



Forord

Denne oppaven ble utført ved Institutt for miljøvitenskap ved Norges miljø- og biovitenskaplige universitet på Ås, som en del av en mastergrad i kjemi. Tema for masteroppgaven ble foreslått av førsteamanuensis Elin Gjengedal ved NMBU og seniorforsker Cathrine Thomsen ved Folkehelseinstituttet. Bakgrunnen for oppgaven var et ønske om å utvikle en metode for analyse av norsk morsmelk, da det er et behov for informasjon om uorganiske komponenter i morsmelk. Mine veiledere har vært førsteamanuensis Elin Gjengedal, senioringeniør Karl Andreas Jensen og seniorforsker Cathrine Thomsen.

Jeg ønsker å takke senioringeniør Karl Andras Jensen ved NMBU for hjelp med valg av utgangsmetode og god opplæring på ICP-MS. Jeg ønsker å takke førsteamanuensis Elin Gjengedal for god veiledning på krav til metodeutvikling og skriving. En takk rettes også til seniorforsker Cathrine Thomsen for forslag til oppgave og opplysninger om hvilke grunnstoff det var ønskelig å måle. Overingeniør Solfrid Lohne fortjener også en stor takk for hjelp og innspill på laboratoriet. Hun utførte analysene på CV- AAS sammen med meg. En takk rettes også til Linn Katrin Nødland for et godt samarbeid på laboratoriet og for innspill til skrivingen av oppgaven.

Og sist men ikke minst en stor takk rettes til Elise Enger for god støtte og tålmodighet underveis når fokus det siste året stort sett har vært på ICP- MS. Jeg hadde ikke kommet i mål uten din støtte.

Ås, mai 2014

Øyvind Enger

Sammendrag

Nivåene av essensielle og toksiske grunnstoffer i morsmelk er ikke kartlagt i Norge. Det er viktig å få kartlagt disse nivåene, da morsmelk er den viktigste næringskilden for babyer frem til 6 måneders alder. Målsettingen for dette arbeidet var å utvikle og validere en metode for simultanbestemmelse av utvalgte grunnstoffer i morsmelk ved bruk av ICP-MS, en 8800 QQQ ICP-MS fra Agilent Technologies. Metoden omfatter bestemmelse av grunnstoffene kadmium (Cd), jod (I), kvikksølv (Hg), magnesium (Mg), mangan (Mn), bly (Pb), selen (Se), sink (Zn), kobber (Cu), jern (Fe), fosfor (P), og kalsium (Ca). I validering av metoden inngikk linearitet, metodens deteksjons (LD)- og kvantifiseringsgrense (LQ), presisjon, nøyaktighet, sensitivitet, spesifisitet, og et estimat for metodens usikkerhet.

Melk som matriser har et høytinnhold av organisk materiale (~12 % organisk i form av fett, proteiner og karbohydrater) som kan gi uønskede effekter under analyse. To fremgangsmåter for prøvepreparering ble prøvd ut, i) mikrobølgedekomponering med et sterkt oksidasjonsmiddel (salpetersyre) og en kompleksbinder (saltsyre), og ii) en fortykning med base, kompleksbinder, karbonkilde og et ikke-ionisk tensid. En løsning med 50 % (V/V) NH_3 , 20 % (V/V) isopropan-2-ol, 0,5 % (w/V) Triton x-100 og 2 % (w/V) H_4EDTA fortynnet 10 ganger i prøvene ble valgt. Det var ikke mulig å oppnå tilfredsstillende nøyaktighet for bestemmelse av kvikksølv med den basiske metoden. Det skjedde mest sannsynlig en utfelling av $\text{HgNH}_2\text{Cl}(s)$. Jod krever basisk dekomponering da det dannes flyktig I_2 ved bruk av salpetersyre. Begge metodene viste en lineær respons innenfor metodens måleområde. LD og LQ var ikke tilfredsstillende for Fe og Mn i de dekomponerte prøvene, det ble derfor bestemt å benytte den basiske fortykningen til alle grunnstoffene bortsett fra kvikksølv. Denne metoden inneholder et steg mindre noe som reduserer faren for kontaminering. Presisjon i metoden var god, sett i sammenheng med konsentrasjonsnivåene. Spesifisitet og nøyaktighet i begge metodene var tilfredsstillende. Det validerte måleområdet ble sammenlignet med nivåer funnet i litteraturen, og ingen av de to metodene gir tilfredsstillende kvantifiseringsgrenser for Hg og Cd. Den øvre grensen av det validerte området var god. Usikkerhet i metoden var <10 % for alle grunnstoffene bortsett fra Pb og Se i dekomponerte prøver, de var henholdsvis 15 og 22 % forklart av lave konsentrasjoner.

Abstract

The levels of toxic and essential elements isn't investigated in Norwegian breast milk. It is important to investigate these levels, since breast milk is the main source of nutrition for babies until 6 months of age. The goal for this work were to develop and validate a method for simultaneous detection of 12 elements in breast milk with an ICP-MS, an 8800 QQQ ICP-MS from Agilent Technologies. The method included quantification of calcium (Ca), cadmium (Cd), iodine (I), manganese (Mn), magnesium (Mg), phosphorus (P), zinc (Zn), iron (Fe), mercury (Hg), selenium (Se), lead (Pb), copper (Cu). The validation of the method included linearity, detection- and quantification limit, precision, accuracy, sensitivity, specificity and an estimate of the uncertainty.

Milk has a high organic content (~12 % organics in the form of fat, proteins, and carbohydrates) which can give rise to unwanted effects during analysis. There were two approaches for sample preparation which were tried, i) microwave digestion with a strong oxidizing agent (nitric acid) and a complex binder (hydrochloric acid), and ii) dilution with a base, complex binder, carbon source and a non-ionic wetting agent. A solution with 50 % (V/V) NH_3 , 20 % (V/V) isopropane-2-ol, 0, 5 % (w/V) Triton x- 100 and 2 % (w/V) H_4EDTA diluted 10 times in the samples were chosen. It was not possible to achieve satisfactory accuracy for determination of Hg with the alkaline method. Most likely Hg precipitated as $\text{HgNH}_2\text{Cl}(s)$. To be able to determine I it is necessary to use alkaline sample preparation, since it forms I_2 which is volatile in acid solutions. Both methods had linear response inside the methods measuring range. LD and LQ were not satisfactory for Fe and Mn in the digested samples, so it were decided to measure all the elements in the alkaline solution, except Hg. This method has one less step so it reduces the risk of contaminating the samples. The methods had good precision, considering the concentrations. Both accuracy and specificity were good in the methods. The validated range were compared with the levels found in the literature, and none of the methods gave LQ that were good enough for Hg and Cd. The upper limit of the validated range were good. The uncertainty in the method were < 10 % for all elements except Pb and Se in the digested samples, they were 15 and 22 %, explained by low concentrations.

Ordliste

cps, tellinger per sekund

Divalente ioner, ioner med oksidasjonstrinn 2, M^{2+}

Ikke- ionisk, det vil si at det ikke har noen elektrisk ladning og vil ikke reagere verken med positive eller negative ioner

Interfaceområdet, området der ionene ekstraheres ut av plasma og går fra høy temperatur og 1 atmosfæres trykk og over i romtemperatur og lavt trykk.

Polyatomære, molekyler

Specier, den kjemiske formen grunnstoffet foreligger på

Spesiering, bestemme på hvilken kjemiske form analytten foreligger i prøven

Spiking, det er å tilføre en kjent mengde av en analytt til prøven

Torch den delen av ICP-MS hvor plasma dannes

Uorganiske miljøgifter: Grunnstoff som er skadelig for mennesker og naturen.

Innhold

Forord.....	
Sammendrag.....	
Abstract	
Ordliste	
1. Innledning.....	7
2. Teori	9
2.1 Morsmelk som matriks.....	9
2.2 Teori basisk fortynning	9
2.2.1 Basisk fortynning av biologiske matrikser.....	10
2.2.2 Kompleksbinder	10
2.2.3 EDTA	10
2.3 Mikrobølge dekomponering.....	12
2.4 UltraClave	12
2.5 ICP-MS.....	13
2.5.1 Plasma	14
2.5.2 Prøveinnføring.....	16
2.5.3 Prøveveksler og Integrert prøveinnførings system, (ISIS).....	17
2.5.4 Masseseparasjon og detektor.....	18
2.5.5 Interferenser	20
2.5.6 Matriksinterferenser	23
2.6 CV- AAS	24
2.7 Metodevalidering	24
2.7.1 Linearitet	25
2.7.2 Deteksjonsgrenser, (LD) og kvantifiseringsgrenser,(LQ).....	25
2.7.3 Presisjon	25
2.7.4 Nøyaktighet	25
3. Metode.....	27
3.1 Instrumentelt.....	27
3.2 Reagenser, gasser og standarder.....	29
3.3 Metodeutvikling	32
3.4 Prosedyre.....	34
3.4.1 Tillaging av basisk reagens	34
3.4.2 Forberedelse av prøver med basisk fortynning	35
3.4.3 Forberedelse av prøver til dekomponering.....	35
3.4.4 Sertifisert referansemateriale.....	36
3.4.5 Reagenser til Analyse.....	36

3.5 Kalddamp- atomabsorpsjon spektrofotometri, CV- AAS	38
3.6 Metodevalidering	38
3.6.1 Metodevalidering basiske prøver	38
3.6.2 Metodevalidering syre dekomponerte prøver	38
3.6.3 Usikkerhet	38
3.5 Valg av analyse modus, isotop og intern standard	39
4. Resultater og diskusjon	40
4.1 Metodeutvikling	40
4.1.1 Utvikling av metode for basisk fortytning	40
4.1.2 Utvikling av metode for dekomponering med HNO ₃ og HCl	42
4.1.3 Test av nøyaktighet og spesifisitet av dekomponeringen med CV- AAS.....	43
4.2 Resultater fra metode valideringen	44
4.2.1 Linearitet i målområdet	44
4.2.2 Deteksjonsgrenser og kvantifiseringsgrenser.....	47
4.2.3 Nøyaktighet i metoden	51
4.2.4 Presisjon	54
4.2.5 Intermediær presisjon	57
4.3 Usikkerhet i metoden	59
5 Konklusjon og forslag til videre arbeid.....	60
5.1 Konklusjon	60
5.2 Videre arbeid	61
6 Referanser.....	62
Vedlegg A. Dekomponering	64
Vedlegg B. Beregninger av pH i løsninger og dannelseskonstanter for EDTA komplekser..	65
Vedlegg C. Konsentrasjon av standarder brukt til kalibrering ved metodevalidering	69
Vedlegg D. Resultater fra analyser av sertifiserte referansematerialer	72
Vedlegg E. Informasjon om analytter, internstandard, interferenser og korreksjoner	76
Vedlegg F. CV- AAS	80
Vedlegg G. Bergning av molariteten til TMAH og ioneproduktet til HgI ₂	81
Vedlegg H. Dixon Q.....	83
Vedlegg I. Resultater relevant for metodeutvikling.	84

1. Innledning

Hensikten med oppgaven er å utvikle og validere en analysemetode for 12 grunnstoff i morsmelk. Det er planlagt å bruke en Agilent Technologies 8800qqq ICP-MS, som er et trippel kvadrupol instrument. Dette vil si at det er mulig å gjøre en masseseparasjon både før og etter reaksjons/kollisjonscellen. Noe som gir bedre kontroll over interferenser.

Nivåene av essensielle og toksiske grunnstoffer i morsmelk er ikke kartlagt i Norge. Når det gis råd om amming i Norge, brukes tall fra Sverige (Thomsen 2013). Det er viktig å få kartlagt disse nivåene, da morsmelk er den viktigste næringskilden for babyer frem til 6 måneders alder (Helsedirektoratet 2011). Denne anbefalingen er gitt av helsedepartementet og den sier at barn burde fullammes frem til 6 måneders alder, dette er råd som er hentet fra verdens helseorganisasjon (WHO)(Kramer & Kakuma 2002). Denne anbefalingen forutsetter at morsmelken kan dekke det daglige behovet for essensielle grunnstoff og at melken ikke inneholder over det daglige/ukentlige anbefalte tolererbare inntaket av miljøgifter. Det er viktig å ta hensyn til at barn er små og har kropper som er i utvikling, så de er mer følsomme ovenfor miljøgifter og mangler av essensielle grunnstoff, enn voksne. Her gjelder det at det er like skadelig med for mye som for lite. For mye kan føre til forgiftning og andre helseproblemer, men et større problem er mangel av essensielle grunnstoff. Dette kan føre til hemming av utviklingen til babyene. Her er spesielt jod i fokus om dagen, da det er grunn til å tro at det kan foreligge for lav jod status hos norske mødre som ikke tar tilskudd av jod (Meltzer et al. 2013). Av metallene som er regnet som toksiske er det spesielt kvikksølv, kadmium og bly som er av bekymring (Folkehelseinstituttet 2008). I Norge kan kvikksølvnivåene i mor være høye, da det er en klar sammenheng mellom mengden ferskvannsfisk mor spiser og mengden kvikksølv mor har i kroppen. Assosiert med fisk i dietten er det den organiske formen metylkvikksølv som skaper bekymring (Bjornberg et al. 2005). Alle disse grunnstoffene er forbundet med helseproblemer som kan skade utviklingen av barn (Mattilsynet 2011).

Volumet melk som er tilgjengelig for analyse kan være veldig lite, gjerne ned mot 1 ml. Dette er et ganske lite volum, og det er derfor ønskelig å utvikle en metode for simultanbestemmelse av de ønskede grunnstoffene i melken på ICP-MS. De ønskede grunnstoffene er kadmium (Cd), jod (I), kvikksølv (Hg), magnesium (Mg), mangan (Mn), bly (Pb), selen (Se), sink (Zn), kobber (Cu), jern (Fe), fosfor (P), og kalsium (Ca).

Det er vanlig å benytte to metoder for å forberede melken til analyse, og disse metodene er mikrobølgedekomponering med salpetersyre (HNO_3) for bestemmelse kationene og en basisk preparering for bestemmelse av halogenene, i dette tilfellet jod. I denne oppgaven er det ønskelig å utvikle en metode der alle analyttene kan måles i en basisk løsning, for da trenger man bare en prøveopparbeidelse og færre steg i prøveopparbeidelsen. Dette er elementer som er med på å redusere sjansen for kontaminering av prøvene. Dette gjøres ved å tilpasse en metode brukt i blodanalyser til melkeanalyser (Wahlen et al. 2005). Denne metoden vil bli kontrollert mot dekomponering med salpetersyre, da dette er en etablert og anerkjent metode

Det er nødvendig å validere metoden for å bestemme metodens ytelse og dens begrensninger. Valideringsparameterne som skal bestemmes i dette arbeidet er linearitet, deteksjons- og kvantifiseringsgrenser, presisjon, nøyaktighet følsomhet og spesifisitet. Nøyaktighet i metoden bestemmes ved analyse av et sertifisert referansemateriale. Spiking-forsøk skal utføres for å undersøke eventuelle tap av analytt i ulike trinn i metoden. Det er også viktig å bestemme presisjonen i metoden. Dette gjøres ved å analysere flere parallelle av samme prøve og ved å analysere samme prøver over flere dager. Det sier noe om henholdsvis repeterbarhet og reproducerbarhet i metoden. Det må også utføres en test av linearitet for å sjekke at kalibreringen av ICP-MS er lineær over hele det ønskede måleområdet. Det er også ønskelig at metoden skal ha gode nok kvantifiseringsgrenser til å kunne kvantifisere grunnstoffene ned til verdier publisert i Sverige (Bjorklund et al. 2012; Bjornberg et al. 2005). Den må også dekke de øvre grensene. Ved en multigrunnstoffanalyse kan det være vanskelig å oppnå god nok følsomhet for alle grunnstoff, da analysen må tilpasses slik at alle grunnstoffene får et tilfredsstillende resultat. Ved analyse av et grunnstoff kunne metoden blitt optimalisert for det enkelte grunnstoff.

Analysene skal utføres på en trippel kvadrupol ICP-MS, dette er den første av sitt slag i verden, og den gir mulighet til å ha bedre kontroll på interferenser enn tidligere enkelt kvadrupol instrumenter. Dette gir sikrere resultater og man kan ta hensyn til eventuelle interferenser. Det som er viktig ved analyser på ICP-MS er å velge riktig tune modus og isotop for de grunnstoffene man skal analysere. ICP-MS er en multigrunnstoff analyseteknikk så man kan måle alle de ønskede grunnstoffene i en analyse, da dette er tidsbesparende.

2. Teori

2.1 Morsmelk som matriks

Morsmelk er en kompleks matriks, den har gjennomsnittlig 12,4 % tørrstoff (TDS) som fordeler seg på følgende måte: 3,8 % fett, 1,0 % protein, 7,0 % karbohydrater og 0,2 % mineraler (Lawrence & Lawrence 2011). Prøver som analyseres på ICP-MS bør ikke ha TDS på over 0,2 % mineraler. Det organiske byr ikke på problemer, da prøveprepareringen er med på å bryte det ned og resten brennes i plasma. Utfordringene med organisk materiale i prøvene er fysiske interferenser, spesielt karboneffekter i plasma. Karboneffekten kan elimineres ved å dekomponere melken med HNO_3 før analyse. Det blir brukt forskjellige prinsipper for å dekomponere, men fellesnevneren er at det tilsettes salpetersyre (Bjorklund et al. 2012; Goudarzi et al. 2013; Gurbay et al. 2012). Det kan også tilsettes en karbonkilde til prøvene slik at bidraget fra prøven blir neglisjerbart. Dette er en vanlig løsning ved basisk fortynning (Gajek et al. 2013).

Tidligere har melk blitt analysert ved bruk av GF- AAS (Garcia-Esquinas et al. 2011), ICP-AES (Nascimento et al. 2010), ICP- MS (Bjorklund et al. 2012). For analyser av kvikksølv har det blitt brukt CV- AAS (Da Costa et al. 2005; Drexler & Schaller 1998).

2.2 Teori basisk fortynning

Dersom metoden som utvikles skal brukes til å bestemme halogenene så kan ikke prøvene konserveres med syre. Da må det benyttes en basisk løsning. Noen av halogenene blir oksidert og danner flyktige forbindelser ved tilsetning av syrer. Protonering av halogenene fører også til betydelige minneeffekter i instrumentet. For å kunne bestemme jod er det nødvendig å benytte en base. Vanlige valg av baser for kvantifisering av jod er CFA-C, som er tertiære aminer og tetramethylammoniumhydroksid (TMAH)(Nóbrega et al. 2006). Det er mulig å bestemme kationer i basiske løsninger dersom det benyttes kompleksbindere, som EDTA, for å holde kationene i løsningen(Harris 2010). Kompleksbindere er beskrevet i eget kapittel. Basisk fortynning reduserer også antall trinn i prøveprepareringen i forhold til en syre-dekomponering. En reduksjon av antall trinn i prøveprepareringen gir en redusert risiko for kontaminering av prøvene. Kontaminering er ofte den største begrensningen for kvantifisering av lave konsentrasjoner.

2.2.1 Basisk fortykning av biologiske matriser.

Ved analyser av blod er det vanlig å bruke en basisk fortykning. Det blir da benyttet en base, kompleksbindere, en karbonkilde og ikke- ionisk tensider (Gajek et al. 2013; McShane et al. 2008). Samme type løsning kan også anvendes på melk. Basen tilsettes for å bryte ned proteiner og løse fett, men ved høy pH kan proteinene felle ut av løsningen. Tilsetning av Triton X- 100, som er ikke- ioniske tensidier, er med på å bryte ned cellemembraner og å holde proteiner og fett i løsning. Metallene kan være bundet til organiske ligander, så derfor er det viktig å bryte ned cellene. Karbonkilden er ofte en alkohol, som tilsettes for å motvirke karboneffekten. Karboneffekten er tidligere beskrevet i interferenskapittelet under ICP- MS.

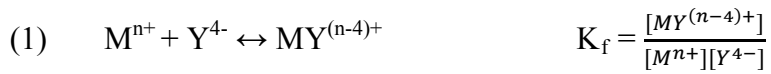
2.2.2 Kompleksbinder

Metaller er Lewis syrer, det vil si at de er elektronpar akseptorer, i en basisk løsning vil de danne hydroksider og disse er ofte tungt- løselige (Harris 2010). Dette er spesielt problematisk med divalente ioner og ioner med høyere oksidasjonstrinn. For å holde metallene i løsning er det da vanlig å bruke en kompleksbinder, det vil si en ligand som binder metallet sterkere enn hydroksidkomplekset, slik at det ikke forekommer utfellinger. Dette er avhengig av at det ikke finnes noen komponenter i løsningen med høyere dannelseskonstant enn kompleksbinderen har, for da kan det fortsatt forekomme utfellinger. Det er også viktig å ha nok av kompleksbinderen i løsningen, da den ikke er selektiv for det ønskede grunnstoffet. Hvis ikke konsentrasjonen av kompleksbinderen er høy nok, kan man fortsatt få tap av analytt gjennom utfellinger (Gajek et al. 2013).

2.2.3 EDTA

Ethylenediaminetetraacetic acid, (EDTA) blir brukt som kompleksbinder i denne oppgaven, dette skjer ved at det dannes et kompleks med metallionene. EDTA danner komplekser med forskjellig styrke til metallene avhengig av koordineringen til metallet og formen EDTA foreligger på. EDTA kan foreligge som +2, +1, 0, -1, -2, -3 og -4. Dette er avhengig av pH, det høyere pH desto mer elektronegativt er EDTA. Dette kommer av at EDTA er en svak syre som vil deprotonere i basiske løsninger. I denne oppgaven benyttes H_4EDTA . Denne må løses i base da den er tungtløselig i vann. Det brukes syre-EDTA da denne er renere enn andre forbindelser av EDTA. EDTA sin evne til å binde til det enkelte grunnstoff er oppgitt i tabell, vedlegg B. Her er det gitt en dannelseskonstant, (K_f). Desto høyere denne K_f er det bedre binder EDTA det aktuelle grunnstoffet. Dannelseskonstanten er beregnet ved å bruke ligning (1), der EDTA for enkelhets skyld er forkortet til Y og metallet til M. Siden evnene til å

kompleksbinde metaller er avhengig av pH, så må dannelseskonstanten beregnes ved hver enkelt pH ved å bruke ligningene (2- 5). Beregningen er vist i vedlegg B.



$$(2) \quad K_f = K_f^* \alpha_4 = \frac{[MY^{(n-4)+}]}{[M^{n+}]c_T}$$

Der c_T er den molare konsentrasjonen av EDTA som ikke er kompleksbundet:

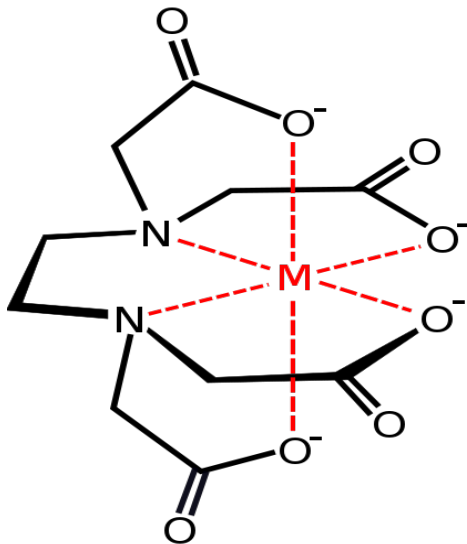
$$(3) \quad c_T = [Y^{4-}] + [HY^{3-}] + [H_2Y^{2-}] + [H_3Y^-] + [H_4Y] + [H_5Y^+] + [H_6Y^{2+}]$$

$$(4) \quad \alpha_4 = \frac{[Y^{4-}]}{c_T}$$

$$(5) \quad \alpha_4 =$$

$$\frac{K_1 K_2 K_3 K_4 K_5 K_6}{[H^+]^6 + K_1[H^+]^5 + K_1 K_2[H^+]^4 + K_1 K_2 K_3[H^+]^3 + K_1 K_2 K_3 K_4[H^+]^2 + K_1 K_2 K_3 K_4 K_5[H^+] + K_1 K_2 K_3 K_4 K_5 K_6} = \frac{K_1 K_2 K_3 K_4 K_5 K_6}{D}$$

Der K_1 - K_6 er disproporsjonskonstantene til EDTA. Disse er vist i tabell 2 i vedlegg B



Figur 1 Viser hvordan EDTA kompleksbinder metaller i en seks koordinert struktur (wikipedia).

Figuren viser hvordan EDTA kompleksbinder metaller i 1:1 ratio. EDTA kan også danne 7 og 8 koordinerte strukturer, dette skjer ved at det bindes et eller to vannmolekyler til komplekset, hvor metallet er bundet til oksygenatomet i vannmolekylet. Hvert metallion trenger et EDTA molekyl for at de skal kunne kompleksbindes og holdes i løsning. I melk hvor det er mye metaller er det viktig å ha nok EDTA da det ikke er en selektiv metode for de ønskede grunnstoffene. En annen viktig faktor, når løsningene er basisk, er å sørge for at metaller som Ca og Fe ikke feller ut som hydroksider. Det er også viktig å finne ut om det er andre molekyler eller ioner i løsningen som binder bedre til de ønskede grunnstoffene enn EDTA slik at de feller ut. EDTA må få tid til å kompleksbinde metallene før de feller ut, det er vanlig å forhindre utfelling ved å bruke en hjelpekompleksbinder. Denne danner et kompleks med metallene som har større dannelseskonstant enn det hydroksidene har, men mindre dannelseskonstant enn det EDTA har. Slik at den vil oppgi kationen til EDTA (Harris 2010), ammoniakk er vanlig å bruke her.

2.3 Mikrobølge dekomponering

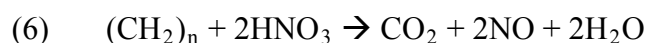
Mikrobølgedekomponering baserer seg på at beholderne med innveid prøve og syre varmes opp med mikrobølger (Stalam 2013). Prøven kan da enten varmes opp direkte ved at beholderne bestråles, eller så kan beholderne senkes ned i et vannbad som blir bestrålt og varme overføres til beholderne. Mikrobølger er elektromagnetisk stråling med frekvens mellom 300 MHz til 30 GHz (Adamo & Alberto 1999). Syre forbrukes i en dekomponering, så det er viktig å tilsette nok syre.

2.4 UltraClave

UltraClave er et lukket mikrobølgesystem som brukes til å dekomponere prøver. Det blir først lastet inn et program på terminalen som styrer temperatur i UltraClaven og tiden den skal holde de forskjellige temperaturene se figur A- 1 i vedlegg A. Dette er viktig da salpetersyre og organisk materiale skaper en kraftig eksoterm reaksjon når det organiske materialet blir oksidert. Ultraclave blir trykksatt med nitrogengass (N_2) når prøvene dekomponeres. Trykket inne i UltraClaven er 50 bar etter trykksetting. Dette er viktig for å forhindre koking under dekomponering. Grunnen til at et høyt trykk forhindrer koking er at en væske koker når væskens damptrykk er lik det ytre trykket. Ved å ha et veldig høyt trykk inne i UltraClaven vil aldri damptrykket til væsken bli like høyt som det ytre trykket. Ved å unngå koking i beholderene reduseres faren for krysskontaminering mellom prøvene. Det kan også benyttes høy temperatur, noe som igjen vil sikre en mer komplett dekomponering.

Prøvene senkes ned i et vannbad kalt load bestående av 370 ml ionebyttet vann, 2 ml svovelsyre og 25- 30 ml hydrogenperoksid, dette er med på å sikre lik temperatur i alle beholderne som skal dekomponeres, fordi det er loaden som varmes opp. Oppvarmingen av loaden skjer ved en ionisk migrasjon og dipol rotasjon, dette skaper friksjonsvarme som vist i figur 2 i vedlegg 1. Ved høye temperaturer vil vannet bli upolart, så det blir tilsatt svovelsyre til loaden for å sikre at man har ioner tilstede i løsningen slik at det kan oppnås høy nok i temperatur. Svovelsyren danner sulfationer og H_3O^+ ioner. Det er viktig fordi temperaturen avgjør hvor raskt en kjemisk reaksjon går. Arrhenius likning, ligning A- 1 vedlegg A, sier at en økning på 10^0C vil gi en dobling av reaksjonshastigheten. Forskjellig temperatur i prøvebeholderne kan bety at dekomponeringen kan være ufullstendig i noen beholdere. Mikrobølgesystemet tillater også dekomponering av forskjellige matrikser i de ulike beholderne, da det er god temperaturkontroll og det er lite sannsynlig med kontaminering mellom rørene, på grunn av trykket. Hydrogenperoksid vil oksidere NO_x gasser til NO_3^- , slik at man slipper store mengder nitrose gasser etter oksidasjon av organisk materiale i prøvebeholderne.

Løsningen blir homogen etter dekomponering og ved bruk av salpetersyre vil man oksidere bort det organiske materiale se ligning 6, noe som er viktig for videre analyser (BERGHOF Products + Instruments GmbH).



2.5 ICP-MS

ICP- MS er en metode basert på massespektroskopi, der det brukes induktivt koblet argon (Ar) plasma som ioniseringskilde. ICP- MS har vært kommersielt tilgjengelig siden starten av 1980 tallet (Agilent Technologies 2005). Teknikken blir benyttet til analyse av alt fra sporgrunnstoff til makrogrunnstoff, da det er en multigrunnstoff teknikk som dekker nesten hele periodesystemet. Teknikken kan også benyttes for å bestemme isotopforhold, noe som muliggjør bruk av isotopfortynnede standarder. Det er noen begrensninger i forhold til hvilke grunnstoff som kan bestemmes. Det kan blant annet ikke bestemmes grunnstoff med høyere første ioniseringsenergi (IE) enn Ar da disse ikke vil bli ionisert i stor nok grad. Grunnen til at ICP-MS er førstevalget blant mange analytiske metoder er den har god sensitivitet, lave bakgrunner og den kan oppnå lave deteksjonsgrenser. Det er også en rask analysemetode der et stort antall prøver kan analyseres på kort tid. Det store lineære området, i størrelsesorden

3×10^9 , gjør at grunnstoff kan bestemmes fra ng/L til mg/L i samme analyse. Teknikken kan også kobles sammen med andre teknikker for spesiering og karakterisering, og laser kan brukes på faste prøver. Det finnes forskjellige prinsipper for å separere ionene innenfor ICP-MS. Disse er høyopløselig ICP-MS, (HR-ICP-MS) der det brukes et magnetfelt og et elektrisk felt til å skille ionene før deteksjon. "Time of flight" ICP-MS, (TOF-ICP-MS) der skilles ionene ved tiden de bruker frem til detektoren. Alle ionene blir tilført lik kinetisk energi og da vil massen avgjøre hastigheten og dermed tiden ionene bruker fram til detektoren. I følge ligning 7 og 8 er E_{kin} er den kinetiske energien, m er masse, v er hastighet, t er tid og s er strekningen.

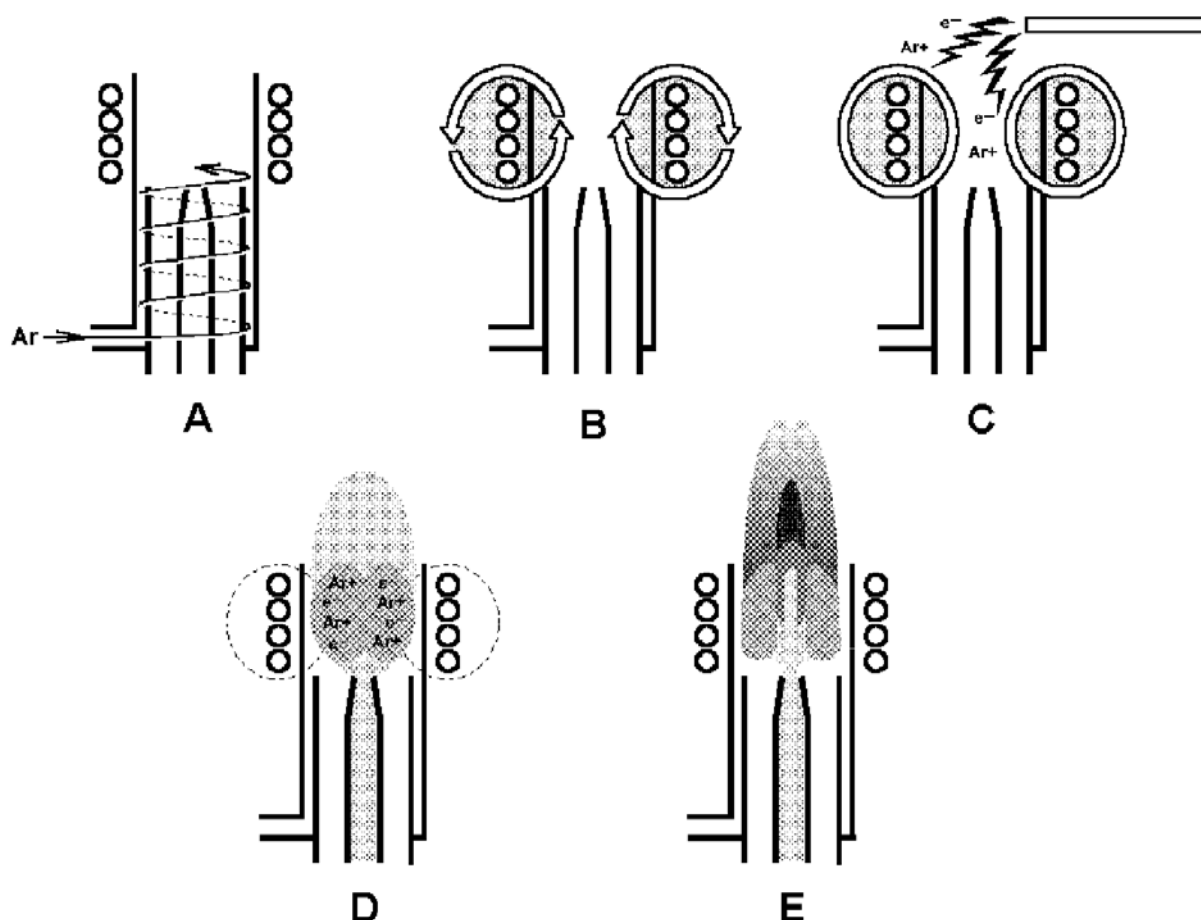
$$(7) \quad E_{kin} = 1/2 * (mv^2)$$

$$(8) \quad t = s/v$$

Den mest vanlige metoden er å bruke en kvadrupol til å skille de forskjellige massene. En kvadrupol består av fire parallelle staver som er elektrisk ladede, der det er pålagt et varierende likestrøms- og vekselstrømspotensial parvis på stavene. Dette danner et komplekst elektromagnetisk felt som bestemmer banen til ionene. For hver kombinasjon av spenning og frekvens vil bare ioner med et bestemt masse/ ladningsforhold (m/z) passere igjennom, alle andre ioner med høyere eller lavere m/z forhold vil få en ustabil bane og kolliderer med stavene. Ionene som kolliderer med stavene når ikke detektoren. I denne oppgaven benyttes en Agilent Technologies 8800 QQQ som er et trippel kvadrupolinstrument, det vil si to kvadrupoler og en reaksjons/kollisjons celle.

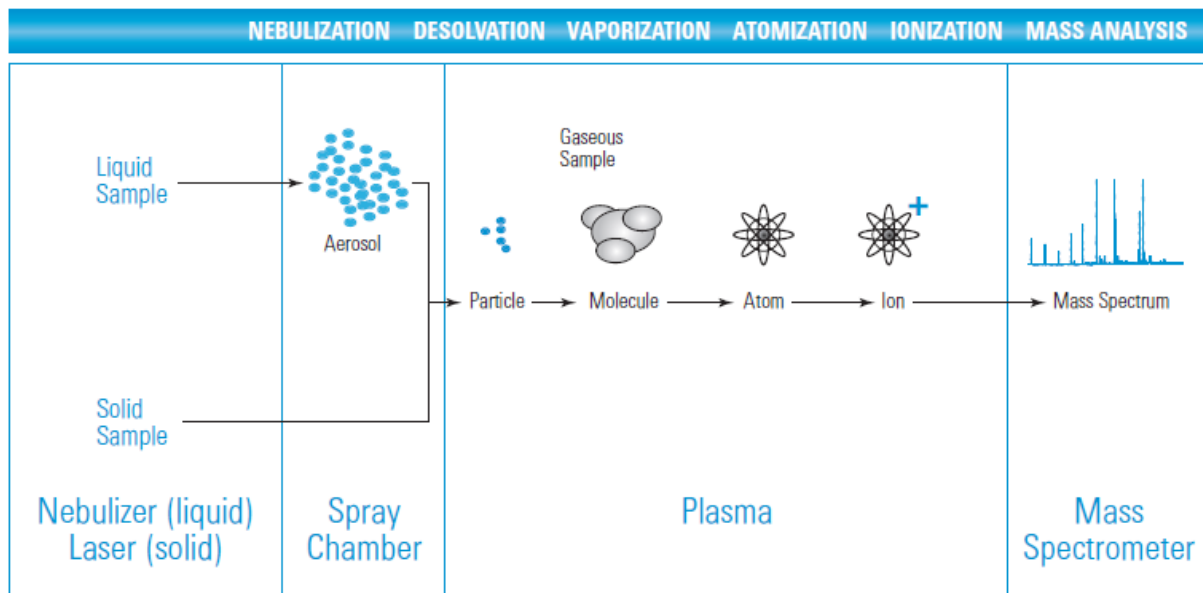
2.5.1 Plasma

Et plasma er en ionisert gass, i dette tilfellet argon, (Ar) ligning 9. Argongassen sendes inn i et radiofrekvent felt som er generert av en RF- generator. Frekvensen i de fleste ICP instrumenter er 27 eller 40 megahertz (MHz), det er en AC strøm inne i spolen som oscillerer i takt med frekvensen og skaper et raskt vekslende magnetfelt. Det vil så bli sendt inn en gnist i torchen, se figur 2 bilde c, som vil slå løs elektroner fra argongassen (ligning 9). De positivt ladede ionene og negativt ladede elektronene vil bevege seg etter magnetfeltet og vil få større og større bevegelsesenergi. Det vil bli slått løs flere og flere elektroner på grunn av kollisjoner mellom atomer og elektroner med stor energi. Denne kjedereaksjonen fører til at et plasma bygges opp.



Figur 2. Viser et tverrsnitt av en ICP “torch”. A. Argongass virvler rundt igjennom torchen. B. Det er tilført RF kraft til spolen. C. En gnist slår løs elektroner fra argongassen. D. Elektronene blir akselerert av magnetfeltet og fører til ytterligere ionisering, som fører til en oppbygning av plasma. E. Prøve aerosolen blir ført inn i senter av plasmaet (Boss & Fredeen 1997).

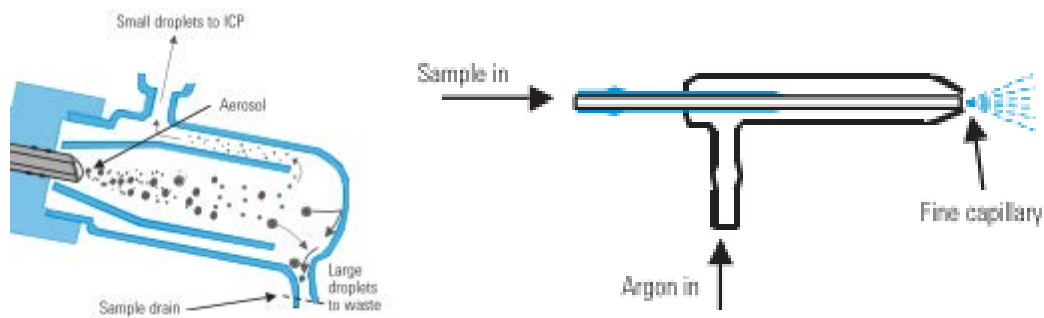
Plasmaet blir svært varmt og temperaturen kan komme opp i 10000 K. Denne temperaturen genererer nok energi til å ionisere de fleste grunnstoff i plasma. Ioniseringen av grunnstoffene skjer som vist i figur 3.



Figur 3. En skjematisk oversikt over hvordan prøven beveger seg gjennom ICP-MS og hva som skjer med prøven (Agilent Technologies 2005).

2.5.2 Prøveinnføring

For å få prøven fra væske til en aerosol brukes det en forstøver som omdanner væsken til en homogen aerosol, man ønsker en fin homogen aerosol for innføring i plasma. Det må brukes et forstøverkammer for å skille den fine aerosolen fra de større dråpene. I denne oppgaven ble det brukt en konsentrisk forstøver (figur 4), der prøven kommer inn og treffes av en strøm av argongass. Prøve og gass blir så presset gjennom et kapillærrør i enden av forstøveren, noe som gir en veldig høy hastighet på væsken, og den kommer ut som en aerosol i senterrøret i forstøverkammeret. Inne i forstøverkammeret må prøven følge gasstrømmen 180 grader rundt og ut av forstøverkammeret gjennom røret som er vist på toppen av kammeret i figur 4. De største dråpene vil treffe veggene da de har større lineært moment enn de små dråpene. Den fineste aerosolen er lettere å bøye av og den vil gå videre inn til plasmaet. De store partiklene renner så ut av avløpet som er vist på tuppen av forstøverkammeret i figur 4.



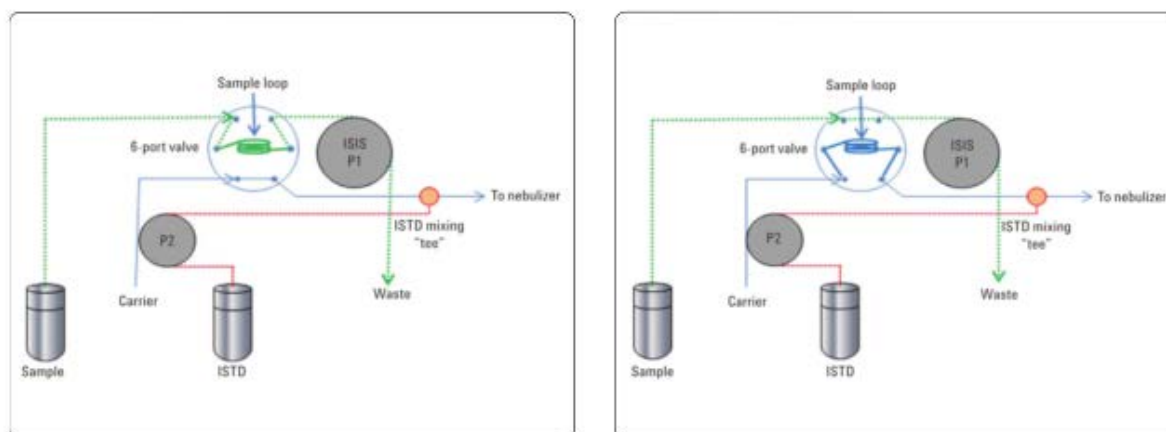
Figur 4. Bildet til venstre viser et Scott double pass forstøverkammer, der aerosolen kommer inn i midten og må bevege seg rundt og ut av hullet på toppen og inn i plasma. De store dråpene og kondensen som setter seg på veggen renner ut av hullet på undersiden. Bildet til høyre viser en konsentrisk forstøver (Agilent Technologies 2005).

Det er ønskelig med minst mulig vann inn i plasma, da dette kan føre til lite robust plasma og høy oksiddannelse på grunn av oksygen i vannet. For å redusere dette problemet er forstøverkammeret kjølt ned til 2°C, da vil mye av vannet kondensere på veggene i forstøverkammeret og renne ut av avløpet (Agilent Technologies 2005).

2.5.3 Prøveveksler og Integrert prøveinnførings system, (ISIS)

Prøver i væskeform settes på en prøveveksler og det legges inn i programvaren i hvilken rekkefølge prøvene skal analyseres. Standarder og vask settes også på prøveveksleren. Det er også en egen posisjon for å rense sonden som suger opp prøve.

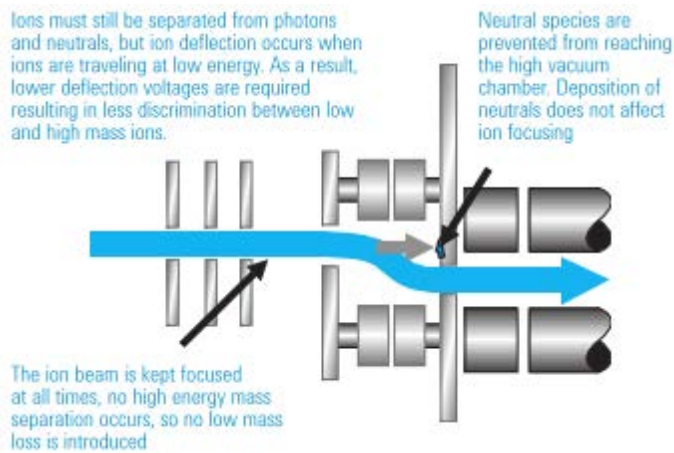
ISIS systemet fungerer på den måten at det alltid går en bæreløsning med konstant flow. Når loopen står posisjonen der den fylles, går bæreløsningen rett til forstøver og inn i plasma. Etter at sonden har gått i en prøve og loopen er fylt med prøve, så er det en ventil som snur slik at bæreløsningen nå dytter prøven foran seg til forstøver. Loopen fylles ved at det suges opp prøve med en peristaltisk pumpe som står plassert etter loopen. Dette betyr at prøven ikke må igjennom pumpe slangene, som er en vanlig kilde til kontaminering, men bare går i teflonslangene fra sonden til loopen. Figur 5 viser en skjematisk oversikt over ISIS systemet, når det står i fyll og injiser.



Figur 5. Til venstre vises ISIS systemet med ventilen i fyll loop stilling. Til høyre kan vises ISIS systemet med ventilen i injiser stilling (Wilbur et al. 2009).

2.5.4 Masseseparasjon og detektor

ICP-MS måler ioniserte grunnstoff. Det er derfor viktig å ekstrahere ionene ut av plasma hvor det er høy temperatur og en atmosfæres trykk, og over i romtemperatur og lavt trykk (10^{-5} torr). Dette blir gjort i et interfaceområde, som består av to nikkel eller platina koner med ca 1 millimeter dyser. Ioner blir ekstrahert fra senter av plasma via dysene. Ionene kommer først inn i området mellom konene som holder et trykk på 1- 3 torr ved hjelp av en høykapasitets rotasjonsvakuumpumpe. Vakuomet her fjerner de fleste argonatomenene som kommer fra plasma. Ionene blir så ekstrahert gjennom dysen til skimmerkonen og inn i ionelinsene og videre til MS, som holder et trykk på 10^{-3} til 10^{-5} torr. Trykket blir opprettholdt av turbopumper. Ionelinsene som sitter før MS gjør det mulig å fjerne fotoner og nøytrale specier fra ionestrålen. Ionelinsene bøyer av og fokuserer ionestrålen ved hjelp av ulike spenninger slik at den ikke er i linje med plasma, men parallell som vist i figur 6. Da er det bare positive ioner som når masseseparasjonsenheten.



Figur 6. Viser Agilent Technologies sitt ionelinsesystem, hvor ionene blir fokusert og bøyd av fra den opprinnelige aksen, slik at nøytrale specier og fotoner forsvinner fra ionestrålen (Agilent Technologies 2005).

Kvadrupolene består av 4 staver, som fungerer som to par. Hvert par blir påført en DC, det ene paret en positiv DC og det andre paret en negativ DC. Det blir også påført en AC på hver av de to stav parene. Spenningen endres med forholdet $AC/DC \approx 6$ for hver m/z , og atomer og ioner med et annet m/z -forhold vil få en ustabil bane gjennom kvadrupolen, kolliderer i stavene og bli borte fra ionestrålen (Agilent Technologies 2005).

Detektoren sitter i enden av massespektrometeret og den detekterer, forsterker og måler antall ioner som passerer massespektrometeret. Detektoren operer under lavt trykk 10^{-5} torr. Den vanligste detektoren i ICP-MS er en elektronmultiplikator. I Agilent 8800 QQQ er det en "dual stage discrete dynode detector". De positivt ladede ionene som kommer ut av masseseperasjonsenheten trekkes mot den negativt ladede dynoden. Når de treffer detektoren slås det løs elektroner som trekkes mot den neste dynoden som er positivt ladet. Denne prosessen gjentas mer enn 20 ganger og hver gang slås det løs flere elektroner og på denne måten blir signalet kraftig forsterket. Signalet blir målt to steder i detektoren og kalles derfor dual stage. I fremre analoge delen av detektoren måles signalet i mA og blir gjort om til cps ekvivalenter. Dette brukes til å måle høye konsentrasjoner. Den nedre delen av detektoren måler lavintensitets målinger som cps. Denne delen av detektoren er skånet for målinger over 1000 kcps. Dette sparer detektoren slik at den ikke må byttes så ofte. De to detektorene gjør at det kan måles over et stort lineært område, det kan måles fra ng/l til mg/l uten fortykning (Agilent Technologies 2005).

Reaksjons-/ kollisjonscellen er plassert mellom de to kvadropolene. I denne kan interferenser med samme m/z som analytten unngås. Det gjøres ved at det sendes inn en gass, da enten en reaksjonsgass eller en kollisjonsgass. Ved å benytte en reaksjonsgass kan vekten på analytt eller interferens endres slik at de ikke får samme m/z i kvadropol to (Q2). En kollisjonsgass brukes i hovedsak ved polyatomære interferenser, da disse har større radius en analytten og vil kollidere mer med gassen og derfor tape kinetisk energi. Et filter som skiller på kinetisk energi (KED) vil derfor hindre polyatomære forbindelser i å nå Q2. Den store nyvinningen med å ha en kvadropol (Q1) før reaksjons/kollisjonscellen er at man ikke får nye interferenser inne i cellen, da det bare slippes igjennom et m/z -forhold av gangen (Agilent Technologies 2012).

2.5.5 Interferenser

2.5.5.1. Spektralinterferenser

Det forekommer 3 forskjellige typer spektralinterferenser i ICP-MS. Det er isobare overlapp, molekylære interferenser og dobbeltladede ioner. Alle disse interferensene er det mulig å korrigere for. Det beste er å velge en analytt som ikke har noen interferenser hvis dette er mulig. Sannsynlige interferenser er mulig å finne i tabeller og dataprogrammer. Finnes det kjente interferenser kan det velges kollisjons og/eller reaksjonsgasser for å korrigere for dette. Ved å måle på to isotoper av analytten og den kvantifiserte verdien blir den samme, er det lite sannsynlig at det er en betydelig interferens tilstede. Ved motsatt tilfelle er det en interferens tilstede og denne må det korrigeres for.

2.5.5.2. Isobar overlapp

En isobar interferens er en isotop av et annet grunnstoff enn analytten har samme masse som analytten. Dette klarer ikke ICP-MS å skille uten at det gjøres en korrigerings. Uten korrigerings vil analytten overestimeres. Isobar overlapp er angitt i tabeller og isotoper uten overlapp velges dersom dette er mulig. Dersom jern skal bestemmes i en prøve velges ikke ^{54}Fe da den har overlapp med ^{54}Cr . Isotopene 56 og 57 er da bedre valg da de ikke har isobare overlapp. ^{40}K og ^{40}Ca er andre eksempler som overlapper hverandre og har en overlapp fra ^{40}Ar , ^{40}Ar vil være et problem i ICP-MS fordi det brukes argon i plasma i store mengder og 99,600% av argon foreligger som isotopen med masse 40. Kalium og kalsium kvantifiseres da best på andre isotoper. Det er viktig å tenke på at den valgte isotopen må

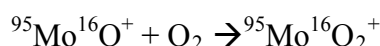
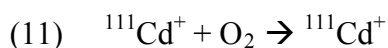
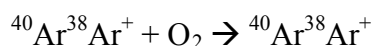
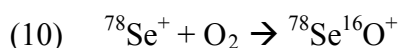
være målbar. Ved å velge en isotop som det er veldig lite av, og det er i utgangspunktet lite av analytten, så kan man risikere å ikke detektere analytten. Det er også mulig å finne en annen isotop av interferensen som ikke da har noen andre interferenser, og matematisk korrigere bort interferensen slik at man bare sitter igjen med signal fra analytten. Dette kan gjøres fordi som nevnt tidligere så er forholdet mellom de naturlige isotopene kjent, og kan brukes for korreksjon. Dette gjøres på ^{115}In og ^{114}Cd , de korrigeres matematisk ved at ^{118}Sn ganges med en faktor og trekkes fra analytt signalet på ^{115}In og ^{114}Cd . Faktoren er 0,014 for In og 0,0268 for Cd. Faktoren bestemmes ved å bruke naturlige isotopforhold og massebias-faktor. Det er ikke ønskelig med matematiske korreksjoner hvis det kan unngås, da det bidrar til økt usikkerhet.

Isobar interferenser kan også korrigeres i reaksjons/kollisjonscellen, da ved å reagere enten analytten eller interferensen. Ved reaksjon av analytt endres masse i Q2 slik at den reagerte analytten kan passere, og ikke interferensen som fortsatt har samme masse. Det er også mulig å reagere interferensen slik at massen til interferensen øker og Q2 holdes på samme masse som Q1 (Agilent Technologies 2012).

2.5.5.3. Molekylære interferenser

Polyatomære(molekylære) interferenser er et mer komplekst område fordi det er veldig mange forskjellige polyatomære forbindelser som kan dannes. Mengden av analytten i prøven vil bli overestimert dersom det er polyatomære interferenser. Det finnes tabeller over de vanligste polyatomære interferensene, men hva som dannes avhenger av hva som er til stede i prøven, reagenser, plasmagassen. Oksider er vanlige polyatomære interferenser. Det er også vanlig at klorid danner polyatomære interferenser. Temperaturen i plasma kan også påvirke dannelsen av polyatomære forbindelser, ved lavere temperaturer dannes det mer polyatomære forbindelser enn ved høye temperaturer. Dette er fordi ved høye temperaturer er det nok energi til å bryte ned bindingene mellom atomene. Høy temperatur i plasma vil derfor gi mindre polyatomære interferenser, men det vil gi flere interferenser med dobbeltladede atomer. En vurdering av plasmabetingelsene må gjøres ut fra hvilke grunnstoff som skal bestemmes. Valg av passende prøveinnføringssystem kan også korrigere for polyatomære interferenser ved for eksempel å eliminere løsemidler som ved bruk av elektrotermisk oppvarming.

I Agilent 8800 QQQ er det også mulig og først skille massene i prøven slik at man har bare den ønskede massen gjennom Q1 samt interferenser med samme m/z. En kollisjons-gass kan da fjerne polyatomære interferenser ved at de får lavere kinetisk energi enn analytten som følge av flere kollisjoner. Det er også mulig å bruke en reaksjons-gass ved å reagere enten analytten eller interferensen. Ved reaksjon av analytt endres masse i Q2 slik at den reagerte analytten kan passere, og ikke interferensen som fortsatt har samme masse. Dette er vist i ligning 10. Det er også mulig å reagere interferensen slik at massen til interferensen øker og kvadropol to holdes på samme masse som kvadropol en (Agilent Technologies 2012), dette er vist i ligning 11.



2.5.5.4. Dobbeltladete ioner

ICP-MS skiller de forskjellige analyttene ved å måle masse over ladning m/z. Et grunnstoff med en masse som er dobbelt så stor som massen til analytten og med ladning 2+ vil gi en interferens på grunn av samme forhold mellom m/z. Dobbeltladete ioner kan reduseres ved å senke temperaturen i plasmaet. Optimale plasmabetingelser er derfor viktig. Det å velge en annen isotop av analytten er den enkleste løsningen, hvis de andre isotopene ikke har interferenser. Det kan også gjøres en matematisk korreksjon på samme måte som for polyatomære forbindelser, der det sendes inn en prøve med bare interferensen og man ser på hvor stort bidrag denne gir til analytt målingen. Det kan så regnes ut en faktor som brukes til å matematisk korrigerer i analysen. Dette kan bare gjøres ved stabile plasmabetingelser og lav konsentrasjon av interferens.

I Agilent 8800 QQQ er det også mulig og først skille massene i prøven slik at man har bare den ønskede massen gjennom Q1, og så reagere interferensen med en reaksjons-gass der det er mulig, og så sette Q1 = Q2 slik at bare analytt slipper igjennom. Det er også mulig å reagere analytten og så stille Q2 to på m/z til reaksjonsproduktet slik at interferensen blir skilt fra på den måten. Et eksempel er ${}^{75}\text{As}^+$ med dobbeltladete ${}^{150}\text{Nd}^{2+}$ og ${}^{150}\text{Sm}^{2+}$. Alle disse ha m/z-forhold på 75. Ved å reagere As^+ til AsO^+ blir masse ladingens forholdet 91. Hvis de dobbeltladete skulle reagere med oksygen vil de få et nytt masse ladingens forhold på 166/2

som er 83, så det er mulig å skille analytt og interferens i Q2. ^{91}Zr vil heller ikke være et problem da den ikke passerer Q1.

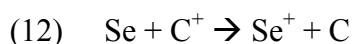
2.5.6 Matriksinterferenser

Prøver med høyt innhold av oppløst fast stoff kan føre til at interface-konene tetter seg gradvis. Mindre og mindre ioner inn kommer i masseseparasjonsenheten og signalet blir gradvis lavere. Dette kan løses ved å fortynne prøvene, slik at det blir mindre totalt oppløst fast stoff. Forstøveren kan også gradvis tette seg ved høye konsentrasjoner av faststoff.

Høy konsentrasjon av lett ioniserbare grunnstoff i prøven, som for eksempel Na, kan føre til ustabile forhold i plasma. Mye energi går med til ionisere den lett ioniserbare komponenten og man får lavere energi og dermed lavere temperatur i plasma. Dette kan redusere ioniseringseffekten til analytten i plasma. Dette kan løses ved en fortynning av prøven eller bruk av passende internstandard (IS).

Ved høy konsentrasjon av ioner i matriksen vil ionene komme så nært hverandre at de vil begynne å frastøte hverandre. Dette kan føre til at de letteste ionene blir presset ut av ionestrålen, spesielt i ionelinsene. Dette kommer av at de har mindre kinetisk energi enn de tunge ionene, som for eksempel bly, uran og vismut. Disse vil presse de lettere massene ut av ionestrålen slik at det blir detektert et for lavt signal for de lette grunnstoffene. Hastigheten til de store og små ionene er lik, men massene er forskjellige, og derfor vil de tyngre grunnstoffene ha mer kinetisk energi, ($E_{\text{kin}}=1/2mv^2$). Dette kalles romladningseffekten (space charge effect) For å unngå dette kan prøven fortynnes slik at ionetettheten ikke blir så høy, eller bruke en IS med tilsvarende masse.

Ved høye konsentrasjoner av karbon i prøven kan grunnstoff med høy første ioniseringsenergi overestimere. Dette kalles karboneffekten. Det som skjer er en ladningsoverføring fra karbon til analytten da karbon har høyere IE enn analytten, se ligning 12.



Analytten i prøver med høyt karboninnhold vil da overestimere. Dette kan hindres ved enten en dekomponering med salpetersyre der det organisk oksideres bort, eller ved å tilsette en massiv karbonkilde i standarder og prøver. Denne vil da dominere matriksen slik at bidrag av karbon fra prøven blir neglisjerbart.

Viskositeten til prøvene er også en viktig faktor. Forstøvereffekten blir forskjellig i standard og prøve dersom viskositeten er forskjellig. Dette vil påvirke mengden prøve som kommer inn i plasma. Dette kan korrigeres ved matriksmatching og ved bruk av internstandard. Grunnstoffene i internstandard bør ikke finnes i prøven, og de bør dekke et stort område av periodesystemet. Dette er fordi det grunnstoffet som blir valgt som internstandard for analytten bør ligge i samme område når det gjelder atomvekt og første ioniseringsenergi, slik at det oppfører seg mest mulig likt analytten. Det kan også brukes isotopfortynning. Da tilsettes det en kjent mengde av analytt som ikke har samme isotopsammensetning som den naturlige. Isotopfortynning er immun mot matriksinterferenser, men er utsatt for kjemisk interferens.

I Agilent 8800 QQQ er det også mulig å gjøre en gassfortynning, da senkes mengden bæregass som føres inn i forstøveren, slik at prøven ikke blir en like fin aerosol. Mer av prøven vil da gå til avløpet på grunn av større dråper. Aerosolen fortynnes med gass etter forstøverkammeret, slik at mengden gass som blir ført inn i plasma blir lik. Dette fører til mindre totalt oppløst fast stoff og det gir mindre oksiddannelse og jevnere betingelser i plasma, som gir et mer robust plasma.

2.6 CV- AAS

Her suges prøven opp i en loop, den blir så ført inn sammen med reduksjonsmiddelet, tinn(II)klorid dihydrat. Kvikksølv blir da redusert til Hg(0) og tinn blir oksidert til tinn(IV). Kvikksølv blir så blåst ut av væskefasen av en bæregass, her argon og inn i en spektrofotometrisk celle der det blir målt hvor mye lys som blir absorbert ved 253,7nm. Lyskilden er en kvikksølvlampe så man får akkurat den ønskede bølgelengden. Reduksjonsfasen er like lang hver gang, så det trenger ikke å være en fullstendig reduksjon, så lenge man vet at kontakttiden med reduksjonsmiddelet er lik hver gang.

2.7 Metodevalidering

Metodevalideringen baserer seg på parametere som er beskrevet i Eurachem sin guide til metodevalidering (Eurachem, 1998). Parametrene som vurderes under valideringen av metoden er linearitet, deteksjons- og kvantifiseringsgrenser, nøyaktighet, spesifisitet, sensitivitet og presisjon. På grunn av begrenset tid og økonomi har arbeidet i denne oppgaven

blitt begrenset til validering av to metoder, en med dekomponerte løsninger og en med basisk fortynning.

2.7.1 Linearitet

Det er viktig å sjekke at kalibrering er lineær i måleområdet, da det vanligvis bare benyttes et punkts kalibrering. Dette gjøres ved at det legges inn en seks punkts kalibrering i metoden, i stede for en et punkts. Da får man ut en regresjons linje og en regresjons koeffisient. Denne vil vise at man har et lineært måleområde, eller at man eventuelt ikke har det.

2.7.2 Deteksjonsgrenser, (LD) og kvantifiseringsgrenser, (LQ)

Deteksjonsgrensene og kvantifiseringsgrensene til den enkelte analytt bestemmes ut i fra standardavviket til blankprøvene. Blankprøvene har fulgt prosessen fra prøveprepareringen, det var ikke tilgjengelig blankprøver som har fulgt hele prosessen. Det analyseres 6 blankprøver som da benyttes til å finne deteksjons- og kvantifiseringsgrense.

Deteksjonsgrense bestemmes med formel 13

$$(13) \quad LD = 3 * \text{Standardavviket til blankprøvene}$$

Kvantifiseringsgrensene bestemmes med formel 14

$$(14) \quad LQ = 10 * \text{Standardavviket til blankprøvene}$$

2.7.3 Presisjon

Presisjonen er hvor likt resultatet blir hvis man måler flere paralleller av samme prøve. Dette oppgis som standardavviket til parallellene eller som et relativt standardavvik. Det relative standardavviket er standardavviket til parallellene delt på den gjennomsnittlige målte verdien til prøveparallellene. Dette er presisjonen i en analyse, det bestemmes også en intermediær presisjon, det vil si at prøvene måles over flere dager, og man ser på de samme parametrene. Dette viser om prøvene endres ved lagring.

2.7.4 Nøyaktighet

Nøyaktighet er hvor nærme man er den sanne verdien, det vil si hvor langt unna er analyseresultatet den verdien som faktisk finnes i prøven. Nøyaktigheten i metoden

bestemmes ved analyse av et sertifisert referansemateriale hvor man vet det sertifisert område for hver analytt. Det sertifiserte området er oppgitt i sertifikatet til det enkelte referansemateriale. Det er viktig å velge et referansemateriale som er lik den matriksen man jobber med.

Det kan også gjøres spiking forsøk, det vil si at prøvene tilsettes en kjent mengde av analytten, og etter analyse beregner man hvor mye av spiken man finner igjen med formel 15 (Eurachem 1998)

$$(15) \quad \text{Funnet \%} = [(C_1 - C_2) / C_3] * 100$$

Der C_1 er konsentrasjonen målt i spiket prøve. C_2 er konsentrasjonen målt i uspiket prøve. C_3 tilsatt mengde spike

Man bør finne igjen mellom 90 og 110 prosent for at det skal være ok. Dette kan ikke brukes som eneste mål på nøyaktighet, da det bare er tilsetning av ioner i løsning, i prøven kan de aktuelle grunnstoffene være bundet på til et organisk molekyl eller ha andre oksidasjonstrinn og da oppføre seg annerledes. Så den sier bare at for ionene er metoden god eller dårlig.

3. Metode

3.1 Instrumentelt

Analysene ble utført på en 8800 qqq ICP-MS fra Agilent Technologies, med en ASX- 520 prøveveksler og Agilent Technologies "integrated sample introduction system", (ISIS). De instrumentelle parametrene som ble brukt i oppgaven er vist i tabell 3-1. I tabell 3-2 er utstyret som brukes på ICP-MS beskrevet. Tabell 3- 3 oppgir tiden som er lagt inn i software for de forskjellige opprasjonene i metoden. Det ble også benyttet en CV- AAS for å sammenligne kvikksølvresultatene. Instrumentet var en Perkin Elmer FIMS 400 utstyrt med en Perkin Elmer AS 90 prøveveksler.

Tabell 3-1: Instrumentelle parametere på 8800 qqq ICP-MS fra Agilent Technologies.

		Enhet	He kollisjonsmodus	O ₂ reaksjonsmodus
Cellebetingelser	Celle gass		He	O ₂
	Hastighet på cellegass	ml/min	4,8	30%
	Octopole bias	V	-22	-4,0
	KED	V	5	-7,0
	Celle utgang	V	-70	-70
	Deflektor	V	-7,2	4,2
	Plate	V	-60	-60
Plasmabetingelser	RF kraft	W	1550	
	Sampling depth	mm	10	
	Forstøvergass	L/min	1,07	
	Fortynningsgass		0	
Tuning av ionelinser	Ekstraksjon 1	V	0	
	Ekstraksjon 2		-200	
Spraykammer	Temperatur	°C	2	

Tabell 3-2: Spesifikasjon av utstyret som er brukt på ICP-MS.

Utstyr/ deler	Type
Forstøver	Konsentrisk, kvarts
Spraykammer	Scott double pass, kvarts
Injektor	Kvarts
Torch	Kvarts
Koner	Nikkel
Slanger	Teflon
Loop	178 cm

Tabell 3-3: Software innstillinger på ICP-MS.

Operasjon	Tid	
Innsuging av prøve	15 sekunder	
Stabiliseringstid	20 sekunder	
Vask mellom prøver	Surt	70 sekunder- pga Hg minneeffekt
	Basisk	25 sekunder
Stabiliseringstid reaksjonsgass, O ₂	15 sekunder	
Stabiliseringstid kollisjonsgass, He	0 sekunder, pga første gassmodus, er automatisk lagt inn 35 sekunder stabilisering	

Utstyr som ble brukt til opparbeiding av prøver og standarder er vist i tabell 3- 4. Det gjelder både prøver opparbeidet i syre og base.

Tabell 3- 4 Instrumenter og utstyr benyttet til dekomponering og opparbeiding av prøver.

Instrument/utstyr	Modell	Leverandør
Mikrobølgedekomponering	Ultra Clave	Milestone
Teflonrør	20 ml TFM	Milestone
Ultralydbad	Artikkel nr. 19- 1542	Biltema
Analysevekt	Analytic AC210S	Sartorius
Toppvekt	LC3201D	Sartorius
Automatisk pipette	30µl- 300µl	BIOHIT
Automatisk pipette	50µl- 1000µl	BIOHIT
Automatisk pipette	100µl- 5000µl	BIOHIT
Syre destilator	Sub PUR Subboiling distillation system	Milestone
Sentrifugerør	Rød kork 15ml, Polypropylen	Sarstedt
Sentrifugerør	Hvit kork 50ml, Polypropylen	Sarstedt

3.2 Reagenser, gasser og standarder

Kvaliteten og leverandør av reagenser og gasser benyttet i oppgaven er oppsummert i tabell 3- 5.

Tabell 3-5: Oppsummering av reagenser og gasser brukt i oppgaven.

Reagens	Kvalitet	Leverandør
Salpetersyre, HNO ₃ ¹	Sub boiled ultrapure, 65 wt%	Institutt for miljøvitenskap, Norges miljø- og biovitenskaplige institutt
Salpetersyre, HNO ₃	Pro analyse 65 wt%	Merck
Saltsyre, HCl ¹	Sub boiled ultrapure, 37 wt%	Institutt for miljøvitenskap, Norges miljø- og biovitenskaplige institutt
Saltsyre, HCl	Pro analyse 37 wt%	Merck
Ammoniakk, NH ₃	Pro Analyse, 25 wt%	Merck
SyreEDTA, H ₄ EDTA	ACS reagens, 99,4-100,6%	Sigma- Aldrich Co. LLC, USA
SyreEDTA, H ₄ EDTA	99.995% trace metals basis	Sigma- Aldrich Co. LLC, USA
Isopropan-2-ol	Analyse kvalitet	MERCK
Triton X- 100	Laboratorie kvalitet	Sigma- Aldrich Co. LLC, USA
Natriumhydroksid monohydrat, NaOH • H ₂ O	≥99.9995% (metals basis)	Sigma- Aldrich Co. LLC, USA
L- cysteine	Biokjemisk bruk	Merck
Argon, Ar	6.0	Yara
Tetrametylammoniumhydroksid, TMAH		Sigma- Aldrich Co. LLC, USA
Oksygen, O ₂	5.0	AGA
Helium, He	6.0	AGA
Nitrogen, N ₂	2.0	AGA
Svovelsyre, H ₂ SO ₄	Analyse	Merck
Hydrogenperoksid, H ₂ O ₂	Pro analyse	Merck
Milli-q vann, H ₂ O	18,3 Ω	Barnstead

1. Destillert fra pro analysisyrene fra Merk.

I denne oppgaven har alle standarder blitt laget fra enkeltstandarder på enten 1000 mg/l eller 10 000 mg/l, konsentrasjoner og leverandører er oppsummert i tabell 3-6. I tabell 3-7 er det en oppsummering av grunnstoffene som ble benyttet som internstandarder.

Tabell 3-6: En oppsummering av standarder, der det er angitt konsentrasjoner i stamløsning, mellomstandarder og ferdige standardløsninger. Det er også oppgitt leverandører.

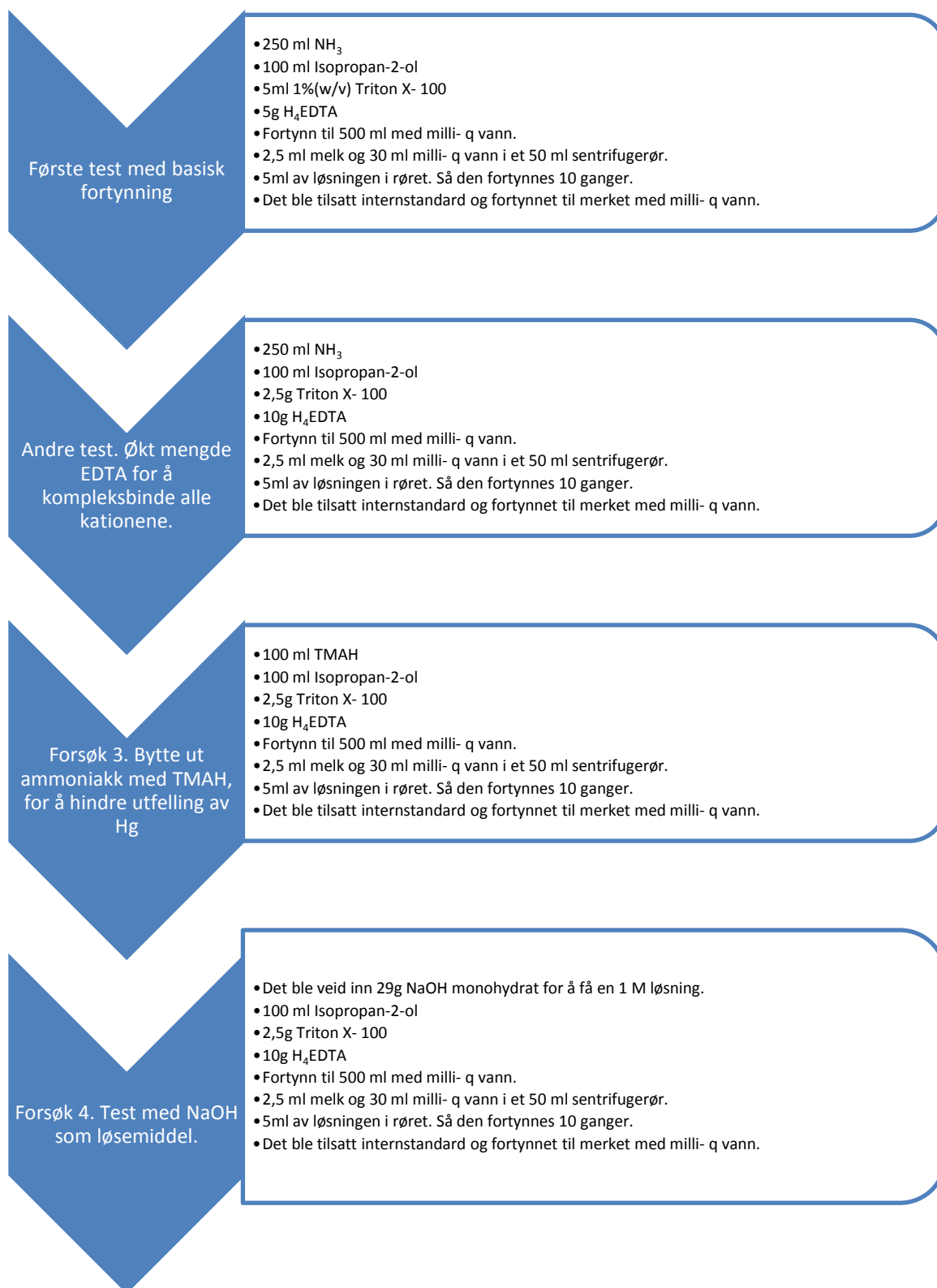
Grunnstoff	Konsentrasjon stamstandard, mg/l	Konsentrasjon mellomstandard, mg/l	Konsentrasjon i løsninger brukt i analyse, mg/l	Leverandør
Kalsium, Ca	10 000	-	100	Inorganic Venture
Natrium, Na	1000	-	25	Inorganic Venture
Kalium, K	10 000	-	100	Inorganic Venture
Magnesium, Mg	1000	-	10	Inorganic Venture
Fosfor, P	1000	-	50	Inorganic Venture
Jod, I	1000	5	0,050	Inorganic Venture
Mangan, Mn	1000	2	0,020	VWR
Jern, Fe	1000	30	0,30	Spektapure Standards
Kobber, Cu	1000	5	0,050	Spektrascan
Sink, Zn	1000	25	0,25	VWR
Selen, Se	1000	2	0,020	Spektrascan
Kadmium, Cd	1000	2	0,020	Spektrascan
Kvikksølv, Hg	1000	10 og 0,20	0,005	Inorganic Venture
Bly, Pb	1000	2	0,020	Spektapure Standards

Tabell 3-7: En oppsummering av internstandarder, der det er angitt konsentrasjoner i stamløsning, mellomstandarder og ferdige standardløsninger. Det er også oppgitt leverandører.

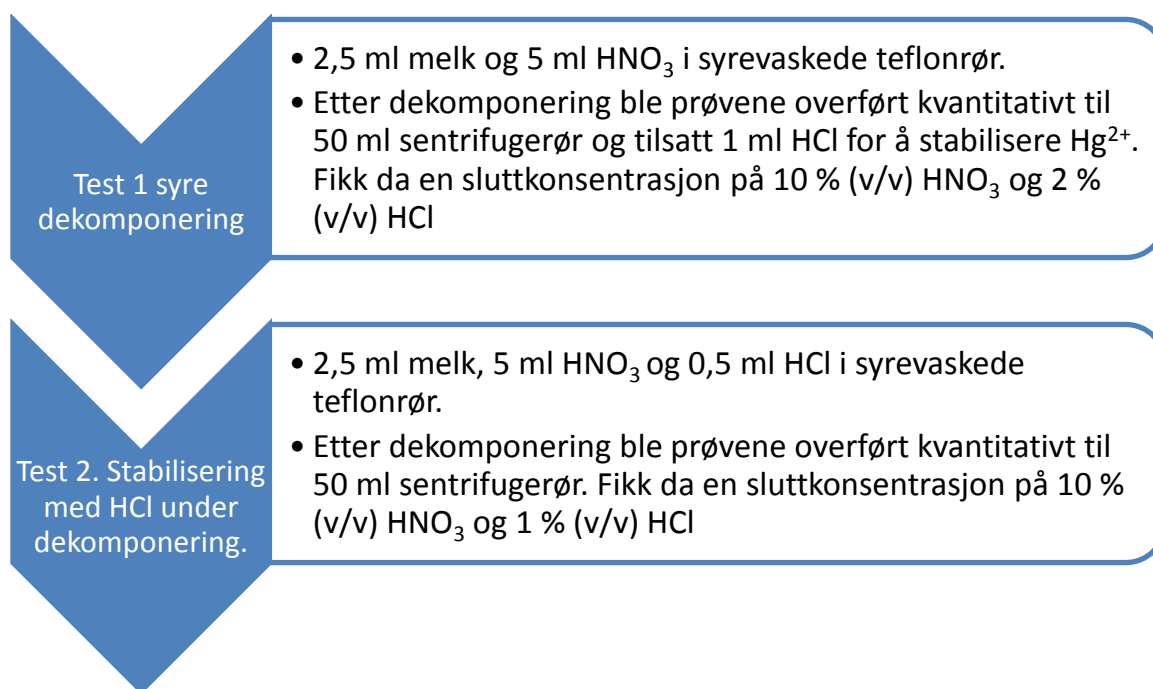
Internstandarder	Konsentrasjon stamstandard, mg/l	Konsentrasjon mellomstandard, mg/l	Konsentrasjon i løsninger brukt i analyse, mg/l	Leverandør
Scandium, Sc	1000	2,0	0,020	Spektapure Standards
Germanium, Ge	1000	2,0	0,020	Spektrascan
Rhodium, Rh	1000	2,0	0,020	Spektrascan
Indium, In	10 000	2,0	0,020	Spektrascan
Gull, Au	1000	2,0	0,020	Spektrascan
Thallium, Tl	1000	2,0	0,020	Spektrascan
Jod, ¹²⁹ I	1	0,10	0,0010	

3.3 Metodeutvikling

Flytskjema viser hvordan metodene har blitt endret for å prøve å optimalisere forholdene. Figur 7 viser hva som ble prøvd i utviklingen av en basisk metode, mens figur 8 viser hva som ble prøvd ut ved dekomponering.



Figur 7. De forskjellige stegene som har blitt testet i utviklingen av en metode til basisk fortynning.



Figur 8. De to stegene som var en del av utviklingen av en metode for dekomponering.

3.4 Prosedyre

3.4.1 Tillaging av basisk reagens

Den basiske reagensen brukt i denne oppgaven ble laget i en 0,5 l plastikkflaske. Flasken ble syrevasket i to dager med 30% (v/v) p.a. HNO₃, dette blir gjort for å frigjøre eventuelle grunnstoff som kan være adsorbent til beholderen. Disse vil da frigjøres ved såkalt hydratisering. Flasken ble etter to dager skyllet godt med ionebyttet vann, den ble ikke skylt med base før bruk da løsningen som ble lagd inneholder 50% (v/v) NH₃.

Løsningen ble laget ved at det ble veid inn 10 g H₄EDTA i et 50 ml sentrifugerør. Røret ble brukt for å forhindre kontaminering av EDTA. Det ble så målt opp 250 ml NH₃ som ble overført til 500 ml flasken. EDTA ble så tilsatt i flasken, dette fordi syre EDTA ikke løses i særlig grad i vann, men er lett løselig i base. Det ble så veid inn 2,5 g Triton X- 100. Dette ble så løst i 50 ml ionebyttet vann og overført til flasken. Det ble videre målt opp 100 ml isopropan-2-ol som ble overført til flasken. Flasken ble så fylt opp med ionebyttet vann til 500 ml. Dette gir en endelig konsentrasjon i løsningen på 50% (v/v) NH₃, 20% (v/v) isopropan-2-ol, 2% (w/v) H₄EDTA og 0,5% (w/v) Triton x- 100. Løsningen ble så tilsatt i prøvene, vask,

bæreløsning og standarder slik at den blir ti ganger fortynnet og får en slutt konsentrasjon på 5% (v/v) NH_3 , 2% (v/v) isopropan-2-ol, 0,2% (w/v) H_4EDTA og 0,05% (w/v) Triton x- 100.

3.4.2 Forberedelse av prøver med basisk fortynning

På grunn av det høye innholdet av fast stoff i melk 12,4% (Lawrence & Lawrence, 2010) ble det gjort en vurdering på at den må fortynnes 20 ganger. Dette vil minske matrikseffektene når prøvene analyseres, det vil også hindre at ICP-MSen tetter seg på grunn som beskrevet i teori kapittel 2.4 av for høy andel TDS. Det er viktig at prøven er varmet opp til 37°C og blandes godt, dette er for å sikre en homogen distribusjon av fett i prøven, da enkelte av grunnstoffene kan befinne seg i fettfraksjonen og melken er ikke homogenisert. Dette ville blitt gjort ved bruk av et ultralyd bad, med timer og temperatur innstillinger.

Bare 1 ml melk ble stilt til rådighet for analysen. Det ble derfor det bestemt at det vil være best å benytte 0,5 ml av prøven til basisk fortynning, slik at man fortsatt har tilgjengelig 0,5 ml hvis det skulle være nødvendig med 2 prøveprepareringer. Det ble da pipetert ut 0,5 ml melk med en autopipette 500µl- 5000µl. Grunnen til at denne pipetten ble brukt var at det skulle minimere mengden melk som hang igjen i pipetten på grunn av den brede spissen. Prøven ble overført til et 15 ml rør fra Sarstedt. Det ble tilsatt ca 7 ml ionebyttet vann, 1 ml basisk reagens, 100µl av intern standard løsningen og 100µl av ^{129}I løsningen som intern standard. Det tilsettes vann før den basiske reagensen slik at man får en hvis fortynning av reagensen ved tilsetting. Dette reduserer faren for utfellinger, da tettheten av hydroksidionene blir mye lavere. Det ble så fortynnet til 10 ml merket og blandet godt.

3.4.3 Forberedelse av prøver til dekomponering

En syre dekomponering av melken vil oksidere bort det organiske materialet i prøven og man sitter igjen med en klar løsning, dette vil redusere den totale mengden tørrstoff i prøven betraktelig og da det benyttes subboiled ultra pure syrer så har man god kontroll på kontaminasjonen fra syrene.

Etter homogenisering ble det pipetert ut 0,5 ml melk med en autopipette 500µl- 5000µl over i et syrevasket teflonrør. Det ble så tilsatt 1 ml HNO_3 , 100µl HCl og 100µl internstandardløsning. Dette ble så satt inn i ultraclaven og dekomponert med en maks temperatur på 250°C, programmet er vist i vedlegg A. Prøvene ble etter dekomponering

overført kvantitativt til et 15 ml rør fra Sarstedt. Prøvene ble så fortynnet til 10ml og blandet godt, slik at de har en slutt konsentrasjon på 10% (v/v) HNO₃ og 1% (v/v) HCl.

3.4.4 Sertifisert referansemateriale

Det ble benyttet 2 sertifiserte referansematerialer, ERM[®] - BD150 og ERM[®] - BD151 (James et al. 2013). Disse referansematerialene er tørrmelk, laget fra skummetmelk. I både basisk og dekomponerte prøver ble det veid inn 0,25g nøyaktig. Det ble brukt en analysevekt, (Sartorius) og en alfa-emitter for å unngå statisk elektrisitet, da dette kan påvirke vekten. Det ble ikke brukt hansker under innveiging, dette er også for å redusere den statiske elektrisiteten.

Prøvene som skulle dekomponeres ble veid inn i teflonrør, det ble så tilsatt 2 ml ionebyttet vann. Dette er for å redusere reaksjonene mellom salpetersyre og melken. . Det ble videre tilsatt 5 ml HNO₃, 500µl HCl og 500µl internstandardløsning. Dekomponering, overføring av prøve og slutt konsentrasjon av syre er likt som i kapittel 3.3.3. Prøvene ble overført i et 50 ml rør fra Sarstedt og fortynnet til 50 ml med ionebyttet vann.

Ved basisk fortynning ble det veid inn i 50 ml rør fra Sarstedt. Det ble tilsatt ca 40 ml vann og så ble det tilsatt 5 ml basisk reagens, 500µl av intern standard løsningen og 500µl av ¹²⁹I løsningen som intern standard.

3.4.5 Reagenser til Analyse

Det trengs tre reagenser når det skal analyseres på ICP-MS, dette er vask, rens og bæreløsning. Disse må lages forskjellig avhengig av om man har en basisk eller syre dekomponerte prøve. De tre forskjellige løsningene for basisk og de tre for syre dekomponerte prøver er listet opp i tabell 3-8.

Tabell 3- 8. Tabellen gir en oversikt over rens, vask og bæreløsning som er brukt ved basiske analyser og analyser av syre dekomponerte prøver.

	Funksjon	Løsning	Konsentrasjoner, %(v/v)	IS
Basisk	Rens	NH ₃	3	-
	Vask	Basisk løsning	10	Ja
	Bæreløsning	Basisk løsning	10	-
Surt	Rens	HNO ₃	5	-
	Vask	HNO ₃ og HCl	10 og 10	Ja, men ikke ¹²⁹ I
	Bæreløsning	HNO ₃ og HCl	10 og 1	-

Rensen brukes til å vaske sonden på prøveveksleren som suger opp prøve på utsiden for å hindre kontaminering mellom prøvene, den blir også brukt til å vaske loop mellom hver prøve. Dette skjer ved at rensen suges opp av prøveveksleren etter at prøven er innført i plasma.

Vasken brukes til å vaske hele systemet, ikke bare loop som rensen gjør. Dette skjer ved at den blir tatt opp som en prøve i loop og innført i plasma og målt. Ved å gjøre dette får man også vasket området mellom loop og forstøver. Det vil også hjelpe til med å fjerne eventuelle rester av forrige prøve som henger igjen. Så det er lurt å vaske før blankprøver og etter standarder, fordi noen grunnstoff vil henge igjen i systemet. Kvikksølv er spesielt problematisk med tanke på overføring fra en prøve til den neste. Det er også tilsatt intern standard i vasken for å unngå inn og utvasking av intern standardene, da dette kan være negativt.

Bæreløsningen går hele tiden, den pumpes av en peristaltisk pumpe, den samme som pumper avløpet. Når det suges opp prøve og vaskes i loop, går bæreløsningen rett i forstøveren og plasma. Mens når, prøven er sugd opp og skal injiseres i plasma, vil ventilen flytte seg slik at bæreløsningen går igjennom loop, og dytter prøven. Dette sikrer at prøven beveger seg like raskt hver gang, og det vil minimere transporteffekter. Det fører også til at prøvene ikke kommer i kontakt med hverandre, når det går bæreløsning i mellom. Dette reduserer også vasketiden, fordi det kan vaskes mens det går bæreløsning utenom loop.

3.5 Kalddamp- atomabsorpsjon spektrofotometri, CV- AAS

Prøvene som ble analysert ved bruk av CV- AAS, ble dekomponert på samme måte som prøvene som skulle analyseres på ICP- MS. Dette ble gjort fordi verdiene på referansematerialet ikke stemte på kvikksølv. De to instrumentene benytter forskjellige måleprinsipp, så like resultater ved bruk av begge teknikkene, antyder god nøyaktighet, da interferensene ikke er de samme. Det ble brukt en fempunkts kalibrering.

3.6 Metodevalidering

3.6.1 Metodevalidering basiske prøver

Det ble forberedt 6 standarder som skulle brukes til å sjekke lineariteten. Det ble også forberedt 6 blankprøver som ble brukt til å bestemme LD og LQ som beskrevet i teorien. LQ ble også sammenlignet med tidligere publiserte verdier for å sjekke om sensitiviteten er god nok. Det blir også gjort en sjekk av om metoden dekker et stort nok område til å kunne måle de høyeste verdiene som er publisert. Presisjonen ble bestemt ved å analysere 6 parallelle melkeprøver. Nøyaktigheten og spesifisiteten ble bestemt med tre referansematerialer som var den nærmeste matriksen tilgjengelig med de ønskede analyttene. Det ble også utført spike forsøk med to spike nivåer.

3.6.2 Metodevalidering syre dekomponerte prøver

Alt ble gjort på samme måten som beskrevet for de basiske prøvene i 3.4.1, bortsett fra at det bare ble brukt to referansematerialer og kvikksølv hadde sin egen standard rekke på fem standarder. Ønsket ikke å gå for høyt med denne for å unngå lang utvasking. Det ble også bestemt en intermediær presisjon, det vil se de seks prøvene analyseres på tre forskjellige dager og så beregnes RSD% fra de 18 prøvene.

3.6.3 Usikkerhet

Usikkerheten ble beregnet som en utvidet usikkerhet av den intermediære presisjonen, det vil si at RSD ganges med en faktor $k = 2$. I de basiske prøvene ble det ikke bestemt intermediær presisjon så i de prøvene ble usikkerheten bestemt ved å gange samme faktor med RSD fra metodevalideringen.

3.5 Valg av analyse modus, isotop og intern standard

Isotoper som ble valgt for hvert grunnstoff er presentert i vedlegg E. Her er det også satt opp hvilket gassmodus de er analysert i og hvilken intern standard som er valgt for det enkelte grunnstoff. De vanligste interferensene er også kommentert, og hvordan de er korrigert.

4. Resultater og diskusjon

4.1 Metodeutvikling

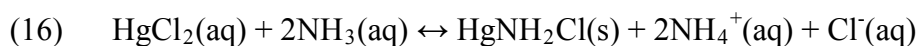
4.1.1 Utvikling av metode for basisk fortynning

Siden melk inneholder en del fett, med et snitt på rundt 3,8% (Lawrence & Lawrence 2011).

For å få en representativ prøve er det viktig å få løst fett. Morsmelk er ikke en homogen væske ved romtemperatur, den ble derfor homogenisert ved 37 °C før uttak fra beholder. Etter fortynning vil temperaturen etter hvert bli den samme som omgivelsene og da er det viktig at fett ikke skiller ut.

Det ble tatt utgangspunkt i en metode som var utviklet for analyse av blod (Wahlen et al. 2005). Da det ikke var kjent om mengden fett i melk og blod var lik ble det utført en visuell test der det ble tilsatt forskjellige mengder ammoniakk NH_3 for å se om det hang igjen fett på innsiden av sentrifugerøret. Ved tilsetning av mindre enn 5% tok det noe tid før alt fett hadde løst seg. Det ble derfor bestemt å benytte 5% da det ikke er ønskelig å ha melkeprøver stående over natten. Grunnen er at det dannes små klumper som flyter i overflaten og det er ikke sikkert at løsningen er homogen. Det viktig å ha en homogen løsning, da analysen er en total analyse og man ikke vet hvordan grunnstoffene fordeler seg i de forskjellige fraksjonene i melken. Steg 1 i figur 7 viser konsentrasjonene av resten av reagensene. I vedlegg I, tabell I- 1 ser man at verdiene som måles ikke stemmer overens med sertifisert område for Fe, Cl, P, Cu og I. Dette tyder på at det ikke er nok kompleksbinder i løsningen til å holde alle kationene i løsning (Gajek et al. 2013; McShane et al. 2008). Det ble også bestemt å øke mengden Triton 100- x da mengden lå godt under det som er publisert i litteraturen.

Den nye løsningen beskrevet i punkt to i metodeutviklingen så ut til å fungere godt på alle de ønskede grunnstoffene, utenom Hg. Den ble underestimert i både ERM- BD150 og BD151 (James et al. 2013). Utfelling av kvikksølv kan skje ved dannelse av flere tungt løselige komplekser. Utfelling av $\text{HgI}_2(\text{s})$ er en potensiell mulighet da konsentrasjonene av kvikksølv og jod er høye nok til å overstige løselighetsproduktet $K_{\text{sp}} = 2,9 \cdot 10^{-29}$ til HgI_2 , beregning vist i vedlegg G. Under produksjonen av referansematerialet ble melken tilsatt kvikksølv fra en standard som Hg^{2+} (James et al. 2013). Da det er høy konsentrasjon av Cl^- i løsningen er det naturlig å tenke seg at det blir dannet et $\text{HgCl}_x^{(2-x)}$ kompleks. Når det tilsettes ammoniakk til en løsning med kvikksølvklorid komplekser vil følgende reaksjon skje, se ligning 16:



Det ble gjort en test der det ble tilsatt Hg og Cl i tilsvarende konsentrasjon som finnes i referansematerialet med høye sertifiserte verdier. Analysen viste et lignende resultat, der det var en lav gjenfinning av Hg. Resultatet er vist i tabell I- 2 i vedlegg I. Funnene øker sannsynligheten for at det er denne reaksjonen som skjer da det ikke er jod i testløsningen. Utfellingen er ikke spesifikk for komplekser med Cl⁻, alle halogenene vil gi en tilsvarende utfelling. For å teste om det var den store mengden ammoniakk som ble tilsatt som var problemet ble det gjort en test der det ble tilsatt cirka 40 ml vann før tilsetning av reagens, mens i en annen prøve ble reagensen tilsatt rett i løst CRM. I en tredje prøve ble det tilsatt 40 ml vann og den stod i 2 timer før tilsetning av reagens. Resultatene er vist i tabell I- 2, og viser at det utgjør ingen forskjell når man tilsetter reagens, men som regel er det alltid lurt å tilsette en del vann før reagens.

Det ble derfor bestemt å prøve ut TMAH i konsentrasjonen som er vist i steg 3 i flytskjema, figur 7. I denne analysen var det jod som var utfordringen. Måling av standarden ga ikke konsekvente resultater, som vist i tabell I- 3 i vedlegg I. Utvaskingen etter analyse av standarden var også dårlig. Ved bruk av ammoniakkløsningen var ikke dette et problem. En økning av signalet ved måling av standarden og dårlig utvasking antyder at løsningen ikke er basisk. Dette ble sjekket med et pH- papir, og det viste at standarden hadde en pH på ~3. En så lav pH betyr at det er stor fare for dannelse av flyktig I₂ forbindelser i løsningen og mobilisering av jod fra tidligere prøver. Hvis dette skjer i spraykammeret vil det gi en økning av signalet og overestimering av analytten.

Molariteten til TMAH var ikke oppgitt, men den ble beregnet og molariteten til EDTA ble også beregnet da dette er en fire-protisk syre. Som beregnet i vedlegg G er molariteten til TMAH i prøver og standarder 0,029 mol/l. Siden alle standardene, bortsett fra jod er konservert med mellom 1- 5% syre, og det tilsettes flere ml av disse, så er ikke TMAH en sterk nok base til å holde løsningen basisk. På grunn av syrebidraget fra standardene var det ikke mulig å bestemme både I⁻ og kationer i samme løsning,. Det kunne ha blitt brukt høyere konsentrasjon av TMAH, men siden den etser glass vil den tære på prøveinnføringssystemet som er laget i kvarts. TMAH ble derfor forkastet som løsemiddel.

En siste test ble utført med natriumhydroksid, NaOH. Løsningen som ble lagd er vist i steg 4 i flytskjema, figur 7. Det ble beregnet hvor mye som måtte veies inn for å ha en sluttkonsentrasjon på 0,1 mol/l i prøvene. Beregningene er vist i vedlegg B. Beregningene av kompleksbindingsegenskapene til EDTA viser at de er best i denne løsningen. Problemet er at

det er ingen andre svakere kompleksbindere i løsningen som holder kationene i løsning, fram til EDTA rekker å kompleksbinde dem. Analyseresultatene av referansematerialet med de høye konsentrasjonene av kationer ligger lavt, noe som indikerer at løsningen ikke klarer å kompleksbinde kationer i øvre del av måleområdet. Analyse med NaOH fører også til at instrumentet forurenses med Na, og det må vaskes etter analysen, før bytte til andre analyser hvor natrium skal bestemmes.

Det ble også gjort en siste modifikasjon på løsningen som ble brukt i steg 2 i figur 7, denne ble tilsatt 0,2% (w/v) L-cysteine, slik at det ble en konsentrasjon på 0,02% (w/v) i prøvene. Grunnen til at det ble tilsatt L-cysteine er for å prøve å holde kvikksølv i løsning. Kvikksølv er en myk Lewis syre, det vil si et stort molekyl, og det har da stor affinitet til ligander som er myke Lewis baser. Svovelmolekylet er en myk Lewis base, så svovel-ligander er gode kompleksbindere for kvikksølv (McShane et al. 2008). L-cysteine har et svovelmolekyl som kan kompleksbinde kvikksølv. Resultatene fra testen viser at det ikke skjer i denne løsningen, så det er ikke mulighet å få noe mål på nøyaktighet for kvikksølv i den basiske løsningen, så den kan ikke valideres for kvikksølv. Resultatene er vist i tabell I- 5 i vedlegg I.

4.1.2 Utvikling av metode for dekomponering med HNO₃ og HCl

I første runde med dekomponering ble det tilsatt 2% (v/v) HCl etter dekomponering for å stabilisere kvikksølv som et kloridkompleks. Resultatene fra prøvene viser at det er god overensstemmelse mellom sertifiserte områder og målte verdier. Det er viktig å tilsette HCl med en gang etter dekomponering slik at prøvene ikke blir stående og kvikksølv blir redusert eller absorbert til plasten. Det ble derfor bestemt å tilsette 1 % (v/v) HCl før dekomponering slik at kvikksølv blir kompleksbundet allerede under dekomponering. Dette er også den anbefalte mengden å tilsette for kvikksølvanalyser hos Agilent Technologies (Hussain et al. 2011).

Når prøvene ble dekomponert i syre er det ikke mulig å måle jod på grunn av oksidering av I⁻ til I₂ som er flyktig. Jern er også vanskelig å få målt da det LD og LQ blir veldig høye, dette kommer av tilfeldige feil, der prøvene har blitt kontaminert. Syrene ble sjekket og de hadde lav bakgrunn på jern. Det var ikke samme problemet i de basiske prøvene. Da er det mest sannsynlig kontaminering fra teflonrørene det dekomponeres i eller fra reaktoren inne i selve UltraClaven.

Basert på disse resultatene ble det bestemt at kvikksølv skal bestemmes i syredekomponerte prøver, og de resterende analyttene bestemmes ved basisk fortynning. Grunnen til basisk fortynning velges er selve prosedyren, det er et steg mindre og dette minsker risikoen for kontaminering. Det er veldig lite som skal til for å kontaminere prøvene når det jobbes med så lave konsentrasjoner.

Melk er en væske så det vil derfor være naturlig å rapportere resultatene i vekt/volum konsentrasjon. Utfordringen her var å være sikker på at det ble pipettert ut like mye hver gang. De 36 prøvene som ble pipettert ut til metodevalideringen med basisk reagens ble veid. Volumet som ble pipettert ut var 500µl og gjennomsnittlig vekt var 0,534g med et standardavvik på 0,0037 og et relativt standardavvik på 0,69%. Et relativt standardavvik på under 1% viser at det er lite variasjon i vektene og det er greit å anta at det pipetteres ut like mye hver gang. Det er derimot viktig å huske å kondisjonere pipettespissen, det vil si å suge opp prøve i pipetten et par ganger før det overføres. Dette reduserer usikkerheten i overføringen av melken.

4.1.3 Test av nøyaktighet og spesifisitet av dekomponeringen med CV- AAS

Det ble også utført en sammenlignende bestemmelse av kvikksølvverdiene i referansematerialet og gjenfinning av spike i noen helmelkprøver ved bruk av CV-AAS i syredekomponerte prøver. Det ble også målt kvikksølv i noen prøver av helmelk. Grunnen til denne målingen var problemer med kvikksølvanalysene på ICP- MS, da det var stor drift i analysen og det kunne se ut som om kvikksølvkonsentrasjonen i referansematerialet ble underestimert. Resultater fra dette forsøket er vist i tabell F-2 og F-1 i vedlegg F. I melkeprøvene ble resultatene under deteksjonsgrensene. LD og LQ er oppgitt i tabell F- 3 i vedlegg F. Alle de spikede prøvene hadde gjenfinning på mellom $100 \pm 10\%$. Målte verdier i referansematerialet stemte godt overens med sertifisert område. Ved å bruke en metode som bygger på et annet måleprinsipp får man en god indikasjon på nøyaktigheten i metoden og at man ikke har noen interferenser. Hvis to metoder med forskjellig måleprinsipp gir samme og riktig verdi etter prøvepreparering, så øker dette sannsynligheten for at man måler den sanne verdien og ikke interferenser. Det er derfor lurt å benytte to forskjellige teknikker da de ofte ikke har samme interferenser.

4.2 Resultater fra metode valideringen

Det har blitt utført en validering av metoden i både basisk løsning og i syredekomponerte prøver, der alle parameterne i valideringsplanen er bestemt og de resultatene så har blitt sammenlignet. Ut i fra disse parameterne har den beste metoden blitt valgt.

4.2.1 Linearitet i målområdet

For å undersøke lineariteten ble det laget en standardrekke med 6 nivåer i tillegg til kalibreringsblank. Konsentrasjonene i de enkelte nivåene er vist i vedlegg C. Standardene ble lagt inn som kalibreringspunkter og analysert. Instrumentet gir da en regresjonslinje og en regresjonskoeffisient for hvert enkelt grunnstoff. Disse er vist i tabell 4- 1 og 4- 2. Tabell 4- 1 er alle grunnstoffene i dekomponert løsning og tabell 4- 2 viser alle grunnstoffene i basisk løsning.

Tabell 4- 1 En oppsummering av det enkelte grunnstoffs regresjonslinje og regresjonskoeffisient ved en sekspunktskalibrering for analyse av dekomponerte prøver.

Grunnstoff	Regresjonslinje, $y = ax+b$	Regresjonskoeffisient, R^2
Mg	$16.6279x + 0.0145$	0.9997
P	$0.2804x + 0.0022$	0.9999
Ca	$0.4423x + 0.0013$	0.9998
Mn	$0.1516x + 8.2686 \cdot 10^{-4}$	0.9997
Fe	$0.2492x + 0.1022$	0.9993
Cu	$0.3535x + 0.0999$	0.9998
Zn	$0.0835x + 0.0137$	0.9998
Se	$0.000899x + 1.4434 \cdot 10^{-5}$	0.9999
Cd	$0.0100x + 1.942 \cdot 10^{-5}$	1.000
Hg	$0.0111x + 6.8077 \cdot 10^{-5}$	1.000
Pb	$0.0633x + 6.676 \cdot 10^{-4}$	0.9999

Tabell 4- 2 En oppsummering av det enkelte grunnstoffs regresjonslinje og regresjonskoeffisient ved en sekspunktskalibrering for analyse av basiske prøver.

Grunnstoff	Regresjonslinje, $y = ax+b$	Regresjonskoeffisient, R^2
Mg	$21.2187x + 0.0174$	0.9996
P	$0.8754x + 0.0520$	0.9998
Ca	$0.2899x + 0.0056$	0.9998
Mn	$0.1911x + 0.0070$	0.9999
Fe	$0.3100x + 0.1190$	0.9998
Cu	$0.3944x + 0.0549$	0.9998
Zn	$0.1102x + 0.0538$	0.9998
Se	$0.0034x + 7.1296 \cdot 10^{-6}$	0.9998
Cd	$0.0110x + 8.8151 \cdot 10^{-6}$	0.9998
I	$1.4909x + 1.0054$	0.9998
Pb	$0.0658x + 0.0045$	0.9998

Fra tabell 4-1 og 4- 2 kan man se at det er en lineær respons innenfor det validerte området.

Alle grunnstoffene, bortsett fra jern i sur løsning har en regresjonskoeffisient, R^2 på over 0,9995. Ut i fra resultatene kan man si at responsen er lineær i arbeidsområdet.

Arbeidsområdet er fra kvantifiseringsgrensene og opp til konsentrasjonen i høyeste målte standard som er vist i tabell 1 vedlegg C. Måleområdet til metoden er fra kvantifiseringsgrensen og opp til 20 ganger høyere konsentrasjon enn den høyeste standarden målt under kalibreringen. Grunnen til dette er at prøvene fortynnes 20 ganger og da kan det validerte arbeidsområdet til metoden utvides til 20 ganger den høyeste standarden. Analytten kan detekteres under kvantifiseringsgrensen og ned til deteksjonsgrensen, men den kan ikke kvantifiseres.

4.2.2 Deteksjonsgrenser og kvantifiseringsgrenser

Det ble bestemt et sett med deteksjons- og kvantifiseringsgrenser for de syre dekomponerte prøvene som er vist i tabell 4- 4 og et sett med deteksjons- og kvantifiseringsgrenser for de basiske prøvene som er vist i tabell 4- 3. Deteksjons- og kvantifiseringsgrensene er bestemt ved analyse av 6 blankprøver som har fulgt prosessen fra prøveprepareringen. Dette er deteksjonsgrensene på dagen for metodevalideringen. Ved en faktisk analyse må det inkluderes nye blank prøver. Grunnen er at kontamineringen av blankprøvene er forskjellig hver gang, og man kan også ha tilfeldige feil som påvirker deteksjonsgrensene. Dixon`s Q test for uteliggere kan benyttes for å kontrollere verdier som avviker fra det som ser normalt ut. Testen er brukt for å sjekke uteliggere i denne oppgaven. Den er vist i vedlegg H.

Tabell 4- 3 Deteksjons- og kvantifiseringsgrenser oppnådd i de basiske prøvene under metodevalidering

Grunnstoff	Benevning	Deteksjonsgrense, LD	Kvantifiseringsgrense, LQ
Mg	mg/l	0,0091	0,030
P	mg/l	0,28	0,92
Ca	mg/l	0,19	0,62
Mn	µg/l	0,57	1,9
Fe	µg/l	1,1	3,7
Cu	µg/l	0,69	2,3
Zn	µg/l	2,1	7,1
Se	µg/l	0,10	0,34
Cd	µg/l	0,025	0,083
I	µg/l	0,32	1,1
Pb	µg/l	0,22	0,73

Tabell 4- 4 Deteksjons- og kvantifiseringsgrenser oppnådd i prøvene som ble syre dekomponert under metodevalidering

Grunnstoff	Benevning	Deteksjonsgrense, LD	Kvantifiseringsgrense, LQ
Mg	mg/l	0,012	0,065
P	mg/l	0,16	0,53
Ca	mg/l	0,13	0,44
Mn ²	µg/l	0,75	2,5
Fe	µg/l	180	58
Cu	µg/l	1,0	3,4
Zn	µg/l	2,0	6,7
Se	µg/l	0,55	1,8
Cd	µg/l	0,040	0,13
Hg ¹	µg/l	0,10	0,34
Pb	µg/l	0,28	0,93

1. Bestemt dag 2 av metodevalideringen, på grunn av minneeffekter dag 1.

2. Bestemt på bakgrunn av 5 blankprøver, da den ene verdien ble fjernet som uteligger med den Dixon Q test, vist i vedlegg H

LD og LQ ble lavest i basisk løsning for de fleste av grunnstoffene hvor det var viktig å bestemme lave konsentrasjoner i morsmelk. Prøvene som ble dekomponert ga lavest LD og LQ for Ca, P og Zn. Dette er grunnstoff det er relativt mye av i morsmelk, så lave kvantifiseringsgrense er ikke avgjørende for å kunne rapportere disse grunnstoffene. For kvikksølv er det bare LD og LQ i syredekomponerte prøver da, det ikke var mulig å validere kvikksølv i basisk løsning. Jod blir oksidert bort ved bruk av salpetersyre og er derfor bare bestemt i basiske prøver og har ikke LD og LQ i sur løsning.

Tabell 4- 5 En oversikt over området metoden er validert for og hvordan det validerte området presterer i sammenligning med verdier for morsmelk målt i Sverige. Grønt er bra, gult er i grenseland og rødt er dårlig.

Grunnstoff	LQ, µg/l	Øvre grense måleområde, µg/l	Laveste målte verdi ² , µg/l	Gjennomsnitt ² , µg/l	Øverste målte verdi ² , µg/l
Mg	0,030*10 ³	240*10 ³	21*10 ³	28*10 ³	43*10 ³
P	0,92*10 ³	1200*10 ³	126*10 ³	172*10 ³	233*10 ³
Ca	0,62*10 ³	2400*10 ³	196*10 ³	305*10 ³	416*10 ³
Mn	1,9	480	0,79	3	8,4
Fe	3,7	7200	135	339	794
Cu	2,3	1200	327	471	670
Zn	7,1	6000	1238	3471	5710
Se	0,34	480	8,8	13	18
Cd	0,08	480	0,028	0,086	0,27
I	1,1	600			
Hg	0,34	100	0,06	0,29 ¹	2,1
Pb	0,73	480	0,74	1,5	6,4

¹ Median og ikke gjennomsnitt. ² Verdier fra (Bjorklund et al. 2012). ³ Verdier fra (Bjornberg et al. 2005).

Tabell 4- 5 viser en sammenligning mellom validert måleområde for den basiske metoden og verdier rapportert for morsmelk i Sverige. Det er gjort en sammenligning av målte verdier av kvikksølv i Sverige bestemt med CV- AAS og det måleområdet kvikksølv er validert for i denne metoden. Det er oppgitt laveste målte verdi, høyeste målte verdi og gjennomsnittet. Ingen av de målte verdiene i Sverige overstiger øverste grense for validert område for metoden. Det vil si at de øvre grensene for metoden er gode nok til å dekke tidligere publiserte verdier. Hvis man ser på den laveste verdien så er det ikke god nok følsomhet for Mn, Cd, Hg og Pb. Bly ligger i grenseland, men regner man med usikkerheten i metoden er det ikke mulig å si at den er over LQ. For de resterende grunnstoffene er det tilfredsstillende følsomhet og alle verdiene kunne blitt rapportert. Kvikksølv har heller ikke god nok følsomhet til å kunne rapportere medianen oppgitt i Sverige. Gjennomsnittlig kadmium verdi er også i grenseland til å kunne rapporteres. Det betyr at for kvikksølv og kadmium er det ikke

god nok følsomhet til å kunne kvantifisere verdier som tidligere har blitt publisert. Bruker man gjennomsnittlig målt verdi som utgangspunkt presterer metoden bra for de resterende grunnstoffene, men det er ønskelig å forbedre LQ for bly og mangan, da det laveste målte verdiene er under LQ.

4.2.3 Nøyaktighet i metoden

Resultatene fra analyser av referansemateriale er vist i vedlegg D og tabell 4- 6. Her er verdiene markert med grønt hvis de er innenfor det sertifiserte området og rødt hvis det ikke er innenfor det sertifiserte området. Hvis verdiene er under kvantifiseringsgrensen så er de markert med gult. Hvis det ikke er noen farge på resultatet så er verdien ikke sertifisert.

I de basiske prøvene er alle parallellene innenfor det sertifiserte området for ERM- BD150 og 151. Dette vil si at metoden har god nøyaktighet. Det ble også beregnet bias for hvert grunnstoff. Bias ble beregnet ved å trekke den gjennomsnittlige målte verdien fra den sertifiserte verdien. Denne verdien ble så delt på den sertifiserte verdien og ganget med 100 for å finne prosent avvik fra sertifisert verdien. Bias er en kvantifisering av hvor langt man er fra den sanne verdien. I ERM- BD150 og 151 var det lav bias, dette er oppgitt i tabell 4- 6, bortsett fra samme trend som i de andre resultatene. Det er noe høyere bias ved lave konsentrasjoner. Det ble også inkludert et nytt referansemateriale ved analyse av de basiske prøvene, NIST 1549a. De målte verdiene for NIST 1549a stemte godt overens med de sertifiserte verdiene for alle grunnstoffene bortsett fra P, Ca og Cu, resultatene er oppsummert i tabell D- 1 i vedlegg D. Grunnen til feil kan være at ved innveining var ikke sertifikatet tilgjengelig, så referansematerialet ble ikke blandet før åpning slik som det står beskrevet i sertifikatet. Dette kan føre til at materialet ikke er homogent for alle grunnstoff (Gonzalez & Watters 2013). På grunn av lite tid var det ikke tid til å undersøke om resultatene hadde blitt bedre ved å blande materiale før åpning.

Nøyaktigheten i den metoden der prøvene syredekkomponeres ble bestemt med ERM- BD150 og 151. NIST 1549a var ikke tilgjengelig på dette tidspunktet. I de syredekkomponerte prøvene var det større variasjon i målte verdier. Der er det flere enkeltmålinger som ligger rett utenfor den sertifiserte verdien dag en. Dag to og tre av metodevalidering var dette bedre, den andre dagen var det bare to kalsiumverdier som var utenfor og dag tre var det ingen verdier som var utenfor det sertifiserte området, resultatene er i tabell D- 2 til D- 4 vedlegg D. Jern i ERM- BD150 er under kvantifiseringsgrensen så den kan ikke rapporteres. Ved å finne bias på

samme måte som for de basiske prøvene ser man at det ikke er noen store avvik fra sertifisert verdi i gjennomsnittlig målt konsentrasjon i de syredekomponerte prøvene, resultatet vist i tabell 4- 6.

Tabell 4- 6. Tabellen viser gjennomsnittlig verdi, samt standardavvik (SD) og relativt standardavvik (RSD) målt i det enkelte referansemateriale dag 1 ved metodevalidering i både basiske og dekomponerte prøver. Det ble også beregnet en bias.

Dekomponerte prøver		Mg	P	Ca	Mn	Fe	Cu	Zn	Se	Cd	Hg	Pb
BD 150	Gjennomsnitt, mg/kg	1,29*10 ³	10,4*10 ³	13,5*10 ³	0,29	<LQ	1,05	45,2	0,20	0,01	0,057	0,019
	SD, mg/kg	0,015	0,089	0,50	0,0084		0,010	0,29	0,014	0	0,0022	0,0033
	RSD, %	1,2	0,86	3,7	2,9		0,95	0,65	7,1	0	3,8	17
	Bias, %	-2,1	5,1	2,9	0,35		2,8	-0,89	-6,4	12	5,3	0,00
BD 151	Gjennomsnitt, mg/kg	1,30*10 ³	10,5*10 ³	13,8*10 ³	0,29	53	5,09	45,5	0,19	0,1	0,53	0,21
	SD, mg/kg	0,027	0,19	1,1	0,017	1,5	0,084	0,68	0,011	0	0,0071	0,0055
	RSD, %	2,1	1,8	8,0	5,7	2,8	1,7	1,5	6,1	0	1,3	2,6
	Bias, %	-3,0	4,4	0,86	-1,4	0,75	-1,8	-1,2	2,1	5,7	-1,9	-3,38
Basiske prøver		Mg	P	Ca	Mn	Fe	Cu	Zn	Se	Cd	I	Pb
BD 150	Gjennomsnitt, mg/kg	1,2*10 ³	11*10 ³	13,3*10 ³	0,28	4,4	1,0	45,4	0,19	0,01	1,66	0,015
	SD, mg/kg	0,045	0,45	0,089	0,0045	0,11	0,045	0,43	0,0089	0	0,026	0
	RSD, %	3,7	4,1	0,67	1,6	2,6	4,4	0,94	4,6	0	1,6	0
	Bias, %	3,2	1,8	4,0	2,4	5,2	5,6	-1,4	-3,2	12	3,8	21
BD 151	Gjennomsnitt, mg/kg	1,3*10 ³	11*10 ³	13,8*10 ³	0,28	53	5,1	45,7	0,19	0,1	1,66	0,21
	SD, mg/kg	0,045	0	0,30	0,0089	0,84	0,045	0,43	0,0089	0	0,055	3,1E-17
	RSD, %	3,5	0	2,1	3,1	1,6	0,88	0,93	4,8	0	3,3	1,5E-14
	Bias, %	-1,6	0,0	0,43	2,1	-0,38	-1,6	-1,8	2,1	5,7	6,5	-1,4
1549a	Gjennomsnitt, mg/kg	0,93*10 ³	8,3*10 ³	9,49*10 ³	0,18	1,6	0,38	34,8	0,26		3,58	
	SD, mg/kg	0,010	0,058	0,10	0,0058	0,058	0,012	0,058	0,0058		0,049	
	RSD, %	1,1	0,70	1,1	3,3	3,5	3,0	0,17	2,2		1,4	
	Bias, %	-4,3	-8,8	-7,8	4,0	9,3	40	-2,9	-6,1		-7,1	

Tilsatt spike-nivå i basiske prøver er vist i tabell C- 2 og tilsatt spikenivå i dekomponerte prøver er vist i tabell C- 4, begge i vedlegg C.

I de basiske prøvene ble alle resultatene fra gjenfinning av spike innenfor $100\pm 10\%$, dette viser at løsningen stabiliserer grunnstoffene som er oppgitt i tabell C-3 i vedlegg C. Det er ikke kontrollert om jod holder seg stabilt, men denne er verifisert med 3 forskjellige referansematerialer. Det ble heller ikke utført spike-tester av makrogrunnstoffene.

I syreprøvene ble alle resultatene fra gjenfinning av spike innenfor $100\pm 10\%$, bortsett fra en av prøvene med jern. Grunnen til overestimering av spike-gjenfinningen skyldes trolig de tilfeldige feilene som oppstår på grunn av kontaminering. Resten av analyttene som ble spiket inn ligger innenfor det akseptable området og er derfor stabile i løsning. Resultatene er vist i tabell C- 5 vedlegg C.

Det er viktig å ikke konkludere på at metoden er god basert på spikede prøver. Et forsøk med tilsetning av spike sier lite eller ingen ting om hvordan analyttene i prøvematriksen oppfører seg, de kan være bundet til organiske molekyler eller låst i gitterstrukturer, det er derfor viktig å tenke på at spiket analytt kan oppføre seg annerledes enn det samme analytt gjør når den forekommer naturlig i prøven. Så det kan bare konkluderes med at løsningen kan stabilisere de tilsatte ionene.

4.2.4 Presisjon

Presisjonen til metoden har blitt bestemt ved å analysere seks paralleller av samme prøve. I de syredekomponerte prøvene ble prøvene målt 3 ganger for å bestemme intermediaær presisjon også. Den er presentert i tabell 4- 8. I de basiske prøvene er presisjonen bestemt på samme måte, men prøvene ble bare analysert en gang på grunn av lagringsproblemer. Resultatene fra testing av metodens presisjon er presentert i tabell 4- 7.

Tabell 4- 7. Resultater fra de tre dagene med metodevalidering av syredekomponerte prøver, og den ene dagen med basiske prøver. Det er oppgitt gjennomsnittlig målt verdi, standardavvik (SD) og relativt standardavvik (RSD) for de fire målingene.

Grunnstoff		Syre- dekomponering, dag 1	Syre- dekomponering, dag 2	Syre- dekomponering, dag 3	Basisk fortynning
Mg	Gjennomsnitt, mg/l	35,0	34,4	34,5	34
	SD, mg/l	0,62	0,32	0,71	1,0
	RSD, %	1,8	0,9	2,1	3,0
P	Gjennomsnitt, mg/l	143	148	147	153
	SD, mg/l	3,4	0,99	1,9	4,2
	RSD, %	2,3	0,7	1,3	2,7
Ca	Gjennomsnitt, mg/l	326	340	347	330
	SD, mg/l	7,8	17	7,0	5,7
	RSD, %	2,4	4,9	2,0	1,7
Mn	Gjennomsnitt, µg/l	5,3	5,0	5,1	4,6
	SD, µg/l	0,27	0,21	0,15	0,17
	RSD, %	5,0	4,1	3,0	3,7
Fe	Gjennomsnitt, µg/l	<580	<580	<580	177
	SD, µg/l				5,3
	RSD, %				3,0

Tabell 4- 7 fortsetter

Cu	Gjennomsnitt, µg/l	486	487	491	490
	SD, µg/l	8,1	6,7	7,5	12
	RSD, %	1,7	1,4	1,5	2,5
Zn	Gjennomsnitt, µg/l	1420	1420	1430	1440
	SD, µg/l	17	14	22	19
	RSD, %	1,2	1,0	1,6	1,3
Se	Gjennomsnitt, µg/l	9,5	9	9,3	10,0
	SD, µg/l	0,84	1,3	0,43	0,26
	RSD, %	8,8	16	4,6	2,6
Cd	Gjennomsnitt, µg/l	<0,1	<0,1	<0,1	<0,08
I	Gjennomsnitt, µg/l				82,7
	SD, µg/l				0,81
	RSD, %				0,98
Hg	Gjennomsnitt, µg/l	<0,34	<0,34	<0,34	
Pb	Gjennomsnitt, µg/l	2,0	2,0	2,0	1,46
	SD, µg/l	0,17	0,15	0,15	0,064
	RSD, %	8,3	7,7	7,7	4,4

Resultatene viser at det er god presisjon for de fleste grunnstoff og det er relativt standardavvik som ikke overskrider 5%. Det er derimot noen av grunnstoffene som viser et noe høyere relativt standardavvik. Det er grunnstoff som Se og Pb, som forekommer i veldig lave konsentrasjoner. Når grunnstoffene finnes i veldig lave konsentrasjoner vil det føre til en økt RSD. Grunnen til dette er at man får et dårligere analytt/støy forhold, det vil si at bakgrunnen i instrumentet vil være vanskeligere å skille fra analyttsignalet. Hvis analytten i tillegg til å ha en lav konsentrasjon, har en høy første ioniseringsenergi, slik at lite blir ionisert i plasma, som Se, øker dette problemet ytterligere. Det er også viktig å huske at prøvene er fortynnet 20 ganger, så det som detekteres av instrumentet er en konsentrasjon som ligger 20 ganger lavere enn den som er oppgitt i tabellen.

4.2.5 Intermediær presisjon

Det ble også bestemt en intermediær presisjon, det vil si presisjon for alle tre analysene av de syredekomponerte prøvene. Resultatene fra test av intermediær presisjon er vist i tabell 4- 6. Resultatene viser om det å analysere prøvene over flere dager vil endre konsentrasjonen, noe som vil vises i som høyere RSD verdier enn det som er tilfellet i analyse av prøvene den enkelte dag.

Tabell 4- 8. Her vises gjennomsnitt, standardavvik (SD) og relativt standardavvik (RSD) for syredekomponerte 6 prøver analysert 3 ulike dager, det vil si 18 måleresultater. Denne tabellen angir den intermediære presisjonen.

	Mg	P	Ca	Mn	Fe	Cu	Zn	Se	Cd	Hg	Pb
Gjennomsnitt, µg/l	34,6*10 ³	146*10 ³	340*10 ³	5,1	<580	488	1420	9,2	<0,1	<0,34	2,0
SD, µg/l	0,59*10 ³	2,9*10 ³	14*10 ³	0,23		7,4	18	0,97			0,15
RSD %	1,7	2,0	4,1	4,4		1,5	1,2	11			7,6

Den intermediære presisjonen er god for de undersøkte grunnstoffene. Den er høyere for de grunnstoffene det er lite av, som Se og Pb, grunnen til dette er de lave konsentrasjonene. Dette er forklart i kapittel 4.2.4 presisjon.

Det ble ikke gjort en test av intermediær presisjon i de basiske prøvene, da det ble dannet klumper i prøvene over natten, som fløt i overflaten. Prøvene må analyseres samme dag som de forberedes, det betyr at man ikke kan gjøre klar store prøveserier og analysere dem på en dag. For å kunne effektivisere prosessen er det mulig å overføre melken til rør og fryse dem. Hvis man da har en ferdig blanding med reagens og internstandard er det bare å tilsette 9,5 ml av denne løsningen. Melken må da ikke homogeniseres, da det er et problem som oppstår når man skal ta ut prøve. Her er det bare en fortynning med reagens. Dette er helt klart en begrensende faktor i mengden prøver som kan prepareres i løpet av en dag.

Metodens selektivitet sjekkes ved å analysere sertifiserte referansematerialer. Det er da viktig at referansematerialet og prøvene har likest mulig matriks. I denne oppgaven hadde det vært ønskelig å bruke helmelk, men det ble brukt skummet melk da dette var det nærmeste man kom som var sertifisert for ønskede grunnstoff. Hvis man treffer innenfor sertifisert område på referansematerialet, kan man være ganske sikker på at man ikke måler en interferens. Det kan også benyttes et annet måleprinsipp som det ble i denne oppgaven, der prøvene ble analysert på CV- AAS. Det var overensstemmelse mellom målte verdier i referansematerialet både ved bruk av ICP- MS og CV- AAS. Da kan man si at det er god spesifisitet for kvikksølv.

I selve analysen ble hvert grunnstoff analysert i det gass modus som egnet seg best ut ifra kjente interferenser. Det er med på å sikre at man faktisk måler analytten, og analyse av to isotoper der det er mulig viser også om det er en interferens tilstede i analysen. Tre av analyttene hadde bare en stabil isotop det kunne måles på og det var P, Mn og I.

En utfordring med den basiske metoden er om den stabiliserer alle forskjellige kjemiske specier av analyttene. Den metoden gjør det i referansematerialet, men det kan forekomme andre kjemiske specier i morsmelken, så det kan være lurt å sammenligne verdiene med noen få dekomponerte prøver for å se om man måler samme verdier. Dekomponerte prøver er ikke så utsatt for forskjellige kjemiske specier da det organiske oksideres bort og HNO_3 er en oksiderende syre som også vil oksidere grunnstoffene, slik at de foreligger som samme kjemiske specier.

4.3 Usikkerhet i metoden

Usikkerhetsbidragene vil være forskjellig for de to prøveprepareringene. Prøver som dekomponeres vil få et bidrag til usikkerhet fra dekomponeringen, siden det er økt sjans for kontaminering. De basiske prøvene har en utfordring med fortynningen da de ikke er klare, men dette skal kunne fanges opp av intern standarden. Den skal korrigere for feil fortynning. Metodens usikkerhet er bestemt ved å bruke utvidet usikkerhet. Det vil si gange RSD med en faktor $k = 2$. For de dekomponerte prøvene ble RSD fra den intermediære presisjonen bruk, mens i de basiske prøvene ble det ikke bestemt intermediær presisjon. Usikkerheten ble derfor bestemt ved bruk av RSD fra metodevalideringen og faktoren $k = 2$.

Tabell 4- 9. Utvidet usikkerhet for det enkelte grunnstoff i syredekomponerte prøver.

	Mg	P	Ca	Mn	Fe	Cu	Zn	Se	Cd	Hg	Pb
Usikkerhet i metoden ¹ , %	3,4	4,0	8,2	8,8		3,0	2,4	22			15

¹.Beregnet utvidet usikkerhet fra RSD i tabell 4.6. Det er brukt en faktor $k=2$

Tabell 4- 10. Utvidet usikkerhet for det enkelte grunnstoff i basiske prøver.

	Mg	P	Ca	Mn	Fe	Cu	Zn	Se	Cd	I	Pb
Usikkerhet i metoden ¹ , %	6,0	5,4	3,4	7,4	6,0	5,0	2,6	5,2		2,0	8,8

¹.Beregnet utvidet usikkerhet fra RSD i tabell 4.5. Det er brukt en faktor $k=2$

Begge metodene har en usikkerhet på under 10 % på de fleste grunnstoffene der det er mulig å bestemme usikkerheten. Det er to grunnstoff som skiller seg ut, det er Se og Pb i de dekomponerte prøvene med usikkerhet på henholdsvis 22 og 15 %. Dette kommer mest sannsynlig av de lave konsentrasjonene, som forklart i kapitlet om presisjon. Siden usikkerheten i de dekomponerte prøvene er bestemt på bakgrunn av 18 målinger og det bare er seks målinger av de basiske så må man forvente høyere usikkerhet, i det lave området. For et økt antall målinger øker ikke presisjonen, bare nøyaktigheten.

5 Konklusjon og forslag til videre arbeid

5.1 Konklusjon

Målet om en metode for alle 12 grunnstoff ble ikke oppnådd i denne oppgaven. Dette kommer i hovedsak av at det ikke er mulig å analysere jod i prøver som er dekomponert med HNO_3 . Det var ikke er mulig å få validert kvikksølv i basisk fortynning da målt verdi ikke ga tilfredsstillende nøyaktighet. Det vil derfor være nødvendig å benytte to metoder for å få bestemt alle grunnstoffene. Det vil være hensiktsmessig å analysere alle grunnstoffene bortsett fra kvikksølv, ved bruk av basisk fortynning. Grunnen er at denne metoden ikke har dekomponeringssteget, noe som reduserer faren for kontaminering av prøven. Sammenligner man LQ til jern i basisk og dekomponerte prøver ser man tydelig at det har skjedd tilfeldige feil i form av kontaminering av prøvene. Jern er ikke mulig å kvantifisere i de dekomponerte prøvene, mens det ikke er problematisk i de basiske prøvene. Tidsperspektivet kan være problematisk for de basiske prøvene, for de må analyseres samme dag som de forberedes. Det burde derfor brukes en ferdig fortynnet løsning med internstandard, som tilsettes prøven slik at man får et forhold mellom prøve og fortynning på 1+19. Dette løser også problemet med vanskelig fortynning på grunn av at prøven er hvit.

Dårlig følsomhet i metoden for kvikksølv og kadmium gjorde at disse grunnstoffene ikke var mulig å kvantifisere i morsmelk ved hverken basisk fortynning eller i dekomponerte prøver, kvantifiseringsgrensene var ikke tilstrekkelige lave. En sammenligning med publiserte verdier fra Sverige bygger opp under dette. Sensitiviteten for bly og mangan er også i grenseland i forhold til tidligere publiserte verdier. Den øvre grensen av det validerte måleområdet er ikke problematisk i forhold til tidligere publiserte verdier.

Metoden hadde god presisjon, selv ved overføring av små volum. Grunnstoffene med lave konsentrasjoner ga noe høyere RSD, men dette må forventes nær LQ. Metoden har også lineær respons innenfor det kalibrerte området.

Analyser av ERM- BD150 og 151 viste at metodene har tilfredsstillende nøyaktighet. Spiking av prøver i både basiske og dekomponerte prøver viste gjenfinning innenfor $100 \pm 10\%$ for alle prøvene, bortsett fra jern i en dekomponert prøve. Dette skyldes trolig de store tilfeldige feilene som forekommer for jern i dekomponerte prøver.

Metodens spesifisitet er sjekket med et sertifisert referansemateriale som har så god matrikstilpassning som mulig. Dette var god overensstemmelse mellom sertifisert verdi og målt verdi. Så da er det greit å si at det er god spesifisitet. Kvikksølv ble i tillegg bestemt ved

bruk av to måleprinsipp. Det var heller ingen ting i analysene som tydet på interferenser, da det var god overensstemmelse mellom de målte isotopene av samme grunnstoff.

Usikkerheten i metoden er estimert til <10% for alle grunnstoffene der det er mulig å estimere, bortsett fra Se og Pb i dekomponerte prøver. Som diskutert kommer dette trolig av de lave konsentrasjonene.

5.2 Videre arbeid

For å få metoden til å fungere bedre kan det være aktuelt å analysere Se, Cd, Hg og Pb i syredekomponerte prøver, men endre på fortynningen. Det hadde vært ønskelig å bare fortynne prøvene 5 ganger. Dette vil gi et mye bedre analytt/støy forhold i prøvene. Ulempen er mengden syre, det vil da være nødvendig med 20% (v/v) salpetersyre i sluttløsning, mens det er ønskelig å holde HCl konsentrasjonen på 1- 2% (v/v).

En annen metode som kunne egnet seg godt til en komplisert matriks som melk er isotopfortynning (ID). ID er regnet som en veldig pålitelig metode der man tilsetter en kjent konsentrasjon av analytten, med et annet og kjent isotopforhold. Denne metoden er fri for matriksinterferenser, for den oppfører seg helt likt som analytten. Den er derimot ikke uten kjemisk interferens. Den er også avhengig av at analytt og spike foreligger som samme specier, slik at de ikke oppfører seg forskjellig i matriksen.

Det anbefales også å teste den basiske fortynningen på noen reelle prøver for å se om kvikksølv lar seg måle, da må nøyaktigheten bestemmes med en sammenlignende laboratorieprøving, der prøvene sendes ut for analyse hos andre laboratorier. Kontroll mot analyse ved bruk av en teknikk som bygger på et annet måleprinsipp er også en mulighet, for eksempel CV-AAS. På denne måten hadde det vært mulig å kontrollere om det var den kjemiske formen til kvikksølv i referansematerialet som var problemet, eller om metoden ikke stabiliserer kvikksølv.

Det bør også gjennomføres et lagringsforsøk der det samles inn helt ferske prøver, som analyseres og så fryses ned. Disse kan så tines opp igjen med jevne mellomrom. Ved å gjøre et lagringsforsøk ser man om prøvene endres under frysing. Det er for eksempel mulig med en oppkonsentrering av analyttene når prøven varmes opp for å homogeniseres, ved at det fordamper vann. Det er også mulig at kvikksølv diffunderer gjennom plastikken og andre ioner adsorberes til beholderen prøven er lagret i.

6 Referanser

Adamo, F. & Alberto, B. (1999). Chemistry by microwaves. *Pure Appl. Chem.*, Vol. 71 (No. 4): pp. 573- 579.

Agilent Technologies. (2005). ICP-MS Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. 84.

Agilent Technologies. (2012). Agilent 8800 Triple Quadrupole ICP-MS. 12. Tilgjengelig fra: http://www.chem.agilent.com/Library/brochures/5991-0079EN_8800_ICPQQQ_Brochure.pdf.

BERGHOF Products + Instruments GmbH. Theory of Sample Preparation Using Acid Digestion, Pressure Digestion and Microwave Digestion (Microwave Decomposition). Tilgjengelig fra: http://www.berghof.com/fileadmin/Dateien-Einpflege/Seitenbaum/Home-Downloads/Produkte/Laborgeraete/Aufschlusstechnik/MW_Theorie_Probenvorbereitung_PT_en.pdf (lest 07.05.2014).

Bjorklund, K. L., Vahter, M., Palm, B., Grander, M., Lignell, S. & Berglund, M. (2012).

Metals and trace element concentrations in breast milk of first time healthy mothers: a biological monitoring study. *Environmental Health*, 11.

Bjornberg, K. A., Vahter, M., Berglund, B., Niklasson, B., Blennow, M. & Sandborgh-Englund, G. (2005). Transport of methylmercury and inorganic mercury to the fetus and breast-fed infant. *Environmental Health Perspectives*, 113 (10): 1381-1385.

Da Costa, S. L., Malm, O. & Dorea, J. G. (2005). Breast-milk mercury concentrations and amalgam surface in mothers from Brasilia, Brazil. *Biological Trace Element Research*, 106 (2): 145-151.

Drexler, H. & Schaller, K. H. (1998). The mercury concentration in breast milk resulting from amalgam fillings and dietary habits. *Environmental Research*, 77 (2): 124-129.

Eurachem. (1998). The Fitness for Purpose of Analytical Methods. 1: 75.

Folkehelseinstituttet. (2008). B.6.07 Metaller. Tilgjengelig fra: <http://www.fhi.no/artikler/?id=69495> (lest 08.05.2014).

Gajek, R., Barley, F. & She, J. W. (2013). Determination of essential and toxic metals in blood by ICP-MS with calibration in synthetic matrix. *Analytical Methods*, 5 (9): 2193-2202.

Garcia-Esquinas, E., Perez-Gomez, B., Fernandez, M. A., Perez-Meixeira, A. M., Gil, E., de Paz, C., Iriso, A., Sanz, J. C., Astray, J., Cisneros, M., et al. (2011). Mercury, lead and cadmium in human milk in relation to diet, lifestyle habits and sociodemographic variables in Madrid (Spain). *Chemosphere*, 85 (2): 268-276.

Gonzalez, C. A. & Watters, R. L. (2013). Standard Reference Material Powder. Gaithersburg, USA: National Institute of Standards & Technology. 9 s.

□ 1549a: Whol

Goudarzi, M. A., Parsaei, P., Nayeypour, F. & Rahimi, E. (2013). Determination of mercury, cadmium and lead in human milk in Iran. *Toxicology and industrial health*, 29 (9).

Gurbay, A., Charehsaz, M., Eken, A., Sayal, A., Girgin, G., Yurdakok, M., Yigit, S., Erol, D. D., Sahin, G. & Aydin, A. (2012). Toxic Metals in Breast Milk Samples from Ankara, Turkey: Assessment of Lead, Cadmium, Nickel, and Arsenic Levels. *Biological Trace Element Research*, 149 (1): 117-122.

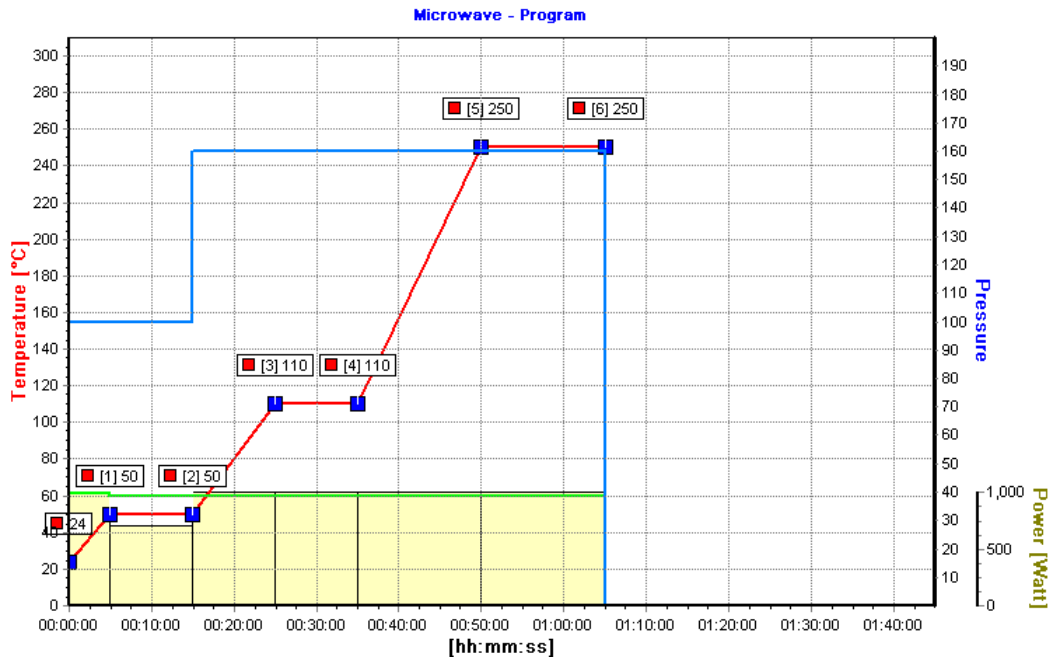
Harris, D. C. (2010). *Quantitative chemical analysis*. New York: Freeman. 719 s.

Helsedirektoratet. (2011). *Hvordan du ammer ditt barn. Noen råd den første tiden* Oslo. Norge.

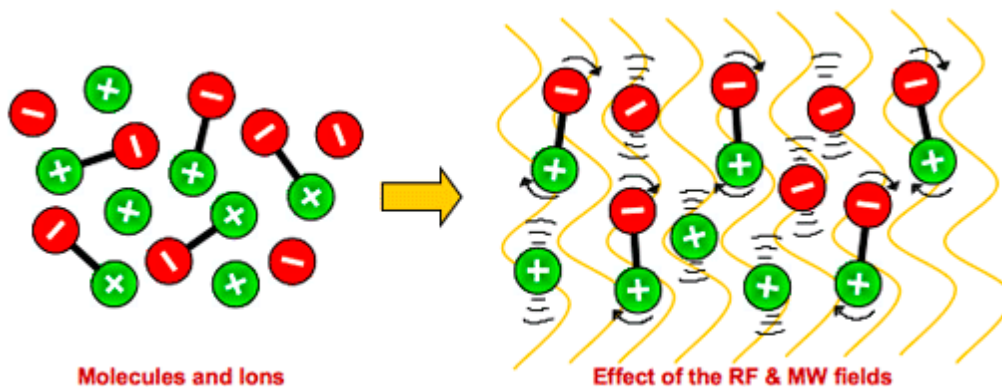
Hussain, S., Liba, A. & McCurdy, E. (2011). Validating the Agilent 7700x ICP-MS for the determination of elemental impurities in pharmaceutical ingredients according to draft USP general chapters <232>/<233>. 10 p. Tilgjengelig fra: https://www.chem.agilent.com/Library/applications/5990-9365EN_AppNote_7700x_Pharma.pdf (lest 05.05.2014).

- James, S., Alper, I. & Marta, D. R. (2013). The certification of the mass fractions of elements in skimmed milk powders: Certified Reference Materials ERM®-BD150 and ERM®-BD151. Belgium. 118 s.
- Jensen, K. A. (2012). <Dekomponering 2012 med notater.pdf>. Ås, Norge: IPM- UMB. 3 s. Upublisert manuskript.
- Kramer, M. S. & Kakuma, R. (2002). THE OPTIMAL DURATION OF EXCLUSIVE BREASTFEEDING A SYSTEMATIC REVIEW. 52. Tilgjengelig fra: http://www.who.int/nutrition/topics/optimal_duration_of_exc_bfeeding_review_eng.pdf (lest 20.04.2014).
- Lawrence, R. A. & Lawrence, R. M. (2011). *Breastfeeding: a guide for the medical profession*. Maryland Heights, Mo.: Mosby/Elsevier. 1 online resource 1114 s.
- Mattilsynet. (2011). *Ferskvannsfisk og kvikksølvforurensing*. http://www.matportalen.no/matvaregrupper/tema/fisk_og_skalldyr/ferskvannsfisk_og_kvikksolvforurensing: Mattilsynet (lest 08.05.2014).
- McShane, W. J., Pappas, R. S., Wilson-McElprang, V. & Paschal, D. (2008). A rugged and transferable method for determining blood cadmium, mercury, and lead with inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 63 (6): 638-644.
- Meltzer, H. M., Brandtzæg, P., Knutsen, H., Løland, B. F., Odland, J. Ø., Skåre, J. U. & Torheim, L. E. (2013). Benefit and risk assessment of breastmilk for infant health in Norway. 303 p. Tilgjengelig fra: <http://www.vkm.no/dav/820a1a0bf8.pdf>.
- Miller, J. N. & Miller, J. C. (2010). *Statistics and chemometrics for analytical chemistry*. Harlow: Prentice Hall. xvi, 278 s. : ill s.
- Nascimento, R. S., Froes, R. E., e Silva, N. O., Naveira, R. L., Mendes, D. B., Neto, W. B. & Silva, J. B. (2010). Comparison between ordinary least squares regression and weighted least squares regression in the calibration of metals present in human milk determined by ICP-OES. *Talanta*, 80 (3): 1102-9.
- Nóbrega, J. A., Santos, M. C., de Sousa, R. A., Cadore, S., Barnes, R. M. & Tatro, M. (2006). Sample preparation in alkaline media. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 61 (5): 465-495.
- PerkinElmer. (2004). ELAN DRC II. 12. Tilgjengelig fra: <https://www.esc.cam.ac.uk/esc/files/Department/facilities/icp-ms/drcii-b.pdf> (lest 10.05.2014).
- Quevauvillier, P. (1993). The certification of the contents (mass fraction) of CA, Cu, Cl, I, Fe, K, Mg, P, Pb, N, Na, and Zn in SKIM milk powder: (CRM 063R): final report 184 s.
- Stalam. (2013). *How do the RF & MW technologies work?* Tilgjengelig fra: <http://www.stalam.it/en/technologies/radio-frequency-and-micro-waves.html> (lest 11.05.2014).
- Thomsen, C. (2013). *Personlig meddelelse*.
- Wahlen, R., Evans, L., Turner, J. & Hearn, R. (2005). The Use of Collision/Reaction Cell ICP-MS for the Simultaneous Determination of 18 Elements in Blood and Serum Samples: Agilent Technologies. 8 s.
- wikipedia. *Ethylenediaminetetraacetic acid*. Tilgjengelig fra: <http://en.wikipedia.org/wiki/EDTA> (lest 15.03.2014).
- Wilbur, S., Kuwabara, T. & Sakai, T. (2009). High-Speed Environmental Analysis Using the Agilent 7500cx with Integrated Sample Introduction System – Discrete Sampling (ISIS–DS). 8. Tilgjengelig fra: <http://www.chem.agilent.com/Library/applications/5990-3678EN.pdf>.

Vedlegg A. Dekomponering



Figur A- 1. Figuren viser programmet som er brukt i denne oppgaven(Jensen 2012).



Figur A- 2. Viser hvordan ioner og polariserte molekyler beveger seg i et elektrisk felt(Stalam 2013).

$$(16) \quad \ln k = \ln A - E/RT$$

Der k er reksjonshastigheten, A er en konstant, E er aktiveringsenergien til reaksjonen, R er gasskonstanten og T er den absolutte temperatur.

Vedlegg B. Beregninger av pH i løsninger og dannelseskonstanter for EDTA komplekser.

Tabell B- 1. Viser dannelseskonstanten K_f til EDTA kompleksene for de grunnstoffene der det eksisterer, og de pH justerte dannelseskonstantene i NaOH og NH_3 (Harris 2010) .

Grunnstoff	K_f EDTA komplekser	K_f EDTA komplekser i NaOH ved pH 13	K_f EDTA komplekser i NH_3 ved pH 11,5
Mg	$4,9 \cdot 10^8$	$4,9 \cdot 10^8$	$4,63 \cdot 10^8$
Ca	$5,0 \cdot 10^{10}$	$5,0 \cdot 10^{10}$	$4,73 \cdot 10^{10}$
Mn	$6,2 \cdot 10^{13}$	$6,2 \cdot 10^{13}$	$5,86 \cdot 10^{13}$
Fe^{2+}	$2,1 \cdot 10^{14}$	$2,1 \cdot 10^{14}$	$1,98 \cdot 10^{14}$
Fe^{3+}	$1,3 \cdot 10^{25}$	$1,3 \cdot 10^{25}$	$1,23 \cdot 10^{25}$
Cu	$6,3 \cdot 10^{18}$	$6,3 \cdot 10^{18}$	$5,95 \cdot 10^{18}$
Zn	$3,2 \cdot 10^{16}$	$3,2 \cdot 10^{16}$	$3,02 \cdot 10^{16}$
Se	-	-	-
Cd	$2,9 \cdot 10^{16}$	$2,9 \cdot 10^{16}$	$2,74 \cdot 10^{16}$
I	-	-	-
Hg	$6,3 \cdot 10^{21}$	$6,3 \cdot 10^{21}$	$5,95 \cdot 10^{21}$
Pb	$1,1 \cdot 10^{18}$	$1,1 \cdot 10^{18}$	$1,04 \cdot 10^{18}$
P	-	-	-

Mengden EDTA som er på formen Y^{4-} er avhengig av pH. Dette vil si at det må beregnes en dannelseskonstant K_f for den enkelte pH, denne vil bare gjelde ved den angitte pH. Endrer

man pH må dannelseskonstanten beregnes på nytt. Denne beregnes ved å bruke ligningene (1-6).

K_1 - K_6 er disproporsjonskonstantene til H_6EDTA^{2+} , se tabell 2.

Tabell B- 2 Dispropasjonskonstantene til H_6EDTA^{2+} og produktet av alle seks konstantene(Harris 2010).

Konstant	Verdi
K_1	1
K_2	0,0316
K_3	$1,02 \cdot 10^{-2}$
K_4	$2,14 \cdot 10^{-3}$
K_5	$6,92 \cdot 10^{-7}$
K_6	$5,50 \cdot 10^{-11}$
$K_1 \cdot K_2 \cdot K_3 \cdot K_4 \cdot K_5 \cdot K_6$	$2,63 \cdot 10^{-23}$

Beregning av pH og dannelseskonstant for EDTA- komplekser i en NaOH- løsning.

Når 0,1 mol/L NaOH brukes som løsemiddel vil løsningen ha en pH på:

$$pH = 14 - pOH = 14 - (-\log [OH^-]) = 14 - (-\log 0,1) = 14 - 1 = 13$$

$$[H^+] = 10^{-pH} = 10^{-13} = 1,0 \cdot 10^{-13}$$

Ved å bruke $[H^+]$ konsentrasjonen og verdiene for K_1 - K_6 kan nå D beregnes.

$$D = [H^+]^6 + K_1[H^+]^5 + K_1K_2[H^+]^4 + K_1K_2K_3[H^+]^3 + K_1K_2K_3K_4[H^+]^2 + K_1K_2K_3K_4K_5[H^+] + K_1K_2K_3K_4K_5K_6 = 2,63 \cdot 10^{-23}$$

Ved å bruke beregnet D kan man nå beregne α_4

$$\alpha_4 = \frac{2,63 \cdot 10^{-23}}{2,63 \cdot 10^{-23}} = 1,00$$

Her ser man at ved pH 13 vil all EDTA foreligge som EDTA⁴⁻ og dannelseskonstanten vil være lik den som er oppgitt i tabeller.

Beregning av pH og dannelseskonstant for EDTA- komplekser i en NH₃- løsning.

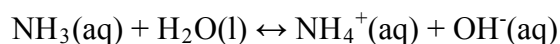
Det benyttes en 5% (v/v) NH₃ løsning, noe som gir en pH på:

Utgangsløsningen er konsentrert ammoniakk som er 25 wt%, denne har en konsentrasjon på 13,4 mol/L.

Det vil si at konsentrasjonen i prøvene er:

$$13,4 \text{ mol/l} \cdot 0,0500 = 0,670 \text{ mol/L}$$

Likevekten til ammoniakk i vann er:



Tabell B- 3. Skjematisk fremstilling av reaksjonen mellom vann og ammoniakk, med konsentrasjonene i molar.

	NH ₃ , M	NH ₄ ⁺ , M	OH ⁻ , M
Start	0,670	0	0
Reaksjon	-x	x	x
Likevekt	0,670-x	x	x

Basekonstanten til ammoniakk er $K_b = 1,80 \cdot 10^{-5} \text{ M}$

Man får da ligningen:

$$K_b = \frac{[NH_4^+][OH^-]}{[NH_3]} = \frac{x*x}{0,670-x} = \frac{x^2}{0,670-x} = 1,80*10^{-5}$$

$$x^2 = 1,80*10^{-5}*0,670$$

$$x = \sqrt{(1,80*10^{-5}*0,670)} = 3,50*10^{-3}$$

$$pH = 14 - pOH = 14 - (-\log [OH^-]) = 14 - (-\log 3,50*10^{-3}) = 14,0 - 2,50 = 11,5$$

$$[H^+] = 10^{-pH} = 10^{-11,5} = 3,20*10^{-12}$$

Ved å bruke $[H^+]$ konsentrasjonen og verdiene for K_1 - K_6 kan nå D beregnes.

$$D = [H^+]^6 + K_1[H^+]^5 + K_1K_2[H^+]^4 + K_1K_2K_3[H^+]^3 + K_1K_2K_3K_4[H^+]^2 + K_1K_2K_3K_4K_5[H^+] + K_1K_2K_3K_4K_5K_6 = 2,78*10^{-23}$$

Ved å bruke beregnet D kan man nå beregne α_4

$$\alpha_4 = \frac{2,63*10^{-23}}{2,78*10^{-23}} = 0,945$$

Her ser man at 94,5 % av EDTA vil foreligge som $EDTA^{4-}$, dannelseskonstantene må da ganges med 0,945 for å finne den nye dannelseskonstanten. De nye dannelseskonstantene er ført inn i tabell 1.

Vedlegg C. Konsentrasjon av standarder brukt til kalibrering ved metodevalidering

Tabell C- 1 Konsentrasjonen av det enkelte grunnstoff i kalibreringsstandardene.

Grunnstoff	Benevning på konsentrasjonen	Standard	Standard	Standard	Standard	Standard	Standard	Standard
Mg	mg/l	0	2	4	6	8	10	12
P	mg/l	0	10	20	30	40	50	60
Ca	mg/l	0	20	40	60	80	100	120
Mn	µg/l	0	4	8	12	16	20	24
Fe	µg/l	0	60	120	180	240	300	360
Cu	µg/l	0	10	20	30	40	50	60
Zn	µg/l	0	50	100	150	200	250	300
Se	µg/l	0	4	8	12	16	20	24
Cd	µg/l	0	4	8	12	16	20	24
I ¹	µg/l	0	10	12,5	15	20	25	30
Hg ²	µg/l	0	0,1	0,5	1	2,5	5	
Pb	µg/l	0	4	8	12	16	20	24

¹ Bare i basisk løsning. ² Bare i syre dekomponerte prøver.

Tabell C- 2. Viser de to spike nivåene i basiske prøver i µg/l.

Spike nivå	Mn	Fe	Cu	Zn	Se	Cd	Pb
Lavt	8	120	20	100	8	8	8
Høyt	16	240	40	200	16	16	16

Tabell C- 3. Tabellen viser % gjenfinning av spike i basiske prøver.

Prøve	Spike nivå	Mn	Fe	Cu	Zn	Se	Cd	Pb
25	L	103	103	100	106	107	103	105
26	L	103	106	99	104	107	102	104
27	L	103	104	101	105	108	103	103
28	L	105	106	101	103	106	102	104
29	L	101	102	99	104	109	104	103
30	L	103	102	99	102	106	103	104
31	H	104	103	103	106	109	103	104
32	H	100	101	101	103	107	104	104
33	H	104	103	104	107	106	103	104
34	H	101	102	101	105	107	104	104
35	H	102	102	100	105	107	104	102
36	H	104	104	101	107	105	103	103

Tabell C- 4. Viser de to spike nivåene i syre prøver i µg/l.

Spike nivå	Mn	Fe	Cu	Zn	Se	Cd	Hg	Pb
Lavt	10	150	25	125	10	10	2,5	10
Høyt	20	300	50	250	20	20	5	20

Tabell C- 5. Gjenfunnet spike i 7 paralleller ved to spike nivåer for syv grunnstoff.

Gjenfinning av spike er oppgitt i prosent av tilsatt spike.

Prøve	Spike nivå	Mn	Fe	Cu	Zn	Se	Cd	Hg	Pb
27	L	106	120	107	105	97	100	97	102
28	L	100	96	104	103	98	100	99	101
29	L	99	103	104	103	100	100	97	104
30	L	100	104	106	105	100	101	97	101
31	L	100	99	107	105	99	101	99	102
32	L	99	97	104	104	101	100	97	102
33	L	96	96	105	104	103	100	96	102
34	H	100	97	102	101	101	100	96	102
35	H	99	98	105	103	101	101	98	101
36	H	99	99	104	102	99	100	98	102
37	H	99	100	105	103	100	101	98	101
38	H	99	98	103	102	101	100	97	102
39	H	102	101	108	105	97	101	96	102
40	H	101	100	104	102	98	100	96	103

Vedlegg D. Resultater fra analyser av sertifiserte referansematerialer

Tabell D- 1. Viser resultater fra analyser av de sertifiserte referansematerialene ERM- BD150 og 151 og NIST 1549a fortynnet med basisk reagens. De grønne verdiene er innenfor det sertifiserte området, de røde tallene er utenfor det sertifiserte området mens de hvite er ikkesertifisert.

	Mg	P	Ca	Mn	Fe	Cu	Zn	Se	Cd	I	Pb
Sertifisert referansemateriale	g/kg	g/kg	g/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg
BD 150	1,2	10,0	13,3	0,28	4,20	1,0	44,7	0,200	0,01	1,67	0,0150
BD 150	1,3	11,0	13,5	0,28	4,40	1,1	45,6	0,200	0,01	1,70	0,0150
BD 150	1,2	11,0	13,3	0,28	4,30	1,0	45,6	0,180	0,01	1,65	0,0150
BD 150	1,2	11,0	13,3	0,29	4,40	1,0	45,4	0,200	0,01	1,67	0,0150
BD 150	1,2	11,0	13,3	0,28	4,50	1,0	45,8	0,190	0,01	1,63	0,0150
BD 151	1,3	11,0	13,5	0,29	54,0	5,1	45,7	0,200	0,1	1,64	0,210
BD 151	1,3	11,0	14,3	0,29	52,0	5,0	45,1	0,180	0,1	1,66	0,210
BD 151	1,2	11,0	13,9	0,27	53,0	5,1	45,7	0,180	0,1	1,76	0,210
BD 151	1,3	11,0	13,7	0,28	53,0	5,1	45,8	0,180	0,1	1,62	0,210
BD 151	1,3	11,0	13,8	0,29	54,0	5,1	46,3	0,190	0,1	1,64	0,210
1549a	0,93	8,30	9,45	0,17	1,70	0,39	34,8	0,260	<0,00098	3,61	<LD
1549a	0,92	8,20	9,42	0,18	1,60	0,39	34,8	0,260	<LD	3,60	<LD
1549a	0,94	8,30	9,61	0,18	1,60	0,37	34,7	0,250	<LD	3,52	<LD

Tabell D- 2. Viser resultater fra analyser av de sertifiserte referansematerialene ERM- BD150 og 151 i dekomponerte prøver, første dag av metodevalideringen. De grønne verdiene er innenfor det sertifiserte området, de røde tallene er utenfor det sertifiserte området mens de gule er under LQ.

	Mg	P	Ca	Mn	Fe	Cu	Zn	Se	Cd	Hg	Pb
	g/kg	g/kg	g/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg
BD 150	1,29	10,6	14,3	0,30	<6,4	1,06	45,5	0,21	0,01	0,057	0,018
BD 150	1,27	10,4	13,6	0,29	<6,3	1,06	45,3	0,21	0,01	0,058	0,022
BD 150	1,28	10,4	13,4	0,28	<5,7	1,04	44,8	0,19	0,01	0,058	0,023
BD 150	1,28	10,4	13,0	0,29	<6,5	1,04	45,0	0,18	0,01	0,058	0,016
BD 150	1,31	10,4	13,2	0,28	<7,6	1,05	45,4	0,21	0,01	0,053	0,016
BD 151	1,27	10,2	12,6	0,28	52	4,97	44,4	0,19	0,1	0,53	0,21
BD 151	1,30	10,5	13,2	0,29	53	5,12	45,6	0,18	0,1	0,53	0,22
BD 151	1,34	10,6	13,2	0,30	55	5,20	46,3	0,17	0,1	0,54	0,21
BD 151	1,28	10,7	15,1	0,28	52	5,09	45,4	0,20	0,1	0,53	0,21
BD 151	1,30	10,6	14,8	0,32	55	5,06	45,6	0,19	0,1	0,52	0,22

Tabell D- 3. Viser resultater fra analyser av de sertifiserte referansematerialene ERM- BD150 og 151 i dekomponerte prøver, andre dag av metodevalideringen. De grønne verdiene er innenfor det sertifiserte området, de røde tallene er utenfor det sertifiserte området mens de gule er under LQ.

	Mg	P	Ca	Mn	Fe	Cu	Zn	Se	Cd	Hg	Pb
	g/kg	g/kg	g/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg
BD 150	1,30	10,5	16	0,31	<6,8	1,06	45,4	0,2	0,01	0,054	0,018
BD 150	1,29	10,8	15	0,29	<6,6	1,07	45,6	0,2	0,01	0,057	0,020
BD 150	1,29	10,6	15	0,28	<6,0	1,05	44,8	0,2	0,01	0,055	0,022
BD 150	1,31	10,8	14	0,29	<6,8	1,07	46,2	0,2	0,01	0,059	0,017
BD 150	1,30	10,4	14	0,29	<8,0	1,02	45,2	0,2	0,01	0,054	0,016
BD 151	1,30	10,5	16	0,29	53	5,13	45,6	0,2	0,1	0,51	0,21
BD 151	1,28	10,7	15	0,30	53	5,12	45,5	0,2	0,1	0,51	0,21
BD 151	1,29	10,7	15	0,29	54	5,11	45,3	0,2	0,1	0,52	0,21
BD 151	1,29	10,7	15	0,29	54	5,07	45,2	0,2	0,1	0,53	0,21
BD 151	1,29	10,5	14	0,32	55	5,11	45,3	0,2	0,1	0,52	0,21

Tabell D- 4. Viser resultater fra analyser av de sertifiserte referansematerialene ERM- BD150 og 151 i dekomponerte prøver, tredje dag av metodevalideringen. De grønne verdiene er innenfor det sertifiserte området, de røde tallene er utenfor det sertifiserte området mens de gule er under LQ.

	Mg	P	Ca	Mn	Fe	Cu	Zn	Se	Cd	Hg	Pb
	g/kg	g/kg	g/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg
BD 150	1,31	10,6	15	0,29	<6,6	1,08	46,3	0,18	0,01	0,058	0,018
BD 150	1,29	10,6	14	0,29	<6,4	1,05	45,1	0,19	0,01	0,057	0,020
BD 150	1,29	10,6	14	0,27	<5,8	1,07	45,1	0,19	0,01	0,055	0,022
BD 150	1,32	10,7	14	0,29	<6,6	1,05	45,3	0,18	0,01	0,057	0,016
BD 150	1,32	10,7	15	0,30	<7,8	1,05	45,6	0,17	0,01	0,055	0,016
BD 151	1,29	10,6	14	0,29	50	5,09	44,9	0,20	0,1	0,53	0,21
BD 151	1,32	10,9	14	0,29	50	5,15	45,7	0,17	0,1	0,52	0,21
BD 151	1,29	10,6	14	0,28	50	5,03	45,0	0,18	0,1	0,53	0,21
BD 151	1,31	10,9	14	0,29	50	5,10	45,2	0,20	0,1	0,52	0,21
BD 151	1,31	10,8	14	0,31	50	5,19	45,2	0,19	0,1	0,53	0,22

Vedlegg E. Informasjon om analytter, internstandard, interferenser og korreksjoner

Tabell E- 1. En oversikt over analyttene, isotopene det måles på, deres første ioniseringsenergi, de vanligste interferensene og hvordan de blir korrigert.

Grunnstoff	Isotop	Første ioniseringsenergi, eV	Internstandard		Interferenser	Korreksjon av interferenser
			Syre	Base		
Mg	24	7,65	Ge	Rh	$^{12}\text{C}_2^+$	Interferensene består av polyatomære interferenser, det benyttes derfor kollisjon med He for å fjerne interferensene.
	25				$^{12}\text{C}_2^1\text{H}^+$	Interferensene består av polyatomære interferenser, det benyttes derfor kollisjon med He for å fjerne interferensene.
P	31	10,49	Ge	Rh	$^{14}\text{N}^{17}\text{O}^+$, $^{15}\text{N}^{16}\text{O}^+$, $^{12}\text{C}^{18}\text{O}^1\text{H}$	Dette ville normalt blitt korrigert med reaksjonsgass, O_2 der $^{31}\text{P}^+ \rightarrow ^{31}\text{P}^{16}\text{O}^+$. I melk er P så høy at reaksjon er en belastning for detektoren, derfor ble P målt i He kollisjon, referansematerialet viser at resultatet blir riktig.
Ca	43	6,11	Ge	Rh	$^{27}\text{Al}^{16}\text{O}^+$	Begge isotopene analyseres i kollisjon med He og reaksjon, der $\text{Ca}^+ \rightarrow \text{Ca}^{16}\text{O}^+$
	44				$^{12}\text{C}^{16}\text{O}_2$, $^{14}\text{N}_2^{16}\text{O}^+$, $^{28}\text{Si}^{16}\text{O}^+$	

Tabell E- 1 fortsetter

Mn	55	7,43	Ge	Rh	$^{40}\text{Ar}^{14}\text{N}^1\text{H}$, $^{39}\text{K}^{16}\text{O}$, $^{37}\text{Cl}^{18}\text{O}$, $^{40}\text{Ar}^{15}\text{N}$, $^{38}\text{Ar}^{17}\text{O}$, $^{36}\text{Ar}^{18}\text{O}^1\text{H}$, $^{38}\text{Ar}^{16}\text{O}^1\text{H}$, $^{37}\text{Cl}^{17}\text{O}^1\text{H}$, $^{23}\text{Na}^{32}\text{S}$	Interferensene består av polyatomære interferenser, det benyttes derfor kollisjon med He for å fjerne interferensene.
Fe	56	7,90	Ge	Rh	$^{40}\text{Ar}^{15}\text{N}^1\text{H}$, $^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}$, $^{38}\text{Ar}^{18}\text{O}$, $^{37}\text{Cl}^{18}\text{O}^1\text{H}$, $^{40}\text{Ca}^{16}\text{O}$	Interferensene består av polyatomære interferenser, se Mn.
	57				$^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}^1\text{H}^+$, $^{40}\text{Ca}^{16}\text{O}^1\text{H}^+$, $^{40}\text{Ar}^{17}\text{O}^+$, $^{38}\text{Ar}^{18}\text{O}^1\text{H}^+$, $^{38}\text{Ar}^{19}\text{F}^+$	Interferensene består av polyatomære interferenser, se Mn.
Cu	63	7,73	Ge	Rh	$^{40}\text{Ar}^{23}\text{Na}$, $^{47}\text{Ti}^{16}\text{O}$, $^{14}\text{N}^{12}\text{C}^{37}\text{Cl}$, $^{16}\text{O}^{12}\text{C}$ - ^{35}Cl , $^{44}\text{Ca}^{18}\text{O}^1\text{H}$, $^{23}\text{Na}^{40}\text{Ca}$	Interferensene består av polyatomære interferenser, se Mn.
	65				$^{49}\text{Ti}^{16}\text{O}^+$, $^{32}\text{S}^{16}\text{O}_2$ $^1\text{H}^+$, $^{40}\text{Ar}^{25}\text{Mg}^+$, $^{40}\text{Ca}^{16}\text{O}^1\text{H}^+$, $^{36}\text{Ar}^{14}\text{N}_2$ $^1\text{H}^+$, $^{32}\text{S}^{33}\text{S}^+$, $^{32}\text{S}^{16}\text{O}^{17}\text{O}^+$, $^{33}\text{S}^{16}\text{O}_2$ + $^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{37}\text{Cl}^+$, $^{12}\text{C}^{18}\text{O}^{35}\text{Cl}^+$, $^{31}\text{P}^{16}\text{O}^{18}\text{O}^+$	Interferensene består av polyatomære interferenser, se Mn.

Tabell E- 1 fortsetter

Zn	64	9,93	Ge	Rh	$^{64}\text{Ni}^+$, $^{32}\text{S}_2$	Interferensene består av polyatomære interferenser, se
----	----	------	----	----	--	--

						Mn. $^{64}\text{Ni}^+$ blir korrigert for matematisk, ved å trekke fra tellingene fra ^{60}Ni ganget med 0,0268.
	66				$^{50}\text{Ti}^{16}\text{O}$, $^{50}\text{Cr}^{16}\text{O}$, $^{50}\text{V}^{16}\text{O}$, $^{34}\text{S}^{16}\text{O}_2$, $^{32}\text{S}^{16}\text{O}^{18}\text{O}$, $^{32}\text{S}^{17}\text{O}_2$, $^{33}\text{S}^{16}\text{O}^{17}\text{O}$, $^{32}\text{S}^{34}\text{S}$, $^{33}\text{S}_2$	Interferensene består av polyatomære interferenser, se Mn.
Se	78	9,75	Ge	Rh	$^{38}\text{Ar}^{40}\text{Ar}$, $^{156}\text{Gd}^{2+}$	Reaksjon med O_2 , der $^{78}\text{Se}^+ \rightarrow ^{78}\text{Se}^{16}\text{O}^+$
	82				$^{12}\text{C}^{35}\text{Cl}_2$, $^{164}\text{Dy}^{2+}$	Reaksjon med O_2 , der $^{82}\text{Se}^+ \rightarrow ^{82}\text{Se}^{16}\text{O}^+$
Cd	111	8,99	In	In	$^{95}\text{Mo}^{16}\text{O}^+$	O_2 - reaksjon der $^{95}\text{Mo}^{16}\text{O}^+$ reagerer videre til $^{95}\text{Mo}^{16}\text{O}_2^+$
	114				$^{114}\text{Sn}^+$, $^{98}\text{Mo}^{16}\text{O}^+$	O_2 - reaksjon der $^{98}\text{Mo}^{16}\text{O}^+$ reagerer videre til $^{98}\text{Mo}^{16}\text{O}_2^+$. $^{114}\text{Sn}^+$ blir korrigert for matematisk, ved å trekke fra tellingene fra $^{118}\text{Sn}^+$ ganget med 0,0268.
I	127	10,45		^{129}I		Måles i O_2 , fordi $^{129}\text{I}^+$ som brukes som internstandard må analyseres i O_2 for å fjerne $^{129}\text{Xe}^+$ som interferens.
Hg	201	10,44	Au		$^{185}\text{Re}^{16}\text{O}$,	O_2 - reaksjon der $^{185}\text{Re}^{16}\text{O}^+$ reagerer videre til $^{185}\text{Re}^{16}\text{O}_2^+$
	202				$^{186}\text{W}^{16}\text{O}$, $^{186}\text{Os}^{16}\text{O}$	O_2 - reaksjon der $^{186}\text{W}^{16}\text{O}^+$ og $^{186}\text{Os}^{16}\text{O}^+$ reagerer videre til $^{186}\text{W}^{16}\text{O}_2^+$ og $^{186}\text{Os}^{16}\text{O}_2^+$

Tabell E- 1 fortsetter

Pb	206	7,42	Tl	Tl		Pb analyseres vanlig vis i No gas, men i denne oppgaven er Pb den eneste analytten som analyseres i No gas. Så for å spare tid kuttes no gas ut og Pb analyseres i O ₂ . Pb reagerer ikke med O ₂ men ionene kolliderer så man får et mer stabilt signal ved å senke den kinetiske energien til ionene. Det fører til økt følsomhet (PerkinElmer 2004).
----	-----	------	----	----	--	---

Vedlegg F. CV- AAS

Tabell F- 1. Viser tilsatte spike-nivåer i µg/l og gjenfinning av spike i %, ved bestemmelse av Hg med CV- AAS.

Spike nivå, µg/l	Spike gjenfinning, %
1	102
1	106
1	104
5	103
5	101
5	101

Tabell F- 2. Viser målte konsentrasjoner i CRM ERM- BD150 og 151. Verdiene er korrigert for tørrstoff.

	Hg
	mg/kg
BD150	0,057
BD151	0,53

Tabell F- 3. Viser deteksjons- og kvantifiseringsgrense for Hg oppnådd ved analyse av tre blankprøver.

	µg/l
LD	0,15
LQ	0,50

Vedlegg G. Bergning av molariteten til TMAH og ioneproduktet til HgI_2

TMAH

Tabell G- 1. Viser gangen i beregningen av molariteten til TMAH i prøvene.

Mm TMAH	91,15	g/mol
Tetthet TMAH	1,016	g/ml
wt% TMAH	25	
1 L løsning	1000	ml
masse	$1,016\text{g/ml} = x/1000\text{ml}$	
x=	1016	g
Ren TMAH i 25wt%	254	g
Mol TMAH	2,8	mol
M TMAH	2,8	mol/l
I løsningen 20% TMAH	0,56	mol/l TMAH
EDTA i løsning	0,27	mol/l H^+ fra EDTA
Reagerer	$1\text{ mol } \text{H}^+ \text{ fra EDTA} \leftrightarrow 1\text{ mol } \text{OH}^- \text{ fra TMAH}$	
I løsningen 20% TMAH	0,29	mol/l TMAH
I prøve 2% TMAH	0,029	mol/l TMAH

Tabell G- 2 Viser gangen i beregningen av molariteten til EDTA og H^+ i den basiske fortynningen.

Mm EDTA	292,24	g/mol
Masse	20	g
Volum, l	1000	ml
mol EDTA	0,068	mol
M EDTA	0,068	mol/l
	$1\text{ mol EDTA} \leftrightarrow 4\text{ mol } \text{H}^+$	I basisk løsning
M H^+	0,27	mol/l

$$K_{sp} = 2,9 \cdot 10^{-29} = [\text{Hg}^+][\text{I}^-]^2$$

Konsentrasjon av Hg i ERM- BD150: 0,06 mg/kg = 0,06 $\mu\text{g/g}$

Konsentrasjon av I i ERM- BD150: 1,73 mg/kg = 1,73 $\mu\text{g/g}$

Innvekt: 0,25g

Volum: 0,05L

Konsentrasjonen av Hg og I i prøven:

$$[\text{Hg}] = (0,06\mu\text{g/g} * 0,25\text{g}) / 0,05\text{L} = 0,3 \mu\text{g/l}$$

$$[\text{I}] = (1,73\mu\text{g/g} * 0,25\text{g}) / 0,05\text{L} = 8,65 \mu\text{g/l}$$

Antall μg i 1 liter:

$$m_{\text{Hg}} = 0,3\mu\text{g/l} * 1\text{l} = 0,3 \mu\text{g} = 0,3 * 10^{-6}\text{g}$$

$$m_{\text{I}} = 8,65\mu\text{g/l} * 1\text{l} = 8,65 \mu\text{g} = 8,65 * 10^{-6}\text{g}$$

$$M_{\text{mHg}} = 200,6\text{g/mol}$$

$$M_{\text{mI}} = 126,9\text{g/mol}$$

$$n_{\text{Hg}} = 0,3 * 10^{-6}\text{g} / 200,6\text{g/mol} = 1,5 * 10^{-9}\text{mol}$$

$$n_{\text{I}} = 8,65 * 10^{-6}\text{g} / 126,9\text{g/mol} = 6,82 * 10^{-8}\text{mol}$$

Molariteten til Hg og I:

$$M_{\text{Hg}} = 1,5 * 10^{-9}\text{mol} / 1,0\text{L} = 1,5 * 10^{-9}\text{mol/l}$$

$$M_{\text{I}} = 6,82 * 10^{-8}\text{mol} / 1,0\text{L} = 6,82 * 10^{-8}\text{mol/l}$$

Ioneproduktet:

$$Q = [\text{Hg}^+][\text{I}]^2 = 1,5 * 10^{-9}\text{mol/l} * (6,82 * 10^{-8}\text{mol/l})^2 = 7,0 * 10^{-24} \text{M}^3$$

Ser at

$$7,0 * 10^{-24} \text{M}^3 = Q > K_{\text{sp}} = 2,9 * 10^{-29} \text{M}^3$$

Siden den beregnede $Q > K_{\text{sp}}$ kan det skje utfellinger.

Vedlegg H. Dixon Q

Test for uteliggere ved små populasjoner(Miller & Miller 2010).

$Q = | \text{Mistenkelig verdi} - \text{nærmeste verdi} | / (\text{høyeste verdi} - \text{laveste verdi})$

Hvis beregnet verdi < verdi i tabell, for det spesifikke antallet prøver, beholdes resultatet ved et signifikansnivå på 0,05.

Vedlegg I. Resultater relevant for metodeutvikling.

Tabell I- 1. Første analyse av melk med steg 1 i metodeutviklingen, resultatene er av BCR 063R. Rød betyr utenfor sertifisert område og grønn innenfor sertifisert område (Quevauvillier 1993).

	Na	Mg	P	Cl	K	Ca	Fe	Cu	Zn	I	Pb
	g/kg	g/kg	g/kg	g/kg	g/kg	g/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg
Resultat	4,49	1,3	2,32	8,22	18	13,6	0,609	0,63	49,3	1,09	<0,022

Tabell I- 2 Test av CRM BD150 og 151, for å se om forskjellig tilsetning av basisk løsning hindrer utfellinger. Det er også inkludert en syntetisk standard med tilsvarende konsentrasjoner av Hg og Cl som i referansematerialet. Rød betyr utenfor sertifisert område og grønn innenfor sertifisert område.

		Hg
BD150	mg/kg	0,022
BD150	mg/kg	0,022
BD150	mg/kg	0,022
BD151	mg/kg	0,21
BD151	mg/kg	0,21
BD151	mg/kg	0,21
Test 5µg/l Hg + Cl	ug/l	2,9

Tabell I- 3. Viser resultatene fra målingen av en 25 µg/l standardløsning av jod i en TMAH matriks. Det er bare oppgitt som rådata og ikke tatt hensyn til gjeldende siffer.

I (µg/l)
26,90
26,56
23,63
28,37
27,48
27,53

Tabell I- 4. Resultater fra analyse av referansemateriale BD150 og 151 i NaOH matriks. Rød betyr utenfor sertifisert område og grønn innenfor sertifisert område.

	Mg	P	Ca	Mn	Fe	Cu	Zn	Se	Cd	I	Hg	Pb
	g/kg	g/kg	g/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg
BD150	1,30	10,9	14,2	0,28	4,25	1,06	44,3	0,18	0,01	1,67	0,07	0,016
BD151	1,15	9,7	12,7	0,25	46,5	4,58	39,6	0,18	0,09	1,69	0,5	0,18

Tabell I- 5. Kvikksølv resultater fra analyse av referansemateriale BD150 og 151 i basisk løsning nummer to tilsatt L- cysteine for å stabilisere kvikksølv. Rød betyr utenfor sertifisert område og grønn innenfor sertifisert område.

	Hg
	mg/kg
BD150	0,031
BD150	0,031
BD150	0,029
BD 151	0,28
BD 151	0,28
BD 151	0,28



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Postboks 5003
NO-1432 Ås
67 23 00 00
www.nmbu.no