <b>Tot-Hg</b> |                   |   |                          |  |
| <b>alder</b>  | <b>Fortynning</b> | <b>Målt(<math>\mu\text{g/L}</math>)</b> | <b>vekt(g)</b>           | <b>Endelig beregning (mg/kg)</b>                     |
| 36            | 15                | 9,37673                                 | 0,099                    | 1,42072  |
| 36            | 15                | 9,47809                                 | 0,099                    | 1,43607  |
| 36            | 75                | 1,93772                                 | 0,098                    | 1,48295  |
| 36            | 75                | 3,21289                                 | 0,127                    | 1,89737  |
| 50            | 15                | 3,70839                                 | 0,094                    | 0,59176  |
| 50            | 15                | 5,16851                                 | 0,105                    | 0,73836  |
| 24            | 15                | 2,73194                                 | 0,091                    | 0,45032  |
| 24            | 15                | 4,40806                                 | 0,147                    | 0,44980  |
| 56            | 75                | 10,05909                                | 0,115                    | 6,56028  |
| 56            | 75                | 8,66757                                 | 0,097                    | 6,70173  |
| 40            | 75                | 2,90150                                 | 0,102                    | 2,13345  |
| 40            | 75                | 2,76084                                 | 0,106                    | 1,95343  |
| <b>Urin</b>   | <b>Fortynning</b> | <b>Målt(<math>\mu\text{g/L}</math>)</b> | <b>Tilsatt volum(mL)</b> | <b>Endelig beregning(<math>\mu\text{g/L}</math>)</b> |
| 24            | 15                | 0,16058                                 | 2,5                      | 0,96347  |
| 24            | 15                | 0,15620                                 | 2,5                      | 0,93722  |
| 24            | 15                | 0,15802                                 | 2,5                      | 0,94809  |
| 36            | 15                | 0,47264                                 | 2,5                      | 2,83585  |
| 36            | 15                | 0,46481                                 | 2,5                      | 2,78884  |
| 36            | 15                | 0,47374                                 | 2,5                      | 2,84245  |
| <b>Blod</b>   | <b>Fortynning</b> | <b>Målt(<math>\mu\text{g/L}</math>)</b> | <b>Tilsatt volum(mL)</b> | <b>Endelig beregning(<math>\mu\text{g/L}</math>)</b> |
| 50            | 15                | 0,1501                                  | 1                        | 2,2516   |
| 50            | 15                | 0,1272                                  | 1                        | 1,9085   |
| 6(hest)       | 15                | 0,0118                                  | 1                        | 0,1766   |
| 6(hest)       | 15                | 0,0145                                  | 1                        | 0,2181   |

Eksempel på beregning av Tot-Hg(hår og blod)

$$\text{Tot Hg, Hår(mg/kg), parallell 1: } \frac{4,03 \mu\text{g/L} * 0,075\text{L}}{0,106\text{g}} = 0,57$$

Eksempel på beregning av MeHg(hår og blod)

$$\text{MeHg, hår(mg/kg), parallell 1: } \frac{0,385 \mu\text{g/L} * 1000\text{ml/l} * \frac{6 * 12\text{ml}}{20\text{ml}} * \frac{25\text{ml}}{20\text{ml}}}{0,145\text{g}} = 0,239$$

$$\text{Tot Hg}(\mu\text{g/L}), \text{urin, parallell 1: } \frac{0,160 \mu\text{g/L} * 15\text{mL}}{2,5 \text{ mL}} = \mathbf{0,963}$$

$$\text{MeHg, blod}(\mu\text{g/L}), \text{parallell 1: } \frac{4,0869 \mu\text{g/L} * (30 * 2,5\text{mL}) * 20\text{ml}}{1\text{mL}} = \mathbf{204,69}$$

Tabell V.10: Målt data for reelle prøver fra hår med benyttede fortynninger og beregnet MeHg

| Hår   |            | MeHg                    |            |                          |
|-------|------------|-------------------------|------------|--------------------------|
| Alder | Fortynning | Målt( $\mu\text{g/L}$ ) | Innveid(g) | Endelig beregning(mg/kg) |
| 36    | 6          | 1,55543                 | 0,1086     | 1,28903                  |
| 36    | 6          | 1,56489                 | 0,115      | 1,22470                  |
| 36    | 6          | 1,95698                 | 0,128      | 1,37600                  |
| 36    | 6          | 2,04309                 | 0,1387     | 1,32572                  |
| 36    | 6          | 1,72851                 | 0,1177     | 1,32171                  |
| 36    | 6          | 1,65965                 | 0,1049     | 1,42392                  |
| 50    | 6          | 0,52467                 | 0,103      | 0,45845                  |
| 50    | 6          | 0,69416                 | 0,1006     | 0,62102                  |
| 50    | 6          | 0,53206                 | 0,1135     | 0,42189                  |
| 24    | 6          | 0,39111                 | 0,0918     | 0,38344                  |
| 24    | 6          | 0,43191                 | 0,1088     | 0,35727                  |
| 24    | 6          | 0,38466                 | 0,109      | 0,31761                  |
| 56    | 30         | 1,29238                 | 0,1157     | 5,02655                  |
| 56    | 30         | 1,15787                 | 0,0963     | 5,41059                  |
| 56    | 30         | 1,36842                 | 0,1001     | 6,15175                  |
| 56    | 30         | 1,48076                 | 0,101      | 6,59746                  |
| 56    | 30         | 1,22286                 | 0,09       | 6,11432                  |
| 56    | 30         | 1,41844                 | 0,107      | 5,96541                  |
| 56    | 30         | 1,27610                 | 0,092      | 6,24181                  |
| 40    | 6          | 2,88721                 | 0,1106     | 2,34945                  |
| 40    | 6          | 2,41113                 | 0,1079     | 2,01114                  |
| 40    | 6          | 2,37777                 | 0,1075     | 1,99069                  |



## Vedlegg 6: Måledata for teflonrør

Tabell V.11: Vasket teflonrør i 8M HNO<sub>3</sub> bad testet for kvikksølv.(n antall rør= 30)

| Målt(µg/L) | Fortynning | Beregnet(µg/L) |
|------------|------------|----------------|
| 0,359137   | 5          | 1,79568        |
| 0,479518   | 5          | 2,39759        |
| 0,39908    | 5          | 1,99540        |
| 0,506361   | 5          | 2,53180        |
| 0,433459   | 5          | 2,16729        |
| 0,282027   | 5          | 1,41013        |
| 0,251594   | 5          | 1,25797        |
| 0,482032   | 5          | 2,41016        |
| 0,446615   | 5          | 2,23307        |
| 0,348976   | 5          | 1,74488        |
| 0,319833   | 5          | 1,59917        |
| 0,292353   | 5          | 1,46177        |
| 0,763576   | 5          | 3,81788        |
| 0,599343   | 5          | 2,99671        |
| 0,637873   | 5          | 3,18937        |
| 0,076632   | 5          | 0,38316        |
| 0,060348   | 5          | 0,30174        |
| 0,007001   | 5          | 0,03500        |
| 0,010292   | 5          | 0,05146        |
| 0,07502    | 5          | 0,37510        |
| 0,00277    | 5          | 0,01385        |
| 0,050817   | 5          | 0,25408        |
| 0,097262   | 5          | 0,48631        |
| 0,02327    | 5          | 0,11635        |
| 0,082578   | 5          | 0,41289        |
| 0,075241   | 5          | 0,37620        |
| 0,058885   | 5          | 0,29443        |
| 0,006234   | 5          | 0,03117        |
| 0,01031    | 5          | 0,05155        |
| 0,003833   | 5          | 0,01916        |

Tabell V.12: Syrevaskede teflonrør i høytrykksmikrobølgeoppvarming testet for kvikksølv.(n antall rør=30)

| Målt(µg/L) | fortynning | Beregnet(µg/L) |
|------------|------------|----------------|
| 0,014188   | 7,5        | 0,10641        |
| 0,022853   | 7,5        | 0,17139        |
| 0,025532   | 7,5        | 0,19149        |
| 0,043552   | 7,5        | 0,32664        |
| 0,017106   | 7,5        | 0,12830        |
| 0,002925   | 7,5        | 0,02194        |
| 0,027421   | 7,5        | 0,20566        |
| 0,032099   | 7,5        | 0,24075        |
| 0,035503   | 7,5        | 0,26627        |
| 0,020297   | 7,5        | 0,15223        |
| 0,019132   | 7,5        | 0,14349        |
| 0,030988   | 7,5        | 0,23241        |
| 0,008051   | 7,5        | 0,06039        |
| 0,010602   | 7,5        | 0,07951        |
| 0,021042   | 7,5        | 0,15782        |
| 0,048072   | 7,5        | 0,36054        |
| 0,021865   | 7,5        | 0,16399        |
| 0,018566   | 7,5        | 0,13925        |
| 0,019219   | 7,5        | 0,14414        |
| 0,012171   | 7,5        | 0,09128        |
| 0,015602   | 7,5        | 0,11702        |
| 0,031343   | 7,5        | 0,23507        |
| 0,01475    | 7,5        | 0,11063        |
| 0,016922   | 7,5        | 0,12692        |
| 0,025519   | 7,5        | 0,19139        |
| 0,009852   | 7,5        | 0,07389        |
| 0,016056   | 7,5        | 0,12042        |
| 0,012748   | 7,5        | 0,09561        |
| 0,013453   | 7,5        | 0,10090        |
| 0,014367   | 7,5        | 0,10776        |

Tabell V.13: Målt data for innhold av kvartsglass med oppslutning på Multiwave

| Rør                            | 1       | 2          | 3          | 4          | 5          | 6          | 7          | 8          | 9           | 10         |
|--------------------------------|---------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-------------|------------|
| Målt (µg/L)                    | 0,0118  | 0,007<br>6 | 0,008<br>3 | 0,009<br>4 | 0,009<br>3 | 0,009<br>0 | 0,007<br>6 | 0,007<br>8 | 0,003<br>6  | 0,007<br>6 |
| Fortynning                     | 3       | 3          | 3          | 3          | 3          | 3          | 3          | 3          | 3           | 3          |
| Endelig<br>beregning<br>(µg/L) | 0,03532 | 0,022<br>8 | -<br>0,025 | 0,028<br>1 | -<br>0,028 | -<br>0,027 | 0,022<br>7 | 0,023<br>5 | 0,010<br>91 | 0,022<br>8 |