



Forord

Metodeutvikling og metodevalidering på ICP-MS-QQQ har i denne mastergradsoppgaven blitt utført på Institutt for miljøvitenskap (IMV) ved Norges miljø- og biovitenskapelige universitet (NMBU) på Ås. Oppgaven har inngått i et samarbeid med Folkehelseinstituttet (FHI) – noe som har gitt meg muligheten til å kunne anvende den validerte metoden på reelle prøver.

Jeg vil rette en stor takk til min hovedveileder Elin Gjengedal for god veiledning under hele arbeidet. Helt siden det måtte gjøres et valg av oppgave har du gitt meg mange nyttige råd og mye kunnskap som jeg skal ta med meg videre. Biveileder Karl Andreas Jensen, samt Solfrid Lohne fortjener en stor takk for all hjelp på laboratoriet. Dere har bidratt med lærerike diskusjoner, praktisk arbeid og har virkelig vist meg nytten av det fantastiske instrumentet, ICP-MS-QQQ. Jeg vil også takke min biveileder på Folkehelseinstituttet, Helle Margrete Meltzer, for god hjelp til oppgaven og oppmuntrende ord.

En takk må også rettes til medstudent Øyvind Enger for godt samarbeid på laboratoriet, og mine gode venner på lesesalene her på campus. Dere vet selv hvem dere er.

Linn Katrin Nødland

Ås, 13. mai 2014

Sammendrag

I denne oppgaven har en ICP-MS metode med en oktapolbasert kollisjons- og reaksjonscelle blitt utviklet, validert og brukt til bestemmelse av jod (I) i urin. Analyttene selen (Se) og arsen (As) er også inkludert i arbeidet. Formål i første del av mastergradsoppgaven var å utvikle en enkel analysemetode med minimal prøveopparbeidelse for å kunne bestemme de to essensielle sporstoffene I og Se, samt det potensielt toksiske sporstoffet As i urin. Krav til metoden var god nøyaktighet, tilfredsstillende følsomhet (bestemmelsesgrense (LOQ) $\leq 5 \mu\text{g/L}$ for I, $\leq 3 \mu\text{g/L}$ for Se og $\leq 1 \mu\text{g/L}$ for As), oppnå god linearitet over et stort konsentrasjonsområde og en usikkerhet i metoden på 10 % eller lavere for alle tre grunnstoffene. Jodstatus hos mødre og deres barn i Oslo og Akershus ble bestemt, og nivåene av jod hos disse to gruppene, samt hos jenter og gutter, røykere og ikke røykere ble sammenlignet. Sammenhengen mellom jodkonsentrasjon i urin (JKU) og ulike matvaregrupper ble også undersøkt. Urinprøver (n=104) ble forbehandlet med en basisk løsning som inneholdt ammoniakk (NH_3), etylendiamintetraeddiksyre (EDTA), 2-propanol og Triton X-100, og deretter analysert for bestemmelse av I, Se og As.

Instrumentkalibrering ble utført ved bruk av ekstern kalibrering med internstandardisering. I metodevalideringen ble det oppnådd en LOQ på $3,8 \mu\text{g/L}$, $0,38 \mu\text{g/L}$ og $0,075 \mu\text{g/L}$ for henholdsvis I, Se og As. Ekspandert usikkerhet ble bestemt til $\leq 6 \%$ for alle grunnstoffene. Analyttene ble holdt i løsning selv med et høyt innhold av oppløst fast stoff (TDS) i urinprøvene, og lineariteten var god over et stort måleområde. Bruk av ICP-MS-QQQ i reaksjonsmodus ga nøyaktige og pålitelige resultater på grunn av effektiv fjerning av interferenser. Median JKU (mJKU) for hele utvalget på $111 \mu\text{g/L}$ korresponderte med et optimalt inntak av jod basert på referanseverdier fra Verdens Helseorganisasjon (WHO). JKU for mødre og barn viste signifikante forskjeller med mJKU på $79,8 \mu\text{g/L}$ (n=48) for mødrene (mild jodmangel) og $146 \mu\text{g/L}$ (n=56) for barna (optimalt inntak). Kun 6,73 % (n=7) av hele utvalget hadde en JKU på mindre enn $50 \mu\text{g/L}$, og 38,5 % (n=40) lå mellom 50 og $100 \mu\text{g/L}$. Det var ikke signifikante forskjeller i JKU mellom jenter og gutter eller røykere og ikke røykere. Enkle korrelasjonsanalyser mellom JKU og inntak av ulike matvaregrupper viste at det var kun inntak av gruppen som inneholdt melk, fløte, is, rømme og yoghurt som korrelerte signifikant. JKU for forsøkspersonene i denne undersøkelsen varierte mye fra person til person grunnet ulikt kosthold – noe som viser viktigheten av det å ha god linearitet over et stort måleområde for denne analysemetoden.

Abstract

An ICP-MS method with an octopole-based collision/reaction cell has been developed, validated and used for determination of iodine (I) in urine. Selenium (Se) and arsenic (As) have been included in the work too. Objectives in the first part of this master thesis were to develop a simple method of analysis with minimal sample preparation to determine the two essential trace elements I and Se, as well as the potentially toxic trace element As in urine. It was required for the method to achieve good accuracy, adequate sensitivity (limit of quantification (LOQ) ≤ 5 $\mu\text{g/L}$ for I, ≤ 3 $\mu\text{g/L}$ for Se and ≤ 1 $\mu\text{g/L}$ for As), accomplish good linearity over a wide range of concentrations and a method uncertainty lower than 10 % for all three analytes. The iodine status of mothers and their children in Oslo and Akershus were determined, and the levels of iodine in these two groups as well as in girls and boys, smokers and non-smokers were compared. The relationship between urinary iodine concentration (UIC) and various food groups was also studied. Urine samples (n=104) were pre-treated with an alkaline solution containing ammonia (NH_3), ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 2-propanol and Triton X-100, and then analysed for the determination of I, Se and As. Instrument calibration was performed using external calibration with internal standardization. In the method validation, LOQ values of 3,8 $\mu\text{g/L}$, 0,38 $\mu\text{g/L}$ and 0,075 $\mu\text{g/L}$ for I, Se and As respectively were achieved. An expanded uncertainty of ≤ 6 % was accomplished for all elements. The analytes sustained in solution despite high content of total dissolved solids (TDS) in the urine samples, and the linearity was good over a wide measuring range. The use of ICP-MS-QQQ in reaction mode allowed accurate and reliable results due to the effective removal of interferences. A median UIC (mUIC) of 111 $\mu\text{g/L}$ for the entire population corresponded to an optimal intake of iodine based on reference values from the World Health Organization (WHO). There were significant differences in UIC for mothers and children with a mUIC of 79,8 $\mu\text{g/L}$ (n=48) for the mothers (mild iodine deficiency) and 146 $\mu\text{g/L}$ (n=56) for the children (optimal intake). Only 6,73 % (n=7) had UIC less than 50 $\mu\text{g/L}$, and 38,5 % (n=40) were somewhere in between 50 and 100 $\mu\text{g/L}$. There were no significant differences in UIC between girls and boys or smokers and non-smokers. Simple correlation analysis showed that there was significant correlation between UIC and intake of the group containing milk, cream, ice cream, sour cream and yoghurt. UIC for the subjects in this study ranged widely between persons due to various diets – which justifies the importance of having good linearity over a wide range of concentrations for this analytical method.

Forkortelser og ordforklaringer

CFA-C	En blanding av tertiære aminer og EDTA. Eksakt innhold er ukjent
Chelat	En ligand bundet til et sentralatom ved to eller flere steder
Cps	Enhet for signalintensitet som tilsvarer antall elektroniske pulser som telles hvert sekund (counts per second)
Dekomponering	Fjerning av organisk materiale fra matriks i en flytende prøve eller omvandling av faste stoffer til vandige løsninger ved hjelp av kjemisk separering med syre, vann eller base
EDTA	Etylendiamintetraeddiksyre (ethylenediaminetetraacetic acid)
HMI	Høy matriksindeks (high matrix index/introduction)
Interface i ICP-MS	Instrumentdel som betegner overgangen mellom ICP- og MS-delen (fra atmosfærisk trykk til høyvakuum)
Intermediær presisjon	Likheten mellom gjentatte målinger med en eller flere varierende faktorer. I dette tilfellet er tid en varierende faktor
Intrametodisk presisjon	Likheten mellom gjentatte målinger av samme prøve med like faktorer (samme laboratorium, dag, metode, instrument og operatør)
IP	Ioniseringspotensial. Den energimengden som trengs for at et grunnstoff skal ioniseres
JKU	Jodkonsentrasjon i urin
JMS	Jodmangelsykdommer
Kelvin	SI (International System of Units) enhet for måling av temperatur. En kelvin er brøkdelen $1/273,16$ av den termodynamiske temperatur for vannets trippelpunkt
Ligand	Atom, molekyl eller ion som bindes til et sentralatom ved å donere et elektronpar
Linearitet	Metodens evne til å gi et signal proporsjonalt med konsentrasjon av analytt

Load i Ultraclave	Beholder med vann, svovelsyre og hydrogenperoksid som prøvebeholderne settes oppi for å oppnå en jevn temperatur under dekomponering
LOD	Deteksjonsgrense (limit of detection). Den laveste mengden analytt som kan detekteres med akseptabel statistisk signifikans $LOD = 3 * SD_{Blank}$
LOQ	Kvantifiseringsgrense/bestemmelsesgrense (limit of quantification). Den laveste mengden analytt som kan kvantifiseres med akseptabel statistisk signifikans $LOQ = 10 * SD_{Blank}$
Minneeffekter	Når prøve med analytt henger igjen i prøveintroduksjonssystemet og i pumpe slangene slik at neste måling blir påvirket
Måleområde	Det konsentrasjonsintervallet der analytt kan bestemmes med akseptabel presisjon og nøyaktighet
NEPT	NH ₃ (ammoniakk), EDTA, 2-propanol, Triton X-100
Nøyaktighet	Metodens evne til å måle sann verdi
Reproduserbarhet	Likheten mellom gjentatte målinger når alle faktorene varierer
Robusthet	Analysemetodens kapasitet til å forbli uberørt av små, bevisste endringer i metodeparametere
RSD	Relativt standardavvik $RSD (\%) = \frac{SD}{gjennomsnitt} * 100$
SD	Standardavvik (standard deviation)
Spike	Tilsetting av kjent konsentrasjon med analytt i prøvematriksen for å undersøke gjenfinning
SRM	Standard referansemateriale der verdien til en eller flere egenskaper er funnet ved en teknisk gyldig målemetode som er sporbar til et sertifikat og med gitt usikkerhet
TDS	Oppløst fast stoff (total dissolved solids)
TMAH	Tetrametylammonium hydroksid

Torr	Enhet for trykk. En torr er 1/760 av normal atmosfære og tilsvarer 1 mmHg
Tune	Innstilling/optimalisering
Q1	Forkvadrupol i kollisjons- og reaksjonscellen (quadrupole 1)
Q2	Ny kvadrupol etter oktapolen i kollisjons- og reaksjonscellen (quadrupole 2)
QQQ	Trippel kvadrupol (triple quadrupole)

Det finnes ingen universal enighet om definisjonen på enkelte uttrykt brukt i metodevalidering.

Innholdsliste

Forord

Sammendrag

Abstract

Forkortelser og ordforklaringer

1 Innledning	1
2 Teori	4
2.1 Jod, selen og arsen	4
2.2 Jod	4
2.2.1 Generelt	4
2.2.2 Kostkilder og inntak	5
2.2.3 Fysiologi og metabolisme	7
2.2.4 Helseeffekter	8
2.2.5 Anbefalinger.....	9
2.2.6 Tiltak	10
2.3 Analysemetode	11
2.3.1 Lukket dekomponering med mikrobølgeteknikk	12
2.3.2 Induktivt koplet plasma massespektrometri	13
2.3.2.1 Instrumentelt.....	14
2.3.2.2 Kalibrering	16
2.3.2.3 Metodeutvikling	17
2.3.2.4 Interferenser	17
2.3.2.5 Spesielt om Agilent 8800 QQQ.....	19
3 Eksperimentelt	22
3.1 Utstyr, stamløsninger, gasser og kjemikalier	22
3.2 Tillaging av standarder	25
3.3 Metodeutvikling	25
3.3.1 Syredekomponering med mikrobølgeteknikk	27
3.3.2 Tilsetting av basiske reagenser.....	27
3.3.3 Analyse med ICP-MS-QQQ.....	28
3.3.4 Stabilitet av jod i NEPT-løsning	29
3.4 Metodevalidering	29
3.5 Anvendelse av metode	30

3.5.1 Undersøkelsen og forsøkspersonene	30
3.5.2 Forbehandling av urinprøver	31
3.5.3 Analyse med ICP-MS-QQQ.....	31
3.6 Behandling av resultater og statistiske metoder	32
4 Resultater og diskusjon	33
4.1 Usikkerhetsvurdering og begrensninger	33
4.2 Metodeutvikling	34
4.3 Metodevalidering	39
4.4 Anvendelse av metode	43
5 Videre arbeid	52
5.1 Metodeutvikling og metodevalidering	52
5.2 Anvendelse av metode	52
6 Konklusjon.....	54
Referanser.....	56
Vedlegg A – Metodeutvikling og metodevalidering.....	I
Vedlegg B – Analyseresultater av urinprøver for mor og barn.....	V
Vedlegg C – Utrekninger og tillaging av prøver	X
Vedlegg D – Program for dekomponering med Ultraclave	XIV
Vedlegg E – Instrumentelle måleparametere og driftsforhold på ICP-MS	XV
Vedlegg F – Informasjon om forsøkspersoner	XVI

1 Innledning

Jod er ett av mange essensielle sporstoffer som kroppen behøver for å fungere optimalt. Dette livsviktige grunnstoffet finnes hovedsakelig i skjoldbruskkjertelen eller tyreoida (*Glandula thyreoidea*), og inngår i tyreoidahormonene tyroksin (T_4) og trijodotyronin (T_3). Disse hormonene regulerer den metabolske prosessen i de fleste celler samtidig som de spiller en viktig rolle for tidlig vekst og utvikling av flere organer, spesielt hjernen (WHO & UNICEF 2007). For å unngå mangelsykdommer tilknyttet jod er det anbefalte daglige inntaket av jod hos voksne satt til 150 $\mu\text{g}/\text{dag}$ (NNR 2012). Når disse anbefalingene ikke blir fulgt kan det oppstå både funksjonelle misdannelser og mentale forstyrrelser. Fra og med 1950 ble kraftfôret til kyr tilsatt jod i Norge. Dette gjorde at melk og ost ble viktige kilder til jod i den norske befolkningen, i tillegg til fisk. På verdensbasis var det tilsetning av jod til vanlig husholdningssalt som var og fortsatt er den viktigste kilden, samt årsaken til at inntaket av jod økte i tiårene etter andre verdenskrig. I dag forekommer ikke jodmangel i samme grad som før, men jodmangel er fortsatt et stort folkehelseproblem i flere deler av verden. I følge WHO har omtrent to milliarder av jordens befolkning fortsatt for lavt inntak av jod. Jodmangel er spesielt utbredt i Asia, Afrika og Sør-Amerika, men også i mange europeiske land har det vist seg at nivåene av jod ligger under grensen for anbefalt daglig inntak.

Selv om størsteparten av Norges befolkning ligger innenfor grensene for anbefalt inntak er det enkelte undergrupper av befolkningen som er spesielt utsatt. Det er gravide kvinner, barn og ungdom, og folk som får i seg lite fisk, melk og melkeprodukter (Brantsæter et al. 2013; Dahl et al. 2004). Mange land har i dag overvåkningsprogrammer på jodstatusen i befolkningen ved å undersøke JKU for å kontrollere både jodmangelsykdommer (JMS) og sykdommer grunnet for høyt inntak av jod. Epidemiologiske studier av jodmangel og disse kontrollprogrammene behøver pålitelige metoder for å bestemme JKU, og det er også en fordel at metodene er forholdsvis enkle og raske. Den originale og kanskje mest kjente metoden for bestemmelse av jod i urin i rutineanalyser er Sandell-Kolthoff (S-K) reaksjon med spektrofotometrisk deteksjon. Denne metoden krever oksidativ prøvedekomponering for å fjerne potensielle interferenser før analyse, mens med ICP-MS er det mulig å utføre en direkte analyse etter kun fortykning av urinprøvene (Shelor & Dasgupta 2011). Med Agilent 8800 Trippel Kvadrupol ICP-MS som tilgjengelig analyseinstrument er det i denne oppgaven utført metodeutvikling og validering, samt analyse av urinprøver fra mødre og barn samlet inn av FHI for bestemmelse av jod.

Mikronæringsstoffer som jod er tilstede i varierende og ofte lave konsentrasjoner i kliniske prøvetyper som urin. I første del av oppgaven ønskes det derfor å utvikle en analysemetode for å komme så lavt som mulig ned i bestemmelsesgrense med akseptabel usikkerhet for at jod i urin kan bestemmes kvantitativt ved hjelp av ICP-MS med en oktapolbasert kollisjons- og reaksjonscelle. En utfordring blir å holde blankprøvene rene nok. Andre utfordringer i metoden blir å forbehandle urinprøvene på en slik måte at analytt holdes i løsning uten forstyrrelser fra matriks (som høyt innhold av TDS), samt ha kontroll på eventuelle spektralinterferenser og korrigerende av disse. For å oppnå dette er det under metodeutviklingen testet ulike enkle forbehandling av urinprøver; syredekomponering med mikrobølgeteknikk og tilsetning av diverse basiske reagenser med fortykning. En syredekomponering ble inkludert i tillegg til basisk tilsetning siden urin er en matriks med høyt innhold av salter og oppløst fast stoff. Analyttene Se og As skal også inkluderes i arbeidet, fordi det var av interesse for FHI til senere bruk. Disse analyttene er også involvert i skjoldbruskkjertelen og har stor effekt på menneskers helse (Meltzer 2014). Siden ICP-MS er en multigrunnstoffteknikk er det ønskelig å kunne bruke samme metode for alle disse analyttene. Denne første delen av mastergradsoppgaven inkluderer en vurdering av deteksjons- og kvantifiseringsgrenser, linearitet, måleområde, nøyaktighet, presisjon, robusthet og måleusikkerhet. Krav til valideringsparametere i metoden er å oppnå bestemmelsesgrenser på $\leq 5 \mu\text{g/L}$ for jod, $\leq 3 \mu\text{g/L}$ for Se og $\leq 1 \mu\text{g/L}$ for As med en usikkerhet i metoden lavere enn 10 % for alle grunnstoffene. Det ønskes også at lineariteten er tilstrekkelig god over et stort konsentrasjonsområde, helst med så lite fortykning av prøvene som mulig for minimal prøveopparbeidelse, og at I, Se og As blir bestemt med god nøyaktighet.

Oppsamlet døgnurin fra mødre og deres barn i alderen 6 til 12 år, med bostedsadresse Oslo og Akershus, ble samlet inn i forbindelse med prosjektet EXBISPHA ved FHI. I prosjektet ble det registrert kosthold og eventuell røyking de siste 24 timene før prøvetaking. I andre del av mastergradsoppgaven skal JKU bestemmes i reelle prøver for å kartlegge jodnivået til undergrupper i befolkningen ved bruk av den validerte metoden. Dette er interessant fordi disse gruppene var spesielt utsatt for jodmangel før krigen, det er grupper av befolkningen som fortsatt kan være utsatt for jodmangel, samtidig som at det ikke finnes noen dokumentasjon av JKU hos barn i Norge fra før. Ved å undersøke mor og barn er det mulig å sammenligne nivåene av jod hos disse to gruppene. Med informasjon om kjønn for barna og røykestatus for mødre er det også ønskelig å finne ut om det er forskjell i JKU hos jenter og gutter, samt hos røykere og ikke

røykere. Et annet formål er å undersøke om inntak av ulike matvaregrupper påvirker nivåene av jod i urinen. For å undersøke dette blir det brukt enkle korrelasjonsanalyser.

På grunnlag av krav til valideringsparametere i metoden er det formulert tre hypoteser:

Hypotese 1: Jod, selen og arsen kan bestemmes i samme analysemetode med en LOQ på mindre enn 5 µg/L for I, mindre enn 3 µg/L for Se og mindre enn 1 µg/L for As, med en usikkerhet på mindre enn 10 % i hele måleområdet.

Hypotese 2: Jod, selen og arsen kan bestemmes i samme analysemetode med god nøyaktighet uten alvorlige interferenser.

Hypotese 3: Jodnivået varierer mye fra person til person og fra dag til dag avhengig av kosthold.

Dersom hypotese 3 stemmer blir det viktig at analysemetoden har god linearitet over et stort måleområde.

2 Teori

2.1 Jod, selen og arsen

Det essensielle sporstoffet Se og det giftige grunnstoffet As er inkludert i arbeidet, fordi disse grunnstoffene også har betydning for skjoldbruskkjertelhormonene (Meltzer 2014). Selen er kofaktor i enzymene som omdanner T_4 til T_3 . Det er indikasjoner på at arsen kan hemme seleninkorporeringen i disse enzymene, men As kan også hemme opptaket av jod til tyreoida. Arsen finnes først og fremst i sjømat og er en god bio-indikator på inntaket av fisk (Birgisdottir et al. 2013). I tillegg til sin betydning for skjoldbruskkjertelhormonene har selen også betydning for immunforsvaret, antioksidantsystemet og syntese og reparasjon av DNA (Haug et al. 2007).

2.2 Jod

2.2.1 Generelt

Halogenet jod forekommer som vannløselig jodid (I^-) i små mengder over alt i både jord, vann, planter, dyr og mennesker. Grunnstoffet finnes i fri tilstand som molekylært jod (I_2) i naturen når jodid blir oksidert av oksygen eller andre oksidanter i luften. I mennesket blir jod fra maten absorbert som jodid via tarmen. Ved for lavt inntak av jod kan det oppstå ulike jodmangelsykdommer. Det har vært og er fortsatt stor progresjon i å kontrollere og forhindre JMS over hele verden etter at WHO vedtok en resolusjon i 1990 om å eliminere jodmangel (WHO & UNICEF 2007). Av de to milliarder menneskene rundt omkring i verden som har en risiko for jodmangel er det estimert at 20 % bor i Europa. Målet om å eliminere jodmangel ble stadfestet på nytt i 2002 av Forente Nasjoner (FN). Nå ønsker både Europeisk Union (EU) og Det Europeiske Frihandelsforbund (EFTA) mobilisering av alle europeiske regjeringer til å gjennomføre og overvåke bærekraftige programmer for å kontrollere og forebygge jodmangel i europeiske befolkninger (WHO & UNICEF 2007).

Den mest nylige studien på jodinntak som er gjennomført i Norge er fra Den norske mor og barn undersøkelsen (MoBa-undersøkelsen) i regi av Folkehelseinstituttet (Magnus et al. 2006). 119 kvinner som deltok i en validering av kostholdsskjemaet i MoBa-undersøkelsen samlet 24-timers urin. Selv om denne studien ikke er helt representativ for gruppen gravide i Norge, med en noe større andel med høyere utdanning og mindre andel av røykere, viste studien at 5 % av gruppen hadde et inntak av jod på mindre enn 50 $\mu\text{g}/\text{dag}$ basert på kostholdsdata (Brantsæter et al. 2013).

Historisk var jodmangel utbredt i Norge. Så sent som i 1938 hadde 80 % av skolebarna i Modum kommune synlig struma (Dahl & Meltzer 2009). I 1950 ble det satt i gang jod-berikning av kraftfôr til kyr, og dette tiltaket førte til at jodstatus har vært regnet som tilstrekkelig i Norge like siden. Selv om størsteparten av Norges befolkning siden 1950 har vært vel forsynt med jod er det likevel nødvendig å overvåke befolkningens jodstatus, fordi kostholdet kan endre seg i deler av befolkningen og fordi jodnivået fortsatt ikke er tilstrekkelig hos spesielt utsatte grupper. Siden mer enn 90 % av all jodinntak blir skilt ut i urin vil JKU som biomarkør reflektere nylig inntak av jod direkte (Makhmudov & Caldwell 2013). Det å ha 24-timers kostholdsdata i tillegg til urinprøver for bestemmelse av jod utgjør muligheten for å undersøke om inntak av mat med høyt jodinnhold faktisk gir høyere utskillelse av jod i urin.

2.2.2 Kostkilder og inntak

Hovedgrunnen til jodmangel er for lavt inntak av jod i kosten (WHO 2004). Kilder til jod via kostholdet varierer fra land til land. I Norge er det melk og melkeprodukter, fisk og sjømat, og egg som har høyest innhold av jod (Dahl et al. 2004). Obligatorisk tilsetning av jod til kraftfôr kombinert med et høyt inntak av melk og melkeprodukter har resultert i at denne matvaregruppen er den absolutt største kilden til jod i den norske befolkning. Studien av Dahl et al. (2004) om jodinnhold i norske matvarer og det norske kostholdet viser at melk og melkeprodukter sammen med fisk og fiskeprodukter bidrar med omtrent 80 % av det totale jodinntaket både for voksne og for barn. Innholdet av jod i melk og melkeprodukter varierer likevel mye avhengig av fôret og bruk av desinfeksjonsmiddel med jod i sammenheng med melking (NNR 2012). Inntaket av jod hos kyrne har vist seg å være sesongavhengig i og med at de spiser mindre kraftfôr om sommeren enn om vinteren (Brantsæter et al. 2013; Dahl et al. 2004; Haug et al. 2007). Jodinnholdet i mager fisk som torsk (*Gadus morhua*), sei (*Pollachius virens*) og hyse (*Melanogrammus aeglefinus*) er omtrent dobbelt så høyt sammenlignet med fet fisk som laks (*Salmo salar*), sild (*Clupea harengus*) og makrell (*Scomber scomber*). Tabell 2.1 viser en oversikt over jodkonsentrasjon i ulike norske matvaregrupper.

Jodifisering av bordsalt er den mest vanlige metoden for å bekjempe jodmangel i verdenssammenheng, men bidraget til inntak av jod via salt i Norge er ubetydelig på grunn av at bruken av denne typen salt er begrenset i norske husholdninger. Det er kun noen få merker som er tilsatt 5 µg I/g natriumklorid (NaCl) i tillegg til at matindustrien ikke bruker jodifisert salt.

Bidraget til jod fra drikkevannet er også ubetydelig i Norge (Dahl et al. 2004). Mengde jod i drikkevannet reflekterer ofte mengden jod i jorden, noe som varierer mye avhengig av det geografiske området. I Norge er innholdet av jod i jorden veldig lavt, og dette er også en grunn til at fôret til kuene blir tilsatt ekstra jod. Andre steder i verden kan jodinnholdet i jorden være veldig høyt, noe som fører til at drikkevannet kan bli en stor kilde til jod i den befolkningen. Kosttilskudd og sjøgress (tang og tare) kan være gode kilder til jod, men kostens tilførsel av jod er vanskelig å vurdere nettopp fordi informasjon om jodifisert salt, drikkevann, kosttilskudd og sjøgress ofte mangler. Bruken av kosttilskudd og sjøgress er også ofte begrenset til kun en del av befolkningen. Matvarer som brød og kornvarer, kjøtt og kjøttprodukter, og frukt og grønnsaker har et lavt innhold av jod (se Tabell 2.1).

Tabell 2.1 viser jodkonsentrasjonen ($\mu\text{g}/100\text{ g}$) i norske matvarer i gjennomsnitt, minimum og maksimum.

Matvaregruppe	n	Jod ($\mu\text{g}/100\text{ g}$)		
		Gjennomsnitt	Minimum	Maksimum
Mager fisk	393	86	3	1270
Fet fisk	313	40	5	161
Fiskeprodukter	44	59	8	176
Fisk som pålegg ^a	21	33	7	82
Andre fiskeprodukter ^b	17	12	3	36
Alle typer melk ^c	70	15	2	37
Yoghurt	9	18	12	24
Fløte og kremprodukter	10	11	6	17
Hvitost	20	38	13	75
Mysost	11	129	10	200
Egg	4 ^d	45	39	52
Kjøtt og kjøttprodukter	12	2	<1	7
Brød og korn	32	3	<1	9
Poteter	4 ^e	2	<1	4
Grønnsaker	24 ^f	2	<1	5
Frukt og bær	8 ^g	2	<1	4
Fett og oljer	3	2	<1	6
Vann	15	0,2	0,05	0,55

Kilde: Dahl et al. (2004). Tabellen er oversatt til norsk.

n=antall prøver analysert.

^a Makrell i tomatsaus, brisling i tomat og i olje, syltet sild, kaviar, røkt ørret og makrell, krabbepostei og torskeleverpostei.

^b Reker, ferskvannsrørret og tunfisk i olje på boks.

^c Helmelk, lettmeik, ekstra lettmeik, skummet melk og surmelk, fra sommer- og vintersesong.

^d Hver prøve bestod av 90 egg.

^e Tre prøver bestod av 4 delprøver og én prøve bestod av 25 delprøver.

^f Hver prøve bestod av 2-9 delprøver.

^g Hver prøve bestod av 2-17 delprøver.

Viktigheten av melk og fisk i kosten for å opprettholde jodnivået gjør at undergrupper i befolkningen har større risiko for lavt inntak av jod; folk med allergi mot melk eller fisk, vegetarianere som ikke spiser fisk, melk og melkeprodukter (veganere), og andre med lavt inntak av fisk og melk (Dahl & Meltzer 2009). Studien av Dahl et al. (2004) viser at gutter på 9 år har et høyt inntak av melk og derfor et høyt inntak av jod. Jenter på 13 år har lavest inntak på grunn av lavere inntak av melk sammenlignet med andre aldersgrupper hos barn. Når det kommer til inntaket av fisk har denne naturlige jodkilden blitt redusert de siste tiårene, og unge kvinner har det laveste inntaket (Brantsæter et al. 2009).

2.2.3 Fysiologi og metabolisme

Tyreoideahormonene, tyroksin (T_4) og den biologisk aktive formen trijodotyronin (T_3), er nødvendige for normal vekst, utvikling og metabolisme gjennom livet. Jod er en integrert komponent i disse hormonene som blant annet finnes i skjoldbruskkjertelen, og mangel på jod påvirker syntesen av disse hormonene. Opptak og utnyttelse av jod i skjoldbruskkjertelen forekommer via aktivt opptak av jodid, innarbeidelse av jod i proteinet tyreoglobulin (Tg) og jodtyrosin, samt utskillelse av jodtyronin, T_3 og T_4 (NNR 2012). Det er det tyreoidea-stimulerende hormonet (TSH) fra hypofysen som regulerer dannelsen av disse tyreoideahormonene. TSH regulerer også opptaket av jod i andre vev, som spyttkjertlene, årehinnen og de ammende melkekjertlene (Aakre 2011). Virkningsmekanismen for økt metabolisme i kroppscellene av tyreoideahormonene er ikke helt kjent, men proteinsyntesen øker og både størrelsen og antall mitokondrier øker – noe som tyder på økt produksjon av den energirike forbindelsen adenosintrifosfat (ATP) (NNR 2012).

Absorpsjon i tarmen er nesten fullstendig for jod fra maten, og over 90 % blir skilt ut i urin via nyrene (ikke så mye hos ammende mødre). Utskillelse via avføring er liten, og tap av jod gjennom huden er enda mindre. Akkumulering av jod i skjoldbruskkjertelen og i melkekjertlene foregår ved hjelp av et membranprotein kalt natrium-jodid transportør (NIS). Denne transportøren er en ionepumpe som pumper to Na^+ kationer for hvert I^- anion inn i cellene. Det er mange kjemiske komponenter som kan hemme NIS. Et eksempel er svovelholdige glukosider, som glukosinolater. Dette er bestanddeler i maten som kan brytes ned til tiocyanat som så kan hemme opptaket av jod eller interagere med hormonproduksjonen (NNR 2012). Glukosinolater finnes i kålvekster som brokkoli, nepe, kålrot og rosenkål. Til tross for dette er nivåene av

glukosinolater i det nordiske kostholdet for lavt til at det skal kunne påvirke jodstatusen. I følge Laurberg et al. (2004) er røyking av tobakk en stor kilde til tiocyanat i mennesker. Det er funnet at tiocyanat finnes i høyere konsentrasjon i serum hos røykende mødre enn hos de som ikke røyker. Dette fører til lavere jodkonsentrasjon i morsmelk hos røykende mødre på grunn av svekket jodopptak til melkekjertlene. Melkekjertlene absorberer jod under både graviditet og amming, og forsyner dermed barnet med jod. JKU hos spedbarn har også vist seg å være lavere for de med røykende mødre i svangerskapet i følge denne studien. Selv om tiocyanat hemmer opptaket av jod i natrium-jodid pumpen kan det ikke utelukkes at andre kjemikalier fra røyk er involvert.

Selv om den beste metoden for å bestemme jodkonsentrasjon på er ved analyse av urin, er det også mulig å bestemme jodstatusen ved å undersøke tyreoidavolum og konsentrasjoner av TSH og Tg i serum (WHO et al. 2007). For høye TSH-verdier hos nyfødte er den beste indikasjonen for å forutse hjerneskader og nedsatt funksjon av intellektuell utvikling (WHO & UNICEF 2007).

2.2.4 Helseeffekter

Jodmangel har mange negative effekter på menneskets vekst og utvikling. Disse effektene kan med en samlebetegnelse kalles for jodmangelsykdommer. JMS forekommer ved mangelfull syntese av tyreoidahormonene på grunn av utilstrekkelig inntak av jod. Kretinisme er det mest ekstreme utfallet av JMS (WHO & UNICEF 2007). Kjennetegnene til denne sykdommen er nedsatt vekst og irreversible mentale forstyrrelser. Det er blitt en veldig sjelden sykdom og har så godt som forsvunnet i Europa. De mest ødeleggende konsekvensene av jodmangel forekommer under fosterutviklingen og i tiden rett etter fødsel. Alvorlig jodmangel i denne kritiske perioden vil derfor kunne føre til økt spedbarnsdødelighet, lav fødselsvekt, jodindusert hypotyreose (JIH), hjerneskader og andre medfødte misdannelser ved at syntesen av tyreoidahormonene blir påvirket. Hypotyreose forekommer når skjoldbruskkjertelen produserer for lite hormoner (lavt stoffskifte), og den kliniske konsekvensen av dette er mental utviklingshemming. Til og med milde og moderate grader av jodmangel er av stor bekymring. Disse gradene av psykisk utviklingshemming hos barn kan føre til dårligere prestasjon på skolen, lavere intellektuelle evner og nedsatt arbeidsevne. Jodmangel er den største enkeltårsaken til hjerneskader i verden, men er også det helseproblemet som er lettest å

forhindre. Et tilstrekkelig inntak av jod hos gravide kvinner er derfor svært viktig ettersom det er de som forsyner hjernen til fosteret med tyreoiderhormoner.

Det er ikke bare barn som får konsekvenser på grunn av jodmangelsykdommer. JMS forekommer også i den voksne befolkningen. Utvikling av struma kan forekomme i alle perioder i livet. Denne tilstanden av forstørret skjoldbruskkjertel kan utvikles ved høyt stoffskifte, lavt stoffskifte og ved normalt stoffskifte. Hos voksne kan for lavt inntak av jod også føre til nedsatt fruktbarhet. I følge Dunn (2000) sitert av Aakre (2011) har høy forekomst av spontanaborter blitt rapportert fra områder med jodmangel, mens korreksjon av jodmangel hos gravide kvinner har vist seg å redusere både spontanaborten og spedbarnsdødeligheten.

Det kan også forekomme sykdom på skjoldbruskkjertelen ved inntak av for mye jod. Selv om tilskudd av jod er viktig for å bekjempe jodmangel og JMS bør dette foregå på en sikker måte. Det vil si at nivåer av jod som er mer enn tilstrekkelig ikke nødvendigvis er trygt. Mye tyder på at et for høyt inntak av jod gir de samme utfallene som ved inntak av for lite jod (European Commission 2002). Faren for å få i seg for mye jod er spesielt viktig for folk som har lidd av ulike grader jodmangel før og de med potensielle autoimmune sykdommer på tyreoida (Teng et al. 2006). Tilskudd av mer enn tilstrekkelige mengder jod til disse personene kan føre til en akselerering i utviklingen av subklinisk hypotyreose til åpenlys hypertyreose (høyt stoffskifte).

2.2.5 Anbefalinger

For å nå målet om eliminering av JMS er det nødvendig å opprettholde kontrollprogrammene og overvåkingen av jodstatus i enhver befolkning. Derfor har WHO etablert enkelte kriterier. Disse kriteriene er nokså like de nordiske anbefalingene som er vist i Tabell 2.2 med kun litt høyere anbefalt inntak for gravide og ammende (250 µg/dag). De øvre inntaksgrensene for jod hos voksne varierer fra 500 µg/dag i Frankrike til 1100 µg/dag i USA (WHO & UNICEF 2007). I følge den norske studien av Dahl et al. (2004) hadde ingen av de voksne et inntak av jod høyere enn 1 mg/dag. Dette var grensen satt av NNR i 2004. Fra 2012 har denne grensen vært på 600 µg/dag.

Tabell 2.2 viser de nordiske anbefalingene for inntak av jod i µg/dag.

	Voksne	Barn			Gravide	Ammende
		2-5 år	6-9 år	10-13 år		
Anbefalt daglig inntak	150	90	120	150	175	200
Gjennomsnittlig behov	100					
Nedre inntaksnivå	70					
Øvre inntaksnivå	600					

Tabellen er hentet fra NNR (2012) og oversatt til norsk.

Optimalt inntak av jod som median jodkonsentrasjon i urin (mJKU) ligger på 100-199 µg/L, og mJKU på mindre enn 100 µg/L definerer en befolkning med mild, moderat eller alvorlig jodmangel (se Tabell 2.3). Denne tabellen beskriver jodstatus og jodinntak basert på median JKU i ulike grupper.

Tabell 2.3 viser epidemiologiske kriterier for vurdering av jodstatus basert på median JKU hos barn i skolealder (6-13 år) og gravide kvinner.

	Median JKU (µg/L)	Jodinntak	Jodstatus
Barn over 6 år og voksne	<20	Utilstrekkelig	Alvorlig jodmangel
	20-49	Utilstrekkelig	Moderat jodmangel
	50-99	Utilstrekkelig	Mild jodmangel
	100-199	Tilstrekkelig	Optimalt
	200-299	Mer enn tilstrekkelig	Risiko for jodindusert hypertyreose innen 5-10 år etter inntak av jodifisert salt i utsatte grupper
	≥300	For mye	Risiko for negative helseeffekter (jodindusert hypertyreose, autoimmune sykdommer på tyreoida)
Gravide kvinner	<150	Utilstrekkelig	
	150-249	Tilstrekkelig	
	250-499	Mer enn tilstrekkelig	
	≥500	For mye	
Ammende kvinner og barn mindre enn 2 år	<100	Utilstrekkelig	
	≥500	For mye	

Tabellen er omarbeidet fra WHO et al. (2007) og oversatt til norsk.

”For mye” betyr mer enn det som trengs for å hindre og kontrollere jodmangel.

Selv om ammende kvinner har det samme behovet som gravide kvinner er median JKU lavere fordi jod blir skilt ut i morsmelk.

2.2.6 Tiltak

Alle Europeiske land har godkjent et mål om å eliminere jodmangel, og jodifisering av salt er den mest effektive måten å gjøre dette på. Selv om dekningsgraden av jodert salt i husholdninger har

økt betraktelig siden 1990 har den europeiske regionen blitt pekt ut av WHO til å ha den laveste dekningsgraden av jodifisert salt blant alle regionene (WHO & UNICEF 2007). Når det er tilstrekkelige nivåer av jod i salt må dette nå ut til husholdningene, og slikt salt må også bli brukt av matindustrien ettersom mesteparten av saltinntaket kommer fra bearbeidet mat. Jodifisert salt kan nok ikke løse problemet for alle befolkninger. Derfor tas det også i bruk jodifisert olje, drikkevann, te og sukker. For land som Norge og Finland er tilsetning av jod til kraftfôret et godt tiltak for å redusere jodmangel. Det beste tiltaket for å sikre tilstrekkelig inntak av jod i enhver befolkning er å fortsette med overvåking av jodkonsentrasjon i matvarer og jodstatusen til befolkningen.

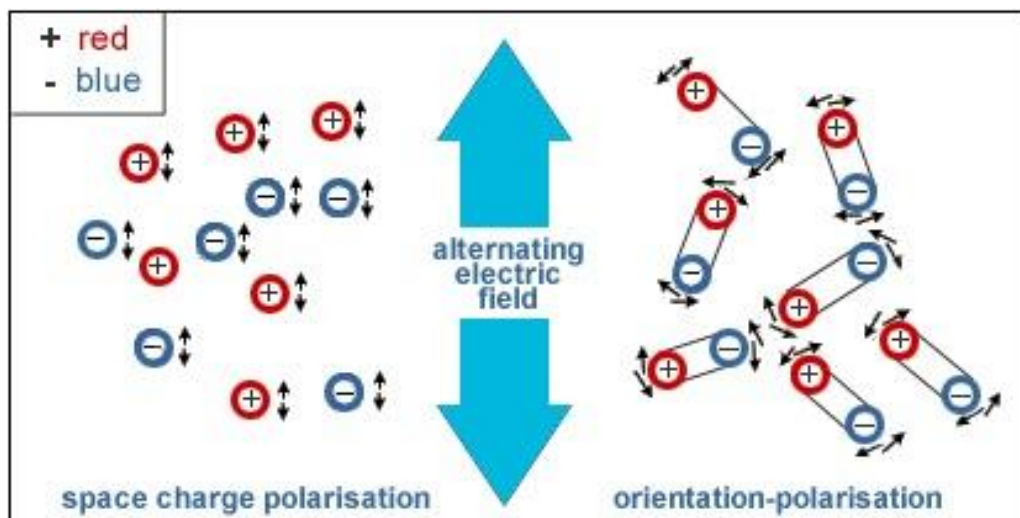
Mange land har i dag kontrollprogrammer som overvåker JKU, men flere land som er berørte av jodmangel har verken det nødvendige laboratoriestyret eller folk med de riktige kvalifikasjonene som skal til for å kunne overvåke nivåene av jod i saltet og i menneskene som er berørte. Dette er grunnen til at det er satt opp et nettverk av regionale laboratorier med de nødvendige ressursene som kan hjelpe slike land med overvåking av deres programmer. "Centers for Disease Control and Prevention" (CDC) har et slikt program som tar for seg utfordringene med jodmangelsykdommer ved å sikre kvalitet på analyser av JKU (se Makhmudov og Caldwell (2013) for mer).

2.3 Analysemetode

Bestemmelse av jod i urin i rutineanalyser blir gjennomført nesten utelukkende ved bruk av enten Sandell-Kolthoff reaksjon eller ICP-MS. Førstnevnte er en spektrofotometrisk metode der urinprøvene først blir syredekomponert under milde forhold før jodid katalyserer reduksjonen av gult ceriumoksyd ammoniumsulfat (Ce^{4+}) til fargeløst Ce^{3+} i nærvær av arsenitt (As^{3+}) (Soldin 2002; WHO 2013). I følge Shelor og Dasgupta (2011) kan også jodat katalysere reduksjonen, men i mye mindre grad sammenlignet med jodid. Jodat vil i tillegg bli omgjort til jodid i nærvær av arsenitt i sure omgivelser. Organiske jodforbindelser vil ikke reagere uten dekomponering. Mange organiske komponenter kan interferere med reaksjonen, og derfor er en fullstendig dekomponering nødvendig. Dersom det er mye tiocyanat tilstede vil denne komponenten kunne interferere med den følsomme kolorimetri som benyttes i S-K reaksjon. Ved bruk av ICP-MS kan urinprøvene måles direkte etter fortynning, og tiocyanat vil ikke være en mulig interferens.

2.3.1 Lukket dekomponering med mikrobølgeteknikk

I metodeutviklingen har urinprøver blitt dekomponert ved hjelp av mikrobølgeteknikk med Ultraclave. Grunnen til dekomponering er at produktet blir en homogen løsning med lavt organisk innhold. Dette oppnås ved høye temperaturer, fordi reaksjonshastigheten er avhengig av temperatur. Prinsippet for mikrobølgeteknikken er at mikrobølgene gir et vekslende elektromagnetisk felt på prøvene. Dette fører til dipolrotasjon og ionisk migrasjon som skaper friksjonsvarme (se Figur 2.1).



Figur 2.1 viser at et elektromagnetisk felt skaper en dipolrotasjon og ionisk migrasjon som gir friksjonsvarme (Püschner Microwave Power Systems).

Teflonbeholdere med prøve blir tilsatt syre og satt ned i en load av vann, svovelsyre (H_2SO_4) og hydrogenperoksid (H_2O_2). Det er ikke kontakt mellom væsken inni beholderne og loaden, men loaden gjør at beholderne oppnår lik temperatur. Prinsippet for Ultraclaven er at mottrykk motvirker koking (Jensen 2012). Ved høyt trykk vil aldri damptrykket bli like høyt som det ytre trykk og løsningen vil dermed aldri koke. Dette hindrer krysskontaminering mellom prøvene. Nitrogengass (N_2) reagerer ikke med andre komponenter i prøven og passer dermed bra som trykksetter. Trykk alene vil ikke kunne dekomponere prøven, men trykket gjør at det oppnås høye temperaturer, og det er den høye temperaturen og den oksiderende salpetersyren som gjør at prøvene blir dekomponert. Oksidasjon av organisk materiale er en eksoterm reaksjon, så dersom reaksjonshastigheten er veldig høy vil temperaturstigningen komme ut av kontroll. Temperaturen stiger derfor trinnvis. Syre i loaden gir SO_4^{2-} og H_3O^+ og absorberer energien i mikrobølgene, mens hydrogenperoksid oksiderer nitrøse gasser (NO_x) til nitrat (NO_3^-). Tilsetning

av H_2O_2 fører til lite NO_x som kan sive ut av beholderen og ut til kammeret for så å øke trykket. Trykket i beholderen holdes kontrollert av N_2 -trykket. Det er meget viktig å holde alt av utstyr rent og bruke rene syrer for å unngå forurensning og oppnå lave bestemmelsesgrenser under analyse. Det er også viktig tenke over hvilke grunnstoffer som skal bestemmes for å kunne løse prøven på best mulig måte med hensyn på valg av syre og program på Ultraclaven. Ved valg av syre må det tas hensyn til eventuelle interferenser som kan dannes, og det må passes på at prøven ikke blir flyktig eller feller ut med den aktuelle syren. HNO_3 er et godt syrevalg for denne analysen ettersom den er meget oksiderende ved høye temperaturer. Prøvemengden og hvilke beholdere som brukes under dekomponering er også viktige faktorer. Teflon og kvarts er godt egnet som beholdere i og med at disse slipper gjennom mikrobølgene uten at energien blir absorbert. Det må ikke være så mye prøvemateriale at man ikke sikrer fullstendig dekomponering, men samtidig må det være nok prøvemateriale til å kunne detektere analytt ved analyse.

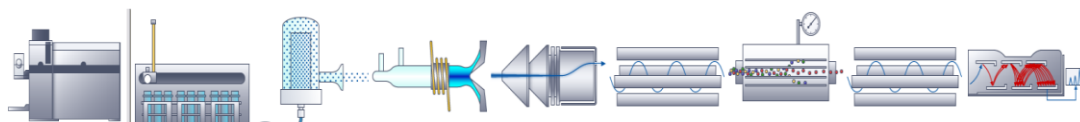
Blankprøver og standard referansemateriale skal gjennom samme opparbeidelse som prøvene og inkluderes derfor i dekomponeringen. Blankprøver benyttes for å undersøke renhet av kjemikalier og utstyr, og kan brukes til å finne eventuelle tilfeldige- eller systematiske feil. Ulike resultater i blankprøvene kan tyde på tilfeldige feil, som brukerfeil eller urent utstyr, og presisjonen i analysen vil bli dårligere. Systematiske feil, som forurensning fra kjemikalier, kan korrigeres for ved å trekke fra resultatet av blankprøve fra prøve.

2.3.2 Induktivt koblet plasma massespektrometri

ICP-MS har siden tidlig 1980-tallet vært en svært viktig multigrunnstoffteknikk. Denne analysemetoden kan kvantifisere grunnstoffer helt ned til pg/L i ulike matriser, den har et stort, lineært konsentrasjonsområde og den gir både raske og presise resultater. ICP-MS blir brukt for bestemmelse av grunnstoffer ved å måle mengde eller isotopforhold i et massespektrometer (MS). Mengden eller isotopforholdet blir målt i form av ioner som blir dannet i et induktivt koblet argonplasma (ICP). Prøven i væskeform føres med bæregassen argon (Ar) inn til plasmaet der analyttene blir overført til positivt ladede ioner. Ionene blir så ekstrahert til høyvakuum via en interface, deretter fokusert i et ionelinsesystem, separert etter masse/ladningsforhold og til slutt detektert og målt i en detektor.

2.3.2.1 Instrumentelt

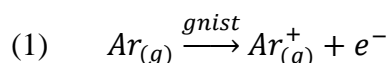
Instrumentet består av et prøveintroduksjonssystem, en ionisasjonskilde, et ionetransportsystem, masseseparasjonsenheter, kollisjons-/reaksjonscelle og detektor (se Figur 2.2).



Figur 2.2 viser skjematisk oppsett av en ICP-QQQ-MS (utklipp fra Masshunter programvare).

Prøven blir først pumpet gjennom et kapillær med en peristaltisk pumpe som en pulsfri og konstant væskestrøm. Prøven blir deretter sprøytet inn i et blandingskammer ved hjelp av en konsentrisk forstøver. Denne forstøveren introduserer prøven til plasmaet i en fin spray av aerosoler ved hjelp av gass med høy hastighet. Forstøveren kan lett gå tett dersom prøven inneholder partikler. I blandingskammeret vil derfor kun dråper mindre enn 10 μm kunne gå videre til plasmaet. Blandingskammeret er kjølt ned til 2 grader Celsius ($^{\circ}\text{C}$) for å få lavere oksiddannelse. Temperaturen her kan være avgjørende for effektiviteten til plasmaet ved å påvirke mengden av vanddamp som kommer inn til plasmaet slik at temperaturen i plasmaet ikke blir redusert.

Ionisasjonskilden i ICP-MS er et induktivt koblet argonplasma. Plasmaet dannes inne i et kvartsrør eller en torch som har en avkjølt kobberspole rundt seg. Torchen består av tre konsentriske rør med en strøm av argongass. Kobberspolen rundt torchen blir tilført et radiofrekvent potensial og det dannes et elektromagnetisk felt. Når ioner og elektroner vekselvirker med dette elektromagnetiske feltet blir det dannet friksjonsvarme (se likning 1).



Ionene som dannes blir akselerert og kolliderer med andre argonatomer som igjen ioniseres. Dette gjør at plasmaet bygges opp og temperaturen blir svært høy.

Temperaturfordelingen i plasmaet varierer sterkt og kan komme helt opp mot 10 000 Kelvin (K). Dette gjør at fordampning, atomisering og ionisering skjer umiddelbart, og de fleste grunnstoffer blir mer enn 90 % ionisert i det varme plasmaet. Det er derimot noen unntak for grunnstoffer med omtrent lik eller høyere første ioniseringspotensial (IP) enn argon med et første ioniseringspotensial på 15,76 elektronvolt (eV). Dette gjelder for blant annet halogenene, Se, As, kvikksølv (Hg), fosfor (P) og svovel (S). Slike grunnstoffer blir ionisert i relativt liten grad, og størstedelen vil dermed forbli på atomær form. Jod har et første ioniseringspotensial på 10,451 eV, som er høyt. Kun rundt 25 % av jod blir ionisert i plasmaet (Haldimann et al. 1998; Shelor & Dasgupta 2011), men til tross for dette kan jod lett bestemmes med lav følsomhet på ICP-MS. Rekombinasjon av prøve, matriks og argonioner kan finne sted i de kaldere sonene i plasmaet som kan føre til uønskede molekulære forbindelser (se mer om dette i kapittel 2.3.2.4).

Ionetransportsystemet består av en interface og et ionelinsesystem. Ionene må transporteres fra argonplasmaet der det er høy temperatur, høyt trykk (760 torr) og et korrosivt miljø til massespektrometeret der det er lavt trykk (10^{-5} torr) og romtemperatur. Dette blir gjort ved hjelp av interface-området. Dette området består av to nikkell- eller platinakoner som ekstraherer ionene fra plasmaet ved hjelp av en høykapasitets rotasjonsvakuumpumpe og turbopumper som opprettholder trykket på henholdsvis 1–3 torr og 10^{-5} torr. Mestdelen av argonatomene blir fjernet før ionestrålen blir videre ekstrahert til fremre del av massespektrometeret hvor ionelinsesystemet sitter. De positivt ladede ionelinsene gjør det mulig å ekstrahere positivt ladede ioner fra en matriks med nøytrale forbindelser eller fotoner, og fokusere strålen inn i massespektrometeret med både store og små ioner. Dette gjør at verken fotoner eller nøytrale partikler kan bli detektert for så å skape tilfeldig bakgrunnsstøy (Agilent Technologies 2005).

Kvadrupol MS er det som vanligvis brukes som masseseparasjonsenhet. Dette massefilteret separer ioner etter masse/-ladningsforhold. Kvadrupol MS består av to elektrisk ladede stavpar med et varierende like- og vekselstrømpotensial. Det blir dannet et komplekst elektromagnetisk felt mellom stavene som avgjør banen til ionene. For en gitt kombinasjon av spenning og frekvens vil kun ioner med en spesifikk masse/ladning (m/Z) gå gjennom massespektrometeret. Ioner med høyere eller lavere masse/-ladningsforhold vil få ustabile baner, treffe stavene, bli nøytralisert og dermed ikke detektert. Kvadrupol MS kan ikke skille mellom ladede partikler fra

ulike forbindelser som har samme masse/-ladningsforhold, for eksempel isotoper fra ulike grunnstoff, molekylære ioner og forbindelser med dobbel ladning.

Detektoren finnes under et meget lavt trykk ($\sim 10^{-5}$ torr). Detektoren registrerer, forsterker og måler antall analyttioner som når detektoren. Detektoren som er brukt i denne oppgaven er utstyrt med en "dual-stage discrete dynode detector". Positivt ladede ioner fra MS trekkes mot den negativt ladede dynoden og slår løs elektroner fra overflaten som blir tiltrukket mot den neste dynoden som er positivt ladet. Denne dynoden slår igjen løs nye elektroner og prosessen fortsetter slik at ionesignalet blir forsterket. Signalintensiteten måles simultant ved to ulike steder i detektoren. I fremre del av detektoren måles signalet som en strøm og blir omgjort til tellinger per sekund (cps). Dette brukes til å måle høye konsentrasjoner, mens den nedre delen av detektoren måler lavintensitetssignaler. Denne kombinasjonen med to trinn gjør at det kan måles lineært over et stort område. Signalene som blir detektert for hver masse vises som et massespektrum. Størrelsen på hver topp i massespekteret tilsvarer konsentrasjonen av et grunnstoff i prøven. Kvantitative resultater fås ved å sammenligne disse signalintensitetene med kalibrerte standarder (Agilent Technologies 2005).

2.3.2.2 Kalibrering

Det finnes en del ulike måter å kalibrere instrumentet på. Ekstern standardisering er mye brukt, og brukes også i dette tilfellet i tillegg til internstandardisering. Ekstern standardisering benyttes ved at en kalibreringsblank og en kalibreringsstandard med kjente konsentrasjoner som dekker måleområdet blir brukt til å lage en lineær kalibreringskurve tvunget gjennom origo.

Signalintensiteten i standarden brukes til å beregne konsentrasjon av analytter i ukjent prøve. Å tilsette en internstandard (IS) vil si å normalisere alle data mot en ikke-analyttisotop som er tilstede i lik konsentrasjon i alle prøver og standarder som skal analyseres (Jensen 2012). Den har som funksjon å vise om det er tap underveis i analysen, siden forholdet mellom analytt og IS hele tiden er likt. Dette gjør at det lett kan korrigeres for eventuelle tap som skjer under prøveprepareringen. Denne internstandard bør ligge i samme masseområde og ha tilnærmet likt første IP som analytten. I følge Vanhaecke et al. (1992) sitert av (Ataro et al. 2008) vil det å velge en IS i samme masseområde som aktuell analytt føre til bedre presisjon. Dersom det er drift i instrumentet vil dette vises på både analytt og IS. Fysiske interferenser, som at høy viskositet eller komplisert matriks gir redusert forstøvergass, som igjen gir mindre prøve inn i

instrumentet og dermed lavere signal, kan korrigeres ved hjelp av at IS oppfører seg likt som analytten.

2.3.2.3 Metodeutvikling

Mange spørsmål må bli stilt og flere forhold må vurderes i forkant av en metodeutvikling. ”Hva er nødvendig for at matriks ikke endres og at analyttene holdes i løsning ved analyse?” og ”hvordan unngå kontaminering?” er spørsmål det er viktig å tenke over på forhånd. Det er lurt å planlegge både lagringsmetode og behandling av beholdere i forkant. Hvilken isotop som velges for hvert grunnstoff i en analyse er avhengig av hvor alvorlig potensielle interferenser er. Ideelt sett foretrekkes den isotopen av grunnstoffet med størst forekomst for å få best mulig respons. Dersom den isotopen med størst forekomst har potensielle interferenser som er for alvorlige til å gjøre korreksjoner på velges den isotopen som er nest størst i forekomst. Som beskrevet i forrige kapittel er også valg av IS viktig for analysen, samt dens konsentrasjon. Konsentrasjonen av IS er spesielt viktig for sporanalyser. Mange grunnstoffer finnes overalt i små mengder og det blir dermed vanskelig å finne en IS som ikke finnes i prøvetypen fra før. Dersom IS finnes i prøven i små mengder er det mulig å tilsette internstandard i en konsentrasjon slik at bidraget fra prøven blir ubetydelig (Wahlen et al. 2005).

2.3.2.4 Interferenser

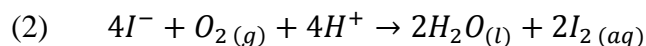
På grunn av den høye temperaturen i plasmaet vil ikke denne metoden ha de klassiske kjemiske interferensene. I tillegg har dette instrumentet god kontroll på interferensene som kan oppstå. Spektralinterferenser er nok det mest vanlige, men selv disse kan være forutsigbare og kan dermed lett korrigeres for. Ved å måle to isotoper av samme grunnstoff kan spektralinterferenser oppdages ved at disse er ulike. Isobare interferenser oppstår når ulike grunnstoff har samme masse (eksempelvis $^{114}\text{Cd}^+$ (kadmium) og $^{114}\text{Sn}^+$ (tinn) eller $^{80}\text{Se}^+$ og $^{80}\text{Kr}^+$ (krypton)). Denne typen interferens kan lett unngås ved å velge en annen isotop, eller ved at en annen bølgelengde av interferensen måles og korrigeres med en faktor som trekkes fra den rene prøven. Det kan også forekomme molekylære interferenser som dannes ved rekombinasjon i kalde soner i plasma av prøve og matriksioner med argon eller andre matrikskomponenter (for eksempel $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$ med $^{75}\text{As}^+$ og $^{40}\text{Ar}^{2+}$ med $^{80}\text{Se}^+$ (May & Wiedmeyer 1998)). Disse er som regel forutsigbare og kan korrigeres ved å enten velge en annen isotop eller måle på en interferensløsning og finne en

passende korreksjonsfaktor. Det kan også forekomme dobbeltladede ioner som også er en type spektralinterferens. De vil interferere med analytter som har halve massen, fordi massespektrometeret skiller etter masse/ladning (eksempelvis $^{136}\text{Ba}^{2+}$ (barium) med $^{68}\text{Zn}^+$ (sink)), men siden første IP til argon er større enn for de fleste grunnstoff, men mindre enn andre IP for de fleste, vil mestedelen av ioner i argonplasmaet kun ha én ladning. Mange interferenser kan minimaliseres ved å optimalisere instrumentet med hensyn på gasstrøm, effekt og andre instrumentelle måleparametere. Mestdelen av optimaliseringen skjer automatisk med Agilent 8800 QQQ. Matematiske korreksjoner blir brukt i mange tilfeller av disse spektralinterferensene.

Matriksinterferenser kan oppstå ved for eksempel høye konsentrasjoner av oppløst fast stoff i prøvene. Dette problemet kan unngås ved å fortynne prøven eller minske prøvemengden. Med tidligere instrumenter er det måttet sørget for at oppløst fast stoff ikke overstiger 0,1 % (w/V), men ved hjelp av en såkalt høy matriksindeks (HMI) er denne matrikstoleransen økt til 2 % (Agilent Technologies 2012). Dette gir økt temperatur i plasma som kan føre til flere dobbeltladede ioner, men minsker muligheten for molekylære forbindelser. Urin inneholder en del av både karbon og ulike salter. Dersom for mye av dette kommer inn i plasmaet vil det absorbere mye av energien, og ionisasjonseffekten til analytten vil bli svekket. Avsetning av karbon på prøveintroduksjonssystemet kan forekomme, og det er ikke ønskelig på grunn av gjentetting. Det kan også forekomme lett ioniserbare matrikskomponenter (for eksempel natrium) som gjør at ionisasjonseffekten til analytten blir lavere i plasma. Dette kan også unngås med fortynning eller fjerning av de lett ioniserbare forbindelsene. Tunge matrikskomponenter, som uran (U) og bly (Pb), har høyere kinetisk energi gjennom interfacen og ioneoptikken enn lettere matrikskomponenter. Når tettheten blir høy vil ionene frastøte hverandre og de lette massene vil bli presset ut av ionestrålen, noe som fører til at signalintensiteten til de lave massene minker ("space charge effect"). Andre fysiske interferenser som kan oppstå er ulik matriks i prøve og standard. Dette gir ulik viskositet som gir ulik forstøving og forskjellig intensitet. Fysiske interferenser kan fjernes ved å fortynne prøvene, tilsette IS og/eller ved å tilpasse matriks i kalibreringsstandard.

Et alvorlig problem ved bestemmelse av jod i urin på ICP-MS er minneeffekter (Al-Ammar et al. 2001; Haldimann et al. 1998). Ved lav pH vil nemlig jodid bli oksidert til flyktig molekylært jod (se likning 2). Minneeffekter av jod forekommer på grunn av adsorpsjon av jodforbindelser

på forstøveren og av fordampning fra flyktig hydrogenjodid (HI) og molekylært jod (I₂) fra blandingskammeret i sur løsning. Tilsetning av ammoniakk i prøveløsningene har vist seg å eliminere disse minneeffektene av jod ved dannelse av ikke-flyktig NH₄I. Høy pH generelt hindrer både oksidering av I⁻ til I₂ og dannelse av HI (Reid et al. 2008).

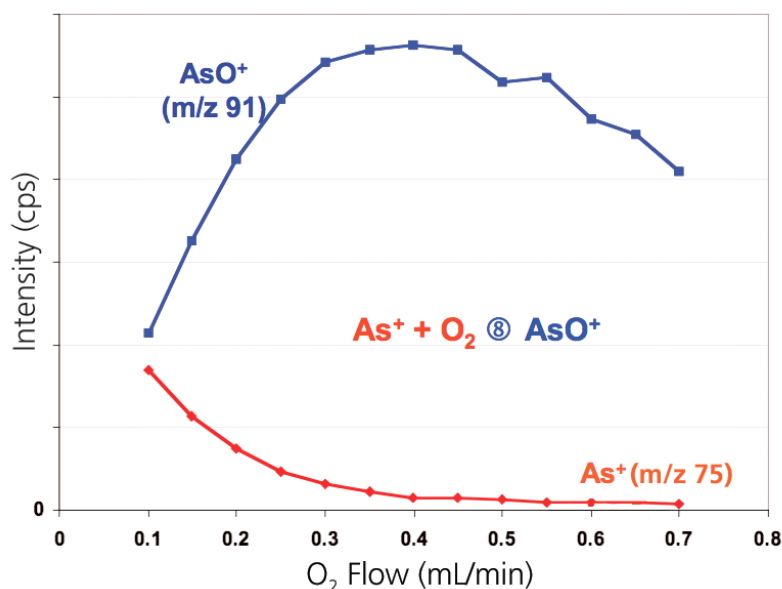


Xenon (Xe) forekommer som en forurensning i argon plasmagassen. Dette gjør at den naturlige isotopen ¹²⁹Xe⁺ interfererer med radioaktivt jod (¹²⁹I⁺) ved å gi en veldig høy bakgrunn på den allerede lave konsentrasjonen av ¹²⁹I. Interferenser på ¹²⁹I⁺ signalet kan også komme fra ¹²⁷IH₂⁺ og ¹¹³Cd¹⁶O⁺ (Agilent Technologies 2013; Hou et al. 2009; Izmer et al. 2003). På den ønskede analytten ¹²⁷I⁺ kan det oppstå interferens med molybdendioksid (⁹⁵Mo¹⁶O₂⁺). Ved benyttelse av trippel kvadrupol ICP-MS kan disse interferensene lett fjernes (se kapittelet nedenfor).

2.3.2.5 Spesielt om Agilent 8800 QQQ

Instrumentet som er brukt i dette arbeidet har en forkvadrupol (Q1), en kollisjons/-reaksjonscelle (oktapol) og en ny kvadrupol (Q2) før detektoren. Dette blir en annen måte å korrigere for ulike interferenser på sammenlignet med enkel kvadrupol ICP-MS. Forkvadrupolen kan stilles inn slik at kun den ønskede analyttmassen går gjennom, mens andre masser ikke kommer gjennom. For eksempel med ⁸⁰Se⁺ som analytt og oksygen (O₂) som reaksjonsgass vil en tradisjonell ICP-MS kunne unngå interferenser som Ar²⁺, Gd⁺⁺ (gadolinium) og Dy⁺⁺ (dysprosium) ved at Se reagerer med O₂ og får massen 96. Ulempen er at zirkonium (Zr), molybden (Mo) og ruthenium (Ru) også har masse 96, og vil dermed gi feil signal for selen. Med ICP-MS-QQQ er det mulig å stille inn forkvadrupolen slik at kun isotoper med masse 80 passerer. Isotopen ⁸⁰Se⁺ reagerer med oksygen til ⁸⁰Se¹⁶O⁺. Denne blir så målt på masse/ladning 96, uten at Zr, Mo og Ru blir detektert, fordi de er allerede blitt avvist av forkvadrupolen, Q1. Det samme gjelder for interferensen ⁹⁵Mo¹⁶O₂⁺ på ¹²⁷I⁺. Den største fordelten med dette instrumentet i forhold til andre ICP-MS instrumenter er at de fleste interferenser kan unngås. Med helium (He) som kollisjonsgass kan de fleste polyatomære forbindelser reduseres ved at de store molekylene vil kolliderer oftere enn de små molekylene. De får da lavere kinetisk energi, og forbindelser med lav kinetisk energi vil da bli mer bøyd av og vil dermed ikke nå frem til Q2 og detektoren. Ved å

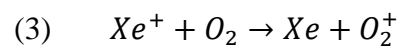
bruke reaksjonsgass er det mulig å reagere enten interferensen eller analytten. Vanlige reaksjonsgasser er O_2 , hydrogen (H_2) og NH_3 . Et eksempel der det er bedre å bruke reaksjonsgass enn kollisjonsgass er når dobbeltladede ioner reagerer med analytt. Monoisotopen $^{75}As^+$ er en ønsket analytt i denne analysen, og urinprøvene inneholder mye klorid. Da vil det bli dannet $^{40}Ar^{35}Cl^+$ (May & Wiedmeyer 1998) som lett kan fjernes med kollisjonsgass. Dersom det i tillegg hadde vært ^{150}Sm (samarium) i prøven ville denne ha dannet Sm^{2+} som hadde blitt detektert på $150 / 2 = 75$ atommasseenheter (amu). På grunn av dens høye kinetiske energi ville den gått rett gjennom kollisjonsgassen og blitt detektert. Ved å heller sette Q1 på 75 amu og sende inn oksygen som reaksjonsgass vil As reagere med oksygen og danne $^{75}As^{16}O^+$. Q2 kan da stilles inn på masse 91 og kun detektere As. Bruk av reaksjonsgass gir god respons for As. Figur 2.3 illustrerer tydelig at der signalet til As^+ synker, øker signalet til AsO^+ .



Figur 2.3 viser optimalisering av oksyngasshastighet i overgangen av $^{75}As^+$ til $^{75}As^{16}O^+$ (Perkin Elmer 2010-2014).

Interferensene på $^{129}I^+$ beskrevet i forrige kapittel blir også fjernet med O_2 som reaksjonsgass. Interferensen $^{129}Xe^+$ blir fjernet på grunn av en rask ladningsoverføring som også er mulig ved bruk av enkel kollisjons/- reaksjonscelle ICP-MS (Hou et al. 2009; Reid et al. 2008) (se likning 3). Dette er mulig fordi $^{129}Xe^+$ reagerer 10^4 ganger raskere med O_2 enn det $^{129}I^+$ gjør. Ved bruk av enkel kvadrupol vil den potensielle interferensen $^{127}IH_2^+$ fortsatt være et problem i følge Agilent Technologies (2013), men den blir helt fjernet ved bruk av oksygenreaksjon i trippel kvadrupol ICP-MS. Tradisjonelle ICP-MS instrumenter har ikke disse kollisjons- og

reaksjonscellene. Det gjør at temperaturen i plasmaet må kontrolleres manuelt, som gjør at det lettere kan dannes oksider i kaldere soner.



3 Eksperimentelt

3.1 Utstyr, stamløsninger, gasser og kjemikalier

Tabell 3.1, Tabell 3.2 og Tabell 3.3 viser en oversikt over utstyr, stamløsninger, gasser og kjemikalier som er brukt under metodeutvikling, metodevalidering og anvendelse av metoden.

Tabell 3.1 viser utstyr og instrumenter som er brukt under metodeutvikling, metodevalidering og anvendelse av metoden.

Utstyr	Spesifikasjon	Produsent
Elektroniske pipetter	10-300 µL, 50-1000 µL, 100-5000 µL	Biohit
Pipettespisser	10-300 µL, 50-1000 µL, 100-5000 µL	Biohit Optifit Tip
Polypropylen (PP) sentrifugerør	15 mL, 50 mL	Sarstedt
Begerglass i plast med lokk	-	-
Plastflasker	250 mL, 500 mL, 2500 mL	-
Stativ til sentrifugerør	21 plasser, 60 plasser	Agilent
ICP-MS Agilent 8800	QQQ	Agilent
Ultraclave III	-	Milestone
Posisjonskarusell	40 plasser	Milestone
Teflonrør	18 mL	Milestone
Destilleringssystem	Sub boiled Ultrapure	Milestone
Toppvekt LC 3201D	3 desimaler, maks 3200 g	Sartorius
Vekt PG5002-S DeltaRange®	2 desimaler, maks 5100 g	Mettler Toledo
Dispenser til CFA-C og H ₂ SO ₄	Eppendorf varispenser plus 0-2,5 mL	VWR
Dispenser til HNO ₃ og H ₂ O ₂	1-50 mL, 1-5 mL, 0,1-1,0 mL	Fortuna Optifix
Ultrasonic Cleaner	Art. 19-1542	Biltema

Tabell 3.2 viser gasser og kjemikalier som er brukt under metodeutvikling, metodevalidering og anvendelse av metoden. Vekt/vekt = (w/w), volum/volum = (v/v), vekt/volum = (w/v).

Kjemikalie/gass	Kjemisk formel	Konsentrasjon	Kvalitet	Produsent
Argongass	Ar	-	6.0	Yara
Oksyngengass	O ₂	-	5.0	AGA
Heliumgass	He	-	6.0	AGA
Nitrogengass	N ₂	-	Industri (2.0)	AGA
Ionebyttet vann	H ₂ O	-	> 18 MΩ	Barnstead
Etylendiamintetraeddiksyre *	EDTA, C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈	-	99,4-100,6 %	Sigma-Aldrich
Etylendiamintetraeddiksyre *	EDTA, C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈	-	99,995 %	Sigma-Aldrich
Isopropanol	C ₃ H ₈ O	-	Teknisk	-
Isopropanol	C ₃ H ₈ O	-	Analyse	Merck Millipore

Ammoniakk	NH ₃	25 % (w/w)	Analyse	Merck
4-(1, 1, 3, 3-Tetrametylbutyl)fenyl-polyetylene glykol t-Oktylfenoksy-poly-etoksyetanol	Triton™ X-100, C ₁₄ H ₂₂ O(C ₂ H ₄ O) _n	-	Analyse	Sigma-Aldrich
CFA-C, Lot No. 092511, tertiære aminer **	-	-	-	Spectrasol Inc.
Tetrametylammonium hydroksid	TMAH, (CH ₃) ₄ NOH	25 % (w/w)	-	Wako Pure Chemical Industries, Ltd.
Salpetersyre ***	HNO ₃	65 % (w/w)	Sub boiled Ultrapure	NMBU
Svovelsyre	H ₂ SO ₄	95-97 % (w/w)	Analyse	Merck
Hydrogenperoksid	H ₂ O ₂	30 % (w/w)	Analyse	Merck

* Fast stoff

** Eksakt innhold er ukjent

*** Syrer med analysekvalitet fra Merck Millipore destillert ved NMBU

Tabell 3.3 viser stamløsninger som er brukt under metodeutvikling, metodevalidering og anvendelse av metoden.

Produkt navn	Grunnstoffer	Konsentrasjon	Matriks (v/v)	Produsent
IV-ICPMS-71D	Bi, In, Li ₆ , Sc, Tb, Y	10 mg/L	3 % HNO ₃	Agilent
Tuning Solution for ICP-MS 7500cs	Ce, Co, Li, Mg, Tl, Y	1 µg/L	2 % HNO ₃	Agilent
Germanium	Ge	1 000 mg/L	Spor av HF / spor av HNO ₃	Inorganic Ventures
Radioaktivt jod	¹²⁹ I	1 mg/L	H ₂ O	-
Jod	I	1 000 mg/L	H ₂ O / 1 % TEA	Inorganic Ventures
Selen	Se	1 000 mg/L	2,5 % HNO ₃	Spectrapure Standards AS
Arsen	As	1 000 mg/L	2,5 % HNO ₃	Spectrapure Standards AS
Natrium	Na	10 000 mg/L	2 % HNO ₃	Inorganic Ventures
Kalium	K	10 000 mg/L	2 % HNO ₃	Inorganic Ventures
Fosfor	P	10 000 mg/L	H ₂ O	Inorganic Ventures
Svovel	S	10 000 mg/L	H ₂ O	Spectrapure Standards AS
Magnesium	Mg	10 000 mg/L	2,5 % HNO ₃	Teknolab AS
Kalsium	Ca	10 000 mg/L	2 % HNO ₃	Inorganic Ventures

Som kontroll på nøyaktighet ble frysetørket human urin fra Sero AS (Serorm™ Trace Elements Urine) brukt i alle analyser. Referansematerialet oppgir det sertifiserte området for SRM L-1 (nivå 1) og SRM L-2 (nivå 2) for de aktuelle analyttene, samt usikkerheten (U) til hver enkelt analytisk verdi (med en dekningsfaktor $k=2$). U tar hensyn til en rekke faktorer inkludert metodens usikkerhet så vel som stabiliteten av den enkelte komponent, og den dekker den sanne verdi med et 95 % konfidensintervall (KI) (Sero AS).

Alt vann benyttet til vask, fortynning av prøver og tillaging av standarder var ionebyttet vann fra renseanlegget Barnstead.

Begrepet reagens blir her brukt om en matriksløsning som er tilsatt alle urinprøver, blankprøver, standarder, husstandard og SRM (for eksempel HNO_3 , CFA-C, TMAH). All bruk av NEPT, NH_3 , TMAH og CFA-C har foregått i avtrekksskap med nødvendig verneutstyr som briller, laboratoriefrakk og vinylhansker.

En blankprøve er en reagensblank med kun reagens, IS og ionebyttet vann for å kontrollere dens bidrag til analyttsignalet. Konsentrasjon av analytt funnet i blankprøven gir en indikasjon på kontamineringsnivå under prøveprepareringsdelen og analysedelen, og kan derfor bli brukt til å bestemme realistiske deteksjonsgrenser. En kalibreringsblank inneholder de samme tilsetningene som en blankprøve, men har ikke vært med under prøveprepareringen.

Urinprøver, blankprøver, SRM og husstandard er fortynnet 1:10 i polypropylen (PP)-beholdere, mens kalibreringsstandarder er fortynnet 1:50 i alle analysene. Under metodeutviklingen er det tilsatt flere mulige internstandarder for bestemmelse av I, Se og As, mens under metodevalidering og anvendelse av metoden er det kun brukt radioaktivt jod som IS for jod, og germanium som IS for selen og arsen. Radioaktivt jod er et fisjonsprodukt av uran og plutonium (Pu) og blir også produsert i små mengder ved kosmisk stråling (Haldimann et al. 1998; Shelor & Dasgupta 2011). Forekomsten av naturlig radioaktivt jod er derimot ubetydelig i urin og andre biologiske prøvetyper. Selv om isotopen er radioaktiv vil den ikke utgjøre noen radiologisk fare når den blir brukt her, i og med at den har en halveringstid på rundt 16 millioner år.

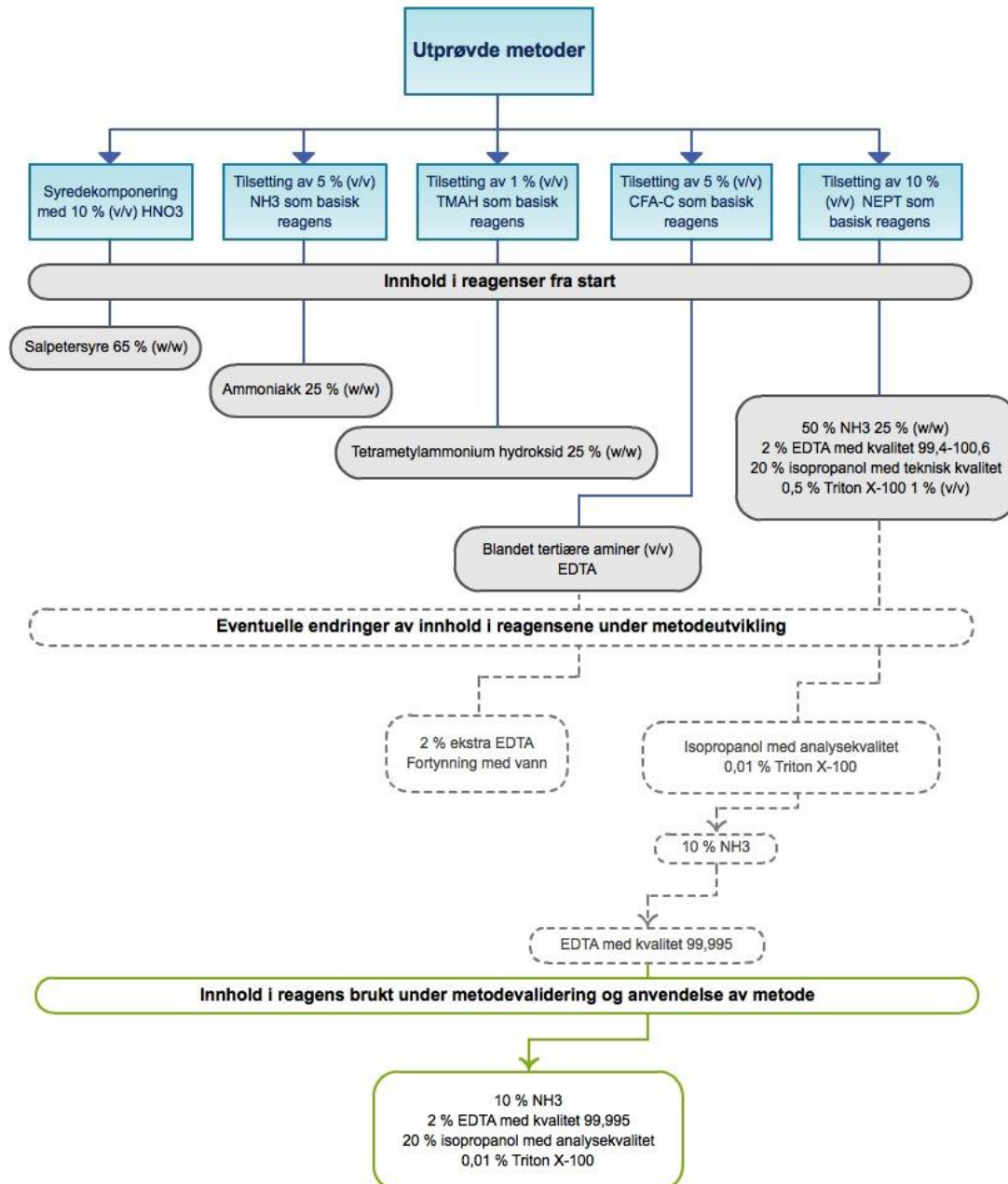
3.2 Tillaging av standarder

Det ble laget nødvendige mellomstandarder for å unngå fortytning på mer enn 200 ganger. I kalibreringsstandardene under metodeutviklingen har konsentrasjonene av de aktuelle analyttene variert, men det har kun blitt brukt ettpunkts-kalibrering tvunget gjennom origo. I metodevalideringsdelen ble det laget en standardrekke med 6 ulike konsentrasjoner utenom kalibreringsblank, mens under analysen av urinprøver fra mor og barn ble det brukt topunkts-kalibrering med jodkonsentrasjoner på 80 og 100 µg/L, konsentrasjoner av selen på 40 og 50 µg/L, samt konsentrasjoner på 20 og 50 µg/L for arsen. Se Tabell 14 og Tabell 15 i Vedlegg C for konsentrasjoner av de aktuelle analyttene i kalibreringsstandardene brukt under metodevalidering og anvendelse av metoden. Konsentrasjonen av ¹²⁹I som IS var 0,5 µg/L i alle analysene, mens konsentrasjonen var 20 µg/L for de andre IS-ene. Alle mellomstandarder ble oppbevart i kjøleskap på rundt 4 °C, mens kalibreringsstandardene ble laget nye for hver analyse. Til uavhengig kontroll av kalibreringskurven ble det brukt en såkalt husstandard, 1643h. Dette er en standard kontrollert opp mot SRM 1643e (Trace Elements in Water) (National Institute of Standards & Technology 2009). For utregning av konsentrasjoner og tillaging av standarder, se Vedlegg C.

3.3 Metodeutvikling

Konsentrasjon av analytter i standardene under metodeutvikling har som sagt variert. Det har også blitt testet med flere ulike grunnstoffer som IS undervegs; ¹²⁹I, Ge, vismut (Bi), indium (In), litium (Li₆), scandium (Sc), terbium (Tb) og yttrium (Y). Metodeutviklingsdelen ble utført med urinprøver fra tre forskjellige personer, fordi urinprøver varierer mye i innhold fra person til person. De ulike metodene som har blitt testet er dekomponering med HNO₃, tilsetning av CFA-C, TMAH, NH₃ og NEPT som basiske reagenser, og deretter fortytning til 10 mL (se Figur 3.1 i neste kapittel for beskrivelse av de ulike reagensene). Selv om det var ønskelig med en minimal prøvepreparering, var fortytning av urinprøvene nødvendig for å minimere det veldig høye innholdet av salt og oppløst fast stoff (TDS). Urin inneholder høye konsentrasjoner av blant annet Cl, Na, K og P som kan felle ut, så fortytning vil senke konsentrasjonene av disse matrikskomponentene samtidig som det reduserer sjansen for gjentetting av prøveintroduksjonssystemet. En fortytning på 1:10 viste seg å fungere godt uten skadevirkninger på prøveintroduksjonssystemet eller på ytelsen av instrumentet. Sammensetning og konsentrasjon av prøvematriksen kan påvirke analyttsignalet direkte slik at signalet under-

eller overestimert. Ved å tilsette internstandard til prøvene og tilpasse matriks i standardene, kan dette kompensere for slike matrikseffekter. IS kan også kompensere for signaldrift og/eller ustabil instrument. I denne oppgaven er det brukt IS i tillegg til at matriks i en av kalibreringsstandardene er tilpasset med matriks i prøve ved å tilsette Na, K, P, S, Mg og Ca til kalibreringsstandardene i tillegg til de ønskede analyttene (se Tabell 14 i Vedlegg C).



Figur 3.1 viser et flytskjema over utprøvede metoder, innhold i reagenser ved start og slutt, samt eventuelle endringer i metodene underveis i metodeutviklingen. Syredekompenering er utført ved opp til 250 °C. Eksakt innhold i reagensen CFA-C er ukjent.

3.3.1 Syredekomponering med mikrobølgeteknikk

Syredekomponering av urin ved bruk av mikrobølgeteknikk i Ultraclave ble utført for å undersøke Se og As. Etter dekomponering skal det ikke være noe organisk materiale igjen som kan reagere med analyttene på uønskede måter. Ved å sammenligne resultatene fra syredekomponering med resultatene fra basisk tilsetning er det mulig å finne ut om nivåene av disse analyttene på noen måte blir feilestimert i basisk reagens ved eventuell utfelling eller reaksjon. I urin finnes omtrent all jod i form av jodid (Shelor & Dasgupta 2011). Ved tilsetning av syre til urinen vil mestedelen av jodid oksidere til elementært jod, og det gjør det vanskelig å kvantifisere jod på ICP-MS (Stärk et al. 1997). Urin ble pipettert ut og overført til teflonrør sammen med 10 % (w/w) HNO₃ og internstandarder før dekomponering (jod ble også inkludert i analysen). Teflonrørene med prøver, blankprøver og standard referansemateriale i to ulike nivåer ble satt i posisjonskarusell som deretter ble satt i en load av 20-30 mL 30 % (w/w) H₂O₂ og 2-3 mL 95-97 % (w/w) H₂SO₄ i cirka 320 mL vann. Det ble trykksatt med nitrogengass til 50 bar og temperaturen økte trinnvis opp til 250 °C. En nærmere beskrivelse av programmet som ble benyttet finnes i Vedlegg D. De dekomponerte prøvene ble overført til 15 mL PP-rør og fortynnet til 10 mL. Det ble også laget kalibreringsstandarder samt en uavhengig kontroll av kalibreringskurven (husstandard 1643h).

3.3.2 Tilsetning av basiske reagenser

Som allerede beskrevet er jod flyktig i sur løsning, og dette kan føre til minneeffekter ved analyse på grunn av flyktige jodforbindelser. Det har derimot vist seg at prøveopparbeiding og analyse med basisk løsning gir gode resultater for jod (se kapittel 4.2 for litteraturhenvisning). Bruk av basisk løsning gjør det også mulig å bestemme andre viktige anion-dannende grunnstoffer som Se og As (Reid et al. 2008). Fire basiske reagenser er testet; CFA-C, TMAH, NH₃ og NEPT (se Figur 3.1 for innhold i reagensene og Vedlegg C. for tillaging av prøver og standarder). CFA-C med ekstra EDTA ble laget med 2 % mer EDTA. Det vil si 0,4 g EDTA til 20 mL CFA-C. For å få løst opp alt ble løsningen fortynnet til 40 mL, ristet og satt i ultralydbad. På grunn av fortynning måtte det bli tilsatt dobbelt så mye som vanlig CFA-C i prøvene (1 mL i stedet for 0,5 mL). EDTA blir tilsatt som kompleksbinder for å holde analyttene i løsning i den basiske løsningen. NEPT-løsningen inneholdt en blanding av NH₃, EDTA, 2-propanol og Triton X-100. Tillaging av denne ble utført ved at EDTA ble løst i NH₃, og deretter tilsatt isopropanol og Triton X-100. Løsningen ble ristet lett for å få alt løst opp. Mengden av de ulike kjemikalierne

som er brukt i NEPT-løsningen er endret på under metodeutviklingen (se Figur 3.1). Så små mengder som mulig var ønsket for å begrense bidrag av andre komponenter til analyttsignalet. 2-propanol eller isopropanol blir tilsatt som karbonkilde for å forbedre matrikstilpasningen mellom standard og prøve.

3.3.3 Analyse med ICP-MS-QQQ

Hvilke isotoper som skal inngå i analysemetoden blir bestemt ut fra mulige interferenser. Både jod og arsen er monoisotoper (^{127}I og ^{75}As). De har altså kun en stabil isotop. Selen har flere isotoper. Se med masse 80 er den største, men på grunn av en matriksbasert interferens med argondimeren $^{40}\text{Ar}^{2+}$ er isotopene ^{78}Se og ^{82}Se også inkludert. For de aktuelle analyttene er det testet ut ulike gassmodus; O_2 og O_2H_2 som reaksjonsgasser. På grunn av flere gassmodus ble det brukt en lang loop på 200 cm. Ved å sette Q2 på 16 masseenheter høyere enn Q1 vil interferensene filtreres bort, og kun de ønskede analyttionene når detektor. Dette er gjort for både Se og As i reaksjonsmodus for å unngå de aktuelle interferensene (se delkapittel 2.3.2.5).

Før hver analyse ble instrumentet innstilt med hensyn på blant annet forstøvergasshastigheten som påvirker dannelsen av oksider og dobbeltladede ioner i plasma, spenningen til ionelinsene, effekten på spolen, posisjonen til plasmaet i forhold til konene og ytelsen til detektoren. Alt dette skjer automatisk med Agilent 8800 QQQ. Tuning av metoden blir også utført automatisk ved optimalisering av gassmodusene. Med en fortykning av prøvene på 1:10 holdt det å ha et plasmamodus for generell bruk i stedet for HMI.

Vaskeløsning og bæreløsning ble laget med samme konsentrasjon av reagens som det var i prøvene. Renseløsning til loopene inneholdt 3 % NH_3 .

Kalibrering av instrumentet ble utført i forkant av hver analyse. Samme standard som ble brukt til kalibrering ble analysert for hver 10. prøve for å sjekke eventuell drift i serien. Drift i instrumentet ble korrigert for med en korreksjonslikning ved behandling av resultatene.

3.3.4 Stabilitet av jod i NEPT-løsning

Ferske urinprøver, blankprøver, SRM, standarder og husstandard ble laget med NEPT-løsning og analysert på ICP-MS dagen etter. Etter en uke ble de samme tillagde prøvene analysert på nytt sammen med nye standarder. Prøvene viste seg å være stabile for både I, Se og As. Etter en uke ble det laget nye urinprøver, blankprøver, SRM, standarder og husstandard av den samme batchen av urin, som også viste seg å være stabile for de aktuelle analyttene. Det vil si at prøvetatt urin kan stå i kjøleskap i opp til en uke før tilsetting av reagenser uten at analyttene endrer seg i løpet av prosessen. Prøver som er tilsatt reagenser kan også stå i kjøleskap i opp til en uke før analyse uten endring på verken jod, selen eller arsen.

3.4 Metodevalidering

Metodevalideringsdelen ble utført med urinprøver fra kun én person for bestemmelse av jod, selen og arsen. Metoden som viste seg å fungere best var NEPT, og denne ble brukt til metodevalidering og til anvendelse av metoden. NEPT-løsningen ble laget i en først syrevasket og deretter basevasket halvliters beholder ved at 10 g EDTA ble løst i 50 mL NH₃, og deretter tilsatt 100 mL isopropanol og 0,01 % Triton X-100. Parametere som skulle undersøkes i valideringen var deteksjonsgrense og bestemmelsesgrense, linearitet, måleområde, nøyaktighet, presisjon, robusthet og måleusikkerhet. Urinprøvene ble også her fortynnet 1:10 med de samme driftsforholdene og måleparameterne som ble brukt under metodeutvikling. Det ble derimot kun brukt O₂ som gassmodus og derfor en loop på 75 cm i stedet for 200 cm på isotopene ¹²⁷I, ⁷⁵As, ⁷⁸Se og ⁸²Se med internstandardene ¹²⁹I og ⁷²Ge. Syv urinprøver, 7 spiket urinprøver, 7 blankprøver og 4 SRM ble analysert.

Linearitet ble undersøkt for å vise at analysemetoden på ICP-MS var lineær i et tilstrekkelig måleområde (Eurachem 1998). Dette ble gjort ved å måle standarder i økende konsentrasjoner fra 0-100 µg/L av I, 0-60 µg/L av Se og 0-30 µg/L av As (se Tabell 14 i Vedlegg C for konsentrasjoner i hver standard). En kalibreringskurve for hver av analyttene ble brukt til kvantifisering av jod, selen og arsen i urinprøvene.

Nøyaktighet i metoden ble undersøkt med SRM (Seronom™ Trace Elements Urine) fra Sero AS. Spiking av urinprøver med 100 µg/L I, 60 µg/L Se og 30 µg/L As ble inkludert for å

undersøke gjenfinning. Presisjon, uttrykt som repeterbarhet, ble bestemt med det relative standardavviket (RSD) til de 7 urinprøvene målt på samme dag for intrametodisk presisjon, og RSD til alle 21 prøvene fordelt over 3 analysedager for intermediær presisjon.

LOD og LOQ ble regnet ut ved å multiplisere henholdsvis 3 og 10 med SD av konsentrasjonen til de 7 blankprøvene.

Krav om robusthet i denne metoden er lagring av urinprøver før analyse. Etter prøvetaking er det nødvendig at prøvene fryses ned. Etter tining og preparering av urinprøver bør de helst stå i kjøleskap dersom de må stå en stund før analyse. Forbehandling av urinprøvene må foregå i basisk reagens for at jod skal holdes i løsning, og urinprøvene må korrigeres for volum eller kreatinin.

Usikkerheten i det lave området blir estimert ut fra den intermediære presisjonen.

3.5 Anvendelse av metode

3.5.1 Undersøkelsen og forsøkspersonene

Det er mødre (n=48) og deres barn (n=56) i området Oslo og Akershus som har gitt fra seg oppsamlet døgnurin og kostholdsskjema til Folkehelseinstituttet i forbindelse med forskningsprosjektet EXBISPHA. Prøvetakingen har foregått mellom januar og begynnelsen av juni 2012. Alt arbeidet med å skaffe forsøkspersoner, innhente informasjon om personene, lage kostholdsskjema og ordne med prøvetaking er utført av Folkehelseinstituttet. FHI har meldt prosjektet til Regional komité for medisinsk og helsefaglig forskningsetikk (REK). Urinprøvene var klare til forbehandling og analyse da metoden var utviklet og validert. Målinger på kreatinin er utført av FHI med prosedyre fra Microgenics Corporation (2005). Kreatinin er et nedbrytningsprodukt av kreatin som forekommer i urin ved en relativ konstant hastighet over en 24-timers periode ved et jevnt væskeinntak (Soldin 2002). Dette er viktig for å indikere volumet av urinen når ikke total mengde døgnurin er kjent. I Vedlegg F finnes informasjon om prøvepersonene og deres 24-timers kostholdsdata.

Deltakergrupper ble delt inn i mødre og barn, jenter og gutter, og røykere og ikke røykere. I kostholdsskjemaet ble røykestatus delt inn i fire kategorier. Deltakere som aldri hadde røykt og deltakere som var registrert som tidligere røykere ble vurdert som ikke røykere, mens deltakerne som røykte av og til og daglig røykere ble vurdert som røykere.

Den inntatte mengden av ulike matvaregrupper er vist i Tabell 19 i Vedlegg F. Matvarer er fordelt i 15 ulike grupper for å skape en enklere fremstilling av kilder til jod i kostholdet. Inntak av kosttilskudd med jod og jodifisert salt er ikke inkludert i kostholdsskjemaet. De ulike matvaregruppene som er inkludert er brød, kornprodukter, kaker, poteter, grønnsaker, frukt/bær, kjøtt/blod/innmat, fisk/skalldyr, egg, melk/fløte/is/rømme/yoghurt, ost, smør/margarin/olje, sukker/søtsaker, drikkevarer og diverse.

3.5.2 Forbehandling av urinprøver

Urinprøvene, som hadde stått lagret i -20 °C på FHI siden våren 2012, ble tint til romtemperatur og det ble overført 1 ml urin fra hver prøve direkte over i 15 mL PP sentrifugerør for deretter å fryses ned til -20 °C igjen. Prøvene ble fraktet fra FHI til NMBU i fryst tilstand. Der ble de igjen tint til romtemperatur og hver prøve ble tilsatt en ferdigblanding som inneholdt reagens (NEPT), Ge og ¹²⁹I som internstandarder i tillegg til ionebyttet vann. Denne ferdigblandingen ble laget for å unngå mange pipetteringer. Det ble pipettert ut 9 mL (4,5 mL to ganger) av denne blandingen til urinprøvene, blankprøver, SRM og husstandard, de ble godt blandet, satt i kjøleskap og analysert dagen etter tilsetning av reagenser. Tillaging av standarder ble utført på samme måte ved tilsetning av 45 mL av ferdigblandingen, aktuelle analytter og fortynning til 50 mL (se Vedlegg C for konsentrasjoner i kalibreringsstandardene og for tillaging av ferdigblanding).

3.5.3 Analyse med ICP-MS-QQQ

Før analyse av urinprøver fra mor og barn ble konene og forstøveren tatt ut og vasket. Dette medførte at instrumentet måtte kondisjoneres før bruk. Kondisjonering av instrumentet ble utført ved at andre urinprøver ble kjørt gjennom systemet før analyse av urinprøvene som kom fra FHI. Analysen ble utført med omtrent de samme instrumentelle måleparameterne og driftsforholdene som under metodeutviklingen. Det ble analysert på de samme analyttene og samme gassmodus som i metodevalideringen. Tuning av instrument og metode ble utført på samme måte som i

metodeutviklingen, det ble brukt samme bæreløsning, samme vaskeløsning (laget fra ferdigblandingen) og det ble brukt plasmamodus for generell bruk. Kalibrering av instrumentet foregikk med to kalibreringsstandarder i tillegg til kalibreringsblank, det ble benyttet 10 blankprøver, og renseløsningen til loopen ble tilsatt ekstra ammoniakk for bedre utvasking av jod. Den ene standarden som ble brukt til kalibrering av instrumentet ble også her analysert for hver 10. prøve under sjekk av drift. Tabell 16 i Vedlegg E viser en oversikt over instrumentelle måleparametere brukt på ICP-MS under analysen av urinprøvene fra mor og barn.

3.6 Behandling av resultater og statistiske metoder

Bearbeiding av all data foregikk ved bruk av regnearket Excel (Microsoft Office Excel 2011). Statistiske analyser er utført med det statistiske dataprogrammet R Studio (R Core Team 2013). For å undersøke om data var normalfordelte ble det benyttet Shapiro-Wilk test. Det ble brukt t-test og Mann Whitney U-Test/Wilcoxon test for å sjekke om det var signifikante forskjeller i JKU i ulike deltakergrupper avhengig om dataene var normalfordelte eller ikke. Spearman rangeringskorrelasjon (korrelasjonskoeffisient r_s eller ρ (rho)) ble benyttet for å undersøke sammenhengen mellom to variabler som ikke var normalfordelte (matvaregruppe X som uavhengig variabel og JKU Y som avhengig variabel). Enkel lineær regresjon ble også anvendt til noen av korrelasjonene.

4 Resultater og diskusjon

4.1 Usikkerhetsvurdering og begrensninger

Den totale usikkerheten i analysemetoden omfatter preparering av prøver, standarder og reagenser, samt analyse. I denne metoden ligger den største usikkerheten i alt som blir gjort før analyse. Det vil si all forbehandling av urinprøver og reagenser. Selve prøvetakingen inngår ikke i mitt estimat for metodeusikkerhet, men prøvetakingen skal helst utføres med rene hender og så lite kontakt med beholder som mulig for å unngå kontaminering. Med over hundre forsøkspersoner i prosjektet som skal gjøre dette er det ikke sikkert at dette har foregått som ønsket. Etter prøvetaking har urinprøvene blitt fryst ned, tint, overført til andre beholdere og fryst ned igjen. Dette bidrar til usikkerhet i analysemetoden med hensyn på tap av analytt og kontaminering. Ved overføring av urin til beholdere som skulle brukes under analyse ble det benyttet elektronisk pipette. Det skulle overføres 1 000 µL en gang av hver prøve, men på grunn av andre pipettespisser fra FHI måtte det tas ut 500 µL to ganger. Beholdere til prøvetaking og lagring av urinprøver ble ikke syrevasket før bruk. Det burde derfor blitt inkludert en blindtest på beholderne som ble brukt for å sjekke eventuell kontaminering.

For resultater ved anvendelse av metoden har en begrensning vært at kostholdsskjema ikke har inneholdt informasjon om inntak av kosttilskudd som inneholder jod eller sjøgress. Dette er inntak som kan gi betydelig økte nivåer av jod i urin. Det er heller ikke gitt noe informasjon om for eksempel sykdom på skjoldbruskkjertelen – noe som kan påvirke opptaket av jod i kroppen. Grunnen til dette er at prøvetakingen og lagring av kostholdsskjema ikke har blitt iverksatt med hensyn på jod. Dette er også grunnen til at det ikke har blitt innhentet informasjon om totalt døgnurinvolum, eller prøvetatt spoturin i stedet for samleurin. Kostholdsskjemaet har derimot inneholdt mye annen informasjon som ikke er brukt i denne oppgaven. Det gjelder blant annet hvilken type ost som har blitt spist og om forsøkspersonene har spist mager fisk eller fet fisk. Ut i fra Tabell 2.1 i kapittel 2.2.2 er det mysost som har det absolutt høyeste gjennomsnittsinholdet av jod (129 µg/100 g). Mager fisk har også et høyt innhold av jod på i gjennomsnitt 86 µg/100 g i følge studien av Dahl et al. (2004). På grunn av liten tid etter utførelse av kreatininmålinger på urinprøvene er det ikke undersøkt korrelasjoner på type ost eller type fisk. Det er i denne oppgaven kun brukt enkle korrelasjonsanalyser for å undersøke sammenhenger mellom JKU og ulike matvaregrupper. Dersom tid ikke hadde vært en begrensning kunne det blitt benyttet multivariabel lineær regresjon for å undersøke om inntaket av ulike matvarer hadde en

uavhengig effekt på JKU, og bruke informasjon om alder, kjønn, kroppsmasseindeks, utdanning og røykestatus som justeringsvariabler.

4.2 Metodeutvikling

Tabell 4.1 viser en oversikt over de ulike metodene som er prøvd ut og hvilke observasjoner som er gjort ved analyse på ICP-MS. For en beskrivelse av hva reagensene inneholder, se Figur 3.1.

Tabell 4.1 viser observasjoner som er gjort under analyse med de ulike metodene. Grunnstoffer som er inkludert som IS-er er ^{45}Sc , ^{72}Ge , ^{89}Y , ^{115}In , ^{129}I , ^{159}Tb og ^{209}Bi . De tomme rutene indikerer at det ikke er undersøkt LOD og LOQ, SRM, bakgrunn, RSD eller stabilitet ved lagring for de ulike metodene.

	5 % NH ₃	1 % TMAH	10 % HNO ₃	5 % CFA-C	10 % NEPT
Intern-standard (IS) signal	Dropp av signal for Sc, Y, In og Tb. Veldig varierende for ^{129}I , Ge og Bi	Dropp av signal for Sc, Y, In, Tb og Bi. Litt varierende for ^{129}I og Ge	Stabilt signal for alle de tilsatte grunnstoffene bortsett fra ^{129}I	Stabilt signal for alle, men høyt innhold av TDS i urinprøvene påvirker signalet til Sc, Y, Tb og Bi. Stabilt for ^{129}I , Ge og In i prøver med høyt innhold av TDS	Stabilt signal for alle grunnstoffene utprøvd som IS
LOD og LOQ	-	-	Høyere LOD og LOQ for Se og As enn ved basisk reagens	Lav LOD og LOQ for alle analyttene	Lav LOD og LOQ for alle analyttene
SRM	-	-	Se og As er innenfor referanseområdet	Alle analyttene er innenfor referanseområdet	Alle analyttene er innenfor referanseområdet
Bakgrunn				Litt høy bakgrunn av I	Høy bakgrunn av As
RSD	-	-	Høyere RSD for Se enn ved basisk reagens, og omtrent lik RSD som ved basisk reagens for As	Lav RSD for alle analyttene	Lav RSD for alle analyttene
Stabilitet av analytter ved lagring	-	-	I følge Gélinas et al. (1998) er jod stabil i reagensen i minst en måned	-	Analyttene er fortsatt stabile i reagensen etter en uke

Ulike basiske reagenser er testet, fordi jod er flyktig i sur løsning. Det er kjent at syredekompenering med HNO₃ er en godt egnet metode for bestemmelse av Se, As, krom (Cr), kobber (Cu), Ni, S, P, Hg, Cd, Pb og mange flere grunnstoffer i biologiske prøvetyper som urin

(Gaines 2011; Heitland & Köster 2005). I kapittel 2.3.1 blir det beskrevet at HNO₃ er et godt syrevalg i denne analysen ettersom den er meget oksiderende ved høye temperaturer. Det ble i dette arbeidet undersøkt om tilsetning av basisk reagens ga mulighet for simultanbestemmelse av I, Se og As. Ved anledninger der ulike grunnstoff skal bestemmes i urin er det mer kostnads- og tidseffektivt å utføre dette i én og samme metode enn ved benyttelse av flere ulike metoder.

Siden ammoniakk som reagens har vist seg å fungere for jod ved å eliminere de såkalte minneeffektene (Al-Ammar et al. 2001; Baumann 1990; Eckhoff & Maage 1997; Haldimann et al. 1998) har det blitt testet en metode med 5 % (v/v) NH₃. Ved tilsetning av 7 ulike internstandarder (⁴⁵Sc, ⁷²Ge, ⁸⁹Y, ¹¹⁵In, ¹²⁹I, ¹⁵⁹Tb, ²⁰⁹Bi) viste denne metoden seg å gi et ekstremt varierende signal for de fleste med dropp av signal til under 20 % for Sc, Y, In og Tb. Germanium og ¹²⁹I var de som hadde et mest stabilt signal uten dropp, men de hadde likevel et nokså varierende og ulikt mønster. Måten grunnstoffer oppfører seg på i et argonplasma er avhengig av fysiske egenskaper som atommasse og ioniseringspotensial. En IS skal ha mest mulig like egenskaper som analyttene av interesse, og ved å følge IS-ene som er tilsatt i alle prøvene er det mulig si noe om analyttens oppførsel i urinprøven med den bestemte metoden. Dropp av IS-signal forteller at signalet til analytten også sannsynligvis har droppet, forutsatt at den valgte internstandard har de samme egenskapene som analytt.

TMAH er en reagens som har blitt brukt til urin og andre biologiske prøver for bestemmelse av jod av blant annet Andersson et al. (2010), Caldwell et al. (2003), Makhmudov og Caldwell (2013) og (Reid et al. 2008). I følge prosedyren til Makhmudov og Caldwell (2013) blir urinprøver fortynnet 1+9 med 1 % (v/v) TMAH. Dette ble også gjort her. Med de samme IS-ene som ble brukt i metoden med NH₃, droppet signalet for de samme grunnstoffene. Germanium og ¹²⁹I hadde også her et mer stabilt signal enn de andre, og varierte kun litt.

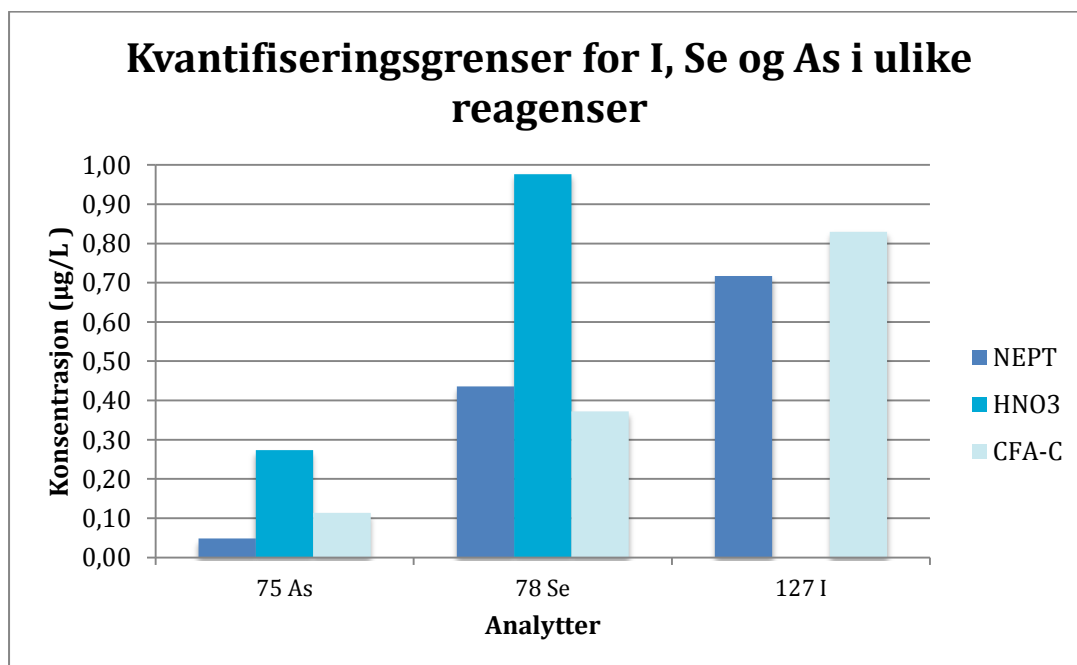
For Gélinas et al. (1998) har 5 % (v/v) CFA-C fungert for bestemmelse av jod. Dette er en blanding av vannløselige tertiære aminer og EDTA, men eksakt innhold i reagensen er ukjent. 5 % (v/v) CFA-C ble testet, og denne fungerte tilfredsstillende. Germanium, ¹²⁹I og In varierte lite og omtrent likt, mens signalet til de andre internstandardene droppet ned til 50 % på det meste i urinprøver med veldig høyt innhold av oppløst fast stoff. Dette viser at enkelte grunnstoffer i urin kan felle ut. Disse grunnstoffene holdes ikke i løsning, og man får dermed ikke et riktig

resultat ved analyse. Uorganisk utfelling i urin kan bestå av grunnstoffene P, Mg, Ca og eventuelt Cu for de som får drikkevann fra kobberrør (Grases et al. 1997; Jönsson 1999; Udert et al. 2003). Utfelling av disse grunnstoffene kan medføre at andre grunnstoffer også feller ut. Dersom for eksempel Cd og Pb skulle blitt bestemt i denne metoden, ville passende IS-er for disse vært ^{115}In for ^{114}Cd og ^{209}Bi for ^{208}Pb . Etersom signalet til disse IS-ene dropper, ville sannsynligvis Cd og Pb felt ut sammen med de nevnte grunnstoffene som kan felle ut i urin. Tilsetning av ekstra EDTA til reagensen (tilsvarende mengde som i NEPT) gjør at enkelte grunnstoffer blir kompleksbundet slik at de ikke feller ut. Effekten av å binde metaller for et chelateringsmiddel som EDTA er avhengig av konsentrasjon og bindingskonstanten til chelatet, konsentrasjonen av metaller i prøven, samt forekomst og konsentrasjon av andre ligander som konkurrerer om de aktuelle metallene (Waters et al. 2001). Liganden EDTA kan bindes til kationer som Pb^{2+} , Cd^{2+} , Ca^{2+} og Mg^{2+} som kan finnes i urin. Etter tilsetning av ekstra EDTA til reagensen ble signalet til alle IS-ene stabile. Dersom riktige IS-er er valgt for de ønskede analyttene vil stabile IS-signaler tyde på at analyttene av interesse blir holdt i løsning. CFA-C med ekstra EDTA som reagens gir lave bestemmelsesgrenser, den treffer bra på referansematerialet for alle analyttene og den gir lav RSD for både I, Se og As. Minuset med reagensen er at den gir litt høy bakgrunn av jod (se Tabell 4.1).

Den siste basiske reagensen som er testet er den såkalte NEPT-løsningen. En blanding av NH_3 , EDTA, isopropanol og Triton X-100. Denne reagensen har blitt brukt i biologiske prøvetyper av blant annet Wahlen et al. (2005). NEPT gir et stabilt signal for alle IS-ene, den gir lave deteksjons- og kvantifiseringsgrenser, den gir lav RSD for I, Se og As, og analyttene er stabile i reagensen i hvert fall en uke dersom de blir oppbevart i kjøleskap. I følge Gélinas et al. (1998) er jod stabil i reagensen CFA-C i minst en måned. Et tidslagingsforsøk som varer lenger enn en uke burde blitt undersøkt for reagensen NEPT. For å unngå bruk av dyrt SRM over lengre tid kunne det ha blitt laget og tatt i bruk en kontrollprøve i stedet. Dette kunne ha blitt gjort ved å samle inn urinprøver fra ulike personer, kontrollert den opp mot SRM over tid for kontroll av stabilitet, for så å bruke den videre. Problemet med urinprøver er at de fort kan danne utfellinger. Lagring av en slik kontrollprøve må derfor muligens oppbevares enten kjølig eller fryst. Reagensen NEPT hadde litt høy bakgrunnskonsentrasjon av As, men etter reduksjon av mengde NH_3 og etter bytting av isopropanol og EDTA til bedre kvaliteter ble problemet løst. Mengden NH_3 ble endret fra 50 % til 10 % i NEPT-løsningen. Dette er også en fordel fordi det er ønskelig med så små mengder som mulig av alle reagenser. I urinprøver er det ikke så mye fett som må

løses, og derfor er det heller ikke nødvendig med så mye ammoniakk som det som trengs i for eksempel melk med høyt fettinnhold. Triton X-100 er et såpemiddel som blant annet brukes for å løse opp proteiner og cellemembraner. Mengden av Triton X-100 ble redusert på grunn av mye skumming. Isopropanol har vist seg å være nødvendig for å forbedre matrikstilpasningen mellom prøve og standard, og fører til lavere deteksjons- og kvantifiseringsgrenser, samt bedre RSD på grunn av høyere cps. Å tilsette en karbonkilde fører også til økt nøyaktighet for både I, Se og As som har et IP som blir påvirket i plasmaet av karboninnholdet. I følge Wahlen et al. (2005) ble gjenfinning av As og Se i SRM for humant fullblod (Serorm MR9067) betydelig høyere enn gjennomsnittlig sertifiserte verdier uten tilsatt karbonkilde.

For å undersøke om analyttene Se og As blir feilestimert på grunn av mye karbon i urinprøvene ble dekomponering med syre inkludert som en metode. Denne metoden ga et stabilt signal for alle de tilsatte IS-ene unntatt ^{129}I , og den traff bra på SRM for Se og As. Metoden ga høyere LOQ for begge analyttene enn ved basisk reagens på grunn av flere trinn i prøveprepareringsdelen (se Figur 4.1). RSD var også høyere for Se, og omtrent lik for As sammenlignet med basisk tilsetning.



Figur 4.1 viser bestemmelsesgrenser for I, Se og As i reagensene NEPT, HNO₃ og CFA-C under metodeutviklingen.

Metodene med tilsetning av NH_3 og TMAH viste varierende signal for IS-ene ^{129}I og Ge, men de droppet ikke ned til under 20 % slik som de andre IS-ene. På grunn av et så ekstremt varierende signal for de fleste IS-ene, ble både NH_3 og TMAH som metoder forkastet før videre undersøkelse av blant annet LOQ og SRM. Dersom de fleste IS-er feller ut slik som de gjør her kan man aldri være sikker på at det ikke skjer med analyttene som skal bestemmes. Selen og Arsen kan bestemmes på ICP-MS etter syredekomponering, men ikke jod. Utførelse av dekomponering før analyse medfører et ekstra steg i prøveopparbeidelsen med risiko for forurensning. Denne metoden ga ikke bedre resultater for Se og As enn det tilsetning av basisk reagens gjorde, og derfor ble det ikke utført noe videre arbeid med syredekomponering. Både med NEPT og CFA-C er det mulig å bestemme alle analyttene i én og samme metode. For CFA-C er det forutsatt at det blir tilsatt ekstra EDTA. Med disse reagensene oppnås det også betydelig lavere LOQ enn ved syredekomponering. Dette vises tydelig i Figur 4.1. For videre arbeid ble NEPT valgt foran CFA-C fordi den kunne lages selv slik at nøyaktig innhold var kjent, fordi CFA-C hadde litt høyere bakgrunn av jod enn det NEPT-løsningen hadde og fordi den ga litt lavere LOQ for jod. NEPT ga også lavere LOQ for As (se Figur 4.1). LOQ for jod i syre er tatt bort i fra figuren fordi den ikke kan bestemmes i denne løsningen.

Ved basiske forhold kan det også være mulig å inkludere en rekke andre grunnstoffer, som for eksempel brom (Br), Cl, S, P, Cd, Pb og Mo. Å undersøke Br kan være av interesse fordi det blant annet har vist seg at økt nivå av jod gir lavere nivåer av bromid i skjoldbruskkjertelen som da forebygger og reverserer den giftige effekten av bromid (Abraham 2003). Det samme gjelder for fluorid, men fluorid kan ikke bestemmes på ICP-MS på grunn av et høyere IP enn Ar. Å kunne inkludere flere analytter i samme metode er som sagt både tids- og kostnadsbesparende. Ved oftere tilgang på instrumentet, samt generelt mer tid, kunne det også blitt testet andre forbehandlinger av urinprøver, som for eksempel basisk dekomponering med lut eller benytte TMAH som reagens med EDTA som kompleksbinder. Birgisdottir et al. (2013) har i sin studie kun fortynnet urinprøvene med ionebyttet vann. Ulempen med basisk dekomponering er at det brukes så mye reagens at det blir lett å forurense prøvene. For å gjøre enda mer ut av kravet om så lite fortynning som mulig kunne det også ha blitt prøvd ut HMI som plasmamodus og en fortynning på 1:5. Analyttene I, Se og As med sitt høye ioniseringspotensial ville da blitt bedre ionisert i plasmaet på grunn av en høyere plasmatemperatur (se kapittel 2.3.2.4). Dersom gjenfinning av I, Se og As i de spikede urinprøvene er tilfredsstillende vil dette vise at fysiske interferenser i denne metoden er under kontroll, og bedre ionisering av analyttene ville dermed

ikke vært nødvendig. Ved bruk av HMI og en 1:5 fortykning ville det fortsatt kunne ha oppstått problemer med introduksjonssystemet ved for høyt innhold av TDS i prøvene, så det er mulig at et plasmamodus med HMI ikke hadde vært noen fordel.

Gjennom hele metodeutviklingen var det ^{129}I og Ge som var de mest stabile IS-ene. Disse to grunnstoffene ble valgt som internstandarder videre fordi de har omtrent like IP og samme masser som I, Se og As. Den radioaktive isotopen ^{129}I er den perfekte IS for ^{127}I i og med at forekomsten av denne er minimal i urin og den har like egenskaper som den stabile isotopen. Ved bruk av ICP-MS-QQQ i reaksjonsmodus er det mulig å anvende ^{129}I som IS uten å måtte tenke på isobar overlapp med $^{129}\text{Xe}^+$ eller polyatomær interferens fra $^{127}\text{IH}_2^+$.

Oksygen er valgt som gassmodus blant annet på grunn av de polyatomære interferensene som er vist for As og Se i May og Wiedmeyer (1998). Andre potensielle interferenser som blir unngått ved bruk av reaksjonsmodus er $^{39}\text{K}^{35}\text{ClH}^+$ og $^{40}\text{Ca}^{35}\text{Cl}^+$ som interfererer på $^{75}\text{As}^+$, $^{82}\text{Kr}^+$ på $^{82}\text{Se}^+$ og $^{95}\text{Mo}^{16}\text{O}_2^+$ på $^{127}\text{I}^+$. Bruk av reaksjonsgass fjerner alle de spektralinterferensene som forekommer for de aktuelle analyttene. Med kollisjons- og reaksjonscelle ICP-MS kan de fleste interferenser unngås. Det ble testet med O_2H_2 som en annen reaksjonsgass på grunn av isotopen ^{80}Se . Det var i hovedsak ønskelig å inkludere denne isotopen fordi den gir best respons (cps). Isotopene ^{78}Se og ^{82}Se gir mye færre cps på grunn av mindre forekomst, men analysene har fungert godt med kun O_2 som reaksjonsgass i og med at konsentrasjoner av Se ikke har vært så veldig lave i urinprøvene.

Stabilitet av I, Se og As ble kun undersøkt ved lagring i reagensen NEPT, og de viste seg å være stabile både etter en uke i reagensen og etter en uke før tilsetning av reagensen. Dette betyr at analyttene ikke går tapt under prosessen ved utfelling eller omdanning til utilgjengelige former, og de kan fortsatt detekteres med god nøyaktighet på ICP-MS i følge SRM som ble analysert og ga resultater innenfor sertifiserte områder.

4.3 Metodevalidering

De ulike valideringsparameterne som er inkludert i denne oppgaven er forklart i ”Forkortelser og ordforklaringer” og beskrevet hvordan utført i kapittel 3.4. Dette gjelder for parameterne

deteksjons- og kvantifiseringsgrenser, linearitet, måleområde, nøyaktighet, presisjon og robusthet.

Tabell 4.2 viser en oversikt over gjennomsnitt, standardavvik, intrametodisk presisjon (RSD ved dag 1, 2 og 3), intermediær presisjon (RSD totalt), deteksjonsgrenser og bestemmelsesgrenser for jod, selen og arsen i urinprøver under metodevalideringen (n=7).

	Dag 1	Dag 2	Dag 3	Totalt
Jod				
Gjennomsnitt (µg/L)	53,1	55,4	55,8	55
SD (µg/L)	0,72	0,88	0,63	1,4
RSD (%)	1,36	1,59	1,12	2,6
RSD i spiket urinprøver (%)	-	-	0,83	-
LOD (µg/L)	0,69	2,1	0,85	1,9
LOQ (µg/L)	2,3	7,1	2,8	6,2
Selen				
Gjennomsnitt (µg/L)	16,5	16,5	17,0	16,7
SD (µg/L)	0,23	0,32	0,42	0,37
RSD (%)	1,37	1,91	2,47	2,22
RSD i spiket urinprøver (%)	-	-	0,79	-
LOD (µg/L)	0,11	0,075	0,072	0,11
LOQ (µg/L)	0,36	0,25	0,24	0,38
Arsen				
Gjennomsnitt (µg/L)	3,79	3,79	3,92	3,83
SD (µg/L)	0,053	0,045	0,045	0,077
RSD (%)	1,39	1,20	1,14	2,02
RSD i spiket urinprøver (%)	-	-	0,45	-
LOD (µg/L)	0,018	0,034	0,014	0,023
LOQ (µg/L)	0,061	0,11	0,048	0,075

Tabell 4.2 viser de oppnådde verdiene av LOD og LOQ for jod, selen og arsen. Kravet var en $LOQ \leq 5 \mu\text{g/L}$ for I, $\leq 3 \mu\text{g/L}$ for Se og $\leq 1 \mu\text{g/L}$ for As. Gjennomsnittlig LOQ for jod ble $6,2 \mu\text{g/L}$. Den første dagen var LOQ for jod $2,3 \mu\text{g/L}$, andre dagen var LOQ oppe i hele $7,1 \mu\text{g/L}$, og så var den $2,8 \mu\text{g/L}$ den tredje og siste dagen. Etter dag 2 var det mistanke om at dette skyldtes forurensning siden det ikke var noen tydelig reduksjon av konsentrasjon i blankprøvene, men ved analyse på dag 3 ble det observert at jod hang igjen i systemet og ikke ble ordentlig vasket ut. Blankprøvene ble analysert flere ganger, og LOQ viste seg da å bli lavere igjen enn ved analysen dagen før. Gjennomsnittlig LOQ for dag 1 og 3 ble $3,8 \mu\text{g/L}$. En bestemmelsesgrense på mindre enn $5 \mu\text{g/L}$ er mer enn godt nok for bestemmelse av jod i urin dersom urinprøvene fra mor og barn gir høyere verdier enn denne grensen, noe som er veldig sannsynlig. En gjennomsnittlig LOQ på $0,38 \mu\text{g/L}$ og $0,075 \mu\text{g/L}$ for henholdsvis Se og As fra alle tre

valideringsdagene oppfyller kravet om følsomhet. I innledningen ble det nevnt at det å holde blankprøvene rene nok ville bli en utfordring for å komme lavt ned i kvantifiseringsgrense for jod. Det har derimot vist seg at den viktigste begrensningen for å oppnå best mulig bestemmelsesgrense i ICP-MS for denne metoden er de såkalte minneeffektene av jod. Det vil si at jod lett henger igjen i pumpe-slanger og andre komponenter i instrumentet på grunn av adsorpsjon av jodforbindelser på forstøveren og av fordampning av HI og I₂ fra blandingskammeret som beskrevet i kapittel 2.3.2.4. Ved å ha 10 % NH₃ i NEPT-løsning og rundt 5 % NH₃ som renseløsning vil det være godt nok for å få jod vasket ut. For mye NH₃ i NEPT-løsningen har i dette arbeidet derimot vist seg å gi høyt bakgrunnssignal av As.

For linearitet ble det i dette tilfellet godkjent en korrelasjonskoeffisient (r) på > 0,9995. Tabell 2 i Vedlegg A viser regresjonslinjer og korrelasjonskoeffisienter for jod, selen og arsen. Alle analyttene hadde en r-verdi på ≥ 0,9999 i konsentrasjonsområder på LOQ-100 µg/L for I, LOQ-60 µg/L for Se og LOQ-30 µg/L for As. Dette er de validerte og kalibrerte måleområdene for analyttene. Med en 10 ganger fortykning var man da sikret linearitet på metodens måleområde på konsentrasjoner opp til 1 000 µg/L for I, 600 µg/L for Se og 300 µg/L for As i urinprøvene. En kalibreringsstandard på 80, 40 og 20 µg/L for henholdsvis I, Se og As ble derfor vurdert til å være tilfredsstillende for videre analyser.

Tabell 4.3 viser gjennomsnittlig konsentrasjon, SD og bias av målt SRM L-1 og L-2, samt sertifisert område for SRM L-1 og L-2 for analyttene jod, selen og arsen under metodevalideringen over tre dager (n=4).

	I	Se	As
SRM L-1			
Gjennomsnitt ± SD (µg/L)	81 ± 1,1	14,3 ± 0,18	83,0 ± 0,67
Sertifisert område (µg/L)	84 ± 6	13,9 ± 2,8	79 ± 16
Bias (%)	-3,6	2,9	5,1
SRM L-2			
Gjennomsnitt ± SD (µg/L)	285 ± 2,2	76 ± 1,5	190 ± 1,4
Sertifisert område (µg/L)	304 ± 22	70,1 ± 14,1	184 ± 37
Bias (%)	-6,3	8,6	3,3

Nøyaktighet i metoden ble bestemt ved analyse av 4 paralleller av hver SRM L-1 og L-2 (Seronorm™ Trace Elements Urine). Tabell 4.3 viser gjennomsnittet for alle de tre dagene under metodeutviklingen, samt sertifiserte områder. Nøyaktigheten viste seg å være god for alle

analyttene ved alle tre dagene. Det vil si at analyttene holdes i løsning slik at de kan detekteres på instrumentet og gi pålitelige resultater. Se Tabell 3, Tabell 4 og Tabell 5 i Vedlegg A for resultater av SRM. For gjenfinning av spiket analytter i matriksen ble det analysert 7 paralleller. Det ble gjenfunnet 100 %, 101 % og 102 % for henholdsvis jod, selen og arsen i urinprøver tilsatt konsentrasjoner på 100 µg/L I, 60 µg/L Se og 30 µg/L As. Resultatet på målt SRM L-1 av referanseverdien (bias) ble -3,6 % for jod, 2,9 % for selen og 5,1 % for arsen. Dette tilsvarer et maks avvik på ± 6 %. For SRM L-2 er resultatet for de samme analyttene henholdsvis -6,3 %, 8,6 % og 3,3 % av referanseverdi. Dette gir et maks avvik på ± 10 % (se Tabell 4.3). En spike gjenfinning på 100 % betyr at alt som er tilsatt er gjenfunnet, men det betyr ikke nødvendigvis at all analytt i prøven blir detektert. Bruk av spike gjenfinning beviser kun at de fysiske interferensene er under kontroll.

Metodens presisjon, uttrykt som repeterbarhet, ble funnet til å være mindre enn 3 % for både intrametodisk presisjon og for intermediær presisjon for alle analyttene (se Tabell 4.2). Metodens presisjon er derfor godkjent med hensyn på det som var målet. Resultatene oppgis med tre gjeldende siffer, noe som er mer enn godt nok. I denne metodevalideringen er intermediær presisjon undersøkt over et veldig kort tidsintervall. Analysene foregikk på en fredag (dag 1) og påfølgende mandag (dag 2) og tirsdag (dag 3). Vanligvis ville dette tidsintervallet vært noe lengre, gjerne to-tre uker, og det er da mulig å bruke en kontrollprøve i stedet for SRM som kan bli dyrt i lengden. Usikkerheten som er oppnådd her kan derfor multipliseres med 2 for å få et KI på 95 %. Dette blir da en ekspandert usikkerhet med en dekningsfaktor $k=2$. Måleusikkerheten i disse relativt lave områdene er for denne oppgaven mindre enn 6 %. Det er tydelig at RSD blir høyere når målte verdier er lave. Dette kan sees ut i fra at RSD til spiket urinprøver er lavere enn RSD for de vanlige urinprøvene (se Tabell 4.2). RSD som ligger rundt måleområdet til LOQ blir høye fordi instrumentet får problemer med å skille analytt fra bakgrunnsstøy. Det er ingen av prøvene i metodevalideringen som blir målt i så lave områder som LOQ.

Riktig lagring av urinprøver før analyse er en svært viktig forutsetning for at analysen skal gi pålitelige resultater. Etter prøvetaking var det nødvendig at urinprøvene ble fryst ned til -20 °C. I følge Haldimann et al. (1998) og Makhmudov og Caldwell (2013) vil lagring av fryst urin ikke ha noen påvirkning på nivåene av jod. Om tining av prøvene ga noe tap av analytt er usikkert.

Etter tining og preparering av urinprøver bør de helst stå i kjøleskap før analyse. Undersøkelse av stabilitet i NEPT-løsningen beviser at urinprøvene kan stå i opp til en uke i kjøleskap etter tilsetning av reagens uten påvirkning på analyttene (se kapittel 4.2). Dette gjelder også for urinprøver med høyt innhold av TDS. En annen forutsetning er at urinprøvene blir forbehandlet med basisk reagens for å holde jod i løsning slik at den kan detekteres.

Human urin er en komplisert matriks som inneholder elektrolytter, nitrogenforbindelser, vitaminer, mineraler, hormoner, organiske syrer og andre organiske forbindelser (Putnam et al. 1971). Alle disse komponentene kan forårsake reduksjon av analyttsignal under analyse. Fortynning av urinprøvene, tilsetning av IS-er og matrikstilpasning har fjernet problemer med fysiske interferenser i dette arbeidet. Det var ønskelig å utvikle en metode med lave bestemmelsesgrenser, og fortynning av urinprøvene var da en viktig faktor. En fortynning på 1:10 viste seg å gi tilfredsstillende lave bestemmelsesgrenser. Under metodeutvikling og metodevalidering ble en av kalibreringsstandardene matrikstilpasset med Na, K, P, S, Ca og Mg. Disse grunnstoffene ble valgt ut i fra Putnam et al. (1971) som skriver om hvilke ulike bestanddeler som finnes i urin. Klor ble ikke inkludert i de matrikstilpassede standardene fordi den ikke var tilgjengelig på laboratoriet på det tidspunktet. De matrikstilpassede kalibreringsstandardene, samt tilfredsstillende gjenfinning ved spiking av urinprøver viste at IS-ene gjorde jobben sin, og derfor var det ikke nødvendig at standardene under analyse av urinprøver fra mor og barn ble matrikstilpasset.

4.4 Anvendelse av metode

I metodevalideringen ble en kalibreringsstandard på 80, 40 og 20 µg/L for henholdsvis I, Se og As vurdert til å være tilfredsstillende. Ved en analysetest ble det observert en konsentrasjon av As på over 400 µg/L som ligger over det validerte måleområdet. Ved analyse av urinprøver fra mor og barn ble det derfor inkludert en ekstra kalibreringsstandard med alle analyttene i en høyere konsentrasjon. Konsentrasjoner i denne var 50 µg/L for Se og As, og 100 µg/L for I. Det sikret et fortsatt lineært måleområde for konsentrasjoner av As på opp til 500 µg/L. Alle prøvene som ble analysert i anvendelse av metoden lå dermed innenfor måleområdet for alle analyttene. Dette burde egentlig vært observert mye tidligere, fordi nivåene av As i SRM L-1 og L-2 ligger mye høyere enn for Se. Under metodevalideringen ble det også observert at det var vanskelig å få vasket ut jod på grunn av minneeffekter. Derfor ble det tilsatt ekstra NH₃ i renseløsningen til

loopen under analysen av de reelle urinprøvene. Dette viste seg å fungere godt ettersom LOQ for jod ble 2,9 µg/L (se Tabell 12 i Vedlegg B). Dette var bedre enn forventet ettersom kravet var en LOQ på mindre enn 5 µg/L.

Tabell 4.4 viser en oversikt over jodnivå i urin for ulike deltakergrupper (mødre, barn, røykere, ikke røykere, jenter og gutter). Jodnivå er oppgitt både som µg/L og µg/g kreatinin i gjennomsnitt, minimumsverdi, median og maksimumsverdi. Forklaring på utregning av korrigering for kreatinin finnes i Vedlegg B.

Tabell 4.4 viser jodnivå i urin (µg/L og µg/g kreatinin) for hele populasjonen og i ulike deltakergrupper.

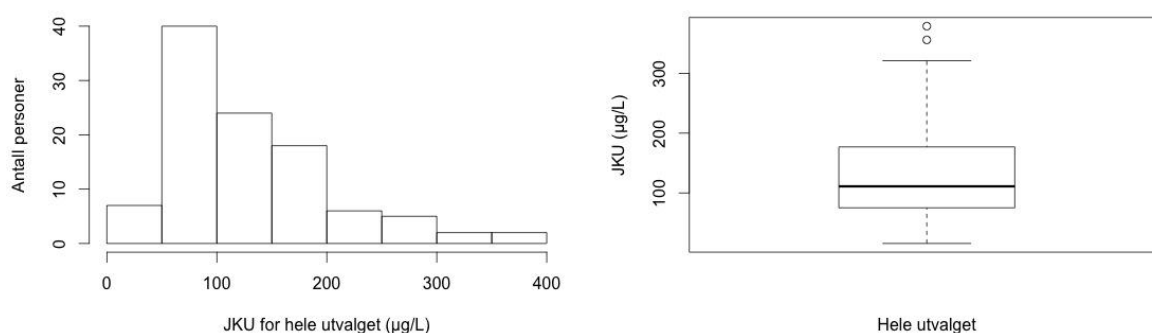
Deltakergrupper	n	Snitt		Min		Median		Maks		
		µg/L	µg/g	µg/L	µg/g	µg/L	µg/g	µg/L	µg/g	
Alle	104	129	129	15,4	30,6	111	114	379	381	
Mor	48	87,8	101	15,4	30,6	79,8	95,1	217	228	
Røykestatus *	Ikke røyker	38	89,6	104	19,4	30,6	79,8	96,8	217	228
	Røyker	9	83,8	90,2	15,4	38,2	83,9	93,9	182	184
Barn	56	165	152	51,3	44,8	146	130	379	381	
Kjønn *	Jenter	29	159	147	62,2	48,9	144	127	356	381
	Gutter	26	174	160	51,3	44,8	162	139	379	307

* For enkelte variabler manglet verdier. Dette kommer frem av n i tabellen.

I denne oppgaven er det analysert urinprøver som er samlet over et helt døgn. I følge blant annet Andersson et al. (2012), Brantsæter et al. (2009) og Soldin (2002) blir 24-timers urin brukt for å kartlegge jodnivå hos enkeltindivider og reflekterer korttidsinntak, men for å undersøke jodstatus i en befolkning brukes det som regel separate spot-urinprøver som korrigeres for kreatinin. Sistnevnte påpeker også at JKU med korreksjon for kreatinin blir enda mer pålitelig dersom det i tillegg korrigeres for alder og kjønn. WHO sine referanseverdier er også basert på median JKU for større populasjoner enn det som er benyttet her. I følge Andersen et al. (2008) trengs det rundt 400 individuelle estimerte 24-timers samleurinprøver for å bestemme jodinntaket i en populasjon med en presisjon på 5 %. Det trengs også omtrent 10 tilfeldige urinprøver for å vurdere en persons jodstatus med 20 % presisjon (Andersen et al. 2008; König et al. 2011). Dette er fordi JKU varierer betydelig fra person til person og fra dag til dag, avhengig av jodinntak. Hvorvidt man i denne oppgaven kan konkludere på jodstatus i et utvalg er derfor usikkert. Til tross for dette er median JKU i populasjonen diskutert opp mot WHO sine referanseverdier.

Andersson et al. (2010), Caldwell et al. (2003), Haldimann et al. (1998), Macours et al. (2008) og May et al. (1997) har gjort analyser på korrelasjonen mellom ICP-MS og S-K reaksjon. Alle studiene har vist at disse to analysemetodene korrelerer. Derfor kan resultater i denne undersøkelsen sammenlignes med resultater som er utført med Sandell-Kolthoff reaksjon som er en av de mest brukte metodene for rutineanalyser av jod i urin.

I Figur 4.2 vises fordelingen av JKU ($\mu\text{g/L}$) for hele utvalget både som et histogram og som et boksplokk. Et boksplokk fremstiller minste og største observasjon sammen med medianen, nedre og øvre kvartil. I tillegg vises eventuelle uteliggere. Både histogrammet og boksplokket viser visuelt at resultatene er skjevfordelt.



Figur 4.2 venstre og høyre viser fordelingen av jodkonsentrasjon i urin ($\mu\text{g/L}$) for hele utvalget ($n=104$) i form av et histogram (venstre) og et boksplokk (høyre). Median JKU er $111 \mu\text{g/L}$ for hele utvalget.

Gjennomsnittlig og median konsentrasjon av jod i urin var henholdsvis 129 og $111 \mu\text{g/L}$ for hele utvalget ($n=104$). Fordi JKU ikke er normalfordelt er det medianen som diskuteres videre. I følge WHO og UNICEF (2007) er optimalt inntak av jod som median JKU mellom 100 - $199 \mu\text{g/L}$ (se Tabell 2.3 i kapittel 2.2.5). Siden mer enn 90% av all jodinntak blir skilt ut i urin og reflekterer korttidsinntak vil en median JKU på $111 \mu\text{g/L}$ tilfredsstillende denne anbefalingen. Median JKU for mødrene ($79,8 \mu\text{g/L}$, $n=48$) ligger under dette optimale nivået. Dette blir av WHO definert som mild jodmangel i en befolkning. For barna ligger median JKU på $146 \mu\text{g/L}$ ($n=56$) som er et optimalt inntak. Det var signifikant forskjell i JKU for mødre og barn ($p < 0,05$).

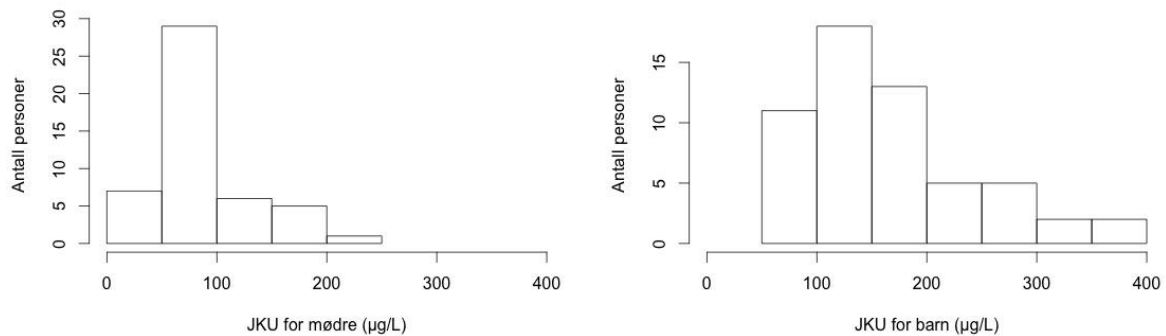
Tabellen nedenfor viser andel av forsøkspersonene som lå i de ulike kategoriene av median JKU basert på WHO sine vurderinger.

Tabell 4.5 viser andel av hele utvalget (n=104), mødrene (n=48) og barna (n=56) som lå i de ulike kategoriene av median JKU i forhold til WHO sine vurderinger.

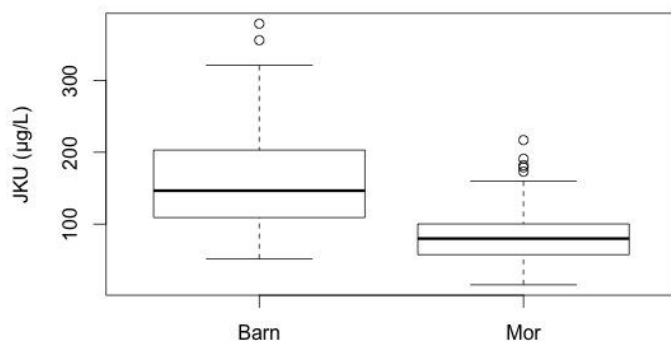
Median JKU (µg/L)	Andel av hele utvalget % (n)	Andel av mødrene % (n)	Andel av barna % (n)	Jodinntak	Jodstatus
<20	1,92 (2)	4,2 (2)	-	Utilstrekkelig	Alvorlig jodmangel
20-49	4,81 (5)	10,4 (5)	-	Utilstrekkelig	Moderat jodmangel
50-99	38,5 (40)	60,4 (29)	19,6 (11)	Utilstrekkelig	Mild jodmangel
100-199	40,4 (42)	22,9 (11)	55,4 (31)	Tilstrekkelig	Optimalt
200-299	10,6 (11)	2,08 (1)	17,9 (10)	Mer enn tilstrekkelig	Risiko for jodindusert hypertyreose innen 5-10 år etter inntak av jodifisert salt i utsatte grupper
≥300	3,85 (4)	-	7,14 (4)	For mye	Risiko for negative helseeffekter (jodindusert hypertyreose, autoimmune sykdommer på tyreoida)

Tabell 4.5 viser at av hele utvalget var det 45,2 % (n=47) som hadde en JKU på mindre enn 100 µg/L. Kun to av disse hadde en JKU på <20 µg/L. Fem personer lå mellom 20 og 49 µg/L, mens resten av de personene med lavere enn 100 µg/L jod i urin lå mellom 50 og 99 µg/L. Av mødrene var det hele 75 % (n=36) som hadde JKU <100 µg/L, mens for barna var det kun 19,6 % (n=11). Innenfor disse 19,6 % hadde alle barna en JKU på over 50 µg/L. Kibirige et al. (2004) skriver at et lavt inntak av jod blir indikert av en konsentrasjon i urin på mindre enn 50 µg/L. Dette gjelder for individuell 24-timers samleurin. En JKU mellom 50 og 100 µg/L blir her definert som ”i grenseland for jodmangel”. Som beskrevet i kapittel 2.2.1, viste studien til Brantsæter et al. (2013) at kun 5 % av gruppen med gravide kvinner hadde et jodinntak lavere enn 50 µg/L. Av denne populasjonen er det kun 6,73 % (n=7) som har en JKU på <50 µg/L, og av disse er det ingen barn. 38,5 % (n=40) ligger i grenseland for jodmangel, og av disse er hele 72,5 % (n=29) mødre. I følge WHO et al. (2007) sine kriterier skal ikke mer enn 20 % av en befolkning med tilstrekkelig jodinntak ha lavere JKU enn 50 µg/L.

JKU hos barna var mye jevnere fordelt over et større konsentrasjonsområde enn det den var for mødrene (se Figur 4.3 og Figur 4.4).



Figur 4.3 venstre og høyre viser fordelingen av JKU ($\mu\text{g/L}$) hos mødre, $n=48$ (venstre) og hos barn, $n=56$ (høyre).



Figur 4.4 viser fordelingen av JKU ($\mu\text{g/L}$) hos barn, $n=56$ (venstre) og hos mødre, $n=48$ (høyre). Median JKU for barn er $146 \mu\text{g/L}$ og $79,8 \mu\text{g/L}$ for mødre.

Det var ikke signifikante forskjeller mellom jodnivå i urin og mellom røykere og ikke røykere, men den høyeste maksimumsverdien for mødrene var fra en ikke røykende mor. Det var heller ingen signifikant forskjell i JKU mellom jenter ($n=29$) og gutter ($n=26$) ($p > 0,05$), men den høyeste maksimumsverdien for barna var fra en gutt ($379 \mu\text{g/L}$). Med korreksjon på kreatinin var den høyeste maksimumsverdien fra en jente ($381 \mu\text{g/g}$ kreatinin). Et mål av JKU i $\mu\text{g/L}$ kan underestimere daglig jodutskillelse for personer som har et urinvolum høyere enn 1 L/dag. Ved mangel på totalt døgnurinvolum er det i denne oppgaven derfor korrigert for kreatinin. 24-timers samleurin korrigert for kreatinin er nyttig ved vurdering av nylig jodinntak hos individer (Brantsæter et al. 2009; Zava et al. 2013). Korreksjon på kreatinin tillater variasjoner i

konsentrasjon eller fortykning av urin forårsaket av variasjoner i individets inntak av væske (Zava et al. 2013).

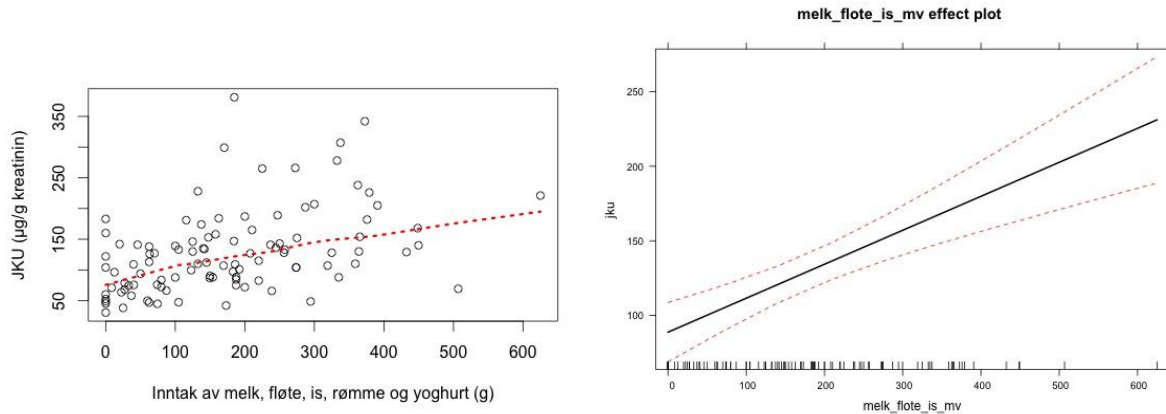
Væskeinntaket varierer mye fra person til person, og det vil også urinvolumet gjøre. En person kan skille ut opp mot 20 liter urin i løpet av en dag, men urinvolumet kan også være nede i 0,5 liter per dag. Standard væskebehov per døgn hos voksne ligger mellom 30 og 40 mL per kg kroppsvekt (Einen et al. 2013). Barn har behov for mer væske per kilo kroppsvekt. Med et væskeinntak på 2 liter per dag, vil normalt urinvolum ligge på rundt 800-2000 mL per dag (Medline Plus 2013). Et urinvolum på 2 liter per dag vil si at maks jodkonsentrasjon på 379 µg/L vil overstige øvre inntaksnivå på 600 µg/dag satt av NNR (2012). Ut i fra rådataene er det kun 4 personer av totalt 104 som har et jodnivå over 300 µg/L, og alle disse er barn. Siden totalt døgnurinvolum er ukjent er det vanskelig å konkludere om noen av forsøkspersonene hadde høyere JKU enn 600 µg/dag. Som i studien av Dahl et al. (2004) der ingen av de voksne hadde et jodinntak høyere enn 1 mg/dag, viser resultatene i denne undersøkelsen at ingen har en JKU høyere enn 1 mg/dag. Med et 2 liters urinvolum per døgn vil minimum jodkonsentrasjon på 15,4 µg/L være mye lavere enn nedre inntaksnivå på 70 µg/dag, men dette gjelder for mødrene i og med at den laveste minimumsverdien for barna er 51,3 µg/L.

Sammenhengen mellom inntak av ulike matvaregrupper og jodkonsentrasjonen i urin er undersøkt. De ulike matvaregruppene som har blitt testet er brød, kornprodukter, kaker, poteter, grønnsaker, frukt/bær, kjøtt/blod/innmat, fisk/skalldyr, egg, melk/fløte/is/rømme/yoghurt, ost, smør/margarin/olje, sukker/søtsaker, drikkevarer og diverse.

Nivåene av jod i urin økte signifikant med økende inntak av melk, fløte, is, rømme og yoghurt med en korrelasjon på $\rho = 0,48$ (se Figur 4.5). Lineær regresjon viste også en sterk signifikant sammenheng mellom JKU og inntak av denne matvaregruppen. Dersom en person får i seg melk, fløte, is, rømme og yoghurt vil dette altså øke nivåene av jod i urin.

Bestemmelseskoeffisienten ved lineær regresjon forteller at omtrent 19 % av JKU er forklart ved hjelp av inntaket av melk/fløte/is/rømme/yoghurt. Det vil si at det også er andre faktorer som bidrar til økte nivåer av JKU, men i forhold til de andre matvaregruppene er disse 19 prosentene

en veldig stor andel som bidrar til økt jodnivå i urin til tross for at urinprøvene er tatt mellom vår og sommer.



Figur 4.5 venstre og høyre viser sammenhengen mellom JKU ($\mu\text{g/L}$) og inntak av melk, fløte, is, rømme og yoghurt (g). $n=104$, $\rho=0,48$ og $p<0,05$. Figurene er laget med Spearman korrelasjon (venstre) og lineær regresjon (høyre) i R Studio (R Core Team 2013).

Statistiske analyser viser at JKU og drikkevarer har en signifikant negativ sammenheng ($\rho = -0,33$ og $p < 0,05$). Det samme gjelder for sammenhengen mellom JKU og matvaregruppen frukt og bær ($\rho = -0,22$ og $p < 0,05$).

I følge Tabell 2.1 i kapittel 2.2.2 er melk og melkeprodukter, fisk og sjømat, ost og egg de matvaregruppene som inneholder mest jod. Fisk og skalldyr, samt matvaregruppene egg og ost korrelerer i denne undersøkelsen ikke med JKU ved bruk av Spearman korrelasjon. Dette er likevel ikke signifikante observasjoner. Spearman korrelasjonstest tar hensyn til skjevfordelt data, samtidig som at nullverdier ikke påvirker analysen fordi den benytter seg av rangeringsverdier. Matvaregruppene fisk og skalldyr, og egg inneholder mange nullverdier, og derfor kan det ikke brukes vanlig lineær regresjon på disse. Som beskrevet i kapittel 2.2.2 er inntaket av fisk redusert de siste tiårene, og unge kvinner har det laveste inntaket. For å undersøke om disse to matvaregruppene påvirket nivåene av jod hos de forsøkspersonene som hadde et inntak av fiskeprodukter ($n=32$) og egg ($n=17$), ble nullverdier fjernet og testet for korrelasjon. Det var fortsatt ikke korrelasjon mellom JKU og fisk eller egg. Dette resultatet kan komme av at ved fjerning av nullverdiene blir det altfor få observasjoner, eller at det burde blitt benyttet andre statistiske tester med for eksempel kategorisering av inntaket. Ved bruk av andre statistiske tester ville muligens korrelasjonen mellom JKU og fisk, JKU og egg, samt JKU og ost

vært annerledes. Manglende korrelasjon med fiskeinntak kan også skyldes at forsøkspersonene som hadde et inntak av fisk og skalldyr spiste fiskeslag med lite jod i (se Tabell 2.1 i kapittel 2.2.2). Dersom alle har spist oppdrettslaks, og porsjonene er små, kan det ikke forventes korrelasjon. Det er en kombinasjon av høyt innhold og høyt inntak som gjør at melk og melkeprodukter er den største kilden til jod i befolkningen. Det høyere nivået av JKU hos barn enn hos mødre kan dermed også forklares ved at barn har et høyere inntak av matvaregruppen melk/fløte/is/rømme/yoghurt enn det mødre har (se Tabell 19 i Vedlegg F). En annen forklaring kan være at barna har tatt jodholdige kosttilskudd.

Det er for lavt inntak av jod som er av bekymring i denne populasjonen, ikke et for høyt inntak, og det er mødre som har en median JKU som tilsvarer mild jodmangel. Laveste JKU er på 15,4 µg/L men ligger langt over LOQ. Denne personen har et nullinntak av kornprodukter, kaker, poteter, kjøtt/blod/innmat, fisk/skalldyr, egg, melk/fløte/is/rømme/yoghurt, ost, smør/margarin/olje, sukker/søtsaker og diverse de siste 24 timene, men har et inntak av brød, grønnsaker, frukt/bær og drikke. Det kan likevel være at denne personen får i seg jod på andre måter, som for eksempel tilskudd med jod, sjøgress eller jodifisert salt, men på grunn av manglende informasjon om dette er ikke det sikkert. Dersom en person ikke får i seg jod på andre måter enn ved å spise sjømat, egg og melkeprodukter (for eksempel en veganer), er det mulig at jodnivået til denne personen kan komme under 15,4 µg/L. En lav LOQ og et stort måleområde er uansett svært viktig fordi urinprøvene viser veldig høy individuell variasjon i jodkonsentrasjon.

Siden JKU hos barna i denne undersøkelsen er tilstrekkelig, burde JKU hos spedbarn undersøkes. Spedbarn har høy risiko for jodmangel fordi deres krav per kilo kroppsvekt for jod og tyreoidhormoner er mye høyere enn på noe annet tidspunkt i livet (Andersson et al. 2010). Tabell 2.3 i kapittel 2.2.5 viser at mindre enn 100 µg/L for både ammende kvinner og barn mindre enn 2 år er utilstrekkelig. Spedbarns høye risiko for jodmangel er i følge Andersson et al. (2010) grunnet at mestedelen av jod kommer fra saltet, og ammende mødre skal ikke spise noe ekstra salt under graviditeten. Dette er ikke så relevant for Norge ettersom vi får marginalt eller ikke noe jod i oss fra saltet. Men fordi det er mødre som forsyner fosteret med jod, og fordi en stor del av mødre i denne undersøkelsen ligger i grenseland for jodmangel, kan dette være interessant å undersøke likevel. Det er tross alt under fosterutviklingen og i tiden rett etter fødsel

at de mest ødeleggende konsekvensen av jodmangel forekommer. I følge studien av Brantsæter et al. (2013) er det grunn til bekymring for norske gravide kvinner, spesielt for de som har et lavt inntak av melkeprodukter og sjømat, fordi denne gruppen ikke får i seg tilstrekkelige mengder jod.

5 Videre arbeid

Det er i dette arbeidet utført en vellykket metodeutvikling og metodevalidering for bestemmelse av jod i urin på ICP-MS-QQQ. Den validerte metoden er i tillegg anvendt på reelle urinprøver fra mor og barn – noe som beviser at denne analysemetoden kan brukes i rutineanalyser for kartlegging av JKU. Det er likevel mulighet for videre arbeid. Mye er diskutert i kapittel 4, men kapittel 5.1 og 5.2 gir en kort oppsummering av mine forslag til videre arbeid.

5.1 Metodeutvikling og metodevalidering

- Teste analysemetoden med flere analytter. Basert på prøveprepareringen kan blant annet grunnstoffer som Br, Cl, S, P, Cd, Pb og Mo inkluderes (se side 38 i kapittel 4.2).
- Prøve ut flere forbehandlinger av urinprøvene. Eksempelvis basisk dekomponering eller tilsetning av TMAH med EDTA (se side 38 i kapittel 4.2).
- Mindre fortynning av urinprøvene og bruk av HMI som plasmamodus (se side 38 i kapittel 4.2).
- Lage en kontrollprøve som kan brukes i stedet for SRM over en lengre periode (se side 36 i kapittel 4.2).
- Gjøre et tidslagingsforsøk for å undersøke stabilitet av analytter i reagensen over lengre tid enn én uke (se side 36 i kapittel 4.2).
- Gjøre et fryselagringsforsøk for å undersøke om tining av urinprøvene påvirker analyttene (se side 33 i kapittel 4.1).
- Inkludere en blindtest på beholderne som er brukt til prøvetaking og lagring av urinprøvene (se side 33 i kapittel 4.1).

5.2 Anvendelse av metode

- Ta spot-urinprøver i stedet for samleurin over 24 timer for å kunne undersøke en befolknings jodstatus (se side 44 i kapittel 4.4).
- Skaffe flere forsøkspersoner for å øke påliteligheten av studier på jodstatus i en populasjon, samt skaffe flere urinprøver fra forsøkspersonene dersom individuell jodstatus skal vurderes (se side 44 i kapittel 4.4).

- Lage kostholdsskjema som er spesifikke for det som skal undersøkes, samt den gruppen som skal undersøkes. Eksempelvis inntak av viktige matvarer, informasjon om faktorer som kan påvirke resultatene og faktorer som er viktige for å kunne sammenligne resultater med annen litteratur (se side 33 i kapittel 4.1).
- Bruke multivariabel lineær regresjon til utførelse av korrelasjoner mellom JKU og ulike matvaregrupper (se side 33 i kapittel 4.1).
- På grunn av høye verdier av jod i mager fisk og mysost, hadde det vært interessant å undersøke korrelasjoner mellom JKU og inntak av disse matvaregruppene (se side 33 i kapittel 4.1)
- Bestemme JKU hos spedbarn (se side 50 i kapittel 4.4).
- Undersøke resultater av selen og arsen i urin, fordi disse også er involvert i skjoldbruskkjertelhormonene.

6 Konklusjon

I dette mastergradsarbeidet har det blitt utviklet og validert en enkel metode for bestemmelse av I, Se og As i urin på ICP-MS-QQQ med god nøyaktighet. Urinprøvene har blitt tilsatt en basisk reagens (NEPT) og fortynnet 1:10. Til tross for en 1:10 fortynning er det oppnådd lave deteksjonsgrenser for alle analyttene. Kravet til LOQ for jod var $\leq 5 \mu\text{g/L}$, og det ble oppnådd en gjennomsnittlig LOQ på $3,8 \mu\text{g/L}$ for valideringsdag 1 og 3. Krav til LOQ for Se og As var henholdsvis $\leq 3 \mu\text{g/L}$ og $\leq 1 \mu\text{g/L}$. Gjennomsnittlig LOQ for alle valideringsdagene ble $0,38 \mu\text{g/L}$ for Se og $0,075 \mu\text{g/L}$ for As. Dette var resultater bedre enn forventet. En ekspandert usikkerhet på mindre enn 6 % totalt for de tre valideringsdagene oppfylte kravet om en usikkerhet i metoden lavere enn 10 % for hele måleområdet. Ved anvendelse av metoden ble LOQ $2,9 \mu\text{g/L}$ for I, $0,20 \mu\text{g/L}$ for Se og $0,076 \mu\text{g/L}$ for As. For å oppnå lave bestemmelsesgrenser var det en utfordring at jod hang igjen i pumpe-slanger og i prøveintroduksjonssystemet i instrumentet. Dette ble løst ved å ha nok ammoniakk i reagensen og i renseløsningen til loopen. Analyttene av interesse ble holdt i løsning til tross for høyt innhold av TDS, og det ble også oppnådd god linearitet over et stort konsentrasjonsområde for alle analyttene. Den validerte analysemetoden oppfylte alle kravene i hypotesene som ble formulert i innledningen. ICP-MS er en relativt dyr teknikk som ikke er tilgjengelig overalt, men med sin MS/MS funksjon kan instrumentet effektivt fjerne interferenser i reaksjonsmodus, noe som fører til mer nøyaktige og pålitelige resultater – uavhengig av prøvetype.

Det er i denne undersøkelsen ikke mulig å konkludere på jodstatusen til Norges befolkning, men forsøkspersonene fra undersøkelsen er representative for undergruppen mødre, samt barn i alderen 6 til 12 år som er bosatt i Oslo og Akershus. Median JKU for utvalget som ble undersøkt i dette arbeidet var $111 \mu\text{g/L}$ ($n=104$). Dette tilsvarer et optimalt inntak av jod. Det var en signifikant forskjell på JKU hos mødre og hos barn, hvor mJKU for mødre var $79,8 \mu\text{g/L}$ ($n=48$), og mJKU for barna var $146 \mu\text{g/L}$ ($n=56$). Dette tilsvarer mild jodmangel for mødre og optimalt inntak for barna dersom referanseverdiene fra WHO benyttes. Dersom et lavt inntak av jod blir indikert av en konsentrasjon i urin på mindre enn $50 \mu\text{g/L}$ (som baseres på individuell 24-timers samleurin) er det kun 6,73 % ($n=7$) av dette utvalget som har et lavt inntak av jod, hvorav disse er det ingen barn. Dersom en JKU mellom 50 og $100 \mu\text{g/L}$ blir definert som ”i grenseland for jodmangel” ligger 38,5 % ($n=40$) i grenseland for jodmangel, og av disse er 72,5

% (n=29) mødre. Det var ikke signifikante forskjeller på JKU mellom jenter og gutter eller røykere og ikke røykere. Enkle korrelasjonsanalyser mellom JKU og inntak av ulike matvaregrupper viste at det var kun inntak av matvaregruppen melk, fløte, is, rømme og yoghurt som korrelerte signifikant. Selv om det var forventet at matvaregruppene fisk og skalldyr, ost og egg også skulle korrelere med JKU på grunn av høyt innhold av jod i disse matvarene, var det ingen sammenheng i denne undersøkelsen. Kombinasjonen av høyt jodinnhold og høyt inntak gjør at melk og melkeprodukter bidrar som den største kilden til jod i denne populasjonen. Det er observert at JKU varierer veldig mye fra person til person grunnet ulikt kosthold. Det blir derfor viktig at analysemetoden har god linearitet over et stort måleområde, samt et forsøksoppsett som tillater pålitelighet av studier på jodstatus.

Referanser

- Abraham, G. E. (2003). *Iodine supplementation markedly increases urinary excretion of fluoride and bromide*: St. Benedicts Health Care. 3 s. Upublisert manuskript.
- Agilent Technologies. (2005). *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry - A Primer*. USA: Agilent Technologies, Inc. 84 s.
- Agilent Technologies. (2012). *Agilent 8800 Triple Quadrupole ICP-MS*. USA: Agilent Technologies, Inc. 12 s.
- Agilent Technologies. (2013). *Agilent 8800 ICP-QQQ Application Handbook*. USA. 92 s.
- Al-Ammar, A., Reitznerová, E. & Barnes, R. M. (2001). Thorium and iodine memory effects in inductively-coupled plasma mass spectrometry. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 370 (5): 479-482.
- Andersen, S., Karmisholt, J., Pedersen, K. M. & Laurberg, P. (2008). Reliability of studies of iodine intake and recommendations for number of samples in groups and in individuals. *British Journal of Nutrition*, 99 (04): 813-818.
- Andersson, M., Aeberli, I., Wüst, N., Piacenza, A. M., Bucher, T., Henschen, I., Haldimann, M. & Zimmermann, M. B. (2010). The Swiss iodized salt program provides adequate iodine for school children and pregnant women, but weaning infants not receiving iodine-containing complementary foods as well as their mothers are iodine deficient. *J Clin Endocrinol Metab*, 95 (12): 5217-5224.
- Andersson, M., Karumbunathan, V. & Zimmermann, M. B. (2012). Global Iodine Status in 2011 and Trends over the Past Decade. *The Journal of Nutrition*, 142 (4): 744-750.
- Ataro, A., McCrindle, R. I., Botha, B. M., McCrindle, C. M. E. & Ndibewu, P. P. (2008). Quantification of trace elements in raw cow's milk by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). *Food Chemistry*, 111 (1): 243-248.
- Baumann, H. (1990). Rapid and sensitive determination of iodine in fresh milk and milk powder by inductively coupled plasma — mass spectrometry (ICP-MS). *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 338 (7): 809-812.
- Birgisdottir, B. E., Knutsen, H. K., Haugen, M., Gjelstad, I. M., Jenssen, M. T. S., Ellingsen, D. G., Thomassen, Y., Alexander, J., Meltzer, H. M. & Brantsæter, A. L. (2013). Essential and toxic element concentrations in blood and urine and their associations with diet: Results from a Norwegian population study including high-consumers of seafood and game. *Science of The Total Environment*, 463–464 (0): 836-844.
- Brantsæter, A. L., Haugen, M., Julshamn, K., Alexander, J. & Meltzer, H. M. (2009). Evaluation of urinary iodine excretion as a biomarker for intake of milk and dairy products in pregnant women in the Norwegian Mother and Child Cohort Study (MoBa). *European Journal of Clinical Nutrition*, 63 (3): 347-354.
- Brantsæter, A. L., Abel, M. H., Haugen, M. & Meltzer, H. M. (2013). Risk of Suboptimal Iodine Intake in Pregnant Norwegian Women. *Nutrients*, 5 (2): 424-440.
- Caldwell, K. L., Maxwell, C. B., Makhmudov, A., Pino, S., Braverman, L. E., Jones, R. L. & Hollowell, J. G. (2003). Use of Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry to Measure Urinary Iodine in NHANES 2000: Comparison with Previous Method. *Clinical Chemistry*, 49 (6): 1019-1021.

- Dahl, L., Johansson, L., Julshamn, K. & Meltzer, H. M. (2004). The iodine content of Norwegian foods and diets. *Public Health Nutrition*, 7 (4): 569-576.
- Dahl, L. & Meltzer, H. M. (2009). The Iodine Content of Foods and Diets: Norwegian Perspectives. I: Preedy, V. R., Burrow, G. N. & Watson, R. (red.) *Comprehensive Handbook of Iodine*, s. 345-352: Oxford: Academic Press.
- Eckhoff, K. M. & Maage, A. (1997). Iodine Content in Fish and Other Food Products from East Africa Analyzed by ICP-MS. *Journal of Food Composition and Analysis*, 10 (3): 270-282.
- Einen, M., Flaatten, H., Iversen, P. O., Kolsrud, E., Kvale, D., Reigstad, H., Tangvik, R. & Tazmini, K. (2013). *Ernæring, væskesubstitusjon og elektrolyttforstyrrelser*. Oslo: Foreningen for utgivelse av Norsk legemiddelhandbok. Tilgjengelig fra: <http://legemiddelhandboka.no/Terapi/25021?expand=1> (lest 25.04.14).
- Eurachem. (1998). *The Fitness for Purpose of Analytical Methods*. A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. UK. 75 s.
- European Commission. (2002). Opinion of the Scientific Committee on Food on the Tolerable Upper Intake Level of Iodine. Belgium: Scientific Committee on Food. 25 s.
- Gaines, P. R. (2011). *ICP Operations Guide*. A Guide for using ICP-OES and ICP-MS. Inorganic Ventures. 37 s.
- Gélinas, Y., Krushevska, A. & Barnes, R. M. (1998). Determination of Total Iodine in Nutritional and Biological Samples by ICP-MS Following Their Combustion within an Oxygen Stream. *Analytical Chemistry*, 70 (5): 1021-1025.
- Grases, F., Villacampa, A. I., Söhnel, O., Königsberger, E. & May, P. M. (1997). Phosphate Composition of Precipitates from Urine-like Liquors. *Crystal Research and Technology*, 32 (5): 707-715.
- Haldimann, M., Zimmerli, B., Als, C. & Gerber, H. (1998). Direct determination of urinary iodine by inductively coupled plasma mass spectrometry using isotope dilution with iodine-129. *Clinical Chemistry*, 44 (4): 817-824.
- Haug, A., Christophersen, O., Høstmark, A. T. & Harstad, O. M. (2007). Melk og Helse. *Tidsskrift for Den Norske Legeforening*, 127: 2542-2545.
- Heitland, P. & Köster, H. D. (2005). Biomonitoring of 30 trace elements in urine of children and adults by ICP-MS. *Clinica Chimica Acta*, 365 (1-2): 310-318.
- Hou, X., Hansen, V., Aldahan, A., Possnert, G., Lind, O. C. & Lujaniene, G. (2009). A review on speciation of iodine-129 in the environmental and biological samples. *Analytica Chimica Acta*, 632 (2): 181-196.
- Izmer, A. V., Boulyga, S. F. & Becker, J. S. (2003). Determination of ¹²⁹I/¹²⁷I isotope ratios in liquid solutions and environmental soil samples by ICP-MS with hexapole collision cell. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 18 (11): 1339-1345.
- Jensen, K. A. (2012). *Personlig meddelelse*. UMB, Ås: Universitetet for miljø- og biovitenskap.
- Jönsson, H. (1999). Source Separation of Human Urine - Separation Efficiency and Effects on Water Emissions, Crop Yield, Energy Usage and Reliability. 7.
- Kibirige, M. S., Hutchison, S., Owen, C. J. & Delves, H. T. (2004). Prevalence of maternal dietary iodine insufficiency in the north east of England: implications for the fetus. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*, 89 (5): F436-9.

- König, F., Andersson, M., Hotz, K., Aeberli, I. & Zimmerman, M. B. (2011). Ten repeat collections for urinary iodine from spot samples or 24-hour samples are needed to estimate individual iodine status in women. *Journal of Nutrition*, 141: 2049-2054.
- Laurberg, P., Nøhr, S. B., Pedersen, K. M. & Fuglsang, E. (2004). Iodine Nutrition in Breast-Fed Infants Is Impaired by Maternal Smoking. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 89 (1): 181-187.
- Macours, P., Aubry, J. C., Hauquier, B., Boeynaems, J. M., Goldman, S. & Moreno-Reyes, R. (2008). Determination of urinary iodine by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 22 (2): 162-165.
- Magnus, P., Irgens, L. M., Haug, K., Nystad, W., Skjærven, R., Stoltenberg, C. & Group, T. M. S. (2006). Cohort profile: The Norwegian Mother and Child Cohort Study (MoBa). *International Journal of Epidemiology*, 35 (5): 1146-1150.
- Makhmudov, A. A. & Caldwell, K. L. (2013). The Challenge of Iodine Deficiency Disorder A Decade of CDC's Ensuring the Quality of Urinary Iodine Procedures Program. USA: Centers for Disease Control and Prevention. 65 s.
- May, S. L., May, W. A., Bourdoux, P. P., Pino, S., Sullivan, K. M. & Maberly, G. F. (1997). Validation of a simple, manual urinary iodine method for estimating the prevalence of iodine-deficiency disorders, and interlaboratory comparison with other methods. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 65 (5): 1441-1445.
- May, T. W. & Wiedmeyer, R. H. (1998). A Table of Polyatomic Interferences in ICP-MS. *Atomic Spectroscopy*, 19 (5): 150-155.
- Medline Plus. (2013). *Urine Volume; 24-hour urine collection*. I: Dugdale, D. C. (red.). Tilgjengelig fra: <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/article/003425.htm> (lest 25.04.14).
- Meltzer, H. M. (2014). *Personlig meddelelse*.
- Microgenics Corporation. (2005). *DRI Creatinine-Detect Test*. For In Vitro Diagnostic Use. USA. 2 s.
- Microsoft Office Excel. (2011).
- National Institute of Standards & Technology. (2009). *Trace Elements in Water*. Standard Reference Material 1643e. Gaithersburg, MD: National Institute of Standards & Technology. 3 s.
- NNR. (2012). *Iodine*. Nordic Nutrition Recommendations. 7 s.
- Perkin Elmer. (2010-2014). *Determination of Trace Metals in Human Urine Using the NexION 300/350 ICP-MS*. ICP - Mass Spectrometry. USA: Perkin Elmer, Inc.
- Putnam, D. F., Company-West, M. D. A., Center, L. R., Aeronautics, U. S. N. & Administration, S. (1971). *Composition and Concentrative Properties of Human Urine*: National Aeronautics and Space Administration.
- Püschner Microwave Power Systems. *Microwave Technology, Physical Basics*. Germany. Tilgjengelig fra: http://www.pueschner.com/basics/phys_basics_en.php (lest 11.02.14).
- R Core Team. (2013). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing.

- Reid, H. J., Bashammakh, A. A., Goodall, P. S., Landon, M. R., O'Connor, C. & Sharp, B. L. (2008). Determination of iodine and molybdenum in milk by quadrupole ICP-MS. *Talanta*, 75 (1): 189-197.
- Sero AS. *Seronorm™ Trace Elements Urine L-1, L-2*. Billingstad, Norway: Sero AS. 4 s.
- Shelor, C. P. & Dasgupta, P. K. (2011). Review of analytical methods for the quantification of iodine in complex matrices. *Analytica Chimica Acta*, 702 (1): 16-36.
- Soldin, O. P. (2002). Controversies in urinary iodine determinations. *Clinical Biochemistry*, 35: 575-579.
- Stärk, H. J., Mattusch, J., Wennrich, R. & Mroczek, A. (1997). Investigation of the IC-ICP-MS determination of iodine species with reference to sample digestion procedures. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 359 (4-5): 371-374.
- Teng, W., Shan, Z., Teng, X., Guan, H., Li, Y., Teng, D., Jin, Y., Yu, X., Fan, C., Chong, W., et al. (2006). Effect of Iodine Intake on Thyroid Diseases in China. *New England Journal of Medicine*, 354 (26): 2783-2793.
- Udert, K. M., Larsen, T. A. & Gujer, W. (2003). Biologically induced precipitation in urine-collecting systems. *IWA Publishing*, 3 (3): 71-78.
- 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. 8.
- Waters, R. S., Bryden, N. A., Patterson, K. Y., Veillon, C. & Anderson, R. A. (2001). EDTA chelation effects on urinary losses of cadmium, calcium, chromium, cobalt, copper, lead, magnesium, and zinc. *Biological Trace Element Research*, 83 (3): 207-221.
- WHO. (2004). Iodine Status Worldwide. I: Benoist, B. d., Andersson, M., Egli, I., Takkouche, B. & Allen, H. (red.). *WHO Global Database on Iodine Deficiency*. Geneva, Switzerland: World Health Organization. 58 s.
- WHO & UNICEF. (2007). Iodine Deficiency in Europe - a continuing public health problem. I: Andersson, M., de Benoist, B., Darnton-Hill, I. & Delange, F. (red.), 978 92 4 159396 0. Geneva, Switzerland: World Health Organization. 70 s.
- WHO, UNICEF & ICCIDD. (2007). Assessment of IDD and Monitoring Their Elimination. I: de Benoist, B., Burrow, G. & Schultink, W. (red.). World Health Organization: International Council for the Control of Iodine Deficiency Disorders. 98 s.
- WHO. (2013). Urinary Iodine Concentrations for Determining Iodine Status in Populations. *Vitamin and Mineral Nutrition Information System*: 5.
- Zava, T. T., Kapur, S. & Zava, D. T. (2013). Iodine and creatinine testing in urine dried on filter paper. *Analytica Chimica Acta*, 764 (0): 64-69.
- Aakre, I. (2011). *Iodine intake and iodine status among lactating women and their children in the Saharawi refugee camps, Algeria*. Food, Nutrition and Health. Oslo, Norway: Akershus University College Faculty of Health, Nutrition and Management. 175 s.

Vedlegg A – Metodeutvikling og metodevalidering

4.2 Metodeutvikling

Tabell 1 viser kvantifiseringsgrenser for I, Se og As i ulike reagenser. Konsentrasjoner er oppgitt i µg/L (n=5).

Analytt	NEPT	HNO ₃	CFA-C
⁷⁵ As	0,049	0,27	0,11
⁷⁸ Se	0,44	0,98	0,37
¹²⁷ I	0,72	-	0,83

4.3 Metodevalidering

Tabell 2 viser oppnådd regresjonslikning og korrelasjonskoeffisient ved analyse av syv standarder med ulike konsentrasjoner inkludert kalibreringsblank.

Analytt	Regresjonslikning Y = b(X+a/b)	Korrelasjonskoeffisient
¹²⁷ I	Y = 3,0702(X+1,7131)	1,0000
⁷⁸ Se	Y = 0,0033(X + 1,2907E-005)	0,9999
⁷⁵ As	Y = 0,0861(X + 4,4457E-004)	1,0000

$$\text{Bias (\%)} = \frac{\text{Gjennomsnittlig konsentrasjon i målt SRM} - \text{referanseverdi}}{\text{Referanseverdi}} * 100$$

Tabell 3 viser målte verdier, gjennomsnitt, SD, RSD og bias for SRM L-1 og L-2 på dag 1 under metodevalideringen (n=4). Alle verdiene unntatt RSD og bias er i µg/L.

	⁷⁵ As	⁷⁸ Se	⁸² Se	¹²⁷ I
SRM L1	82	14,5	13,9	79,6
SRM L1	81	14,7	13,5	80,6
SRM L1	84	14,3	14,1	79,4
SRM L1	83	14,2	15,3	79,4
Gjennomsnitt	82	14,4	14,2	79,8
SD	1,2	0,22	0,77	0,57
RSD (%)	1,48	1,54	5,45	0,720
Bias (%)	3,8	3,6	2,2	-5
SRM L2	187	76,9	77,0	280
SRM L2	189	75,8	77,7	282
SRM L2	189	76,0	77,0	285
SRM L2	189	75,3	75,6	285
Gjennomsnitt	189	76,0	76,8	283
SD	1,0	0,67	0,88	2,4
RSD (%)	0,531	0,879	1,15	0,866
Bias (%)	2,7	8,4	9,6	-6,9

Grønne felt markerer at verdiene ligger innenfor det sertifiserte området, gule felt er verdier som ligger på grensen for sertifisert område, og røde felt er verdier som ligger utenfor SRM.

Tabell 4 viser målte verdier, gjennomsnitt, SD, RSD og bias for SRM L-1 og L-2 på dag 2 under metodevalideringen (n=4). Alle verdiene unntatt RSD og bias er i µg/L.

	⁷⁵ As	⁷⁸ Se	⁸² Se	¹²⁷ I
SRM L1	82	13,6	13,8	81,0
SRM L1	84	14,1	13,9	81,0
SRM L1	85	15,0	14,8	82,3
SRM L1	83	14,7	14,1	80,1
Gjennomsnitt	84	14,4	14,2	81,1
SD	1,3	0,62	0,45	0,91
RSD (%)	1,58	4,35	3,19	1,12
Bias (%)	6,3	3,6	2,2	-2,5
SRM L2	193	78	76,8	284
SRM L2	192	79	77,2	287
SRM L2	193	80	78,0	287
SRM L2	187	75	75,8	286
Gjennomsnitt	191	78	77,0	286
SD	2,9	2,2	0,91	1,4
RSD (%)	1,50	2,88	1,19	0,494
Bias (%)	3,8	11	9,8	-5,9

Grønne felt markerer at verdiene ligger innenfor det sertifiserte området, gule felt er verdier som ligger på grensen for sertifisert område, og røde felt er verdier som ligger utenfor SRM.

Tabell 5 viser målte verdier, gjennomsnitt, SD, RSD og bias for SRM L-1 og L-2 på dag 3 under metodevalideringen (n=4). Alle verdiene unntatt RSD og bias er i µg/L.

	⁷⁵ As	⁷⁸ Se	⁸² Se	¹²⁷ I
SRM L1	82	14,1	13,8	83
SRM L1	83	14,2	13,9	82
SRM L1	85	14,2	14,4	82
SRM L1	82	13,8	13,7	80
Gjennomsnitt	83	14,1	14,0	82
SD	1,5	0,19	0,31	1,1
RSD (%)	1,84	1,34	2,23	1,32
Bias (%)	5,1	1,4	0,72	-2,4
SRM L2	190	75,6	72,9	283
SRM L2	189	74,6	74,7	288
SRM L2	192	75,8	73,0	293
SRM L2	190	74,4	73,2	285
Gjennomsnitt	190	75,1	73,5	287
SD	1,3	0,70	0,84	4,3
RSD (%)	0,661	0,935	1,15	1,51
Bias (%)	3,3	7,1	4,9	-5,6

Grønne felt markerer at verdiene ligger innenfor det sertifiserte området, gule felt er verdier som ligger på grensen for sertifisert område, og røde felt er verdier som ligger utenfor SRM.

Gjenfinning er regnet ut fra gjennomsnittet av urinprøvene med og uten spike.

$$\text{Gjenfinning (\%)} = \frac{\text{Konsentrasjon i spiket prøve} - \text{konsentrasjon i prøve uten spike}}{\text{Tilsatt konsentrasjon i spiket prøve}} * 100$$

Tabell 6 viser målte konsentrasjoner for urinprøver under metodevalidering, samt gjennomsnitt, SD og RSD av I, Se og As fra dag 3 under metodevalidering (n=7). Alle resultatene unntatt RSD er oppgitt i µg/L.

	¹²⁷ I	⁷⁸ Se	⁷⁵ As
Dag 1			
Prøve 1	53,0	16,7	3,76
Prøve 2	54,2	16,3	3,77
Prøve 3	52,4	16,5	3,81
Prøve 4	53,7	16,2	3,69
Prøve 5	52,2	16,6	3,84
Prøve 6	53,6	16,5	3,85
Prøve 7	52,9	16,9	3,78
Dag 2			
Prøve 1	54,9	16,6	3,76
Prøve 2	55,4	16,7	3,86
Prøve 3	56,4	17,0	3,85
Prøve 4	56,4	16,4	3,78
Prøve 5	53,9	16,7	3,81
Prøve 6	55,5	16,6	3,74
Prøve 7	55,0	15,9	3,76
Dag 3 *			
Prøve 1	5,46	1,66	0,389
Prøve 2	5,57	1,72	0,392
Prøve 3	5,67	1,64	0,393
Prøve 4	5,57	1,67	0,394
Prøve 5	5,61	1,75	0,400
Prøve 6	5,60	1,71	0,388
Prøve 7	5,61	1,73	0,387
Gjennomsnitt	5,58	1,70	0,392
SD	0,063	0,042	0,0045
RSD (%)	1,12	2,47	1,14

* Konsentrasjoner fra dag 3 er oppgitt som målte verdier i fortynnede urinprøver (1:10).

Tabell 7 viser målte konsentrasjoner samt gjennomsnitt, SD og RSD av I, Se og As i spiket urinprøver fra dag 3 under metodevalidering (n=7). Alle resultatene unntatt RSD er oppgitt i µg/L

	¹²⁷ I	⁷⁸ Se	⁷⁵ As
Spiket prøve 1	106	62,7	31,2
Spiket prøve 2	103	63,0	31,2
Spiket prøve 3	105	62,4	31,1
Spiket prøve 4	106	62,2	30,9
Spiket prøve 5	105	62,4	31,4
Spiket prøve 6	105	61,7	31,1
Spiket prøve 7	105	61,7	31,1
Gjennomsnitt	105	62,3	31,1
SD	0,88	0,49	0,14
RSD (%)	0,83	0,79	0,45

Tabell 8 viser konsentrasjoner for blankprøver under metodevalidering. Alle resultater er oppgitt i µg/L.

	¹²⁷ I	⁷⁸ Se	⁷⁵ As
Dag 1			
Blank 1	<2,3	<LD	<LD
Blank 2	<LD	<LD	<LD
Blank 3	<LD	<LD	<LD
Blank 4	<LD	<LD	<LD
Blank 5	<LD	<0,36	<0,061
Blank 6	<LD	<LD	<LD
Blank 7	<LD	<0,36	<0,061
Dag 2			
Blank 1	<LD	<0,25	<0,11
Blank 2	<LD	<0,25	<LD
Blank 3	<LD	<LD	<LD
Blank 4	<LD	<LD	<LD
Blank 5	<LD	<0,25	<LD
Blank 6	<LD	<LD	<LD
Blank 7	<LD	<LD	<LD
Dag 3			
Blank 1	<2,8	<LD	<LD
Blank 2	<2,8	<LD	<0,048
Blank 3	<2,8	<LD	<LD
Blank 4	<LD	<LD	<0,048
Blank 5	<LD	<LD	<0,048
Blank 6	<LD	<LD	<0,048
Blank 7	<2,8	<LD	<0,048

Vedlegg B – Analyseresultater av urinprøver for mor og barn

4.4 Anvendelse av metoden

Tabell 9 viser målte verdier, gjennomsnitt, SD, RSD og bias for SRM L-1 og L-2 ved analyse av urinprøver fra mor og barn (n=3). Alle verdiene unntatt RSD og bias er i µg/L.

	⁷⁵ As	⁷⁸ Se	⁸² Se	¹²⁷ I
SRM L1	82	13,7	13,3	81,9
SRM L1	82	13,5	14,6	82,1
SRM L1	82	14,0	14,7	80,9
Gjennomsnitt	82	13,7	14,2	81,6
SD	0,35	0,25	0,78	0,64
RSD (%)	0,429	1,83	5,50 %	0,788
Bias (%)	3,8	-1,4	2,2	-2,9
SRM L2	189	75	75,7	288
SRM L2	188	75	75,1	293
SRM L2	192	77	76,4	298
Gjennomsnitt	190	76	75,7	293
SD	2,1	1,3	0,65	5,0
RSD (%)	1,10	1,73	0,859	1,71
Bias (%)	3,3	8,6	8,0	-3,6

Grønne felt markerer at verdiene ligger innenfor det sertifiserte området, gule felt er verdier som ligger på grensen for sertifisert område, og røde felt er verdier som ligger utenfor SRM.

Kreatinin er målt i mmol/L. For å gjøre om til per gram kreatinin er det multiplisert med molekylvekt for kreatinin (113,12 g/mol). Dette gir justeringsverdien. Konsentrasjoner av analytt i urinprøvene er så dividert med justeringsverdien.

Tabell 10 viser kreatinin målt i mmol/L og justeringsverdi i µg/g for mødrene og barna.

ID nummer_mor	Kreatinin mmol/L	Justering µg/g	ID nummer_barn	Kreatinin mmol/L	Justering µg/g
1	10,439	1,181	101	7,251	0,820
2	5,236	0,592	102	16,698	1,889
3	5,868	0,664	103	8,974	1,015
4	9,862	1,116	104	12,36	1,398
5	14,765	1,670	105	5,813	0,658
6	8,771	0,992	106	7,582	0,858
7	3,35	0,379	107-1	11,129	1,259
8	3,561	0,403	107-2	10,552	1,194
9	15,041	1,701	108	12,165	1,376
10	6,928	0,784	109-1	10,229	1,157
11	7,333	0,830	109-2	6,328	0,716
12	12,656	1,432	110	14,511	1,641

13	5,611	0,635	111	9,734	1,101
14	10,953	1,239	112-1	11,183	1,265
16	8,818	0,997	112-2	11,238	1,271
17	4,126	0,467	113	9,808	1,109
18	11,593	1,311	114	7,851	0,888
19	5,038	0,570	116	7,442	0,842
20	5,688	0,643	117	7,411	0,838
21	12,438	1,407	118	14,126	1,598
22	8,943	1,012	119	10,186	1,152
23	5,575	0,631	120	13,51	1,528
24	12,594	1,425	121	9,196	1,040
25	5,326	0,602	122-1	11,842	1,340
26	5,431	0,614	122-2	11,113	1,257
27	11,137	1,260	123	2,68	0,303
28	4,921	0,557	124	5,326	0,602
29	5,521	0,625	125	5,447	0,616
30	6,148	0,695	126	12,243	1,385
31	7,337	0,830	127	8,666	0,980
32	5,899	0,667	128	9,543	1,080
33	6,254	0,707	129	11,924	1,349
34	8,202	0,928	130	9,208	1,042
35	7,146	0,808	131	7,957	0,900
36	11,074	1,253	132	12,59	1,424
37	4,519	0,511	133-1	10,271	1,162
38	11,624	1,315	133-2	12,372	1,400
39	7,115	0,805	134	7,325	0,829
40	11,904	1,347	135-1	8,475	0,959
41	11,55	1,307	135-2	12,52	1,416
42	11	1,244	136	13,14	1,486
43	6,176	0,699	137	10,988	1,243
44	4,122	0,466	138	9,293	1,051
45	5,178	0,586	139	10,533	1,191
46	8,506	0,962	140	9,208	1,042
47	4,901	0,554	141	8,498	0,961
49	17,407	1,969	142	10,279	1,163
50	7,002	0,792	143	8,97	1,015
			144	11,655	1,318
			145	12,602	1,426
			146-1	13,151	1,488
			146-2	12,15	1,374
			147-1	15,264	1,727
			147-2	8,202	0,928
			149	10,116	1,144
			150	5,607	0,634

Tabell 11 viser konsentrasjoner av urinprøver fra mor og barn.

ID nummer	⁷⁵ As (µg/L)	⁷⁸ Se (µg/L)	⁸² Se (µg/L)	¹²⁷ I (µg/L)	¹²⁷ I (µg/g kreatinin)
1	10,7	16,8	17,3	77,6	65,8
2	5,49	7,83	8,71	63,3	107
3	72,2	9,03	8,38	97,4	147
4	49,4	23,4	24,4	113	101
5	13,0	18,8	18,5	81,2	48,6
6	20,4	29,0	28,8	182	184
7	4,89	5,03	5,38	52,3	138
8	7,60	7,28	6,81	15,4	38,2
9	244	30,7	29,0	128	75,2
10	3,77	10,8	11,1	179	228
11	130	13,8	14,3	111	133
12	117	21,0	20,5	60,2	42,0
13	3,83	8,79	8,92	19,4	30,6
14	11,0	15,9	16,3	57,9	46,8
16	17,9	15,1	15,5	140	141
17	46,9	7,25	7,57	45,0	96,3
18	41,5	22,3	22,1	62,2	47,4
19	18,9	9,07	8,47	45,0	78,9
20	3,96	8,69	8,73	86,1	134
21	213	20,9	21,0	89,5	63,6
22	47,6	15,5	16,5	71,8	71,0
23	3,02	12,5	13,2	96,1	152
24	23,7	26,4	26,1	71,1	49,9
25	481	9,90	10,2	34,9	58,0
26	1,22	8,61	9,11	51,9	84,4
27	16,7	17,2	17,3	87,2	69,2
28	12,5	7,04	7,54	54,1	97,2
29	54,0	13,2	12,5	68,9	110
30	15,7	18,5	18,9	127	182
31	4,51	12,0	12,3	82,6	99,6
32	48,3	9,60	8,69	58,9	88,3
33	37,9	12,4	12,1	73,9	104
34	71,1	11,8	11,8	48,8	52,6
35	11,5	10,1	9,95	103	127
36	49,3	21,8	22,4	56,7	45,3
37	64,5	17,4	17,0	78,4	153
38	12,4	20,0	19,4	217	165
39	57,2	24,5	25,2	83,9	104
40	73,3	21,7	21,3	89,3	66,3
41	199	30,0	30,6	191	146

42	42,2	19,3	20,2	94,4	75,9
43	43,0	21,5	21,7	52,8	75,6
44	103	8,77	8,66	43,8	93,9
45	28,9	14,0	14,1	82,5	141
46	62,1	19,3	18,7	83,6	86,9
47	40,1	7,59	8,15	75,4	136
49	90,2	27,4	28,1	173	87,9
50	19,3	14,9	15,7	160	202
101	2,26	16,7	17,0	186	226
102	8,12	26,0	26,0	156	82,6
103	90,1	21,1	20,8	128	126
104	20,1	25,3	25,0	194	139
105	3,07	15,1	15,0	105	160
106	83,2	26,0	26,6	263	307
107-1	9,21	18,7	18,1	114	90,4
107-2	10,5	19,6	21,3	124	104
108	8,39	22,2	23,2	176	128
109-1	184	22,0	22,0	96,7	83,6
109-2	63,4	19,4	19,4	93,1	130
110	21,8	32,8	33,1	221	135
111	58,6	24,1	23,6	66,3	60,2
112-1	22,3	24,0	23,4	140	110
112-2	102	27,0	27,6	112	87,9
113	4,36	17,0	15,9	159	143
114	5,56	19,1	19,0	211	238
116	97,9	24,2	23,5	321	381
117	74,7	25,9	24,4	119	142
118	42,1	55,6	55,2	212	133
119	14,3	26,4	27,6	78,5	68,1
120	14,2	27,3	26,9	74,7	48,9
121	205	17,4	17,1	356	342
122-1	7,95	27,6	26,4	154	115
122-2	115	29,3	29,9	141	112
123	4,37	8,88	9,66	62,2	205
124	5,28	14,8	14,7	76,5	127
125	45,8	20,2	21,9	111	181
126	59,1	28,8	27,9	99,6	71,9
127	9,34	18,9	19,5	126	128
128	25,8	20,7	22,9	188	174
129	57,3	29,8	30,0	176	130
130	19,4	28,7	28,5	312	299
131	9,38	17,8	17,0	67,0	74,4
132	3,45	24,1	24,6	149	104

133-1	35,0	20,6	20,4	178	154
133-2	37,8	31,4	32,4	235	168
134	2,04	13,5	13,7	90,0	109
135-1	27,8	16,7	17,3	124	129
135-2	76,9	27,6	26,7	293	207
136	115	23,4	24,7	107	72,1
137	199	42,8	41,7	133	107
138	7,08	16,3	16,2	119	113
139	52,4	21,8	21,8	105	87,7
140	7,47	22,2	22,5	195	187
141	4,80	17,9	18,9	254	265
142	16,9	29,7	29,2	184	158
143	5,59	27,9	28,2	192	189
144	368	34,9	35,3	144	109
145	10,7	40,1	37,8	379	266
146-1	23,4	33,7	33,2	181	122
146-2	193	37,0	36,2	251	183
147-1	47,2	38,4	38,4	242	140
147-2	79,9	20,1	20,5	257	278
149	5,77	18,8	17,9	51,3	44,8
150	3,25	11,6	10,5	140	221

Tabell 12 viser resultater for blankprøver under analyse av urinprøver fra mor og barn, samt LOD og LOQ for I, Se og As (n=10). Alle resultater er oppgitt i µg/L.

	⁷⁵ As	⁷⁸ Se	⁸² Se	¹²⁷ I
Blank 1	<LD	<LD	<LD	<LD
Blank 2	<LD	<LD	<LD	<LD
Blank 3	<LD	<LD	<LD	<LD
Blank 4	<LD	<LD	<LD	<LD
Blank 5	<LD	<LD	<LD	<LD
Blank 6	<LD	<LD	<LD	<LD
Blank 7	<LD	<LD	<LD	<LD
Blank 8	<LD	<LD	<LD	<LD
Blank 9	<LD	<LD	<LD	<LD
Blank 10	<LD	<LD	<LD	<LD
LOD	0,023	0,059	0,10	0,88
LOQ	0,076	0,20	0,34	2,9

Vedlegg C – Utregninger og tillaging av prøver

Alle utregninger for tillaging av standarder (std.) er basert på likningen: $C_1 * V_1 = C_2 * V_2$, hvor C_1 er startkonsentrasjon og V_1 er startvolum, mens C_2 er sluttkonsentrasjon og V_2 er sluttvolum.

$$V_1 = \frac{C_2 * V_2}{C_1}$$

Eks. Ge stamløsning på 1 000 mg/L. Det skal lages en mellomstandard (mellomstd.) på 10 mg/L i en 50 mL beholder:

$$\frac{10 \frac{mg}{L} * 0,05 L}{1\ 000 \frac{mg}{L}} = 0,0005 L = 0,5 mL = 500 \mu L \text{ Ge stamløsning må tilsettes}$$

Alt vann benyttet til fortynning av prøver og tillaging av standarder var ionebyttet vann fra renseanlegget Barnstead.

Det er brukt elektroniske pipetter på alle tillagingene unntatt ved bruk av HNO₃ og CFA-C der det er brukt dispensere.

3.2 Tillaging av standarder

Alle standarder ble fortynnet 1:50. Det ble laget nødvendige mellomstandarder for å unngå fortynning på mer enn 200 ganger. Alle mellomstandarder utenom de med jod, ble konserverert med 1 % HNO₃ (65 % (w/w)).

$$\frac{1\ \%}{100\ \%} * 50 mL = 0,5 mL HNO_3$$

Tabell 13 viser konsentrasjoner av Ge og ¹²⁹I som intern standarder, samt volum tilsatt i kalibreringsstandarder under både metodeutvikling og metodevalidering.

Analytt	Utgangskonsentrasjon i stamløsning	Konsentrasjon i siste mellom IS (µg/L)	Konsentrasjon i kalibreringsstd. (µg/L)	Volum tilsatt i kalibreringsstd. (µL)
Ge	1 000 mg/L	1 000	20	1 000
¹²⁹ I	1 mg/L	50	0,5	500

Tabell 14 viser konsentrasjoner av de aktuelle analyttene i kalibreringsstandardene som ble brukt under metodevalideringen.

Analytt	Std. 1	Std. 2	Std. 3	Std. 4	Std. 5	Std. 6	Std. 7 (matrikstilpasset)
I (µg/L)	10	20	40	60	80	100	80
Se (µg/L)	10	20	30	40	50	60	50
As (µg/L)	5	10	15	20	25	30	25
Na (mg/L)							400
K (mg/L)							300
P (mg/L)							200
S (mg/L)							200
Mg (mg/L)							20
Ca (mg/L)							20

Kalibreringsstandardene er laget med aktuelle analytter, 1 000 µL mellom IS Ge, 500 µL mellom IS ¹²⁹I i enten 5 % CFA-C, 5 % NH₃, 1 % TMAH eller 10 % NEPT som reagens hver for seg.

$$\frac{5\%}{100\%} * 0,05\text{ L} = 0,0025\text{ L} = 2,5\text{ mL CFAC og NH}_3$$

$$\frac{5\%}{50\% \text{ (fortynnet løsning)}} * 0,05\text{ L} = 0,005\text{ L} = 5\text{ mL CFAC med ekstra EDTA}$$

$$\frac{1\%}{100\%} * 0,05\text{ L} = 0,0005\text{ L} = 0,5\text{ mL} = 500\text{ µL TMAH}$$

$$\frac{10\%}{100\%} * 0,05\text{ L} = 0,005\text{ L} = 5\text{ mL HNO}_3 \text{ og NEPT}$$

3.3 Metodeutvikling

Alle urinprøver, blankprøver, SRM og husstandard er laget med enten 1 mL urin, SRM eller husstandard, 200 µL mellom IS Ge, 100 µL mellom IS ¹²⁹I i enten 5 % CFA-C, 5 % NH₃, 1 % TMAH eller 10 % NEPT som reagens hver for seg. Konsentrasjoner av Ge og ¹²⁹I som IS er henholdsvis 20 og 0,5 µg/L.

$$\frac{5\%}{100\%} * 0,01\text{ L} = 0,0005\text{ L} = 0,5\text{ mL CFAC og NH}_3$$

$$\frac{5\%}{50\% \text{ (fortynnet løsning)}} * 0,01\text{ L} = 0,001\text{ L} = 1\text{ mL CFAC med ekstra EDTA}$$

$$\frac{1\%}{100\%} * 0,01\text{ L} = 0,0001\text{ L} = 0,1\text{ mL} = 100\text{ µL TMAH}$$

$$\frac{10\%}{100\%} * 0,01 L = 0,001 L = 1 mL HNO_3 \text{ og NEPT}$$

3.5 Anvendelse av metoden

For å unngå mange pipetteringer ble det laget en ferdigblanding av NEPT, IS og ionebyttet vann. Denne ble laget i en 2,5 liters beholder. For å kunne ta ut henholdsvis 9 mL og 45 mL til urinprøvene og standardene, for at konsentrasjonen av NEPT i prøvene skulle være 10 %, og for at konsentrasjoner av IS i prøvene skulle være 20 µg/L for Ge og 0,5 µg/L for ¹²⁹I ble denne ferdigblandingen laget slik:

Mengde NEPT tilsatt i ferdigblandingen:

$$\frac{2500 mL}{9 mL} = 277,7778 mL$$

Tettheten til denne blandingen er ukjent.

Konsentrasjonene av Ge og ¹²⁹I i ferdigblandingen må være:

$$C_{Ge} = \frac{20 \frac{\mu g}{L} * 10 mL}{9 mL} = 22,2222 \mu g/L$$

$$C_{^{129}I} = \frac{0,5 \frac{\mu g}{L} * 10 mL}{9 mL} = 0,5555 \mu g/L$$

Mengde Ge og ¹²⁹I tilsatt i ferdigblandingen:

$$V_{1_{Ge}} = \frac{22,2222 \frac{\mu g}{L} * 2500 mL}{10\ 000 \mu g/L} = 5,5555 mL$$

$$V_{1_{^{129}I}} = \frac{0,5555 \frac{\mu g}{L} * 2500 mL}{50 \mu g/L} = 27,775 mL$$

Siden ^{129}I er konservert i kun vann kan denne veies inn mer nøyaktig:

$$27,775 \text{ mL} * 0,9980 \frac{\text{g}}{\text{mL}} = 27,72 \text{ g}$$

Mengde vann tilsatt i ferdigblandingen:

$$278 \text{ mL NEPT} + 5,555 \text{ mL Ge} + 27,72 \text{ mL } ^{129}\text{I} = 311,3 \text{ mL}$$

$$2500 \text{ mL totalt} - 311,3 \text{ mL} = 2188,7 \text{ mL vann}$$

$$2188,7 \text{ mL vann} * 0,9980 \frac{\text{g}}{\text{mL}} = 2184,3 \text{ g vann}$$

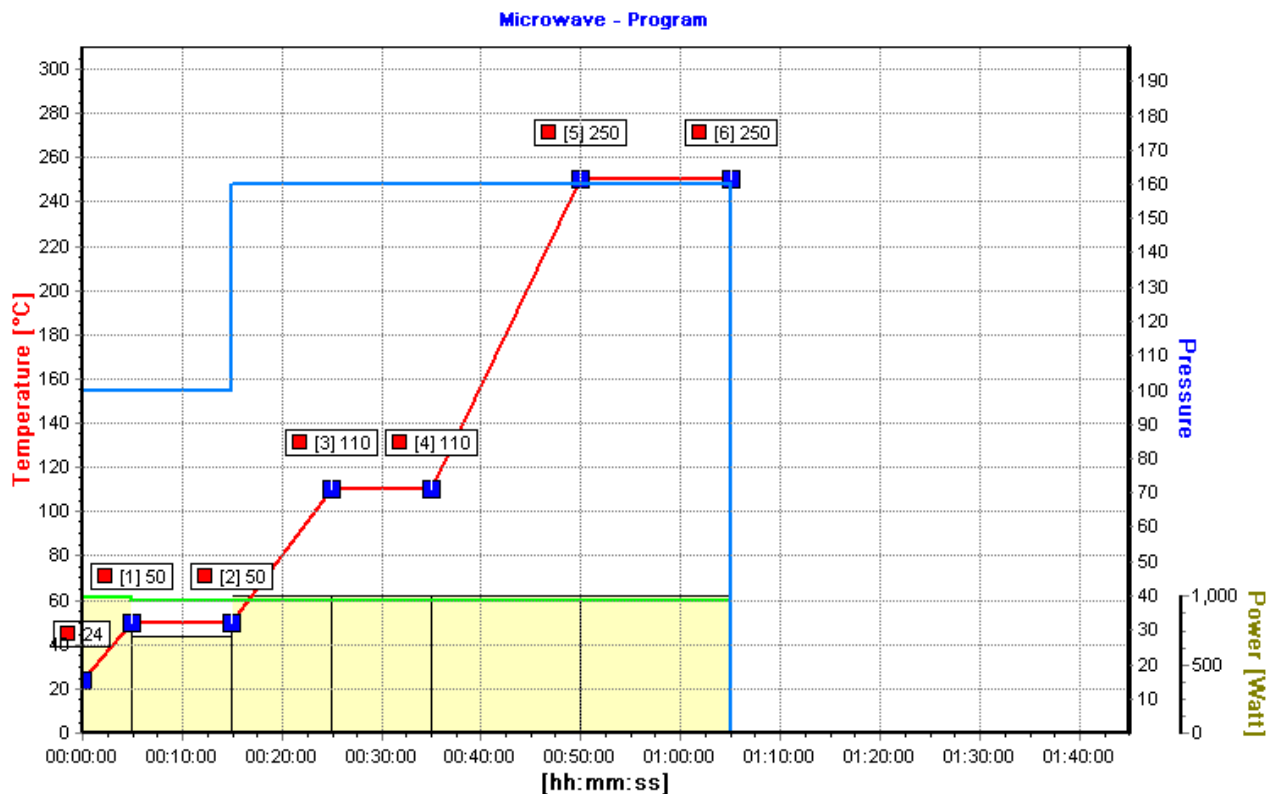
Omtrent 278 g NEPT ble veid inn i beholderen, det ble så tilsatt 5,555 mL Ge med automatpipette og veid inn ca. 27,7 g ^{129}I . Det ble så veid inn ca. 2184,3 g vann.

Denne ferdigblandingen ble brukt i urinprøver fra FHI, blankprøver, SRM, husstandard, kalibreringsstandarder og i vaskeløsningen (225 mL ferdigblanding og 25 mL vann).

Tabell 15 viser konsentrasjoner av jod, selen og arsen i kalibreringsstandardene som ble brukt under anvendelse av metoden. Konsentrasjonene er i $\mu\text{g/L}$.

Analytt	Kalibreringsstd. 1	Kalibreringsstd. 2
I	80	100
Se	40	50
As	20	50

Vedlegg D – Program for dekomponering med Ultraclave



Figur 1 viser en skematisk fremstilling av trykk- og temperaturprogrammet som ble brukt i Ultraclaven ved dekomponering av urinprøver.

Vedlegg E – Instrumentelle måleparametere og driftsforhold på

ICP-MS

Tabell 16 viser driftsforhold og instrumentelle måleparametere for Agilent 8800 ICP-MS.

Innstilling	
Effekt på spole	1550 W
Plasmagass (ytre bæregass)	15 L/min
Hjelpgass (mellomliggende kjølegass)	0,9 L/min
Forstøvergass	Ca. 1,07 L/min
Volumetrisk hastighet peristaltisk pumpe	0,4 mL/min
Type "sample"/"skimmer" koner	Nikkel
Type forstøver	Micromist
Type forstøvings/blandings-kammer	Kvarts Scott double Pass
Dataregistrering for ICP-MS	
Vasketid mellom prøvene	15 s
Ventetid før avlesning (read delay)	20 s
Lesetid (dwell time)	1 s
Dataopptakingsmåte (scanning mode)	Peak hop
Punkt per masse/spektral topp	1
Sveip per avlesning	10
Antall replikater	3
Signalmåling	Tellinger per sekund
P/A detektor (puls/analog)	på
Temperatur forstøverkammer	2 °C
Reaksjonscelleparametere	
Energidiskriminering	-7 V
Oksygen flow	30 %
Oktopol bias	-4 V
Deflektorlinser	5,2 v

Linser og ioneoptikken blir optimalisert hver gang.

Vedlegg F – Informasjon om forsøkspersoner

Tabell 17 viser informasjon om alder, høyde, vekt, kroppsmasseindeks (KMI), røykestatus og utdanning for mødrene som var med i analysen.

ID nummer	Alder	Høyde(cm)	Vekt (kg)	KMI	Røykestatus	Utdanning
1	39	172	79	26,70	aldri	Universitet > 4 år
2	45	172	62	20,96	aldri	Distrikthøyskole
3	44	165	67,8	24,90	aldri	Universitet > 4 år
4	44	166	52,5	19,05	av og til	3 årig videregående
5	42	168	55,3	19,59	aldri	Universitet > 4 år
6	45	161	63,3	24,42	av og til	Distrikthøyskole
7	36	181	104,7	31,96	aldri	3 årig videregående
8	44	171	79,3	27,12	av og til	Universitet > 4 år
9	36	165	56,3	20,68	aldri	Universitet > 4 år
10	40	172	62	20,96	sluttet	Universitet > 4 år
11	39	176	64,2	20,73	sluttet	Universitet > 4 år
12	37	169	69,8	24,44	aldri	Universitet > 4 år
13	37	167	66,6	23,88	sluttet	Universitet > 4 år
14	35	180,5	78,4	24,06	1-10 daglig	Distrikthøyskole
16	43	167	65,8	23,59	aldri	Universitet > 4 år
17	37	169	59,4	20,80	sluttet	Universitet > 4 år
18	37	172	70,5	23,83	aldri	Universitet > 4 år
19	42	169	54,3	19,01	aldri	Universitet > 4 år
20	40	158	66,6	26,68	sluttet	3 årig videregående
21	46	170	84,4	29,20	1-10 daglig	Distrikthøyskole
22	43	171	65	22,23	aldri	Distrikthøyskole
23	42	162	117,2	44,66	sluttet	Universitet > 4 år
24	40	160	92,5	36,13	sluttet	3 årig videregående
25	37	169	64,6	22,62	aldri	3 årig videregående
26	49	170	109,3	37,82	sluttet	9 årig grunnskole
27	41	173	70,9	23,69	sluttet	Universitet > 4 år
28	40	169	57,4	20,10	aldri	Distrikthøyskole
29	56	176	78,8	25,44	aldri	Universitet > 4 år
30	39	171	62,7	21,44	sluttet	Distrikthøyskole
31	43	165	57,5	21,12	sluttet	Universitet > 4 år
32	44	167	67,9	24,35	-	3 årig videregående
33	49	172	81,2	27,45	av og til	Distrikthøyskole
34	40	163	78,3	29,47	aldri	3 årig videregående
35	41	163	69,2	26,05	aldri	3 årig videregående
36	32	167	71,3	25,57	sluttet	3 årig videregående
37	41	168	54	19,13	aldri	Distrikthøyskole
38	37	168	74,6	26,43	aldri	Universitet > 4 år
39	41	157	66,3	26,90	av og til	Universitet > 4 år
40	38	167	62,5	22,41	aldri	Universitet > 4 år
41	45	170	60,2	20,83	sluttet	Universitet > 4 år
42	46	170	75,8	26,23	av og til	Universitet > 4 år
43	41	171	56	19,15	sluttet	Universitet > 4 år

44	40	163	81,1	30,52	1-10 daglig	Universitet > 4 år
45	41	157	50,3	20,41	aldri	Universitet > 4 år
46	44	172	65,3	22,07	sluttet	Universitet > 4 år
47	48	163	61,4	23,11	aldri	Universitet > 4 år
49	41	162	73,4	27,97	aldri	Universitet > 4 år
50	43	163	95,9	36,09	aldri	Universitet > 4 år

Tabell 18 viser informasjon om alder, høyde, vekt, KMI og kjønn for barna som var med i analysen.

ID nummer	Alder	Høyde(cm)	Vekt (kg)	KMI	Kjønn
101	10	150	39,3	17,47	J
102	10	145	31	14,74	J
103	10	131	26,7	15,56	G
104	9	143	31,1	15,21	G
105	9	128	27,2	16,60	G
106	10	139	34	17,60	G
107-1	10	137	27,2	14,49	G
107-2	7	133	24,8	14,02	G
108	9	150	37,9	16,84	G
109-1	10	132	29	16,64	J
109-2	8	129,5	29	-	J
110	11	140	31,8	16,22	G
111	9	151	40,3	17,67	J
112-1	11	132	28,5	16,36	J
112-2	9	147	37,5	17,35	J
113	11	153	43,4	18,54	J
114	7	139	32,3	16,72	G
116	7	150	35,5	15,78	J
117	7	161	45	17,36	G
118	8	138	30,1	15,81	J
119	8	127	24,4	15,13	G
120	12	124	24,8	16,13	J
121	11	139	31,9	16,51	J
122-1	10	129	26,7	16,04	J
122-2	7	127	27,1	16,80	J
123	7	135	27,6	15,14	J
124	11	138	31,6	16,59	J
125	8	145	31,4	14,93	G
126	9	137	27,7	14,76	-
127	9	137	41,3	22,00	G
128	9	156	46,4	19,07	J
129	11	121	22,5	15,37	J
130	6	150	49,8	22,13	J
131	10	144	44,5	21,46	J
132	10	134	28	15,59	G
133-1	9	148	38,8	17,71	J
133-2	11	149	36	16,22	G

134	11	151	35,6	15,61	G
135-1	12	146	34,1	16,00	G
135-2	9	138	30,3	15,91	J
136	11	128	28	17,09	J
137	10	145,4	34,8	16,46	J
138	11	140,5	33	16,72	J
139	10	140	32,4	16,53	J
140	10	146	38,9	18,25	G
141	9	152	37,7	16,32	G
142	8	147	45,7	21,15	J
143	9	130	31,1	18,40	J
144	7	160	68,2	26,64	J
145	-	152,3	43,4	18,71	G
146-1	11	139,8	29,4	15,04	G
146-2	8	132	28,8	16,53	G
147-1	10	161	52,8	20,37	G
147-2	8	132	31,6	18,14	G
149	-	138	33,6	17,64	G
150	11	140	34,9	17,81	G

Tabell 19 viser matinntak (g) de siste 24-timer for hver forsøksperson.

ID	Totalt	Brød	Kornprodukt, andre	Kaker	Poteter	Grønnsaker	Frukt, bær	Kjøtt, blod, innmat	Fisk, skalldyr	Egg	Melk, fløte, is, rømme, yoghurt	Ost	Smør, margarin, olje	Sukker, søtsaker	Drikkevarer	Diverse
1	1705,7	0,0	20,8	40,0	0,0	187,5	162,0	0,0	0,0	0,0	238,8	7,5	0,0	20,0	960,0	69,0
2	2709,7	51,0	75,0	7,5	87,5	84,0	265,0	89,7	0,0	27,5	319,0	22,5	12,0	4,5	1662,5	0,5
3	2199,2	184,0	12,0	30,0	0,0	84,3	247,5	10,0	0,0	0,0	184,3	41,3	36,0	0,0	1095,0	268,9
4	915,3	42,0	43,0	40,0	0,0	50,0	75,0	54,1	30,0	27,5	192,2	2,5	3,0	2,2	282,9	65,0
5	1696,4	63,5	5,4	45,0	27,3	42,0	75,0	0,0	0,0	0,0	294,6	22,5	16,5	1,0	995,4	106,2
6	1510,2	0,0	62,1	0,0	0,0	72,0	107,3	0,0	12,5	0,0	162,5	30,0	18,8	7,5	750,0	284,9
7	1951,3	30,0	0,0	0,0	0,0	141,0	80,0	43,6	0,0	55,0	62,5	27,5	6,0	5,5	1500,0	0,2
8	924,5	39,5	45,0	0,0	0,0	135,5	119,5	0,0	0,0	0,0	25,0	0,0	22,5	2,0	527,5	2,5
9	1565,5	0,0	48,8	0,0	0,0	76,0	131,8	25,6	72,9	0,0	187,4	7,5	8,0	0,0	883,3	124,3
10	1310,8	70,3	0,0	0,0	15,6	165,1	50,0	0,0	0,0	0,0	132,6	15,0	7,7	0,7	714,6	137,7
11	2205,4	43,0	3,8	0,0	0,0	221,3	174,8	39,5	149,4	0,0	257,5	95,0	54,7	9,3	1130,0	19,3
12	1255,3	144,0	11,0	0,0	50,0	60,8	0,0	67,6	0,0	0,0	173,1	15,8	0,0	13,0	680,0	40,1
13	2031,0	54,0	0,0	0,0	0,0	50,0	995,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	930,0	0,0
14	1599,4	75,2	93,3	0,0	0,0	140,7	314,6	19,4	0,0	0,0	62,5	22,5	10,5	2,0	675,0	182,8
16	1203,4	88,5	24,8	30,0	50,0	124,0	57,5	0,0	12,5	37,7	236,9	15,0	25,1	3,0	447,5	48,7
17	2678,0	113,8	5,4	65,0	0,0	417,6	107,3	102,0	0,0	41,3	12,5	29,9	16,3	20,5	1716,5	23,1
18	1395,5	58,0	34,9	36,0	0,0	165,0	435,0	0,0	15,0	15,4	104,8	0,0	4,2	26,5	400,0	100,7
19	1528,4	6,0	30,6	0,0	0,0	122,6	352,5	0,0	57,8	0,0	27,3	30,0	24,5	17,3	675,0	177,4
20	1411,8	56,0	4,5	0,0	0,0	91,5	267,5	95,1	0,0	0,0	141,9	15,0	27,3	34,0	672,6	0,0
21	1278,6	81,0	10,8	0,0	70,0	97,4	0,0	84,4	62,7	0,0	22,5	0,0	3,8	0,5	775,0	68,6
22	1695,8	91,0	6,5	0,0	0,0	12,3	190,0	6,2	0,0	5,7	8,6	40,1	38,8	12,5	1282,5	1,1
23	2206,0	64,5	15,0	0,0	22,7	14,7	44,0	63,2	0,0	0,0	275,0	0,0	12,0	94,0	1550,0	44,3
24	1232,1	29,0	9,0	0,0	69,1	164,3	3,5	113,2	0,0	5,5	60,0	17,5	25,5	1,5	658,0	74,9
25	2534,1	119,5	5,3	50,0	0,0	93,1	100,0	28,8	0,0	0,0	36,9	45,0	21,0	17,0	1900,0	117,6
26	2601,2	90,0	15,0	0,0	0,0	102,5	76,6	169,6	0,0	0,0	187,5	0,0	14,5	80,5	1862,0	0,0
27	1692,0	23,0	2,2	0,0	0,0	101,9	3,0	122,6	0,0	0,0	506,8	67,5	0,0	5,5	843,3	16,3

28	2275,0	16,5	102,1	6,0	0,0	201,6	288,7	41,5	0,0	0,0	183,0	24,0	45,5	34,0	884,0	92,7
29	1430,1	101,5	17,5	0,0	0,0	21,0	99,4	102,5	15,0	0,0	132,5	25,0	2,3	2,0	875,0	35,5
30	2432,6	95,9	90,0	0,0	0,0	15,0	237,2	27,0	0,0	0,0	375,8	170,8	6,0	12,8	1079,2	320,5
31	1076,5	142,5	2,3	0,0	0,0	20,0	283,2	50,0	0,0	0,0	122,9	48,0	14,3	1,5	391,4	0,5
32	1878,1	26,0	137,5	37,5	0,0	0,0	252,5	0,0	0,0	0,0	187,5	0,0	3,0	8,0	1126,1	100,0
33	1888,8	190,5	10,5	0,0	0,0	73,7	266,0	7,5	60,0	0,0	273,7	30,0	21,0	20,5	700,0	235,3
34	1059,9	60,0	0,0	0,0	75,0	0,0	0,0	110,9	0,0	0,0	0,0	18,0	13,5	2,0	780,0	0,0
35	899,1	53,0	32,5	0,0	0,0	10,1	96,7	34,2	0,0	0,0	207,9	27,5	6,6	0,0	350,0	80,7
36	1306,0	8,5	0,0	0,0	0,0	0,0	300,0	5,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	7,5	982,0	0,0
37	1861,7	31,0	12,9	0,0	82,0	34,3	96,5	0,0	103,5	0,0	147,6	47,5	8,1	1,5	1185,0	109,0
38	1091,0	61,5	120,0	0,0	0,0	0,0	12,0	0,0	0,0	0,0	210,4	21,0	0,0	1,5	664,6	0,0
39	1583,7	36,5	62,6	0,0	0,0	106,0	180,0	50,1	24,0	0,0	0,0	20,0	29,8	17,5	1025,0	26,7
40	1595,4	97,5	0,0	0,0	70,5	50,0	161,3	87,2	0,0	0,0	87,3	30,0	31,3	0,5	980,0	0,0
41	1128,1	0,0	0,0	0,0	0,0	186,0	260,0	55,9	0,0	0,0	125,0	3,8	4,0	0,0	456,0	37,4
42	2183,2	189,0	5,0	160,0	0,0	250,3	167,3	147,1	37,5	0,0	74,0	80,0	52,2	2,3	972,5	45,1
43	1139,0	0,0	31,3	0,0	31,1	54,8	163,6	73,1	0,0	0,0	40,4	0,0	4,3	10,0	642,5	85,4
44	2999,6	35,0	10,7	0,0	45,0	99,5	155,1	14,0	80,0	0,0	50,0	16,0	8,5	8,5	2110,0	364,4
45	1387,2	29,8	5,4	0,0	0,0	155,6	21,0	145,1	75,0	36,5	45,9	32,0	29,3	15,0	635,0	161,5
46	1967,4	112,0	46,7	0,0	0,0	224,5	258,0	0,0	97,3	0,0	149,5	40,0	28,7	0,0	950,6	57,3
47	1587,9	61,0	51,8	20,0	0,0	79,3	202,5	12,0	125,0	0,0	244,7	15,0	9,8	6,0	575,0	180,3
49	1153,6	76,0	58,1	0,0	0,0	11,3	0,0	0,0	31,1	0,0	335,0	19,5	5,3	4,0	335,0	278,0
50	1586,3	86,0	0,0	0,0	0,0	46,3	20,0	0,0	98,3	0,0	287,0	60,0	35,5	6,0	940,0	5,6
101	1394,1	12,5	142,5	0,0	0,0	48,4	175,0	25,6	0,0	0,0	379,0	2,5	4,9	0,0	575,0	28,2
102	1169,0	32,5	0,0	0,0	81,3	0,0	275,0	120,9	0,0	0,0	220,0	0,0	13,9	0,0	425,0	0,0
103	1300,5	182,6	9,0	45,0	0,0	63,2	5,0	0,0	0,0	0,0	63,2	40,0	27,4	0,0	650,0	201,6
104	961,3	68,5	41,5	115,0	0,0	87,5	93,0	97,8	0,0	0,0	100,0	0,0	1,5	25,5	300,0	28,5
105	613,1	67,0	61,6	62,5	0,0	30,0	0,0	32,0	0,0	0,0	0,0	0,0	19,5	0,0	250,0	90,5
106	1420,0	72,0	44,6	25,0	0,0	30,8	0,0	35,5	12,5	0,0	337,5	10,0	12,3	0,0	700,0	38,8
1071	1588,0	101,0	79,6	0,0	0,0	52,5	485,0	14,0	0,0	0,0	150,0	85,0	3,0	0,0	425,0	92,4
108	1083,3	84,8	9,7	3,0	0,0	57,2	91,5	54,2	0,0	0,0	256,3	0,0	18,3	5,5	465,0	36,3

1091	903,3	62,0	43,8	15,0	0,0	52,5	107,5	0,0	48,6	2,6	80,0	18,0	12,7	0,0	400,0	60,1
1092	746,1	83,0	38,0	0,0	0,0	28,0	157,5	5,0	48,6	0,0	125,0	12,0	13,5	0,0	175,0	60,0
110	1126,1	56,3	25,9	0,0	35,6	100,1	0,0	105,1	0,0	0,0	140,2	0,0	5,5	99,5	412,5	134,5
111	700,0	140,5	0,0	0,0	0,0	93,5	279,5	44,0	29,4	0,0	0,0	0,0	11,0	1,0	100,0	0,1
1121	1030,6	132,0	36,9	0,0	100,0	0,0	0,0	36,1	0,0	0,0	358,8	40,0	0,0	15,0	250,0	61,2
1122	1124,2	88,5	13,7	0,0	50,0	106,3	150,0	54,2	0,0	0,0	154,0	30,0	0,0	14,0	425,0	38,0
113	988,1	144,0	0,0	125,1	0,0	30,0	0,0	15,0	0,0	0,0	250,0	90,0	9,0	0,0	325,0	0,0
114	1107,3	65,0	107,3	0,0	0,0	32,4	47,5	57,8	0,0	0,0	362,5	0,0	3,0	0,0	244,0	180,8
116	619,4	122,0	24,8	0,0	0,0	104,5	46,3	9,0	0,0	10,2	184,9	0,0	17,1	2,3	50,0	48,0
117	1145,5	173,8	0,0	87,5	0,0	141,1	95,0	85,0	0,0	0,0	20,0	39,8	0,8	14,3	482,0	0,4
118	878,0	87,0	56,4	24,0	0,0	40,0	266,5	0,0	0,0	15,4	104,8	0,0	4,2	19,0	219,0	41,7
119	918,2	121,0	37,0	13,0	0,0	0,0	371,5	0,0	0,0	0,0	27,3	30,0	15,0	0,0	235,0	68,0
120	610,0	0,0	148,9	0,0	0,0	12,5	0,0	260,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,0	0,0	125,0	61,6
121	925,0	35,1	1,0	0,0	35,0	35,0	7,0	30,9	75,0	0,0	372,5	0,0	0,0	7,5	175,0	150,4
1221	807,7	109,0	45,0	0,0	0,0	76,5	10,0	75,0	0,0	0,0	220,0	26,0	19,3	13,1	212,5	0,3
1222	662,6	41,0	68,0	0,0	0,0	107,7	9,0	54,5	0,0	0,0	145,0	47,0	14,3	8,1	150,0	18,0
123	1164,1	37,0	15,0	0,0	42,8	44,9	174,3	133,7	0,0	0,0	390,7	7,5	16,3	0,8	300,0	0,4
124	1120,7	78,0	0,0	0,0	69,1	93,3	66,6	132,3	0,0	70,4	70,1	0,0	27,1	4,5	500,0	9,3
125	961,6	104,5	33,4	100,0	0,0	5,3	7,5	35,0	0,0	14,4	115,8	12,0	13,0	3,0	500,0	17,8
126	1213,6	246,0	0,0	0,0	0,0	45,6	0,0	159,6	0,0	67,9	200,0	0,0	45,5	0,0	430,0	17,0
127	1159,7	82,5	2,2	0,0	0,0	68,4	85,3	142,4	0,0	0,0	325,0	55,0	10,5	10,0	375,0	3,5
128	1218,9	0,0	66,0	19,0	0,0	148,6	380,5	60,3	0,0	0,0	137,5	0,0	10,1	29,5	200,0	160,4
129	1049,8	109,0	26,3	15,0	0,0	0,0	75,0	102,0	0,0	0,0	364,0	25,0	9,8	0,0	269,0	54,8
130	781,4	77,4	0,0	0,0	4,7	30,0	70,0	5,0	24,3	31,7	170,4	0,0	14,9	16,3	230,0	95,7
131	1076,0	117,0	71,0	0,0	0,0	7,5	163,9	135,0	0,0	0,0	33,0	0,0	13,4	5,0	425,0	105,2
132	1002,9	75,0	37,5	37,5	0,0	65,0	167,5	29,4	0,0	0,0	273,8	0,0	0,0	41,0	265,0	11,2
1331	773,3	117,0	19,4	0,0	0,0	10,5	97,5	0,0	45,0	0,0	365,3	0,0	9,0	36,0	39,0	34,6
1332	1169,4	58,0	21,6	45,0	0,0	26,3	84,0	7,5	0,0	0,0	448,6	10,0	7,5	24,5	350,0	85,3
134	1092,5	42,0	0,0	0,0	116,3	0,0	0,0	25,0	0,0	0,0	186,0	10,0	17,2	47,0	635,0	14,0
1351	1091,2	35,0	41,8	0,0	0,0	2,8	51,2	24,9	0,0	0,0	432,4	0,0	3,6	10,0	275,0	213,0
1352	832,0	42,0	45,4	5,0	0,0	2,8	6,2	22,4	0,0	0,0	299,9	10,0	3,3	0,0	350,0	39,0

136	756,4	79,0	0,0	90,0	0,0	10,0	0,0	71,9	0,0	0,0	80,0	0,0	0,0	0,5	425,0	0,0
137	1071,4	42,0	12,9	0,0	57,0	45,0	76,5	19,5	68,8	0,0	169,4	50,0	10,5	3,0	405,0	108,8
138	1371,3	198,0	177,3	28,8	0,0	0,0	125,0	192,0	0,0	0,0	62,5	0,0	16,5	0,0	525,0	46,2
139	1010,4	86,5	131,3	40,0	0,0	76,3	125,0	30,9	0,0	0,0	100,0	20,0	0,0	0,0	400,0	0,0
140	1156,4	59,0	0,0	150,0	50,0	17,5	37,5	147,9	0,0	0,0	200,0	0,0	0,0	9,0	485,0	0,0
141	868,6	132,5	25,0	0,0	0,0	30,0	270,0	182,0	0,0	0,0	225,0	0,0	3,6	0,5	0,0	0,0
142	740,5	40,9	30,0	23,0	0,0	22,5	128,0	90,8	0,0	0,0	158,0	3,0	4,8	0,5	200,0	39,0
143	771,6	10,0	91,0	0,0	49,4	0,0	98,9	119,2	0,0	0,0	247,1	0,0	4,0	5,0	112,5	34,3
144	976,4	8,5	15,0	0,0	17,5	48,8	184,3	6,0	80,0	0,0	40,0	0,0	8,5	0,0	431,0	134,2
145	1027,8	124,8	55,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	28,8	272,6	0,0	25,2	36,2	325,0	159,3
1461	1190,3	168,0	46,7	0,0	0,0	185,9	116,0	0,0	84,8	0,0	0,0	78,0	24,2	0,0	425,0	57,3
1462	914,4	126,0	40,0	0,0	0,0	87,4	213,0	0,0	80,5	0,0	0,0	20,0	20,3	3,6	245,0	74,1
1471	1203,5	61,0	77,8	0,0	0,0	82,0	52,5	14,0	90,6	0,0	449,7	0,0	9,6	29,0	179,0	150,9
1472	1195,0	106,0	93,1	0,0	0,0	85,0	57,5	98,8	90,6	0,0	332,6	8,0	9,6	0,0	250,0	58,3
149	878,7	92,9	47,5	0,0	0,0	54,4	60,0	30,0	0,0	0,0	74,4	6,9	2,6	0,0	366,0	143,8
150	1252,0	158,0	55,0	0,0	0,0	0,0	10,0	22,5	0,0	0,0	625,0	0,0	21,0	9,5	350,0	0,5



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

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