

# UTVIKLING AV METODE FOR BESTEMMELSE AV METYLKVIKKSØLV I HÅR VED HJELP AV EKSTRAKSJON, DEKOMPONERING OG KALDDAMP ATOM ABSORPSJONS SPEKTROSKOPI

DEVELOPMENT OF METHOD FOR DETERMINATION OF METHYL MERCURY IN  
HAIR SAMPLES USING EXTRACTION, DECOMPOSITION AND COLD VAPOUR  
ATOMIC ABSORPTION SPECTROSCOPY

ARNE RAMBØL

UNIVERSITETET FOR MILJØ- OG BIOVITENSKAP  
INSTITUTT FOR PLANTE- OG MILJØVITENSKAP  
MASTEROPPGAVE 30 STP. 2012





## **Forord**

Denne oppgaven ble utført ved Institutt for plante- og miljøvitenskap med Universitet for miljø og biovitenskap på Ås. Temaer for oppgaven ble foreslått av førsteamanuensis Elin Gjengedal, på bakgrunn av et ønske om å utvikle en analysemetode for metylkvikksølv i hår basert på tilgjengelig utstyr ved instituttet. Metoden er tenkt brukt for å undersøke eksponering for kvikksølv fra fisk og kosmetikkprodukter.

Jeg vil takke min veileder Elin Gjengedal for hjelp og støtte underveis. Hun har rettet mine feilskjær, men allikevel latt meg få så mye frihet at den ferdige rapporten føles som min egen. Jeg vil også takke Solfrid Lohne for god hjelp og opplæring underveis. Takk rettes også til Åse Stranden Rambøl for korrekturlesing.

## Sammendrag

Denne oppgaven har gått ut på å optimalisere en analysemetode for metylkvikksølv (MeHg) i hår, basert på en metode for å bestemme metylkvikksølv i sediment og biologiske prøver uten å forringe analysekvaliteten. Metoden bestod av spesiering med ekstraksjoner, dekomponering ved hjelp av mikrobølgeteknikk, og analyse med kalddamp atomabsorpsjonsspektroskopi.

Spesieringsdelen av analysen, som bestod av ekstraksjoner med hydrogenbromidsyre, toluen og L-cysteinløsning ble forenklet. Fire ekstraksjoner ble redusert til tre og sentrifugering av prøvene etter hver ekstraksjon ble utelatt.

Variansanalyse av resultater fra modifisering av metoden gav ingen signifikant forskjell på opprinnelig metode og modifisert metode.

Modifisert metode gav god nøyaktighet basert på analyse av sertifisert referansemateriale.

Den gav en presisjon på 8 % uttrykt som relativt standard avvik, det er like god presisjon som opprinnelig metode tidligere har vist. Da sertifisert referansemateriale hadde lavere standardavvik enn hårprøver er det sannsynligvis mulig å forbedre presisjonen ytterligere ved bedre homogenisering av hårprøvene. Kvantifiseringsgrense for modifisert metode ble bestemt til 0,015 mg MeHg / kg, det er lavere enn for opprinnelig metode.

Metylkvikksølv ble funnet å være stabilt i L-cysteinløsning i opp til 20 dager etter ekstraksjoner.

Hårprøvene som ble analysert kom fra personer som hadde registrert antall måltider av saltvannsfisk og ferskvannsfisk per måned, antall amalgamfyllinger i tenner, alder og bosted. Det ble bestemt innhold av metylkvikksølv i 38 hårprøver og total kvikksølv i 24 hårprøver. De laveste resultatene ble funnet i prøver fra veganere, her var metylkvikksølv konsentrasjonen under kvantifiseringsgrensen for to prøver. De høyeste resultatene ble funnet i prøver fra mennesker som spiser fisk flere ganger om dagen. Det høyeste resultatet på 6,18 mg MeHg / kg ligger under antatt grense for skade på grunn av kvikksølv.

Lineærregresjon av analyseresultater gav en god sammenheng mellom innhold av total kvikksølv og metylkvikksølv i hårprøven. Enkelte prøver avviker imidlertid fra denne sammenhengen, og flere analyser må gjøres før noen konklusjon om sammenheng mellom total kvikksølv og metylkvikksølv kan gjøres.

En bedre rutine for innhenting og behandling av hårprøver er også nødvendig. Det er observert en sammenheng mellom høyt inntak av fisk og høyt innhold av metylkvikksølv i

hår. Denne sammenhengen kunne imidlertid ikke bekreftes statistisk med det tallmaterialet som ble tilgjengelig ved analysene. Det trengs flere forsøkspersoner med høyt innhold av fisk i kosten, og det bør vurderes om man skal finne forsøkspersoner fra et område der metylkvikksølvinholdet i fisk er kartlagt, eller fiskens trofiske nivå er kjent.

## Abstract

The aim of this master thesis was to optimize an analytic method for methyl mercury (MeHg) in hair, based on a method for methyl mercury in sediments and biological samples without impairing the quality of the analysis. The method consists of speciation by extraction, decomposition with microwaves and analysis by cold vapour atomic absorption spectroscopy. The speciation part, consisting of extractions with hydrobromic acid, toluene and L-cystein solution was simplified, four extractions were reduced to three and centrifugation after each extraction was omitted.

Analysis of variance of the results from the modification of the method gave no significant difference between the original method and the modified method.

The modified method gave good accuracy based on analysis of certified reference material. The precision given as relative standard deviation was 8 %, as good as the original method in previous analysis. As certified reference material had lower standard deviation than the samples, the precision can probably be improved by better homogenisation of the hair samples. The limit of quantification for modified method was 0,015 mg MeHg / kg, which is lower than the original method.

Methyl mercury was found to be stable in L-cystein solution up to 20 days after the extractions.

Hair samples were retrieved from people who also reported number of salt water fish and fresh water fish per month, number of amalgam fillings in teeth, age and place of residence. Methyl mercury was determined for 38 hair samples and total mercury was determined for 24 samples. The lowest results were found in hair samples from vegans, the methyl mercury concentration in two these samples were below the limit of quantification. The highest results were found in samples from people who eat fish several times a day. The highest result of 6,18 mg MeHg / kg is below the risk level for the first symptoms of methyl mercury poisoning.

Linear regression of the results gave a good fit for total mercury versus methyl mercury.

Some samples do however differ from the average relation between total mercury and methyl mercury. More tests are necessary before any conclusion can be made.

A better routine for collection of samples is necessary. A connection between high intake of fish and high concentration of methyl mercury was observed, but the connection could not be verified statistically with the present results. More results are needed, especially for the higher

level of fish intake. Preferably from an area where the methyl mercury content of the fish is mapped or at least the trophic level of the fish is known.

## Innhold

1	Innledning.....	9
2	Teori .....	12
2.1	Kvikksølv generelt.....	12
2.2	Kilder til kvikksølvforurensning .....	13
2.2.1	Antropogene kilder .....	13
2.2.2	Naturlige kilder .....	15
2.2.3	Utslipp og spredning .....	15
2.3	Kvikksølv i Arktis .....	16
2.4	Metylering av kvikksølv .....	16
2.5	Kvikksølv i fisk .....	16
2.6	Større tilfeller av kvikksølvforgiftning.....	17
2.7	Tiltak i Norge.....	18
2.8	Internasjonale tiltak .....	18
2.9	Grenseverdier for inntak .....	19
2.10	Kvikksølv i mennesker .....	19
2.10.1	Opptak .....	19
2.11	Skadevirkninger .....	20
2.12	Utskillelse .....	22
2.13	Kvikksølv i hår.....	22
2.14	Teori analysemetode .....	24
2.14.1	Ekstraksjon .....	24
2.14.2	Dekomponering med UltraClave .....	25
2.14.3	Analyse med CV-AAS .....	27
3	Eksperimentelt.....	29
3.1	Utstyr og kjemikaler .....	29
3.2	Forbehandling og vask av hårprøver. ....	30
3.3	Ekstraksjon .....	31
3.4	Analyse ved bruk av CV-AAS .....	32
3.5	Innledende kontroll av presisjon.....	32
3.6	Modifisering av metode.....	32
3.7	Nøyaktighet og presisjon med modifisert metode .....	33
3.8	Deteksjons og kvantifiseringsgrense for modifisert metode .....	34
3.9	Holdbarhet av metylkvikksølv i L-cysteinløsning.....	34



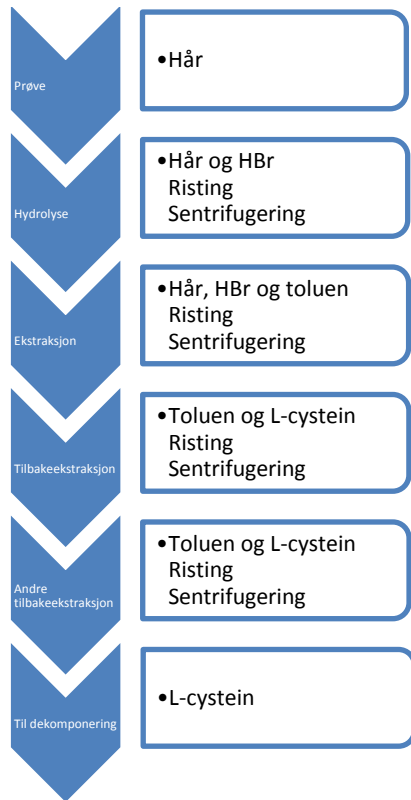
3.10	Analyse av hårprøver .....	34
4	Resultater og diskusjon .....	36
4.1	Forbehandling og vask av hårprøver .....	36
4.2	Modifisering av metoden.....	37
4.2.1	Sentrifugering og enkel tilbakeekstraksjon med L-cystein. ....	37
4.3	Bestemmelse av nøyaktighet og presisjon for modifisert metode.....	38
4.4	Bestemmelse av nøyaktighet i høyere måleområde .....	39
4.5	LOD LOQ for modifisert metode .....	41
4.6	Holdbarhet av metylkvikksølv i L-cysteinløsning.....	42
4.7	Utprøving av metoden på reelle hårprøver .....	44
4.7.1	Sammenheng mellom metylkvikksølv i hår og antall fiskemåltider.....	47
4.7.2	Forhold mellom metylkvikksølv og total kvikksølv .....	48
4.7.3	Forhold mellom Hg <sub>rest</sub> og amalgam i tannfyllinger.....	51
5	Konklusjon og videre arbeid .....	53
	Referanser.....	57
	Vedlegg 1 Analyseresultater .....	59
	Vedlegg 2 Beregninger.....	69
	Vedlegg 3 Oversikt over nasjonalitet, bosted, kjønn og fødselsår til forsøkspersoner .....	70
	Vedlegg 4 Tillagning av løsninger .....	71
	Vedlegg 5 Temperaturprofil for UltraClave.....	72
	Vedlegg 6 Variansanalyse modifisering av metode .....	73

## 1 Innledning

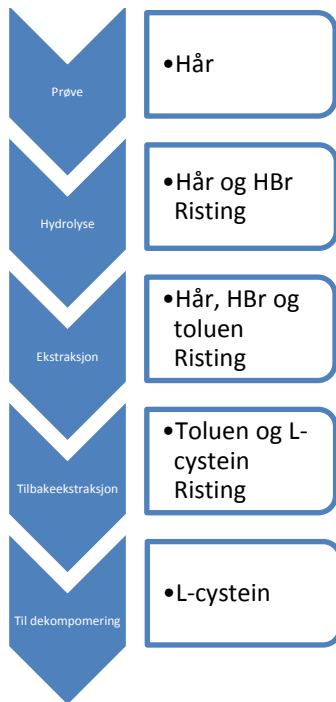
Oppgaven var todelt. Det ble tatt utgangspunkt i en indirekte metode for analyse av metylkvikksølv i sediment, fiskemuskel og hår med kalddamp atomspektroskopi, utviklet av Berit Glomstad (Glomstad 2010) og Logana Mohanathas (Mohanathas 2010). Metoden var arbeidskrevende og inneholdt mange trin: Ekstraksjon med hydrogenbromsyre, ekstraksjon med toluen, to ganger ekstraksjon med L-cysteinløsning, dekomponering med mikrobølgeteknikk og til slutt analyse. Metoden skulle spesialiseres for hårprøver for å redusere arbeidsmengden og antall trinn. Nøyaktighet, presisjon og kvantifiseringsgrense måtte bestemmes for den modifiserte metoden. Metoden skulle testes ut ved å analysere reelle hårprøver. Hårprøvene ble levert av forsøkspersoner som også registrerte innhold av fisk i kosten, antall amalgamfyllinger i tennene, alder og bosted. Fisk er anerkjent som hovedkilden til metylkvikksølv for mennesker.

Den opprinnelige metoden beskrev sentrifugering som en del av hver ekstraksjon. Dette kan være unødvendig for analyse av hår fordi det er bare ekstraksjon av væsker i metoden, det er ingen partikler som må skilles ut. Sentrifugering medfører et ekstra trinn i opparbeidelsen, som er tidkrevende, gir øket risiko for kontaminering og det reduserer antall prøver som kan opparbeides samtidig på, grunn av begrenset antall plasser i sentrifuge. Det ble utført dobbel tilbakeekstraksjon med L-cystein i denne metoden. Dette er tidkrevende og det syntes usikkert om det var nødvendig. Derfor ble det utført forsøk for å undersøke nødvendigheten av sentrifugering og dobbel tilbakeekstraksjon med L-cystein.

I denne oppgaven vil metoden det ble tatt utgangspunkt i kalles opprinnelig metode, mens metoden med reduksjon antall trinn for ekstraksjon kalles modifisert metode. Det skal kun gjøres endringer i ekstraksjonsprosedyren, dekomponering og analyse blir uforandret. En oversikt over trinn i opprinnelig metode er vist i Figur 1, en oversikt over trinn i modifisert metode er vist i Figur 2.



Figur 1 Oversikt over ekstraksjon i opprinnelig metode



Figur 2 Oversikt over ekstraksjon i modifisert metode. Sentrifugering er fjernet og det er kun en tilbakeekstraksjon

For å undersøke om analysen gir samme resultat uten dobbel tilbakeekstraksjon og sentrifugering, skulle 4 sett av 5 paralleller av samme prøve analyseres. Prøvene skulle ekstraheres med og uten sentrifugering og med enkel og dobbel tilbakeekstraksjon.

Det gir 4 sett av resultater med tilhørende standardavvik, en variansanalyse vil da kunne avsløre om det er signifikant forskjell på resultatene.

Deretter skulle nøyaktighet og presisjon, samt kvantifiseringsgrenser for modifisert metode bestemmes. Ut fra et ønske om større fleksibilitet i tid for utførelse av analysen skulle tap av metylkvikksølv ved mellomlagring før dekomponering undersøkt. Holdbarhet av metylkvikksølv i L-cysteinløsning var ikke kjent. Løsningen må lagres i hvert fall en natt før dekomponering og analyse.

Det skulle så undersøkes om man ved analyse av reelle hårprøver med modifisert metode kunne finne:

En sammenheng mellom innhold av metylkvikksølv i hårprøvene med innhold av fisk i kosten.

En sammenheng mellom total kvikksølv og metylkvikksølv i håret. Dersom dette forholdet er konstant er det ikke nødvendig å bestemme metylkvikksølv i håret, det er da tilstrekkelig å bestemme total kvikksølv, noe som er mindre arbeidskrevende.

Analyse av total kvikksølv skulle utføres ved å dekomponere hårprøvene direkte, selve analysen er ellers lik analysen av metylkvikksølv, da alt kvikksølv er på ioneform etter dekomponering.

## 2 Teori

### 2.1 Kvikksølv generelt

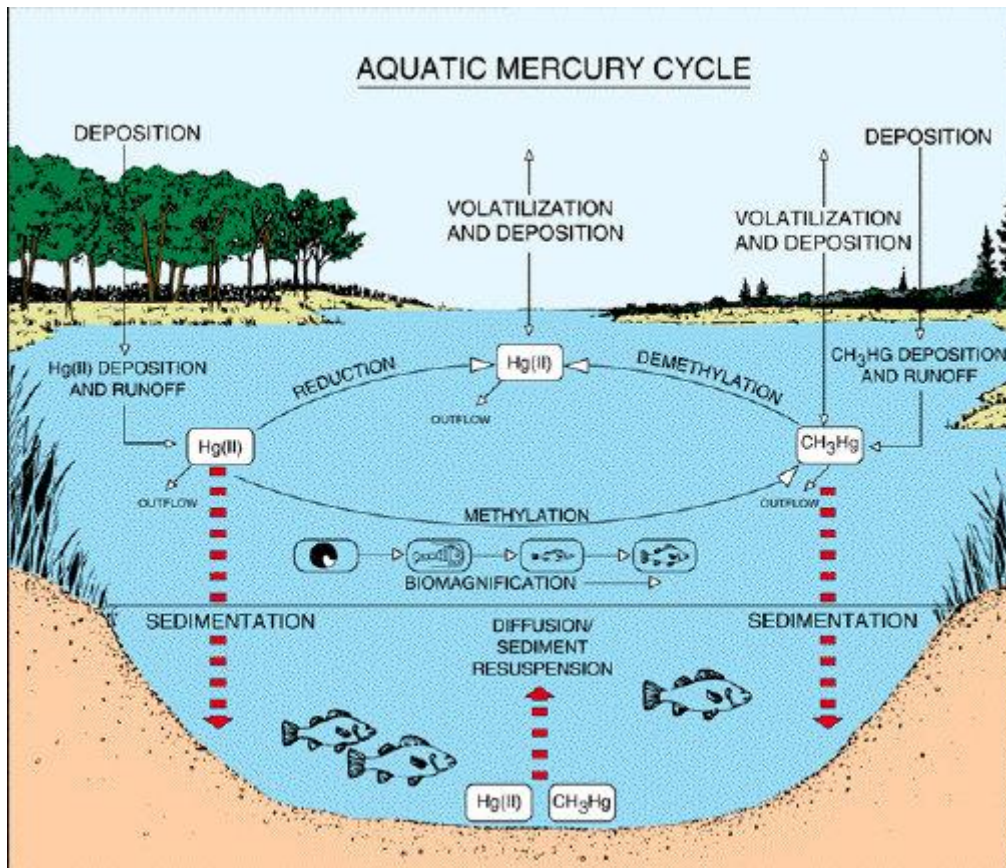
Kvikksølv har atomnummer 80, atommassen er 200,59 u. Det har et kokepunkt på 375 °C og et smeltepunkt på -39 °C. Det er det eneste metallet som er flytende ved romtemperatur. Som gass er kvikksølv monoatomært.

Kvikksølv kan finnes i flere former: Som enverdige eller toverdige ioner i løsning eller salter, som elementært kvikksølv i form av metall eller gass, eller som organisk bundet kvikksølv, for eksempel i form av MeHg (metylkvikksølv) eller EtHg (etylkvikksølv). Kvikksølv kan også danne amalgamer med metaller som for eksempel gull og sølv. (Wibetoe)

Metallisk kvikksølv er relativt flyktig i forhold til andre metaller, og fordamper derfor fra overflater til atmosfæren. I atmosfæren finnes kvikksølv på elementær form som gass, og har da lang oppholdstid. Dermed spres kvikksølv med luftstrømmer, og konsentrasjonen av kvikksølv er ganske lik over den nordlige halvkule og over den sørlige halvkule. Selv om kvikksølvutslipp er redusert kraftig i Norge, er konsentrasjonen av kvikksølv i luft ikke redusert (NILU 2012). Som ion vil kvikksølv lett bindes til partikler og vann, som blir til nedbør. Oppholdstiden blir da mye kortere.

Oksidasjon av Hg til  $\text{Hg}^{2+}$  i atmosfæren kan skje ved reaksjon med ozon (Bjerregaard 2005).

Den mest vanlige kvikksølvforbindelsen i naturen er mineralet sinober, som er en form av kvikksølv(II)sulfid.



Figur 3 Den akvatiske kvikksølvsyklusen. Kvikksølv metyleres og demetyleres. Det tilføres vannet fra regn, bekker og elver, fordampes fra overflaten, sedimenteres og tas opp av fisk. (Watras & Huckabee 1994)

I vann og sedimenter kan kvikksølv finnes både som elementært kvikksølv, enverdige ioner og toverdige ioner. Den akvatiske kvikksølvsyklusen vises i Figur 3. Kvikksølv bindes gjerne til organiske ligander, og i vann med mye organisk materiale vil kvikksølv ofte finnes i form av organiske komplekser. (vanloon & SDuffy 2005)

## 2.2 Kilder til kvikksølvforurensning

### 2.2.1 Antropogene kilder

Det er kjent at kvikksølvforbindelser har vært i bruk i over 30000 år. Sinober ble brukt som fargepigment i hulemalerier Spania og Frankrike, senere som pigment i blekk i Kina og i medisin i Hellas. Kvikksølvforbindelser har dessuten blitt brukt til kosmetikk. (Bjerregaard 2005; Wibetoe)

De største antropogene kildene i dag er: Kullforbrenning og søppelforbrenning.

Kullforbrenning frigjør kvikksølv til atmosfæren, kullet inneholder lav konsentrasjon av

kvikksølv, men det er store mengder kull som forbrennes på verdensbasis. Søppelforbrenning som gir utslipp til atmosfæren når kvikksølvholdig avfall forbrennes.

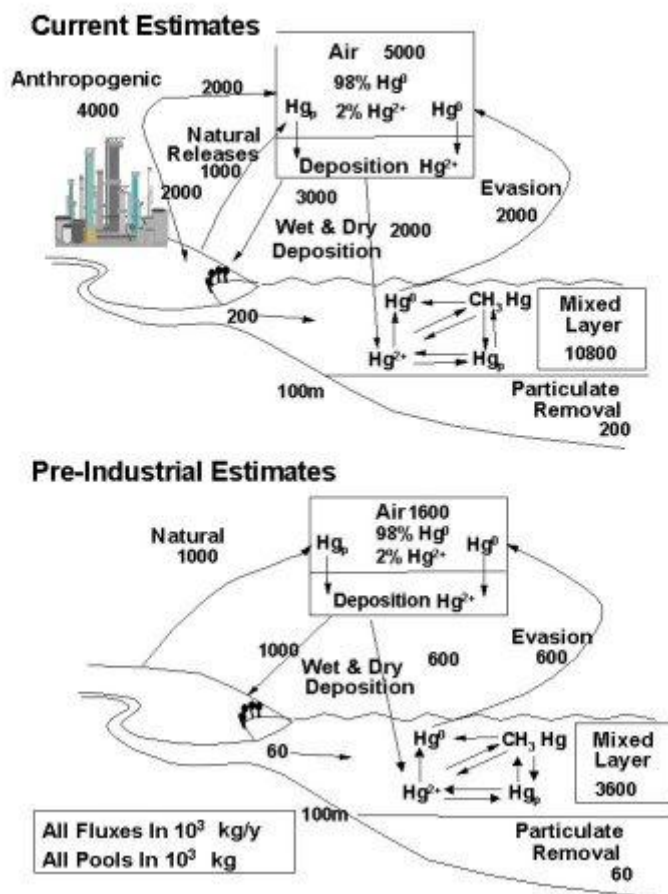
Andre kilder til kvikksølvutslipp er metallindustri, gruvedrift (gull) og krematorier.

Grunnen til at krematorier gir utslipp av kvikksølv er bruken av amalgam som tannfyllingsmateriale. Kvikksølv spres i naturen (miljøet) gjennom forbrenning ved krematorier. Bruk av amalgam som tannfyllingsmateriale gav også rester av amalgam i avløpsvannet fra tannleger (Folkehelseinstituttet 2009). Selv om kvikksølv nå ikke brukes som tannfyllingsmateriale, vil det amalgamet folk allerede har i fyllinger fortsatt kunne gi utslipp av kvikksølv ved utskifting av plomber og fra krematorier.

Bruk av kvikksølv i gruvedrift har medført store utslipp av både elementært kvikksølv og metylkvikksølv. Dette har medført høy eksponering for kvikksølv blant lokalbefolkningen. Det er anslått at bare i Brasil, slippes det ut 2000-3000 tonn kvikksølv i området nær Amazonas. (Counter & Buchanan 2004)

I dag er kvikksølv forbudt, eller begrenset i bruk i Norge. De viktigste antropogene kildene i Norge er metallindustri, veitrafikk, søppelforbrenning og produkter som amalgam til tannfyllinger, måleinstrumenter, lysstoffrør og sparepærer. Sparepærer og lysstoffrør som inneholder kvikksølv er fortsatt tillatt i Norge (Wibetoe). Petroleumsindustrien har redusert sine kvikksølvutslipp betraktelig de siste årene og står nå bare for 1 % av de nasjonale utslippene i Norge (KLIF 2010).

## The Global Mercury Budget



Figur 4 Det globale kvikksølvbudsjettet, mengde av kvikksølv i omløp før den industrielle tid og i dag. (Environment Canada 2010)

### 2.2.2 Naturlige kilder

Naturlige kilder til kvikksølv i miljøet er: Vulkaner og erosjon av kvikksølvholdige bergarter. Skogbranner og fordampning gir remobilisering av kvikksølv, det vil si kvikksølv som har falt ut av atmosfæren på partikler eller i regn, bindes til overflater og frigjøres på nytt.

Fordi kvikksølv har lang oppholdstid i atmosfæren og dessuten kan remobiliseres vil utslipp av kvikksølv til atmosfæren kunne spres globalt. (AMAP 2011)

Figur 4 viser global kvikksølvsyklus i førindustriell tid sammenlignet med i dag.

### 2.2.3 Utslipp og spredning

Utslipp er redusert i Amerika og Europa de siste 20 årene, mens i Asia er utslippende antagelig økende på grunn av forbrenning av kull (AMAP 2005).

Mye av kvikksølvet i naturen er bundet i sedimenter og organisk materiale. Mikroorganismer kan imidlertid omdanne kvikksølv til metylkvikksølv, som er fettløslig og akkumuleres i næringskjedene, spesielt i akvatiske miljøer (AMAP 2005).



Det er i Norge målt økende verdier av kvikksølv i abbor og ørret i innsjøer i Sør-Norge. Dette på tross av at norske utslipp er synkende og at det ikke er påvist lokale utslipp av kvikksølv, årsaken er ikke kjent (KLIF 2012). En teori er at varmere og fuktigere klima øker metylering av kvikksølv, en annen teori er at skogsdrift i nedslagsfeltet kan ha medført økt grad av metylering.

### 2.3 Kvikksølv i Arktis

I Arktis finnes høyere konsentrasjoner av kvikksølv enn på resten av kloden. Kvikksølv damp kan fraktes med globale vinder. Når kvikksølv dampen når nordligere breddegrader, vil luften avkjøles og kvikksølv kondenserer på bakken. Ved temperaturøkning vil noe kvikksølv igjen fordampe og fortsette ferden nordover på globale luftstrømmer. Dette kalles gresshoppeeffekten og er årsaken til at det finnes relativt høye konsentrasjoner av kvikksølv i Arktis. (AMAP 2005). I tillegg vil metallisk kvikksølv om våren i større grad omsettes til metylkvikksølv og etylkvikksølv. Dette skyldes en kombinasjon av uv-stråling, tilstedeværelse av ozon og lav temperatur. (Bjerregaard 2005)

### 2.4 Metylering av kvikksølv

Metyleringsgraden i vandige miljøer er normalt økende med økende temperatur, økende mengde organisk materiale (dersom dette ikke binder  $Hg^{2+}$ ), synkende pH-verdi, konsentrasjonen av biotilgjengelig  $Hg^{2+}$ , men synkende med mengden kompleksbindende ligander.

Metylering av  $Hg^{2+}$  danner monometylkvikksølv. Dette skjer hovedsaklig i en del metanproduserende mikroorganismer under anaerobe og reduserende forhold. Det finnes også mikroorganismer som kan metylere ved aerobe forhold.

Metyleringen kan også gå videre til dimetylkvikksølv, som fordamper relativt lett, og dermed kan komme over i atmosfæren. (vanloon & SDuffy 2005)

### 2.5 Kvikksølv i fisk

Metylkvikksølv tas opp mer effektivt i fisk enn metallisk kvikksølv. Metylkvikksølv bioakkumuleres, det vil si at det skilles ut langsommere enn det tas opp, dermed kan konsentrasjonen av metylkvikksølv i en organisme lett øke med alder. Kvikksølv biomagnifiseres, det vil si at konsentrasjonene av metylkvikksølv i en organisme øker med organismens trofiske nivå. Dermed vil innhold av metylkvikksølv i fisk utgjøre 90-95 % av det totale kvikksølvinnholdet. Fisk høyt oppe i næringskjeden vil inneholde mer

metylkvikksølv enn fisk lenger ned i næringskjeden. Eldre og dermed større fisk, vil også inneholde mer kvikksølv enn yngre fisk. Fisken vil ofte forandre trofisk nivå med alder. Som et eksempel kan nevnes abbor. Som yngel lever den for det meste av planter og får derfor i seg lite metylkvikksølv. Senere består kosten av mer zooplankton, og når den blir voksen spiser den andre fisk, som vil inneholde større mengder metylkvikksølv. Gjedde er et eksempel på en rovfisk som kan inneholde mye metylkvikksølv. (Bjerregaard 2005)

Eksempler på saltvannsfisk som kan ha høyt innhold av metylkvikksølv er Brosme og Kveite. Spesielt i enkelte fjorder som er forurenset av industri, slik som Sørfjorden i Hardanger, kan saltvannsfisk ha høye konsentrasjoner av metylkvikksølv. (NIFES)

## **2.6 Større tilfeller av kvikksølvforgiftning**

Det var et stort tilfelle av metylkvikksølvforgiftning i Irak i 1971-72. Såkorn som var behandlet med et kvikksølvholdig plantevernmiddel ble malt opp og brukt til å bake brød. Det antas at 50 000 mennesker ble berørt, 6500 personer ble brakt til sykehus og 459 personer døde på grunn av kvikksølvforgiftning. Avvik i nevrologisk utvikling hos barn ble observert. (Counter & Buchanan 2004)

Et av de mest berømte og mest omfattende tilfellene av kvikksølvforgiftning skjedde i Minamata i Japan rundt midten av 1900-tallet. Det første tilfellet av kvikksølvforgiftning ble oppdaget i midten av 1950-tallet. Totalt er det estimert at 1700 mennesker døde av kvikksølvforgiftning, i tillegg var det store skader på barn som ble født.

Årsaken viste seg å være en kjemisk fabrikk som benyttet kvikksølv-sulfat som katalysator i produksjon av acetaldehyd. Store mengder kvikksølv og metylkvikksølv ble sluppet ut i Minamata Bay og ble tatt opp av fisken der. Innbyggerne i Minamata levde hovedsakelig av fisk som var fisket i bukten og fikk dermed i seg metylkvikksølv fra fisken.

Utslippene pågikk i perioden 1932-1968, og denne lange tidsperioden bidro til å gjøre forgiftningskatastrofen mer omfattende. (Maier et al. 2009)

Både ved Minamata Bay og i Irak ble det observert effekter av kvikksølvforgiftning som psykisk utviklingshemming, cerebral parese, døvhet, blindhet og Dysartri (nedsatt evne til artikulering). (Counter & Buchanan 2004)

Slike ulykker med høydoseforgiftning av metylkvikksølv er sjelden. Men mange folkegrupper inntar kontinuerlig lavere doser av kvikksølv. Spesielt de som spiser mye fisk. Disse lave

konsentrasjonene gir også avvikende nevrologisk utvikling hos barn. (Counter & Buchanan 2004)

Erfaring fra Minamata Bay viste at konsentrasjonen av metylkvikksølv er høyest i fisk høyt oppe i næringskjeden og øker med alder på fisken.

Det var tilfeller ved Minamata Bay der moren bare hadde svake symptomer på metylkvikksølvforgiftning, mens barnet fikk alvorlig hjerneskade.

(Clarkson & Strain 2003)

Kvikksølv kan lett danne legeringer med andre metaller. Denne egenskapen utnyttes ved utvinning av gull i Amasonas. Utvinningen av gull kan enkelt forklart beskrives slik.

Først skilles de tyngste sandkornene ut, det er disse som inneholder mest gull. Denne tunge sanden fylles i en amalgamiseringsstrømmel sammen med kvikksølv. Kvikksølv og gull bindes sammen i et tungt amalgam. Denne kan så skilles fra sanden i en vaskepanne. Gull og kvikksølv skilles så i en prosess som slipper ut store mengder kvikksølv til atmosfæren og det lokale miljøet.

Klimaet ved Amazonas med høy temperatur, mye organisk materiale og relativt lav pH favoriserer metylering av kvikksølv. (vanloon & SDuffy 2005)

Menneskene i dette området blir utsatt for kvikksølv både i form av damp ved bearbeiding av amalgamer, men også fra kosten, da fisken de spiser vil ha høyt innhold av metylkvikksølv.

## **2.7 Tiltak i Norge**

Bruk av kvikksølv i Norge skal begrenses. Det stilles krav til industrien om rensing og reduksjon i bruken av kvikksølv i forurensingsforskriften. Allerede i 1998 kom det et forbud mot bruk av kvikksølv i termometre. I 2008 kom det et totalforbud mot bruk av kvikksølv, med en del unntak, blant annet for batterier og emballasje. I 2011 kom et forbud mot bruk av amalgam i tannfyllinger. Det finnes returordninger for elektriske produkter, da disse kan inneholde kvikksølv. Det er ikke lov å gjenvinne kvikksølv i Norge, heller ikke å eksportere kvikksølv for gjenvinning. Avfallsprodukter som inneholder kvikksølv skal deponeres på en sikker måte (KLIF 2012).

## **2.8 Internasjonale tiltak**

Det finnes flere internasjonale avtaler som har som mål å redusere bruk og utslipp av kvikksølv. Som eksempel kan nevnes: Rotterdamkonvensjonen, som omtaler flere

kvikksølvforbindelser, Baselkonvensjonen, som forbyr eksport av kvikksølv til land utenfor OECD og FNs miljøprogram, som reduserer bruk og utslipp av kvikksølv (KLIF 2012).

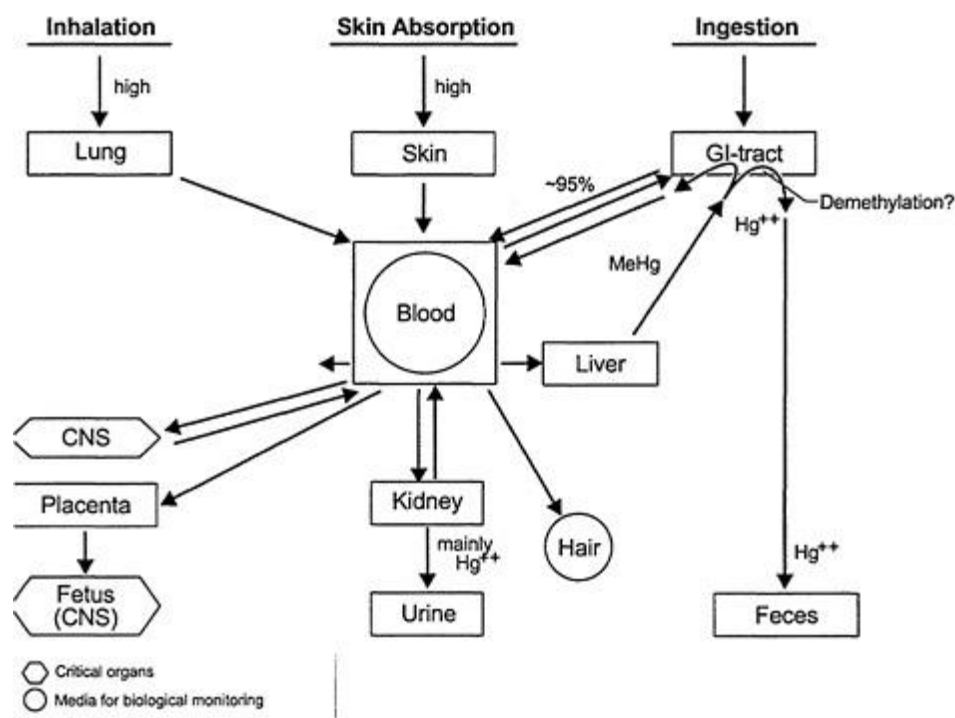
## 2.9 Grenseverdier for inntak

Høyeste tolerable inntak anbefalt av Folkehelseinstituttet er 1,6  $\mu\text{g MeHg} / \text{kg}$  kroppsvekt og uke. United States Environmental Protection Agency (EPA) opererer med en lavere grense på 0,1  $\mu\text{g MeHg} / \text{kg}$  kroppsvekt og dag. Når det gjelder fisk som mat, er det en grenseverdi i Norge og EU, på 0,5 mg Hg / kg. For enkelte fiskeslag er grensen på 1,0 mg Hg / kg. Den siste grensen gjelder fisk som for eksempel kveite, ål, gråsteinbit, gjedde og hai.

Ammende og gravide anbefales ikke å spise gjedde, abbor med lengde over 25 cm, ørret med vekt over en kilo, tunfisk, hai, sverdfisk og skate (Folkehelseinstituttet 2009; NIFES).

## 2.10 Kvikksølv i mennesker

### 2.10.1 Opptak



Figur 5 Opptak, distribusjon og utskillelse av kvikksølv i kroppen (Committee on the Toxicological Effects of Methylmercury 2000).

Oversikt over kvikksølvets vei inn, gjennom og ut av kroppen vises i Figur 5.

Hvor effektivt kvikksølv opptas i organismen avhenger av hvilken form kvikksølv er på. Av metallisk kvikksølv i mage -tarm, opptas gjerne bare 0,01 %. Av uorganiske kvikksølvssalter opptas rundt 15 % i mage -tarm. Av kvikksølv damp som pustes inn opptas rundt 80 %. For metylkvikksølv er opptaket tilnærmet fullstendig i mage -tarm.

Tannfyllingsmaterialet amalgam inneholder kvikksølv på metallisk form. Små mengder kan dampe av over tid og tas opp i blodet.

Metylkvikksølv i kroppen vil spres over hele kroppen da det er fettløslig. Det oppkonsentreres i lever.

Metallisk (elementært) kvikksølv og metylikvikksølv kan passere blod – hjernebarrieren og dermed vandre over i hjernen og sentralnervesystemet. Metylikvikksølv passerer også gjennom morkaken og kan medføre høyere konsentrasjoner hos fosteret enn hos moren. (Counter & Buchanan 2004).

Gjennom mat gir fisk og andre sjødyr det største bidraget til opptak av metylikvikksølv (Clarkson & Strain 2003).

Folk som spiser mye ferskvannsfisk får i seg mer kvikksølv enn gjennomsnittet av befolkningen. Gjennomsnittlig opptak gjennom mat er i Norge 4 µg / dag. (Folkehelseinstituttet 2009).

Det er observert kvikksølvkonsentrasjoner i blod opptil 89 µg / l hos barn i områder med gruvedrift i Ecuador. Dette skyldes en kombinasjon av innånding av kvikksølv damp fra behandling av kvikksølv-gull amalgam og metylikvikksølv fra fisk i nærliggende elver. Det er også observert forhøyet nivå av kvikksølv hos barn av inuitter på Grønland, og hos skolebarn nær gullgruver på Filippinene. (Counter & Buchanan 2004)

Uorganisk kvikksølv er fremdeles en viktig årsak til kvikksølvforgiftning på verdensbasis. Blekekremmer for hud og preparater for bleking av tenner kan inneholde uorganisk kvikksølv, som medvirker til kvikksølvrelaterte skader. Bruk av blekekremmer for hud er økende (2004) og medfører kvikksølvrelaterte helseproblemer i noen land. (Counter & Buchanan 2004)

## 2.11 Skadevirkninger

To store studier av skadevirkning av moderat kvikksølv eksponering hos barn gir avvikende resultater. En studie på Seychellene, som fulgte barn i alder 6 måneder til 9 år og deres mødre fant ingen avvikende utvikling hos barna. Det ble benyttet et vidt spekter av tester på nevrologisk utvikling som antas å påvirkes av kvikksølv.

En studie på Færøyene viser imidlertid avvik i nevrologisk utvikling for språk, konsentrasjonsevne og hukommelse hos barna. (Counter & Buchanan 2004)

Barn er spesielt sårbare for kvikksølvforgiftning. Det kan gi skader på sentralnervesystemet, samt lunge og nyreskader. Skadene blir større enn hos voksne fordi hos barn skjer skaden

under utvikling av organene. (Counter & Buchanan 2004; Mergler et al. 2007)

Hos voksne er ofte skadevirkningene lokale, og kan for eksempel påvirke synet. I en hjerne i utvikling, er skadene mer spredt og alvorlig. Kvikksølvforgiftning kan hos barn føre til avvik i neurologisk utvikling, forsinket utvikling av språk, redusert konsentrasjonsevne. Ved høyere konsentrasjoner kan det føre til døvhet, blindhet, cerebral parese og psykisk utviklingshemming. (Counter & Buchanan 2004)

I Iran og Japan har man erfaring med metylkvikksølvforgiftning av større menneskegrupper. Omtrent 5 % av en befolkning med gjennomsnittinnhold på 50 mg Hg / kg målt i hår, vil merke symptomer som stikking i hender og føtter.

Målbare hjerneskader hos foster kan oppstå ved 10-20 mg Hg / kg hår målt hos moren. Skadene kommer til syne som forsinket motorisk og mentale funksjoner som læreevne og hukommelse. (Folkehelseinstituttet 2009)

WHO anslår en øket risiko på 5 % avvikende neurologisk utvikling hos barn ved et kvikksølvinnhold på 10-20 ppm (mg/kg) i morens hår. Det anslås en risiko på over 30 % ved kvikksølvinnhold på 70 ppm i morens hår. (Counter & Buchanan 2004)

WHO har ikke etablert noen grenseverdi for metylkvikksølvkonsentrasjon hos moren som sikkert ikke gir avvikende neurologisk utvikling.

EPA har satt en grense for hvor mye metylkvikksølv en person kan innta over hele livsløpet uten at det gir helseskader, denne grensen er satt til 0,1 µg/ kg kroppsvekt/ dag. Denne grensen er satt på bakgrunn av studiet fra Færøyene.

ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry) i USA, opererer med et grensenivå for daglig inntak av metylkvikksølv på 0,3 µg/ kg kroppsvekt/ dag, for minimal risiko for helseskader. Denne grensen er satt på bakgrunn av studiet på Seychellene. (Counter & Buchanan 2004)

Det er stor forskjell på hvor følsomme ulike mennesker er på eksponering for metaller i miljøet, spesielt ved små doser, dette gjør det vanskelig å vurdere risikoen ved denne eksponeringen. (Kosanovic & Jokanovic 2011)

Ved høye doser av kvikksølv vil symptomene kunne være tydelige. Symptomene kan være skjelving, problemer med å koordinere bevegelser, synsforstyrrelser, taleproblemer, samt skader på lever og nyrer (Maier et al. 2009). De fleste mennesker får i seg atskillig lavere doser av metylkvikksølv. Dersom det er symptomer på kvikksølvforgiftning ved lavere doser vil disse være vagere. Ofte vil det være vanskelig å identifisere symptomene som

kvikksølvforgiftning da andre miljøgifter og en del psykiske lidelser kan gi lignende symptomer.

## 2.12 Utskillelse

Uorganisk kvikksølv har en halveringstid i organismen på 30-60 dager, mens metylkvikksølv har en halveringstid på 70-90 dager.(Bjerregaard 2005)

99 % av  $\text{Hg}^{2+}$  og metylkvikksølv i blodet vil være bundet i proteiner og lipider, dermed kan det i liten grad skilles ut gjennom nyrene. (Folkehelseinstituttet 2009)

Uorganisk kvikksølv tas opp av nyrer og lever og skilles hovedsakelig ut gjennom urin og avføring. Metylkvikksølv skilles hovedsakelig ut gjennom avføring.

## 2.13 Kvikksølv i hår

Kvikksølvanalyser bør utføres på terminalhår, og da helst fra hodet. Dette håret har en vekstsyklus som gjør at det er det håret som er best egnet. Hodehår vokser med en hastighet på 0,6 – 3,4 cm per måned. Som en forenkling regner man ofte med en veksthastighet på 1 cm per måned.(Nuttall 2006)

Kjemisk behandling av hår forandrer hårets egenskaper, dermed utgjør ikke hår som har blitt kjemisk behandlet en representativ prøve av håret.(Kosanovic & Jokanovic 2011)

Det er noe ulike oppfatninger om hvor god biomarkør kvikksølv i hår er.

I en undersøkelse ble totalkvikksølv og uorganisk kvikksølv bestemt i blod, blodplasma, urin og hår. Bestemmelse av totalkvikksølv i hår ble vurdert som den beste måten å fastslå langtidseksponering for metylkvikksølv.(Kosanovic & Jokanovic 2011)

I en annen rapport påstås det at konsentrasjonene av totalkvikksølv i hår har god korrelasjon med konsentrasjonen av metylkvikksølv. (Freire et al. 2010)

Andre igjen mener at konsentrasjonen av uorganisk kvikksølv i hår ikke kan antas å gi et godt mål for eksponering av uorganisk kvikksølv. (Yasutake & Hachiya 2006)

Konsentrasjon av metylkvikksølv derimot, regnes som en god biomarkør for eksponering av metylkvikksølv.  $\text{MeHg}$  tas opp fra blodet av proteiner i hår. Konsentrasjonene i hår regnes å være ca. 300 ganger konsentrasjonen i blodet hvis konsentrasjonene er stabil over lang tid.

En del av kvikksølvet som finnes i hår er uorganisk. Opptaksraten fra blod til hår av uorganisk kvikksølv er hos rotter funnet til omtrent en sjettedel av opptaksraten for metylkvikksølv. I tillegg tas metylkvikksølv lettere opp av organismen enn uorganisk kvikksølv.(Nuttall 2006; Yasutake & Hachiya 2006)

Imidlertid tilsvarer konsentrasjonen av metylkvikksølv i hår konsentrasjonen i blod på det tidspunktet håret vokste. Altså vil konsentrasjonen av metylkvikksølv 1 cm fra hodebunnen gi et mål for konsentrasjonene i blodet omtrent en måned før hårprøven ble tatt. (Nuttall 2006)

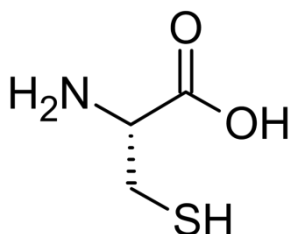
Fordeler med hår som biomarkør for metylkvikksølv eksponering er at det er en stabil matriks, det er enkelt å ta ut prøver, og lett å sende til analyse. (Schoeman et al. 2010)

I studier av grupper av mennesker benyttes ofte kvikksølvanalyse av hår for å beskrive eksponering for kvikksølv. Hos enkeltpersoner bør man utvise forsiktighet når det gjelder å bruke kvikksølvkonsentrasjonen i hår. Kvikksølvanalyser av hår (hos enkeltpersoner) kan være nyttig for å finne eksponering over tid. (Nuttall 2006)

Metylkvikksølv gir høyere konsentrasjon i hår enn uorganisk kvikksølv, sett i forhold til konsentrasjonen i blodet. (Nuttall 2006)

Det er ikke mulig å skille mellom kvikksølv tatt opp fra blodet, og kvikksølv som er avsatt direkte på håret, fra luft eller på partikler. Dette fordi vask av en hårprøve som fjerner kvikksølv avsatt på håroverflaten også vil trekke ut kvikksølv fra selve håret. Ved vask av hårprøven får man kun fjernet løse partikler. (Kosanovic & Jokanovic 2011; Nuttall 2006)

Protein i hår inneholder cystein, som er en aminosyre, denne har en tiol-gruppe som kan bilde metylkvikksølv. Uorganisk kvikksølv bindes dårligere i hår, derfor vil opptaktsraten være lavere enn for metylkvikksølv (Nuttall 2006). Strukturformel for L-cystein er vist i Figur 6.



Figur 6 L-cystein (Wikipedia 2012). MeHg bindes til SH-gruppe.

Andelen av metylkvikksølv i hår regnes å være 80 %, resten er uorganisk kvikksølv. Det er ikke funnet noen opplysninger i litteraturen om hvor mye andelen metylkvikksølv varierer fra person til person eller etter hvor prøven blir tatt. Konsentrasjonen av metylkvikksølv regnes som stabil etter at det er tatt opp i hårets vekstsyklus (Schoeman et al. 2010).

Usikkerheten om kvikksølvets kilde i hår vil i stor grad dreie seg om uorganisk kvikksølv. Opptaket fra blod og dermed konsentrasjonen av uorganisk kvikksølv i hår er lavere enn for metylkvikksølv, og forurensningen, altså avsetninger på hår direkte fra luft og på partikler vil være større for uorganisk kvikksølv enn for metylkvikksølv. (Nuttall 2006)



De vanligste analysemetodene for total kvikksølv er kalddamp atomabsorpsjonsspektroskopi som gir en deteksjonsgrense på omtrent 0,4 mg / kg, kalddamp atom fluorescens spektroskopi som gir en deteksjonsgrense på omtrent 0,04 mg / kg og Induktivt koblet plasma masse spektrometri som gir en deteksjonsgrense på 0,01 mg / kg.(Schoeman et al. 2010)

## 2.14 Teori analysemetode

Analysemetoden som benyttes i denne oppgaven er en indirekte metode. Det analyseres ikke direkte på metylkvikksølv. Metylkvikksølv ekstraheres først fra hår, deretter dekomponeres den ekstraherte prøven, underdekomponering vil all kvikksølv i prøven overføres til ioneform. Det er den dekomponerte prøven som så analyseres. Dette medfører mange trinn i forhold til en direkte metode, og usikkerheten i metoden kan bli større.

### 2.14.1 Ekstraksjon

Bestemmelse av metylkvikksølv i hår består av tre trinn. Først trekkes metylkvikksølv ut av håret og skilles fra uorganisk kvikksølv ved ekstraksjoner. Deretter dekomponeres prøven for å bryte komplekser dannet ved ekstraksjonene og få kvikksølv på ioneform. Til slutt analyseres prøven ved bruk av CVAAS (kalddamp atomspektroskopi).

Ekstraksjonen er nødvendig for å skille metylkvikksølv fra kvikksølv på uorganisk form (Kosanovic & Jokanovic 2011). Det er kun forekomst av metylkvikksølv som skal bestemmes. Tilstedeværelsen av andre organiske kvikksølvforbindelser antas å være så liten at den ikke tas hensyn til.

Hårprøvene tilsettes HBr (hydrogenbromidsyre) som binder seg til kvikksølv. Både metylkvikksølv og kvikksølv på ioneform binder seg til  $\text{Br}^-$ . Begge tilstandsformene trekkes derfor ut av hårprøven.

Ved ekstraksjon med toluen er det hydrofobe metylkvikksølv som går over i organisk fase (toluen). Det hydrofile HgBr blir i vannfase.

En løsning av metylkvikksølv i toluen kan ikke dekomponeres i UltraClave. Selv små mengder toluen vil medføre eksplosjonsfare under dekomponering. Metylkvikksølv må føres tilbake til vannfase.

Ved tilbakeekstraksjon med L-cystein bringes organisk kvikksølv tilbake i vannfase, men denne gangen som et kompleks med L-cystein.

### 2.14.2 Dekomponering med UltraClave

Dekomponering er nødvendig for å få prøven over på formen som lar seg analysere med den aktuelle analyseteknikken. Generelt sett skal prøven være så ren som mulig, uten andre stoffer som kan interferere med målingen eller reagere med analytten på uønskede måter. Analytten skal finnes på ioneform i løsningen. Man må unngå organisk materiale, da det kan sette seg fast i slanger og binde analytten.

Man dekomponerer med syrer. Salpetersyre er godt egnet, spesielt ved høye temperaturer, da er den et kraftig oksidasjonsmiddel.

Til oppvarming i UltraClave, brukes det mikrobølger. Mikrobølger er elektromagnetiske bølger med frekvens fra 1 til 300 GHz.

Prinsippet bak oppvarming med mikrobølger er at molekyler som er dipoler vil snu seg etter feltet de er omgitt av. Vannmolekyler er dipoler og vil snu seg etter feltet hver gang feltet snus. Når feltet så snus hurtig vil denne bevegelsen medføre varme fra friksjon. I UltraClaven er trykket og temperaturen høy, dermed blir vannmolekylene trykket flatere enn de er normalt, de er ikke like sterke dipoler og vil ikke utvikle like mye varme i et skiftende elektromagnetisk felt. Det tilsettes derfor ioner i form av syre til loaden som prøverørene står nedsenket i. Ionene vil bevege seg etter feltet og dermed skape friksjonsvarme. Det er vann og ioner i loaden som hovedsakelig bidrar til temperaturøkning i UltraClaven, ioner og vann i prøvene har mindre volum og bidrar i mindre grad. Det kan også tilsettes hydrogenperoksid ( $H_2O_2$ ) for å oksidere nitrøse gasser fra prøven. Disse nitrøse gassene ville ellers kunne interferere med analytten under analyse. Det påføres et trykk utenfor prøverørene, prøverørene har åpninger som gjør at man får samme trykk inni som utenfor. Dermed minsker risiko for eksplosjoner som følge av ulikt trykk inne i og utenfor prøverørene. Risiko for å miste prøve ved koking elimineres også, dermed oppnås bedre presisjon ved analysen. Trykket påføres for å kunne varme opp load og prøve til temperaturer langt over vanlig kokepunkt uten at det koker. Det er denne høye temperaturen som øker reaksjonshastigheten i dekomponeringen.

Prøver med mye organisk materiale varmes forsiktig, slik at det organiske materialet dekomponerer kontrollert. Oksidasjon av organisk materiale er eksotermt, så hvis den går for fort kan temperaturstigningen komme ut av kontroll. Det brukes gjerne fortynnet syre i prøven når den inneholder mye organisk materiale, dette er også for å redusere reaksjonshastigheten.

Utstyret brukes til sporanalyser, dermed må alt utstyr som kommer i kontakt med prøven være rent. Det benyttes prøverør i teflon i ultraklaven. Teflonrørene vaskes i syrebadd. Til fortynning brukes det gjerne 50 ml engangs sentrifugerør, dermed kan ikke prøven forurenses av tidligere prøver som har blitt fortynnet i samme rør.

Nødvendig renhet av kjemikalier er avhengig av hvilket nivå vi skal måle på. Ofte vil analysekvalitet (pro analysi) være tilstrekkelig. For enkelte sporanalyser må enda renere syrer benyttes, da kan det benyttes sub boiled ultrapure kvalitet.

Blindprøver benyttes for å undersøke renhet av kjemikalier og utstyr. Blindprøvene skal ikke inneholde noe av analytten, men alle andre kjemikalier som prøvene inneholder. De skal også ha gått gjennom samme opparbeidelse som prøvene. Dersom man får utslag for analytten på blindprøvene, så kan også prøvene ha høyere resultat for analytten enn det som var i den opprinnelige prøven. Hvis dette er en systematisk feil, kan man trekke fra resultatet fra blindprøven fra prøveresultatet. Dersom det er en tilfeldig feil, vil analysens presisjon bli dårligere.

Kvikksølv kan tas opp i teflonmaterialet som dekomponeringsrørene er laget av og avgis til senere prøver som oppsluttes i samme rør. Dette vil kunne gi opphav til en tilfeldig feil som vil gi dårligere presisjon i metoden. Alle dekomponeringsrørene som skal brukes i analysen testes derfor på forhånd. Dette gjøres ved at en dekomponering gjøres på ren  $\text{HNO}_3$ , prøveløsningen fortynnes etter dekomponering og analyseres på CVAAS. De rørene som gir høyt resultat på kvikksølv benyttes ikke ved analyse.

Prøven som skal dekomponeres inneholder metylkvikksølv kompleksbundet med L-cystein i en vannfase. Det vil også være små mengder av toluen i prøven da L-cystein fasen tas ut gjennom toluenfasen, men det bør være så lite at det ikke dannes nitroser gasser i nevneverdig grad. Det bør derfor ikke være nødvendig i tilsette  $\text{H}_2\text{O}_2$  direkte i prøven. Men muligheten for at det er toluen til stede gjør at det velges en langsom oppvarming ved dekomponeringen.

Etter dekomponering vil kvikksølv forekomme på formen  $\text{Hg}^{2+}$  i prøveløsningen.

Kvikksølv må konserveres i prøven, det vil si man må holde kvikksølv på ioneform. Dette kan gjøres ved å tilsette et sterkt oksidasjonsmiddel, som kaliumpermanganat,  $\text{KMnO}_4$  i prøven etter dekomponering (se reaksjonslikning 1).

Reaksjonslikning 1:  $2 \text{MnO}_4^-_{(\text{aq})} + 5 \text{Hg}_{(\text{aq})} + 16 \text{H}^+_{(\text{aq})} \Leftrightarrow 2 \text{Mn}^{2+}_{(\text{aq})} + 5 \text{Hg}^{2+}_{(\text{aq})} + 8 \text{H}_2\text{O}_{(\text{l})}$   
(Holler, 2007)

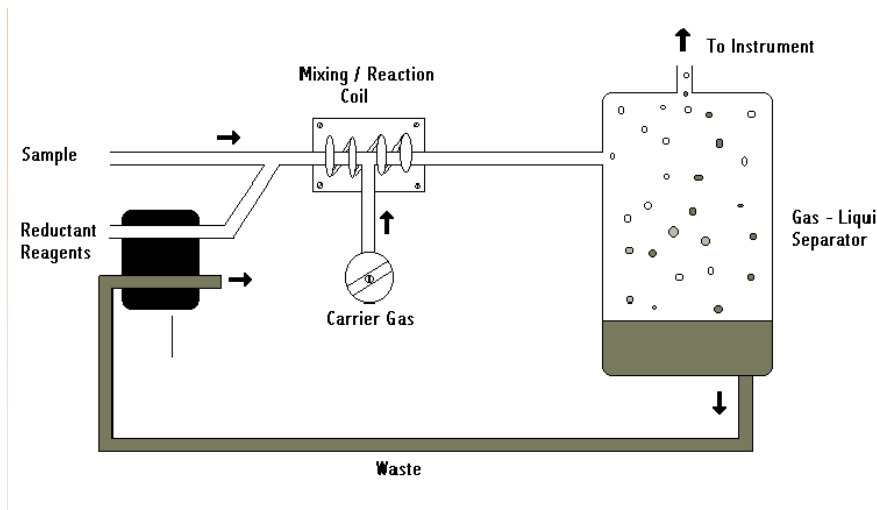
Innholdet av metylkvikksølv i hår antas normalt å være så lavt at prøveløsningen på 2,5 ml L-cysteinløsning og salpetersyre fortynnes til 10 ml etter dekomponering. I analysen benyttes det standarder fra 0,5 til 10  $\mu\text{g Hg/l}$ , samt standard blank. Ved fortynning til 10 ml gir dette et analyseområde for hårprøver fra LOQ til 3 mg MeHg / kg. Ved fortynning til 50 ml utvides dette området til hårprøver med et innhold av metylkvikksølv på opptil 15 mg/kg.

### 2.14.3 Analyse med CV-AAS

Kvikksølv bestemmelse med FIMS (Flow Injection Mercury System) baserer seg på kalddamp atomabsorpsjonsspektroskopi. Kvikksølv fordampes ved romtemperatur og trenger derfor ikke tilføres energi for å komme over på atomær form.

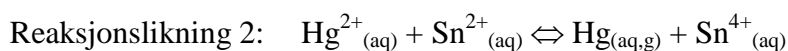
Atom absorpsjon spektroskopi går generelt ut på at et grunnstoff på atomær form blir gjennomlyst med et lys med kjent bølgelengde, for kvikksølv 235,7 nm. Man kan så måle transmisjon først uten prøve og så med prøve i prøvekommer. Dermed kan prøvens absorbans beregnes ved  $A = \log(T_0/T)$ . Sammenhengen mellom absorbans og konsentrasjon er gitt ved Beer-Lamberts lov.

FIMS systemet har en bæreløsning av saltsyre, som både frakter prøveløsningen til gass / væske separatoren og også vasker ut rester av prøveløsning i systemet mellom prøver.



Figur 7 Skjematisk tegning av et system for kalddampgererering av kvikksølv (Lohne 2009)

Ved kvikksølvanalyse med FIMS er kvikksølv på ioneform ( $\text{Hg}^{2+}$ ) i prøveløsningen. Prøveløsningen blir blandet med tinnkloridløsning i FIMS, og vil dermed bli redusert til  $\text{Hg}^0$  (gassfase) (se reaksjonslikning 2).



Det blir boblet argongass inn i prøveløsningen. Deretter går løsningen gjennom en gass / væskeseparator der argon fungerer som en bæregass for kvikksølv damp (se Figur 7). Denne gassblandingen blir så ført gjennom en kvartscelle for analyse.

Bestemmelse av presisjon og kvantifiseringsgrense for opprinnelig metode

Presisjonen i opprinnelig metode ble bestemt ved å analysere 10 paralleller av samme hårprøve. Kvantifiseringsgrense ble testet med 6 paralleller av blindprøve. Hensikten var å ha et sammenligningsgrunnlag for presisjon og kvantifiseringsgrense for modifisert metode.

## 3 Eksperimentelt

### 3.1 Utstyr og kjemikalier

En oversikt over utstyr og kjemikalier brukt under opparbeidelse og analyse av prøver er gitt i Tabell 1 og Tabell 2.

Tabell 1 Utstyr brukt i opparbeidelse og analyse

Utstyr	Spesifikasjon	Produsent
B-pure vannrenseanlegg	-	Barnstead
UltraClave 3	-	Milestone
Posisjonskarusell med 40 plasser	-	Milestone
Teflonrør	18 ml	Milestone
FIAS 400, med FIMS	-	Perkin Elmer
Autosampler AS 90	-	Perkin Elmer
Analysevekt	4 desimaler	Sartorius
Toppvekt	3 desimaler	Sartorius
Vertikalt ristebrett SM 30	-	Edmund Bühler
Sentrifuge Labfuge M	-	Heraeus
Elektronisk pipette	10-300 µl, 50-1000 µl, 100-5000 µl	Biohit
Målekolber i glass, 50 ml	klasse A	Brand
Målekolbe i glass, 250 ml	klasse A	Hirschmann
Målekolber i glass, 1000 ml	klasse A	Schott
Sentrifugerør (polypropylen)	15 ml, 50 ml	Sarstedt
Ark til dekking av bord	-	-
Dispenser	1-25 ml, 1-5 ml, 0,1-1,0 ml	Fortuna Optifix

Tabell 2 Kjemikalier og standarder brukt i opparbeiding og analyse.

Kjemikalie	Formel	Konsentrasjon	Kvalitet	Produsent
Toluen	$C_6H_5CH_3$	92 mol / l	Pro analysi	Merck
L-cysteinhydrokloridmonohydrat	$C_3H_8ClNO_2S \cdot H_2O$	Fast stoff	For biokjemi	Merck
Natriumsulfat	$Na_2SO_4$	Fast stoff	Pro analysi	Merck
Natriumacetat	$CH_3COONa$	Fast stoff	Pro analysi	Merck
Hydrogenbromidsyre	HBr	47 % (V/V)	Pro analysi	Merck
Salpetersyre	$HNO_3$	65 % (V/V)	Subboiled ultrapure *	UMB
Saltsyre	HCl	37 % (V/V)	Subboiled ultrapure *	UMB
Svovelsyre	$H_2SO_4$	96 % (V/V)	Pro analysi	Merck
Hydrogenperoksid	$H_2O_2$	30 % (V/V)	Pro analysi	Merck
Hydrogenperoksid	$H_2O_2$	30 % (V/V)	Teknisk	Merck
Kaliumpermanganat	$KMNO_4$	5 % (w/V)	Pro analysi	Merck
Tinn(II)klorid-dihydrat	$SnCl_2$	Fast stoff	For analyse	Merck
Argongass	Ar	-	5,0	Yara
Nitrogengass	$N_2$	-	2,0	AGA
Metylkvikksølvstandard	$CH_3Hg$	880 mg / l**	Analytisk kvalitet	Laget av metylkvikksølvklorid fra Sigma-Aldrich
Kvikksølvstandard	Hg	1000 ± 3 mg / l	99,9999 % ren	Spectrapure Standards
Ionebyttet vann	$H_2O$	100 %	18 Mohm / cm	B-pure vannrenseanlegg
Triton X-100	$C_{14}H_{22}O(C_2H_4O)_n$	-	-	Sigma-Aldrich

Destillert ved UMB av pro analysi syrer fra Merck

\*\* Laget som 1000 mg / l i 2009, analysert og bestemt til 880 mg / l i 2012.

### 3.2 Forbehandling og vask av hårprøver.

Hårprøvene ble vasket med en 1 % (V/V) triton X-100 løsning, ved at røret, med hår og omtrent 5 ml triton X løsning ble ristet i 20 sekunder. Prøvene ble så skylt minst 3 ganger med ionebyttet vann. Rørene ble så satt i varmeskap ved 60 °C uten lokk for to dager for å tørke hårprøvene. Etter tørking ble hårprøvene klippet i små biter med lengde 5 - 10 mm,

homogenisert, og plassert i et 50 ml sentrifugerør. De prøvene det var lite av, ble ikke klippet opp og homogenisert, da dette medførte tap av noe prøvemateriale. Prøvene ble deretter lagret mørkt ved 4 °C frem til analyse.

### 3.3 Ekstraksjon

Det ble veid inn omtrent 0,1 g hårprøve nøyaktig med analysevekt i et 50 ml sentrifugerør. Prøvene ble tilsatt 10 ml 47 % HBr med dispenser og ble ristet på ristemaskin i 10 minutter. Deretter ble det tilsatt 25 ml toluen med dispenser og prøvene ble ristet på ristemaskin i 20 minutter.

Det ble tatt ut 20 ml toluen av prøverørene med 1-5 ml automatpipette til et nytt 50 ml i polypropylenrør og til dette røret ble det tilsatt 6 ml 1 % L-cysteinløsning med 1-5 ml automatpipette. Prøvene ble så ristet i 20 minutter på ristemaskin.

5,8 ml L-cysteinløsningen ble så overført fra prøverøret med 1-5 ml automatpipette til et 15 ml polypropylenrør. Det ble tatt ut litt mindre L-cysteinløsning enn det ble tilsatt, for å sikre at så lite toluen som mulig blir med L-cystein fasen under overføringen.

I den opprinnelige metoden (Mohanathas 2010) ble det på nytt tilsatt 6.0 ml 1 % L-cysteinløsning til toluen, røret ble ristet og det ble overført 5,8 ml L-cystein til 15 ml røret. Det ble også utført en sentrifugering etter hver risting.

All risting på ristemaskin ble utført horisontalt med 300 bevegelser /minutt.

Da den største tilgjengelige automatpipetten på laboratoriet var 5,0 ml, ble uttaket av toluen utført som 4 x 5,0 ml. Tilsvarende ble L-cysteinløsningen tilsatt som 2 x 3,0 ml og uttaket av L-cysteinløsningen var 2 x 2,90 ml.

Selve oppslutningen og analysen ble utført påfølgende dag.

Dekomponering av prøver ved bruk av mikrobølgeteknikk

2,5 ml av L-cysteinløsningen ble tatt ut til dekomponering ved å overføre løsningen med automatpipette til et teflonrør. Løsningen ble så tilsatt 1,0 ml eller 5,0 ml HNO<sub>3</sub>, avhengig av om prøven etter oppslutning skulle fortynnes til 10,0 ml eller 50,0 ml. Fortynningen vil avhenge av konsentrasjonen av metylkvikksølv i hårprøven.

Teflonrørene med prøver, blank og referanseprøver ble satt inn i Milestone UltraClave 3 (heretter kalt UltraClave), og oppsluttet etter metode for prøver med organisk materiale, da



det kan være små rester av toluen i prøven. Metoden gir oppvarming av prøven til 50 °C, så holdes temperaturen i 10 minutter, deretter varmes prøven til 110 °C som holdes i 10 minutter, før videre oppvarming til 250 °C. Se vedlegg nr 5 for temperaturprofil. Årsaken til at det tas pauser i oppvarmingen er at dekomponeringen av organisk materiale er eksoterme reaksjoner. Ved hurtig oppvarming er det risiko for at temperaturstigningen kommer ut av kontroll. Ved å legge inn pauser i oppvarmingen kan energien fra varmeutviklingen i de eksoterme reaksjonene overføres til loaden og materialene i UltraClaven.

Prøvene ble overført til 15 ml eller 50 ml polypropylenrør og ble tilsatt en dråpe 5 % (V/V)  $\text{KMnO}_4$ , som er et kraftig oksidasjonsmiddel (ved fortykning av prøven til 10 ml ble 5 % (V/V)  $\text{KMnO}_4$  løsningen fortyknet til 1 % (V/V)). Det vil bidra at kvikksølv ikke reduseres til  $\text{Hg} (g)$ , dermed blir kvikksølv stabilt i løsningen som  $\text{Hg}^{2+}$ . Deretter ble prøvene fortyknet til ønsket volum, 10 ml eller 50 ml med ionebyttet vann.

### 3.4 Analyse ved bruk av CV-AAS

Standarder og prøver ble plassert i prøveveksler, det ble satt i standarder for kontroll av drift, vaskeløsning (standard 0) etter høyeste standard og sertifisert referansemateriale DORM-3 og IAEA-086.

Analysemetoden inneholdt parametre som vist i Tabell 3.

Tabell 3 Parametre ved MeHg bestemmelse på FIAS 400 med FIMS.

Bølgelengde	253,7 nm
Dataopptagningsmåte	Peak height
Pumpehastighet, pumpe 1	100
Pumpehastighet, pumpe 2	120
Glatting	9 pts
Prøvevolum	500 $\mu\text{l}$
Replikater	3

Rådata og resultater ble overført til en Excel fil. Videre beregning av resultater ble utført i Excel.

### 3.5 Innledende kontroll av presisjon

10 paralleller av hårprøve 2 ble analysert sammen med 6 blank prøver. Prøvene ble sentrifugert etter hver risting og det ble brukt dobbel tilbakeekstraksjon.

### 3.6 Modifisering av metode

Sentrifugering og enkel tilbakeekstraksjon med L-cystein

Det ble laget 4 sett av 5 prøver fra hårprøve 33, samt 3 blanke for hvert sett se Tabell 4.

**Tabell 4 Oversikt over ulik behandling av prøvesett for test av nødvendighet av sentrifugering og dobbel tilbakeekstraksjon**

	Sentrifugering	Tilbakeekstraksjon
Sett 1	Ja	Dobbel
Sett 2	Ja	Enkel
Sett 3	Nei	Dobbel
Sett 3	Nei	Enkel

Prøvene som ikke ble sentrifugert sto en stund på benken før videre behandling.

Dette var ikke et planlagt valg, men en nødvendighet fordi sentrifugen bare rommer 8 rør. Dermed måtte sentrifugeringen foregå i to omganger. Videre opparbeiding for hvert trinn startet med prøvene som ikke ble sentrifugert, mens det andre settet var til sentrifugering. Prøvene som ikke ble sentrifugert sto altså like lenge på benken som den tiden det tok å sentrifugere ett sett med prøver.

### **3.7 Nøyaktighet og presisjon med modifisert metode**

Seks prøver med CRM (sertifisert referansemateriale) for hår (IAEA-086)(International Atomic Energy Agency 2000), samt 6 prøver med hårprøve 34 ble analysert. I tillegg ble 6 prøver med hårprøve 34 tilsatt en kjent mengde metylkvikksølvstandard (spiket). Grunnen til at det ble analysert spikede prøver var at CRM inneholder lav konsentrasjon av MeHg. Det var ønskelig å undersøke om enkel tilbakeekstraksjonen er tilstrekkelig også ved høyere konsentrasjon av MeHg. Spiking ble utført i toluenfasen. Spiking i dette stadiet ble valgt fordi forandringene i metoden, altså fravær av sentrifugering og tilbakeekstraksjonen, hovedsaklig er gjort etter dette trinnet. Spiking ble utført ved å tilsette 0,20 ml av en 5 mg/l MeHg standard. Denne var fortynnet fra en 1000 mg Hg/l MeHg standard. Standarden er laget ved UMB (Glomstad 2010). Da standarden hadde stått lagret i kjøleskap i 3 år, ble det også opparbeidet og analysert en prøve av ren spikestandard, som besto av 0,1 ml 5 mg / l MeHg. Denne ble analysert for å finne reelt tilsatt mengde MeHg.

Da de spikede prøvene ble fortynnet til 50 ml og resten av prøvene ble fortynnet til 10 ml, ble det opparbeidet 3 blindprøver for fortynning til 10 ml og 3 blindprøver for fortynning til 50 ml. Blindprøvene for fortynning til 50 ml måtte kastes da det oppsto nitrøse gasser i to av dem. Det ble også oppsluttet en prøve med CRM Dorm 3 for kontroll av standardkurven.

### 3.8 Deteksjons og kvantifiseringsgrense for modifisert metode

LOD / LOQ ble undersøkt ved å analysere 6 blindprøver fortynnet til 10 ml, og 6 blindprøver fortynnet til 50 ml. Blindprøvene gjennomgikk hele ekstraksjons prosedyren, og oppløsning i UltraClave. Blindprøvene ble analysert på CVAAS sammen med andre prøver.

### 3.9 Holdbarhet av metylkvikksølv i L-cysteinløsning

Stabiliteten til kvikksølv i L-cystein ble bestemt ved å analysere 4 prøver, 1 prøve av sertifisert referansemateriale IAEA-086, 2 av hårprøver og L-cystein tilsatt 0,25 ml 400 µg / l metylkvikksølvstandard til 9,75 ml L-cysteinløsning, i tillegg til L-cystein løsning uten tilsetning av standard. Dekomponering og analyse av prøvene ble utført etter et tidsintervall som strakk seg fra 1 døgn (17 timer) til 20 døgn etter ekstraksjon.

Det ble analysert 5 paralleller av hver hårprøve, 3 paralleller av L-cystein tilsatt standard. For CRM IAEA-086 (International Atomic Energy Agency 2000) ble det bare analysert paralleller etter et døgns lagring av L-cystein, det vil si dekomponering og analyse dagen etter ekstraksjoner. Da prøvene av L-cystein tilsatt metylkvikksølvstandard ikke måtte ekstraheres, kunne dekomponeringen av disse prøvene starte bare 20 minutter etter tilsetningen av metylkvikksølvstandard.

Da metylkvikksølvstandard ikke var sertifisert, og dessuten laget i 2009, ble det opparbeidet en prøve denne. Dette for å bestemme hvilken konsentrasjon av metylkvikksølv denne standarden hadde på analysetidspunktet.. Dette ble gjort ved å tilsette litt vann til et teflonrør, pipettere 0,250 ml av 400 µg MeHg / l standarden og tilsette 1,0 ml HNO<sub>3</sub> med dispenser. Standardprøven ble så dekomponert på UltraClaven, fortynnet til 10 ml og analysert.

Metylkvikksølv er meget giftig og toluen er helseskadelig. Ved alt arbeid med toluen og metylkvikksølv standard, ble det benyttet engangshansker av nitrilgummi. Alt arbeid ble utført i avtrekkskap hvis mulig.

### 3.10 Analyse av hårprøver

Hårprøvene ble analysert både med hensyn på å bestemme metylkvikksølvinnhold og med hensyn på å bestemme totalt kvikksølvinnhold.

Analysen for bestemmelse av innhold av metylkvikksølv i hårprøvene fulgte modifisert metode. Det ble benyttet CRM DORM 3 (National Research Council Canada 2008) for å kontrollere kalibreringskurve, og CRM IAEA-086 (International Atomic Energy Agency

2000) for å kontrollere nøyaktigheten av hele analysen.

Analyse av total kvikksølv ble utført ved at omtrent 0,1 g av hårprøven ble veid direkte i et teflonrør. Prøvene ble så tilsatt 5 ml HNO<sub>3</sub> og 2 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> og dekomponert i UltraClave.

Prøvene ble tilsatt 1 dråpe 5 % (V/V) KMnO<sub>4</sub> og fortynnet til 50 ml før analyse.

Prøve 1-12 ble ekstrahert fredag og dekomponert og analysert mandag.

Prøve 13-35 ble ekstrahert mandag og dekomponert og analysert tirsdag.

Prøve 36-38 stod lagret i 10 dager mellom ekstraksjoner og dekomponering.

## 4 Resultater og diskusjon

Selve analysene på FIMS 400 ble utført med en standardkurve med konsentrasjoner fra 0,5 µg Hg / l til 10 µg Hg / l. CRM IAEA-086 gav i prøveløsning et resultat på rundt 1 µg Hg / l.

Analysen gir avlesninger over LOQ på blankprøver (0,40-0,46 mg MeHg / l) fordi L-cysteinløsningen er forurenset med MeHg. Feilen er systematisk, derfor er alle analyseresultater der prøven ble ekstrahert med L-cystein korrigert for blindprøve. L-cystein hydroklorid monohydrat fra Merck ble benyttet. I tidligere arbeid er L-cystein hydroklorid monohydrat fra Sigma undersøkt, men dette gav ikke lavere blindverdier. (Glomstad 2010; Mohanathas 2010)

### 4.1 Forbehandling og vask av hårprøver

Ved prøveuttak bør det ikke tas ut mer enn 2 g hårprøve til hvert sentrifugerør. Mer prøve gjør vasking av prøven vanskelig. Triton-x skummer veldig mye, så første skylling blir nærmest en ny vask, bare med lavere konsentrasjon. Det ble på de aller fleste prøvene skylt mer enn tre ganger.

Dersom hårprøvene klippes opp og homogeniseres før vasking, vil mye av prøvematerialet (håret) bli mistet under vask og skylling, dersom det er lite hår tilgjengelig kan dette medføre av man siter igjen med for lite prøvemateriale for analyse. Det er derfor bedre å vaske håret først og klippe og homogenisere etterpå.

Bestemmelse av presisjon og bestemmelsesgrense for opprinnelig metode

Resultat på bestemmelse av presisjon for opprinnelig metode er presentert i Tabell 5. Resultat for blindprøver for bestemmelse av LOD/LOQ er gjengitt i Tabell 6.

Tabell 5 Presisjon for opprinnelig metode uttrykt ve standardavvik og relativt standardavvik.

Det ble analysert 10 paralleller av hårprøver.

	Resultat (mg MeHg / kg)	Standardavvik (mg MeHg / kg)	Relativt standardavvik (%)
Hårprøve 32	0,51	0,012	2,4

Relativt standardavvik på 2,4 % gir akseptabel presisjon for metoden.

Tabell 6 Bestemmelse av LOD og LOQ for analysen, basert på 6 blindprøver, Blindprøvene har gjennomgått samme ekstraksjoner og dekomponering som hårprøvene. Beregning av

konsentrasjon av metylkvikksølv i hår, er gjort med en tenkt prøvemengde på 0,1 g hår, fortynning til 10 ml. LOD er satt til 3 x standard avvik for blank. LOQ er satt til 10 x standard avvik for blank.

Standardavvik (mg MeHg / kg)	LOD (mg MeHg / kg)	LOQ (mg MeHg / kg)
0,005	0,016	0,052

LOD og LOQ for opprinnelig metode er tidligere funnet til henholdsvis 0,027 og 0,090 mg/kg for fortynning til 10 ml (Mohanathas 2010). LOD og LOQ ble nå funnet til 0,016 og 0,052 mg/kg, altså i samme størrelsesorden, men noe lavere. Dette er antagelig et resultat av at teflonrørene ble kontrollert før analyse, slik at rør som ga utslag på kvikksølv ved analyse etter dekomponering med kun HNO<sub>3</sub> kunne fjernes. Presisjon uttrykt som relativt standard avvik er tidligere bestemt til 9 % (Mohanathas 2010). Ved denne analysen ble relativt standard avvik funnet til 2,4 %. Årsaken til lavere standard avvik kan være at forurensede teflonrør ikke ble benyttet for analyse. Kvikksølv kan tas opp fra prøven til teflonrør. Da alle CRM prøver var innenfor sertifisert område, antas tap av analytt til teflonrør å være minimalt.

## 4.2 Modifisering av metoden.

### 4.2.1 Sentrifugering og enkel tilbakeekstraksjon med L-cystein.

Hensikten var å forenkle metoden uten å forringe analysekvaliteten, opprinnelig metode er laget for både hår, fisk, blod, urin og sediment, modifisert metode er bare for hår. Det ble antatt at det var mulig å utelate sentrifugeringer, da det ikke finnes partikler som må fjernes i prøvene. Tidligere metodeutvikling hadde fjernet dobbel ekstraksjon med toluen (Glomstad 2010). Det var ønskelig å undersøke om det på samme måte var tilstrekkelig med en enkel tilbakeekstraksjon for å overføre all metylkvikksølv fra toluen til kompleksbundet form i L-cysteinløsning.

Nødvendighet av sentrifugering mellom hver ekstraksjon og nødvendigheten av dobbel tilbakeekstraksjon ble undersøkt med 4 sett prøver med 5 paralleller i hvert sett. Resultater for hvert sett av prøver er presentert i Tabell 7.

**Tabell 7 Resultater for ulike prosedyrer for ekstraksjon av MeHg fra hårprøver**

	Resultat hårprøve (mg MeHg / kg)	Standardavvik (mg MeHg / kg)
Sentrifugering og dobbel tilbakeekstraksjon	0,27	0,007
Sentrifugering og enkel tilbakeekstraksjon	0,27	0,010
Dobbel tilbakeekstraksjon uten sentrifugering	0,28	0,011
Enkel tilbakeekstraksjon uten sentrifugering	0,26	0,012

Variansanalyse (Vedlegg 6) viser ingen signifikant forskjell på de fire resultatene. Da den modifiserte metoden er arbeidsbesparende og gir mulighet for å opparbeide flere prøver samtidig, ble den benyttet i påfølgende analyser.

Det var noe mindre standardavvik i prøvesettet med sentrifugering og dobbel tilbakeekstraksjon, men forskjellen er kun synlig i tredje desimal. Senere analyser med modifisert metode på sertifisert referansemateriale ga enda lavere standardavvik. Det antas dermed at opprinnelig metode og modifisert metode er likeverdige for hår.

### 4.3 Bestemmelse av nøyaktighet og presisjon for modifisert metode

Nøyaktighet i modifisert metode ble bestemt ved analyse av 6 paralleller CRM IAEA-086, presisjon ble bestemt ved analyse av 6 paralleller av hårprøve 34, se Tabell 8.

Konsentrasjonen av metylkvikksølv i CRM IAEA-086 er lav, for å avgjøre om ekstraksjonene overfører all metylkvikksølv også ved høyere konsentrasjoner, ble det analysert seks paralleller med en spiket hårprøve (hårprøve med tilsatt kjent mengde standard), se Tabell 9. Som referanse ble hårprøven også analysert uten tilsetning av metylkvikksølv.

**Tabell 8 Resultater for analyse av CRM IAEA-086.**

	Resultat hårprøve (mg MeHg / kg)	Standardavvik (mg MeHg / kg)	Sertifisert område (mg MeHg / kg)
CRM IAEA-086	0,249	0,001	0,236 – 0,279
Hårprøve 34	0,12	0,01	-

Resultatet for CRM IAEA-086 er innenfor sertifisert område. Modifisert metode gir dermed god nøyaktighet i lavt konsentrasjonsområde. Relativt standardavvik er på 0,4. Standardavvik

for 6 hårprøver ble bestemt til 0,01mg MeHg / kg. Dette gav et relativt standard avvik på 8 %, som er tilnærmet det samme som tidligere er funnet for opprinnelig metode.

Det ble analysert en prøve av CRM IAEA-086 sammen med prøvene hver analysedag, alle resultatene var innenfor sertifisert område. Det ble også analysert CRM DORM 3 som en kontroll av standardkurve hver dag og den ga også resultater innenfor sertifisert område CRM prøven hadde lav konsentrasjon av metylkvikksølv, det hadde også de prøven som ble brukt til bestemmelse av presisjon, derfor er nøyaktighet og presisjon kun bestemt ved lav konsentrasjon og ved fortykning til 10 ml etter dekomponering. Presisjon kunne vært utført på en prøve med høy konsentrasjon, med de få prøvene som hadde høy konsentrasjon var det for lite prøvemateriale av. Imidlertid er gjenfinningen i spikede prøver god (se kapittel 4.4), som tyder på god nøyaktighet også for høyere konsentrasjoner.

For opprinnelig metode ble relativt standardavvik funnet til 2,4 %, for en prøve med 0,5 mg MeHg/kg, denne hårprøven var i sin helhet tatt i en lengde under 1 cm fra hodebunnen, prøven var derfor antagelig ganske homogen med hensyn på kvikksølvinnhold, det var også rikelig mengde, dermed var prøven lett å homogenisere. For modifisert metode ble relativt standardavvik funnet til 8 % for en prøve med 0,12 mg MeHg /kg. Ved analyse av CRM var standard avvik 0,4 %. Dette kan tyde på at presisjonen kan forbedres ved bedre homogenisering av hårprøvene.

CRM, standarder og blindprøver gir variasjon i tredje desimal. Da resultatene for det meste er under et mg MeHg / kg tilsvarer det tre gjeldende siffer i resultatene. På hårprøver som har blitt homogenisert manuelt, er det kun i to analyser som gir grunnlag for å benytte tre gjeldende siffer, resten av analysene gir to desimaler. Analyseresultater på hårprøver er derfor oppgitt med to desimaler, noe som for de fleste prøvene betyr to gjeldende siffer.

Denne reduserte presisjonen for reelle hårprøver kan skyldes at den manuelle homogeniseringen av hårprøvene ikke var god nok.

Standardavviket for CRM er bedre enn for de fleste blindprøvene, dette tyder på at standardavviket funnet ved analysen av CRM er så lav som metoden i sin nåværende form kan prestere.

#### **4.4 Bestemmelse av nøyaktighet i høyere måleområde**

Kalibreringskurven for analysen går fra 0 til 10  $\mu\text{g hg} / \text{l}$ . CRM IAEA-086 og prøven som ble brukt til å bestemme presisjon gir resultater i den nedre delen av denne kurven. Det var også



ønskelig å bestemme nøyaktighet i øvre del av metodens konsentrasjonsområde. En prøve ble tilsatt metylkvikksølv standard og fortynnet til 50 ml.

Standarden som ble benyttet til spiking var ikke en sertifisert standard, den ble laget i 2009 ved å veie inn og løse 108,680 mg CH<sub>3</sub>HgCl i 85,86 g vann tilsatt 0,8 ml HCl (37 % (w/w)). Dette gav en konsentrasjon på 1000 mg Hg / l, eller 1080 mg MeHg / l. Konsentrasjonen av metylkvikksølv i standarden ble etter tre års lagring bestemt til 880 mg / l ved analyse. Tilsatt standard var fortynnet og inneholdt 4,40 mg MeHg / l.

Konsentrasjon i prøveløsning fortynnet til 50 ml var 5,3 µg Hg / l, dette tilsvarer en konsentrasjon i en tenkt 0,1 g hårprøve på omtrent 8 mg MeHg / kg. Altså i den øvre halvdelen av metodens konsentrasjonsområde.

Analyse av spiket prøve ga et resultat vist i Tabell 9. Dermed ble så og si all metylkvikksølv overført fra toluen til L-cysteinløsning ved enkel ekstraksjon. Relativt standardavvik var 0,4 %.

Tabell 9 Gjenfinning av MeHg innhold i prøve tilsatt 0,200 ml 4,40 ml / l MeHg standard.

	Resultat (µg MeHg)	Standardavvik (µg MeHg)	Tilsatt mengde MeHg (µg)	Gjenfinning av MeHg (%)
Spiket prøve	0,846	0,003	0,880	96

Gjenfinningen av standarden var på 96 %. Til sammenligning er resultatet på CRM 97 % av referanseverdi. Dermed ser det ut til at nøyaktigheten er god også for høyere konsentrasjoner. Spiking med metylkvikksølv i HBr ble ikke forsøkt, da tidligere forsøk med spiking i blindprøver har vist at dette kan gi en gjenfinning ned mot 20 %. (Glomstad 2010) Spikede prøver hadde ikke blindprøve da det oppstod nitrøse gasser i to av de tre blindprøvene som skulle fortynnes til 50 ml. Alle tre blindprøvene ble derfor kastet. Blindprøver for 10 ml fortynning ble analysert. Resultat for blindprøver for 50 ml fortynning ble beregnet til 1/5 av resultatet for blindprøver fortynnet til 10 ml. Det ble antatt at all forurensning av metylkvikksølv i prøven kommer fra L-cystein, dermed vil en fortynningsfaktor på 5 medføre et resultat på 1/5. Dette ble undersøkt ved bestemmelse av LOD/LOQ på blindprøver med både 10 ml og 50 ml fortynning, og det var riktig at blindprøver fortynnet til 50 ml hadde et nivå av metylkvikksølv som var 1/5 av nivået til blindprøver som var fortynnet til 10 ml.

Det ble kontrollert om alt MeHg ble overført fra toluen til L-cystein med enkel tilbakeekstraksjon. Dette ble gjort ved direkte sammenlikning, ved analyse av CRM og ved

analyse av spiket prøve. Alle disse kontrollene tyder på god nøyaktighet for modifisert metode.

#### 4.5 LOD LOQ for modifisert metode

LOD / LOQ for modifisert metode er vist i Tabell 10 for fortynning til 10 ml og 50 ml.

Tabell 10 Bestemmelse av LOD og LOQ for modifisert metode, basert på 6 blindprøver, Beregning av konsentrasjon av metylkvikksølv i hår er gjort med en tenkt prøvemengde på 0,1 g hår, fortynning til 10 og 50 ml.

Fortynning (ml)	Standardavvik (mg MeHg / kg)	LOD (mg MeHg / kg)	LOQ (mg MeHg / kg)
10	0,00145	0,004	0,015
50	0,0032	0,010	0,032

LOD og LOQ for modifisert metode ble funnet til 0,004 og 0,015 mg/kg, for fortynning til 10 ml. Dette er betydelig lavere enn for opprinnelig metode. Årsaken kan være at færre trinn i ekstraksjonen gir færre muligheter for avvik og at forurensede teflonrør fjernes før analyse. Det er 100 ganger lavere enn deteksjonsgrensen på 0,4 mg / kg oppgitt i teori for total kvikksølv (Schoeman et al. 2010). Dette kan delvis skyldes oppkonsentrasjon av kvikksølv under ekstraksjon, eller ulik innvekt av prøver, men deteksjonsgrensen for total kvikksølv ble i denne oppgaven funnet til 0,01mg / kg, riktignok bare basert på 3 paralleller. Allikevel kan det se ut som den oppgitte deteksjonsgrensen hos Schoeman er for høy. Det bør nevnes at standardavviket for blindprøver varierte fra dag til dag i intervallet 0,0014 til 0,012 mg / kg og analysen som ga LOD og LOQ var blant de med lavest standardavvik. Ved denne analysen var det 6 paralleller av blindprøven, på de andre dagene var det 3 paralleller av blindprøven. I utgangspunktet vil prøvene ved lave konsentrasjoner bli fortynnet til 10 ml, det synes derfor unødvendig å bestemme LOD /LOQ for prøver fortynnet til 50 ml. I tilfeller der man ikke har grunnlag for å vurdere om innholdet av metylkvikksølv er høyt eller lavt før analyse, eller dersom man antar at prøver har stor variasjon i konsentrasjon av metylkvikksølv, kan det være arbeidsbesparende å fortynne alle prøver til 50 ml.

Fortynning til 50 ml gir omtrent dobbelt så høy LOD og LOQ som fortynning til 10 ml, LOQ for 50 ml fortynning ble funnet til 0,032 mg MeHg / kg. Tre av hårprøvene som ble analysert var fra personer som er veganere, altså mennesker som ikke spiser animalske produkter. Disse hadde et innhold av metylkvikksølv i håret som lå rundt og under LOQ. Unntatt de tre veganerene var den laveste konsentrasjonen som ble funnet i dette forsøket 0,085 mg MeHg / kg. Dermed ville fortynning til 50 ml gitt god nok LOQ for hårprøvene analysert i dette forsøket, med unntak av veganerene. Dette kan være nyttig dersom det skal analyseres prøver

der man ikke vet om man har høyt eller lavt nivå av metylkvikksølv, eller om man mistenker høyt nivå. Ved å fortynne alle prøver til 50 ml vil LOQ fremdeles være tilstrekkelig lav, og man utvider måleområdet med en faktor på 5 i forhold til fortynning til 10 ml.

Resultater fra 10 og 50 ml fortynninger av blindprøver tyder også på at det var fra L-cysteinløsningen MeHg forurensningen kom fra. Analyse av L-cysteinløsning som bare ble dekomponert og analysert ga samme resultat som blindprøver som fulgte hele ekstraksjonsprosessen, dette tyder også på at forurensningen kom fra L-cysteinløsningen.

Det ble hovedsakelig benyttet samme boks med L-cystein for alle analyser. Nivået i blindprøver varierte, fra 0,40 til 0,46  $\mu\text{g Hg} / \text{l}$ . For en analyse ble en annen boks med L-cystein brukt. Da ble nivået på blindprøven 0,1  $\mu\text{g Hg} / \text{l}$ . Det at nivået forandret seg ved bruk av en annen boks L-cystein tyder på at det er fra L-cystein forurensningen av MeHg kommer. I tillegg har paralleller av blindprøver lavt standardavvik, dermed konkluderes det med at feilen er systematisk og at forurensningen kommer fra L-cysteinløsningen. Dermed kan blindverdier trekkes fra resultatet målt på prøvene.

Modifisert metode gir lavere kontaminering i blindprøver, beregnet på grunnlag av en gjennomsnittlig innvekt på 0,1 g hår, enn den opprinnelige metoden. Dette er fordi i modifisert metode brukes 6 ml L-cystein istedenfor 12 ml L-cystein. Beregnet konsentrasjonen i hårprøve blir derfor den halve i forhold til analyseløsning, sammenlignet med opprinnelig metode.

#### 4.6 Holdbarhet av metylkvikksølv i L-cysteinløsning

Resultater for bestemmelse av metylkvikksølv i L-cysteinprøver som var lagret mørkt i 20 °C, er presentert i Tabell 11 og Tabell 12.

Tabell 11 Resultat av metylkvikksølv etter 1, 3, 10 og 17 døgns lagring av L-cysteinløsningen. Hårprøve E-3 er tidligere analysert med opprinnelig metode, den er nå kun brukt for å bestemme holdbarhet av MeHg i L-cystein.

	Analyseresultat etter 1 døgn (mg MeHg / kg)	Analyseresultat etter 3 døgn (mg MeHg / kg)	Analyseresultat etter 10 døgn (mg MeHg / kg)	Analyseresultat etter 17 døgn (mg MeHg / kg)
CRM	0,25	0,25*	0,25	-
Hårprøve E-3	0,55	-	0,57	0,58

\*Kun en parallell analysert

Tabell 12 Resultat av metylkvikksølv etter 0, 14 og 20 døgns lagring av L-cysteinløsningen.

Spiket prøve 3 paralleller	Analyseresultat etter 0 døgn (mg MeHg / kg)	Analyseresultat etter 14 døgn (mg MeHg / kg)	Analyseresultat etter 20 døgn (mg MeHg / kg)
Gjennomsnitt	2,20	2,29	2,29
standardavvik	0,03	0,02	0,03

Analysen går over to dager, der ekstraksjoner gjøres på dag en og dekomponering og selve analysen gjøres på dag to. Dermed må L-cysteinløsningen med analytt, stå lagret i nesten et døgn før analyse. Dette gjør at det er ønskelig å undersøke om metylkvikksølv er stabilt i L-cysteinløsningen. Selv om man alltid skal analysere en prøve så raskt som mulig kan det oppstå situasjoner der L-cysteinløsningen må lagres lenger. Det kan for eksempel være ønskelig å ekstrahere prøvene på fredag, for å så dekomponere og analysere på mandag. Sykdom kan gjøre at prøvene ikke kan analyseres som planlagt og må vente noen dager.

Forsøket ble utført ved å analysere uttak av ferdig ekstrahert prøve etter ulike lagringstider. Ved en ekstraksjon av en hårprøve får en 5,8 ml L-cysteinløsning, et uttak til dekomponering er på 2,5 ml. Dermed får en bare gjort to analyser av samme L-cysteinløsning. For å få flere enn to tidspunkter, måtte flere separate uttak av samme hårprøve gjøres.

Ved tillagning av L-cysteinløsning med tilsetning av metylkvikksølvstandard ble det laget 10 ml. Dette skulle teoretisk holde til 4 prøveuttak, men i praksis ble det bare gjort 3, da det er en risiko for ikke å ha nok løsning til et fjerde uttak.

Hårprøve E-3 kan se ut til å ha en noe økende tendens, det samme gjelder L-cystein tilsatt standard, men variasjonene er små. CRM har bare små variasjoner over tid. Totalt ser resultatene ut til å være uavhengige av hvor lenge etter ekstraksjon L-cysteinprøven ble tatt ut. Det er små variasjoner, men dette skyldes antagelig naturlig variasjon.

Det ser derfor ut til at metylkvikksølv er stabilt i L-cysteinløsningen i testede konsentrasjoner i opptil 20 dager. Det er variasjon, men hovedsakelig vil variasjonen ikke være signifikant når resultatet oppgis med to gjeldende siffer. Dersom det er ønskelig med tre gjeldende siffer, og presisjonen i metoden forbedres slik at dette er mulig, bør dekomponering og analyse utføres så raskt som mulig etter ferdig ekstraksjon, eller holdbarheten i L-cystein må undersøkes på nytt.

Med nåværende rapportering med to gjeldende siffer vil det derfor være mulig å utsette dekomponering og analyse noen dager dersom det er nødvendig.

#### 4.7 Utprøving av metoden på reelle hårprøver

Det var ønskelig å se om metoden kunne vise en sammenheng mellom inntak av fisk og innhold av metylkvikksølv i håret. Det var også ønskelig å undersøke om det finnes en sammenheng mellom innhold av total kvikksølv og metylkvikksølv i hårprøvene. Dersom slike sammenhenger ikke finnes må man forsøke å vurdere hvorfor. Det bør da vurderes om noe nå gjøres annerledes, som for eksempel prøveuttak og forbehandling av prøvene. Undersøkelsen var i utgangspunktet et forprosjekt for å gi et utgangspunkt for videre undersøkelser.

Prøver det var lite av ble ikke homogenisert. Hårprøvene klistrer seg fast på overflater på grunn av statisk elektrisitet. Dermed mistes noe av prøven under oppklipping og homogenisering. Det ble forsøkt to ulike måter å klippe opp og homogenisere håret. Den ene var å klippe opp hårprøvene på et prøveark og homogenisere ved å blande med fingrene. Dette ga antageligvis best homogenisering, men behandling av prøver med hendene gir risiko for forurensning av prøvene. Risikoen er imidlertid liten for kvikksølv, dersom det ikke foregår analyse av prøver med høyt kvikksølvinnhold på samme laboratorium. Oppklipping av hårprøven direkte i sentrifugerør medførte også tap av prøve, håret festet seg til utsiden av røret på grunn av statisk elektrisitet. En del hår falt også utenfor sentrifugerøret. Det antas at homogeniseringen av prøven blir dårligere med denne metoden. For prøver med lite prøvemateriale ble enten hele prøven brukt til analysen, eller det ble gjort flere små uttak fra ulike sider av hårprøven, som så ble samlet til en prøve i sentrifugerøret.

I Tabell 13 finnes oversikt over resultater for metylkvikksølv, total kvikksølv og forholdet mellom MeHg og THg som % metylkvikksølv, samt opplysninger om antall amalgamfyllinger og antall fiskemåltider per måned.

Tabell 13 Oversikt over amalgamfyllinger, antall fiskemåltider per måned og resultater av kvikksølvanalyser i hår for alle forsøkspersonene.

Prøve nummer	Antall	Antall	Antall	Totalt antall	THg	MeHg	Andel
1	4	0	8	8	1,063	0,86	76
2	3	1	1	2	0,606	0,53	81
3	5	0	14	14	0,518	0,45	80
4	6	5	2	7	1,409	1,08	71
5	12	24	6	30	4,083	3,37	77
6	0	0,2	4	4,2	0,409	0,30	69
7	14	0	15	15	1,403	1,17	77
8	4	1,75	8	9,75	2,493	1,95	73
9	6	1	8	9	1,578	0,52	31
10	3	4	9	13	0,290	0,22	72
11	0	0	1	1	0,151	0,11	67
12	0	3	0	3	0,509	0,38	69
13	8	5	1	6	0,292	0,26	83
14	12	0,9	11,2	12,1	0,451	0,37	75
15	8	1,2	0,2	1,4	0,257	0,21	77
16	2	1	0,3	1,3	0,239	0,20	77
17	6	1	1	2	0,109	0,09	73
18	>12	36	0	36		6,18	
19	0	2	4	6		1,48	
20	4	2	4	6		0,58	
21		1	2	3		0,29	
22	3	4	1	5		0,52	
23	1	4	0	4		0,53	
24	0	1	7	8		0,14	
25	5	0,5	5	5,5		0,21	
26	5	1	17	18		0,38	
27	0	4	0	4		0,19	
28	1	4	0	4		0,49	
29	4	3	0	3		0,71	
30	12	0	6	6	0,390	0,34	80
31	0	0	0,2	0,2	0,243	0,21	80
32	20	0	6	6	0,503	0,51	94
33	2	0	6	6	0,316	0,26	77
34	0	0	6	6	0,145	0,12	77
35	6	0	6	6	0,315	0,29	84
36	2	0	0	0	0,047	0,02	34
37	0	0	0	0	0,042	0,00	
38	0	0	0	0	0,045	0,01	

Forsøkspersonene er fra ulike geografiske områder. Fisken i kostholdet inneholder derfor sannsynligvis ulik mengde metylkvikksølv. Det finnes opplysninger om navn på fisken, men trofisk nivå for fiskene i deres miljø er ikke kjent. Dette vil kunne gi store variasjoner i innhold av metylkvikksølv i fisken, dermed er ikke datagrunnlaget godt egnet til å diskutere MeHg innhold i hår i forhold til inntak av fisk. Når dette allikevel gjøres i Figur 8 og Figur 9, er dette mest ment som en illustrasjon av nettopp dette.

Hårprøver langt fra hodebunnen vil i større grad ha vært utsatt for kjemisk behandling som farging eller bleking. Hårprøve 31 bestod av hår i full lengde, der den ytterste halvparten var bleket og den innerste var ubehandlet.

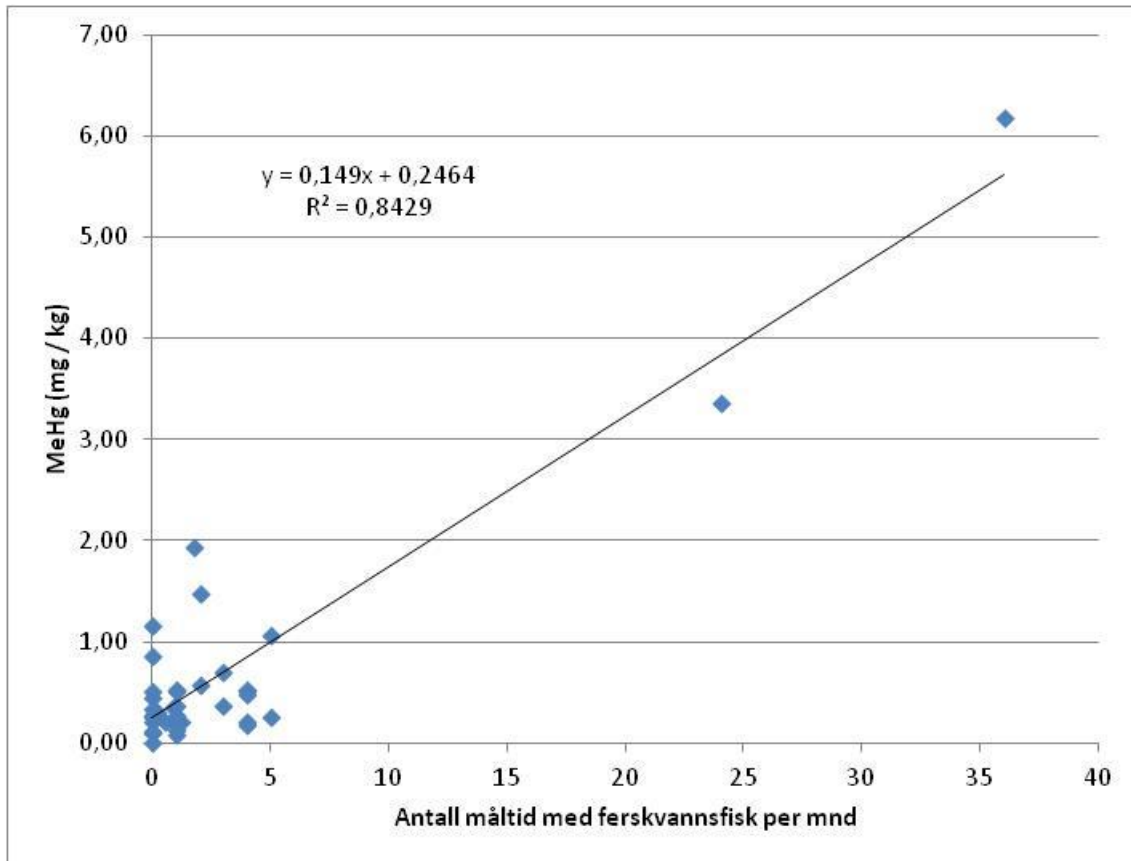
Resultat fra prøve 31 finnes i Tabell 14. Det er høyere innhold av kvikksølv i det blekede håret, men forholdet mellom MeHg og THg er den samme i begge prøvene. Det var forventet at det relative innholdet av metylkvikksølv skulle være høyere lenger ut i håret, men siden dette håret var bleket, kan hårets kjemiske egenskaper være endret (Kosanovic & Jokanovic 2011). Man kan derfor ikke trekke noen konklusjoner av disse resultatene, men det ville være interessant å undersøke flere hårprøver i lange lengder, både for å undersøke variasjon i kvikksølvinnhold over tid, men også for å sammenligne flere prøver med bleket kontra ubleket hår.

Da disse to prøvene representerer kvikksølvinnhold i kroppen i to ulike tidsintervaller kan forskjellen i resultatene like gjerne skyldes forandring i kosthold som at den ene prøven var bleket og den andre ikke var bleket.

Tabell 14 Innhold av MeHg og THg i bleket og ubleket hår fra samme forsøksperson.

	MeHg (mg / kg)	THg (mg / kg)	% MeHg
Hårprøve 31 ubleket	0,21	0,243	80
Hårprøve 31 bleket	0,33	0,384	80

#### 4.7.1 Sammenheng mellom metylkvikksølv i hår og antall fiskemåltider



Figur 8 MeHg i hår som funksjon av antall måltid med ferskvannsfisk per måned.

Sammenheng mellom antall måltider med ferskvannsfisks per måned og innhold av metylkvikksølv i hår er vist i Figur 8.  $R^2$  er på 0,84. Det ser ut til å være en god sammenheng mellom antall måltider med ferskvannsfisk og innhold av metylkvikksølv i håret. Imidlertid er det for få forsøkspersoner som spiser over 5 måltider med ferskvannsfisk per måned til å kunne trekke statistisk begrunnede konklusjoner. Ved færre enn 5 fiskemåltider per måned er det ingen synlig sammenheng.

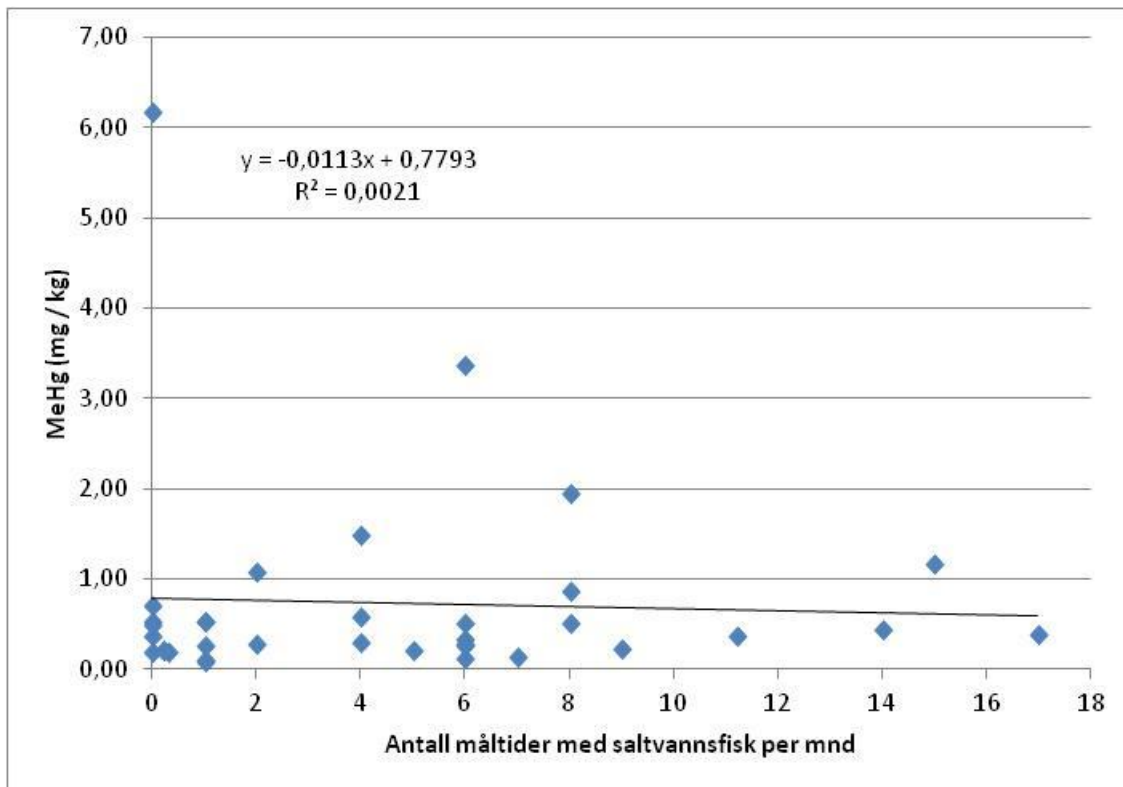
Figur 9 viser ingen sammenheng mellom inntak av saltvannsfisk og innhold av metylkvikksølv i hår. De vanligste matfisker i saltvann inneholder lite metylkvikksølv. Noen saltvannsfisk inneholder mer metylkvikksølv, spesielt i forurensede fjorder, for eksempel kveite og brosme (NIFES).

I



Tabell 13 kan man se en sammenheng mellom antall måltider med ferskvannsfisk og innhold av metylkvikksølv i håret. De som spiser mest ferskvannsfisk (prøve 5 og 18), har også høyest innhold av metylkvikksølv i håret. Hårprøvene som inneholdt minst metylkvikksølv, (forsøksperson 36, 37 og 38) kommer fra veganere, altså personer som ikke har fisk i kostholdet. Mellom disse ytterpunktene er imidlertid ikke sammenhengen like klar. Dette kan ha flere årsaker.

Da de analyserte prøvene ble sendt inn til laboratoriet, var det mange som tok ut prøver, flere av prøvepersonene tok hårprøvene selv. Det ble ikke gitt klare instruksjoner om hvordan hårprøven skulle tas, det antas derfor de fleste hårprøvene ble tatt ytterst. Med en hårlengde på 30 cm og en veksthastighet på 1 cm per måned kan metylkvikksølvinnholdet i håret representere fiskeinntak for 2-3 år siden. Fiskeinntaket rapportert i Tabell 13 er på samme tidspunkt som prøvene ble tatt.



Figur 9 MeHg i hår som funksjon av antall måltid med saltvannsfisk per måned.

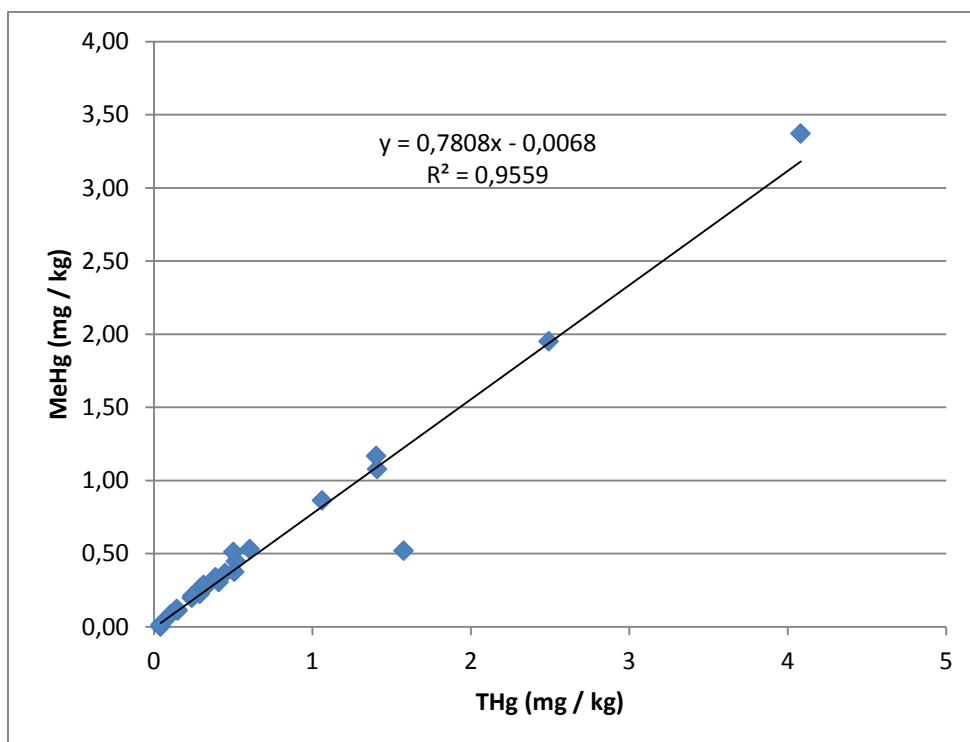
#### 4.7.2 Forhold mellom metylkvikksølv og total kvikksølv

Dette er interessant da en bestemmelse av metylkvikksølv er mye mer resurskrevende enn en bestemmelse av total kvikksølv. Av 24 prøver som ble analysert med hensyn på bestemmelse av både total kvikksølv og metylkvikksølv inneholder 12 mellom 70 og 80 % metylkvikksølv. Gjennomsnittet er 78 % metylkvikksølv, dette stemmer godt med tidligere undersøkelser (Schoeman et al. 2010). Kun to prøver inneholdt en andel MeHg mellom 30 og 40 %, disse

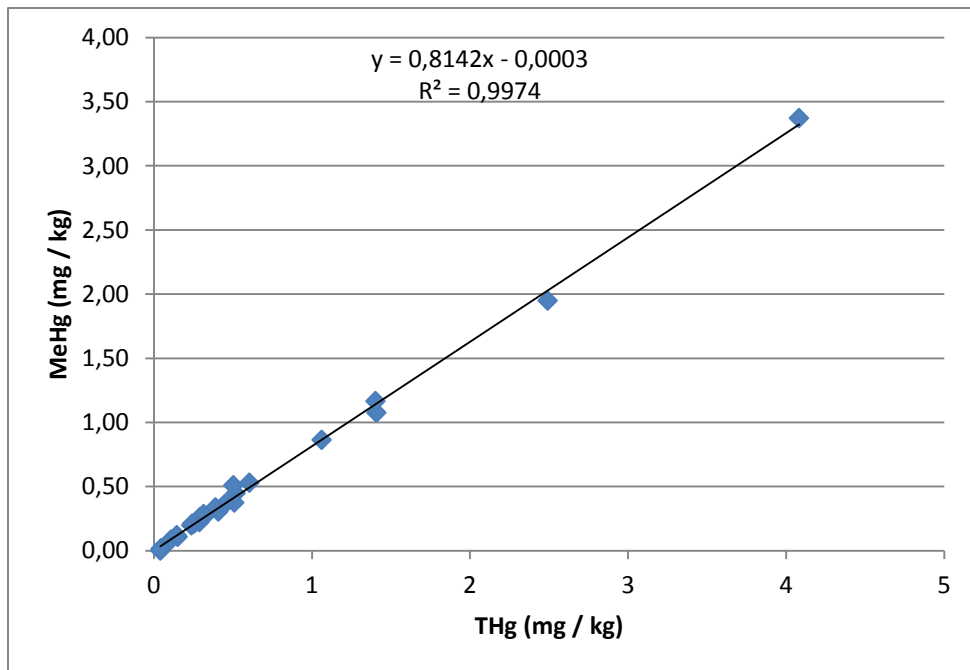
var de eneste som inneholdt under 60 % metylkvikksølv. En prøve hadde mer enn 90 % metylkvikksølv. Forholdet mellom total kvikksølv og metylkvikksølv er vist i Figur 10. Det oppnås en  $R^2$  på 0,95 i lineærregresjonene, dette tyder på en god sammenheng mellom innhold av total kvikksølv og innhold av metylkvikksølv. I Figur 11 er prøve nummer 9 (31 % MeHg) vurdert å være en ”uteligger” og dermed utelatt. Dette gir en  $R^2$  på 0,997 som tyder på en meget god sammenheng mellom konsentrasjonen av total kvikksølv og metylkvikksølv i hår. Men her er det utelatt et måleresultat uten noen annen begrunnelse enn at det skilte seg ut. Ytterligere opplysninger om forsøkspersonen må innhentes før disse resultatene kan ses bort fra.

Hårprøver tatt langt ute har vært eksponert for Hg fra omgivelser i lengre tid enn en hårprøve tatt inne ved hodebunnen, det er derfor sannsynlig at hårprøver tatt langt ute vil ha et relativt høyere innhold av uorganisk kvikksølv enn hår nær hodebunnen. Imidlertid tyder de lave resultatene på total kvikksølv fra veganere på at avsetning av uorganisk kvikksølv direkte på hår fra luft og partikler er liten.

Hårprøve 32, som hadde 94 % metylkvikksølv ble i sin helhet tatt nær hodebunnen.



Figur 10 MeHg som funksjon av THg.

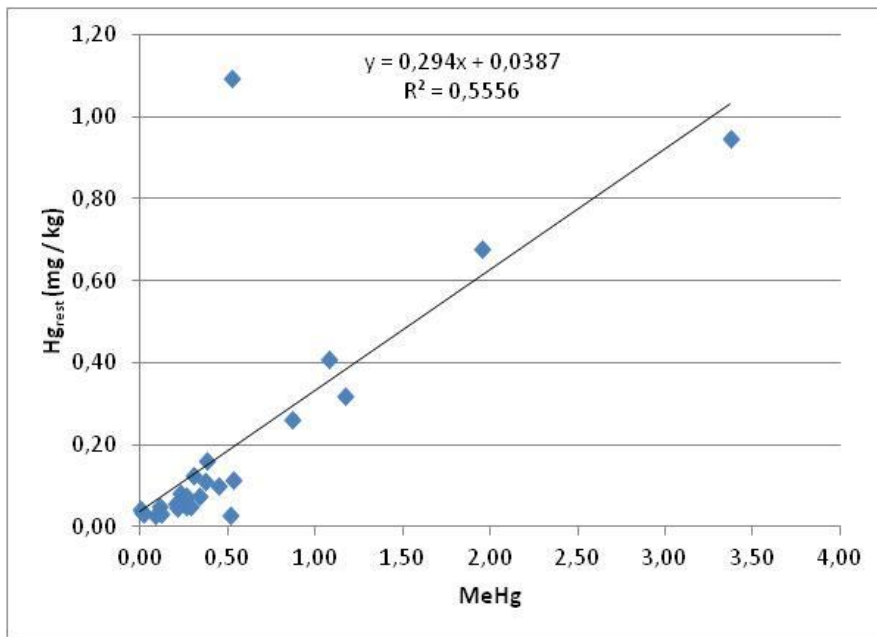


Figur 11 MeHg som funksjon av THg, uten prøve 9.

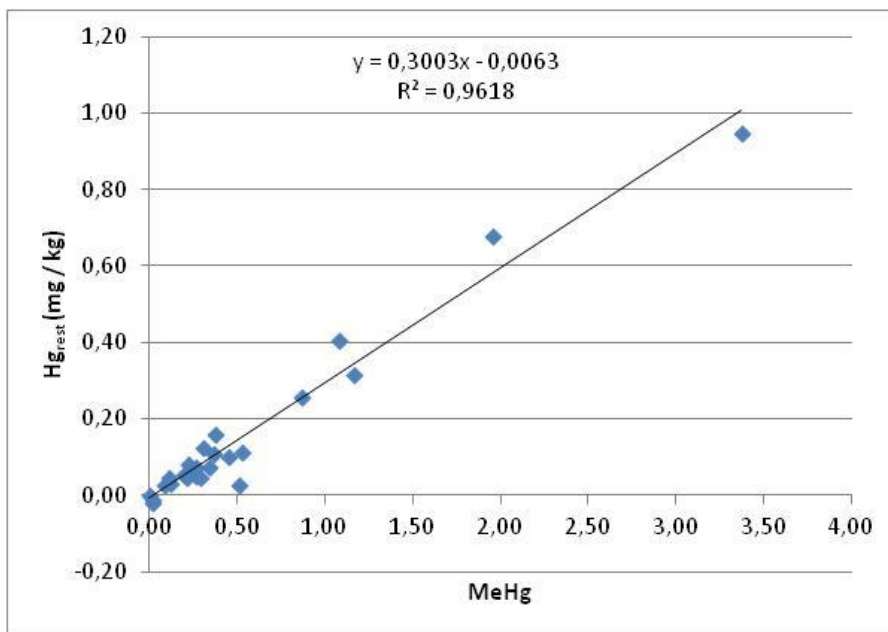
Måling av total kvikksølv inneholder også metylkvikksølv, dermed er det naturlig at det er en viss sammenheng mellom disse målingene. Dersom man antar at  $Hg_{rest}$ , differansen mellom THg og MeHg, er uorganisk kvikksølv kan man se på sammenhengen mellom metylkvikksølv og uorganisk kvikksølv i prøvene.

Figur 12 viser en svak sammenheng med en  $R^2$  på 0,56. Dersom prøve 9 igjen fjernes, som i Figur 13, blir sammenhengen mellom metylkvikksølv og  $Hg_{rest}$  bedre, med en  $R^2$  på 0,96.

Det understrekes igjen at det ikke er funnet noen begrunnelse for å fjerne prøve 9 fra tallmaterialet.



Figur 12  $Hg_{rest}$  som funksjon av MeHg

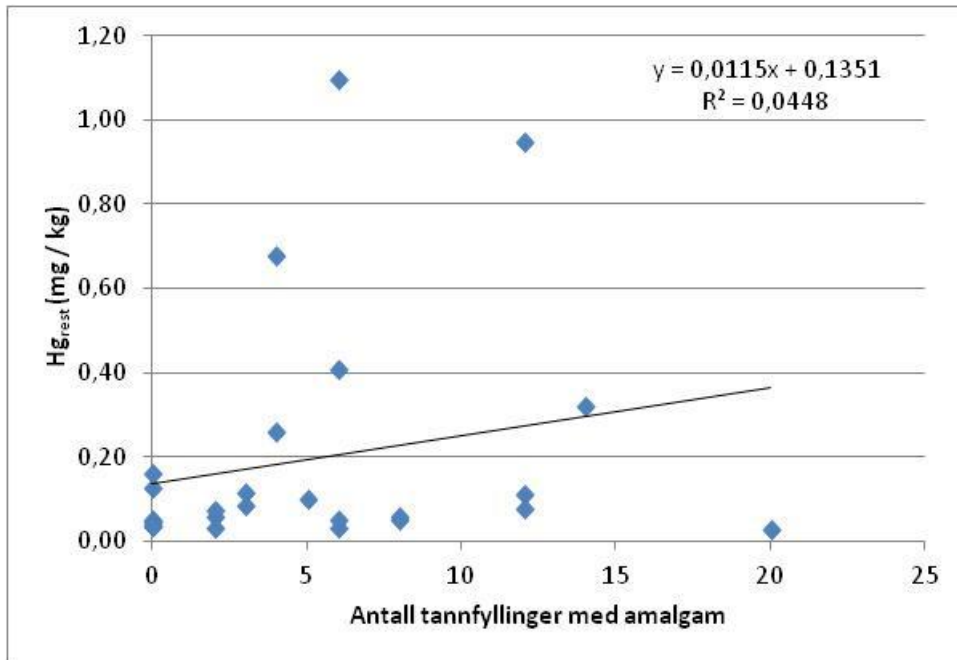


Figur 13  $Hg_{rest}$  som funksjon av MeHg, uten prøve 9.

#### 4.7.3 Forhold mellom $Hg_{rest}$ og amalgam i tannfyllinger

Dersom kvikksølv tas opp fra amalgamfylling er via munnhulen, kan det tenkes at det er en sammenheng mellom antall amalgamfyllinger og uorganisk kvikksølv i hår. Dersom  $Hg_{rest}$  betraktes som uorganisk kvikksølv, viser Figur 14 ingen sammenheng mellom antall amalgamfyllinger og uorganisk kvikksølv i håret. Dette var heller ikke forventet ut fra betraktningen om at uorganisk kvikksølv i hår består av en kombinasjon av kvikksølv fra

blodet og kvikksølv avsatt direkte på hår fra luft og støv. Det er imidlertid ikke sikkert at hele  $Hg_{rest}$  er uorganisk, det er også mulig at alder på amalgamfyllinger kan påvirke opptak av kvikksølv.



Figur 14  $Hg_{rest}$  Som funksjon av antall tannfyllinger med amalgam.

## 5 Konklusjon og videre arbeid

Variansanalyse viser ingen forskjell på opprinnelig metode og modifisert metode. Modifisert metode gir like god nøyaktighet og presisjon og en lavere kvantifiseringsgrense i forhold til opprinnelig metode, og er mindre tidkrevende. Dermed vil modifisert metode kunne erstatte opprinnelig metode for hårprøver. Presisjon for modifisert metode vil kunne forbedres dersom man finner en god metode for homogenisering av hårprøvene. Holdbarhet av metylkvikksølv i L-cysteinløsningen er god, det er mulig å lagre prøver i opptil 20 dager etter ekstraksjon før dekomponering og analyse utføres.

Det er fremdeles usikkert om bestemmelse av metylkvikksølv i hår kan erstattes av bestemmelse av totalt kvikksølv, selv om man aksepterer større usikkerhet i resultatet. Det var en tilsynelatende god sammenheng mellom resultat for total kvikksølv og metylkvikksølv ved lineærregresjon, men antall resultater med nivå over 1 mg / kg er lavt, dermed er det mange punkter for lav konsentrasjon, men få punkter for høy konsentrasjon. Da vil de få punktene for høy konsentrasjon ha uforholdsmessig stor innvirkning på beregning av  $R^2$ , og sammenhengen kan se bedre ut enn den virkelig er.

Modifisert metodes konsentrasjonsområde er tilstrekkelig for prøvene i denne oppgaven med unntak av to av veganerene som fikk resultater under LOQ. For håranalyse av mennesker med fisk i kostholdet er metodens kvantifiseringsgrense lav nok. En prøve gav resultat over kalibreringskurven med fortykning til 10 ml, men denne var så nær 10  $\mu\text{g Hg} / \text{l}$  standarden at resultatet allikevel ble godkjent. For prøven med høyest konsentrasjon av MeHg ble resultat for fortynnet prøve innenfor kalibreringskurven fordi det var lite prøvemateriale og dermed ble innvekten av prøven lav.

Høyeste konsentrasjon funnet i hårprøvene var 6,18 mg MeHg / kg. Dette er under WHO anslag om mulige fosterskader ved 10 – 20 mg MeHg / kg i morens hår. Personen med det høyeste resultatet var en mann. Det er ikke funnet noen grenseverdi trygt nivå av metylkvikksølv i hår, men det er anslått av 5 % av en befolkning med et gjennomsnitt på 50 mg Hg / kg vil kjenne symptomer som stikking i hender og føtter (Folkehelseinstituttet 2009). Alle forsøkspersonene lå langt under denne verdien.

Selv om kvikksølvet i de fleste hårprøvene er  $80 \pm 10$  % metylkvikksølv, er det noen prøver som skiller seg kraftig ut.

Tallmaterialet i denne oppgaven er for lite, og inneholder ikke nok resultater over 1 mg / MeHg / kg hår til å konkludere med en tydelig sammenheng mellom mengden av fisk i kosten

og innhold av metylkvikksølv i hår. Det er imidlertid slik at de forsøkspersonene som spiste mest fisk hadde høyest innhold av metylkvikksølv i håret, og de forsøkspersonene som ikke spiser fisk hadde lavest innhold av metylkvikksølv i håret.

For å oppnå sikrere resultater må prøvetakning av hårprøver standardiseres.

Det bør utarbeides en mal for prøvetakning. Ved videre metodeutvikling kan hårprøve tas av nakkehår, og klippes maksimalt en halv centimeter fra huden. Prøven bør så festes slik at hårstråenes orientering i forhold til hverandre beholdes. Dermed kan hårprøvene deles opp i seksjoner og man kan analysere kvikksølvinnhold bakover i tid. Dette vil også gjøre det mulig å bestemme forskjeller i kvikksølvinnholdet på hår nær hodebunnen og lenger ut i hårstrået. Dermed kan man finne ut om hår lenger ut er mer utsatt for opptak av kvikksølv direkte fra luft og partikler. Det vil også være mulig å gjøre en grundigere sammenligning av behandlet hår i forhold til ubehandlet hår.

Det bør undersøkes om vask av prøvene er nødvendig. Dette kan gjøres ved å bestemme metylkvikksølvkonsentrasjonen i en prøve før og etter vask. I følge litteratur (Kosanovic & Jokanovic 2011; Nuttall 2006) vil ikke en vask av hårprøvene fjerne kvikksølv på overflaten med mindre vasken er så kraftig, for eksempel ved bruk av HCl, at den også trekker kvikksølv ut av håret. Hvis vask av hår er unødvendig, vil man kunne spare et trinn i analysen som gir risiko for tap av prøvemateriale.

For å oppnå bedre kvantifiseringsgrense bør man forsøke å finne kjemikalier uten kvikksølvforurensing. Det er mest sannsynlig at kvikksølvforurensingen av L-cysteinløsningen kommer fra L-cysteinhydrokloridmonohydrat siden L-cystein binder metylkvikksølv, men det kan også være natriumsulfat eller natriumacetat som er forurenset med kvikksølv. Dette kan testes ved å blande L-cysteinløsningen med ulik masse L-cysteinhydrokloridmonohydrat, amoniumacetat og amoniumsulfat. Etter at kilden til kvikksølvforurensningen er funnet, kan man undersøke om renere kjemikalier kan skaffes. Hvor mye renere kjemikalier vil ha å si for kvantifiseringsgrensen er uvisst. Nivået for blindprøver varierer fra dag til dag, men standardavviket er lavt ved samme analyse.

For å oppnå bedre presisjon i analysen, må prosedyre for homogenisering av hårprøver forbedres. Når håret klippes i biter vil disse bitene klistre seg til hverandre og andre materialer de kommer i kontakt med. Dersom det er lite prøvemateriale må man være forsiktig så man ikke mister prøvemateriale. Dette gjør homogenisering av hårprøvene vanskelig.

Det finnes en teori om at kvikksølv kan absorberes av plasten i sentrifugerørene (Glomstad 2010), da spiking i HBr gir dårlig gjenfinning av metylkvikksølv. Metoden bør testes med CRM med høyere konsentrasjon for å bestemme om høyere konsentrasjoner også gjenfinnes. IAEA-085 er et slik CRM.

Resultatene av hår analysene gav flest resultater under 1 mg MeHg / g. Fordi det er få resultater over dette er det vanskelig å finne en sammenheng mellom antall fiskemåltider per måned og innholdet av metylkvikksølv i håret. Det er innhentet opplysninger om fiskeslag, men trofisk nivå for fisken og dermed sannsynlig kvikksølvnivå er ikke kjent.

For å få tak i flere forsøkspersoner med høyere nivå av metylkvikksølv i håret, bør en finne et område der kvikksølvinnholdet i fisken er kjent, eller man kjenner trofisk nivå på fisken og velger forsøkspersoner som spiser fisk man vet inneholder mye metylkvikksølv, eller fisk med høyt trofisk nivå. For eksempel et hytteområde rundt en innsjø, der det er utført studier på metylkvikksølv i fiskebestanden, eller en fjordarm hvor det er forurensninger av kvikksølv. Eksempler på steder der man kan undersøke om forholdene ligger til rette er Steinsfjorden, der det er mye abbor og gjedde, eller Sørfjorden ved Odda, der det advares mot å spise fisk fra fjorden på grunn av kvikksølv.

Det er stor variasjon i forholdet mellom metylkvikksølv og totalt kvikksølv. Andelen av metylkvikksølv varierer fra 30 til 95 % av totalt kvikksølv, selv om det er få resultater i ytterpunktene. En enhetlig prøvetagning vil muligens kunne minke variasjonen i andel metylkvikksølv.

Hvis forsøkspersonene fisker selv bør de gi opplysninger om hvor fisken de spiser er fisket, det bør også føres opp hvor på hodet hårprøven er tatt og hvor langt fra hodebunnen, dessuten må hårprøven merkes med hvilken ende som var nærmest hodebunnen.

For at analysen av hår skal gi et riktig bilde av kvikksølvinnholdet i kroppen, må utskillelsen være lik for alle, hvis det er slik at noen mennesker skiller ut kvikksølv langsommere enn andre vil ikke denne metoden avsløre høyt kvikksølvinnhold hos disse personene. For å avgjøre dette må det gjøres et sammenlikningsstudie med analyser av blodprøver.

Det er også mulig at andre stoffer, for eksempel selen, påvirker opptaket og utskillelsen av metylkvikksølv. Det er også tenkelig av hårets veksthastighet vil kunne påvirke konsentrasjonen av metylkvikksølv i håret, hårets veksthastighet varierer fra person til person. Det bør undersøkes om det er gjort studier på dette tidligere.



Man kan ikke trekke noen konklusjoner av disse resultatene, men det ville være interessant å undersøke flere hårprøver i lange lengder, både for å undersøke variasjon i kvikksølvinnhold over tid, men også for å sammenligne flere prøver med bleket kontra ubleket hår.

## Referanser

### Sertifisert referansemateriale

International Atomic Energy Agency (2000). Reference sheet - Reference material IAEA-086. *Methylmercury, total mercury and other trace elements in human hair*.

National Research Council Canada (2008). DORM-3, *Fish Protein Certified Reference Material for Trace Metals*.

### Litteratur

- AMAP. (2005). *Mercury - a priority pollutant* [Fact sheet]. [www.amap.no](http://www.amap.no): AMAP (Arctic Monitoring and Assessment Program).
- AMAP. (2011). AMAP Assessment: Mercury in the Arctic. Oslo, Norway: Arctic Monitoring and Assessment Programme. 193 s.
- Bjerregaard, P. (2005). *Økotoksikologi*. København: Nordisk Forlag A/S. 245 s.
- Clarkson, T. W. & Strain, J. J. (2003). Nutritional factors may modify the toxic action of methyl mercury in fish-eating populations. *Journal of Nutrition*, 133 (5): 1539s-1543s.
- Committee on the Toxicological Effects of Methylmercury. (2000). Toxicological Effects of Methylmercury. *Chemistry, Exposure, Toxicokinetics, and Toxicodynamics*.: s 44.
- Counter, S. A. & Buchanan, L. H. (2004). Mercury exposure in children: a review. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 198 (2): 209-230.
- Environment Canada. (2010). *Mercury*. Major pollutants: Environment Canada. Tilgjengelig fra: <http://www.ec.gc.ca/mercure-mercury/default.asp?lang=En&n=D64997D2-1> (lest 2012-09-21).
- Folkehelseinstituttet. (2009). *B.6.07 Metaller Miljø og helse - en forskningsbasert kunnskapsbase*. Tilgjengelig fra: [http://www.fhi.no/eway/default.aspx?pid=233&trg=MainLeft\\_6039&MainArea\\_5661=6039:0:15,4520:1:0:0:::0:0&MainLeft\\_6039=6041:69495::1:6043:7:::0:0](http://www.fhi.no/eway/default.aspx?pid=233&trg=MainLeft_6039&MainArea_5661=6039:0:15,4520:1:0:0:::0:0&MainLeft_6039=6041:69495::1:6043:7:::0:0) (lest 2012.06.09).
- Freire, C., Ramos, R., Lopez-Espinosa, M. J., Diez, S., Vioque, J., Ballester, F. & Fernandez, M. F. (2010). Hair mercury levels, fish consumption, and cognitive development in preschool children from Granada, Spain. *Environmental Research*, 110 (1): 96-104.
- Glomstad, B. (2010). *Utvikling av metode for bestemmelse av metylkvikksølv i ekstraherte og oppsluttede prøver av sediment og biota ved hjelp av kalddamp atomabsorpsjonsspektroskopi*. Master of Science Thesis: Universitetet for Miljø og Biovitenskap, Institutt for plante og miljøvitenskap. 70 s.
- International Atomic Energy Agency. (2000). *Reference sheet - Reference material IAEA-086*. Methylmercury, total mercury and other trace elements in human hair.
- KLIF. (2010). Handlingsplan for å redusere utslipp av kvikksølv - 2010. Tilgjengelig fra: <http://www.klif.no/publikasjoner/2684/ta2684.pdf> (lest 20-9-2012).
- KLIF. (2012). *Kvikksølv*. Miljøstatus Norge: Klima- og forurensningsdirektoratet. Tilgjengelig fra: <http://www.miljostatus.no/tema/Kjemikalier/Noen-farlige-kjemikalier/Kvikksolv/> (lest 08.04.2012 ).
- Kosanovic, M. & Jokanovic, M. (2011). Quantitative analysis of toxic and essential elements in human hair. Clinical validity of results. *Environmental Monitoring and Assessment*, 174 (1-4): 635-43.
- Lohne, S. (2009). *Laboratorieøving CVAAS Kvikksølv i fisk*: UMB, Ås.
- Maier, R. M., Pepper, I. L. & Gerba, C. P. (2009). *Environmental Microbiology*: Academic Press, Elsevier inc.

- Mergler, D., Anderson, H. A., Chan, L. H. M., Mahaffey, K. R., Murray, M., Sakamoto, M. & Stern, A. H. (2007). Methylmercury exposure and health effects in humans: A worldwide concern. *Ambio*, 36 (1): 3-11.
- Mohanathas, L. (2010). *Enkel bestemmelse av metylkvikksølv i ekstraherte og dekomponerte biologiske prøvetyper ved bruk av kalddamp atomabsorpsjonsspektroskopi*. Master of Science Thesis: Universitetet for Miljø og Biovitenskap, Institutt for Plante og Miljøvitenskap 65 s.
- National Research Council Canada. (2008). *DORM-3, Fish Protein Certified Reference Material for Trace Metals*.
- NIFES. *Analyser av kvikksølv i brosme*. Tilgjengelig fra: [http://www.nifes.no/index.php?page\\_id=126&article\\_id=3495](http://www.nifes.no/index.php?page_id=126&article_id=3495) (lest 2012-12-01).
- NIFES. *Kvikksølv i sjømat*. Tilgjengelig fra: [http://www.nifes.no/index.php?page\\_id=392](http://www.nifes.no/index.php?page_id=392) (lest 2012-12-01).
- NILU. (2012). *NILUs forskning på kvikksølv*: NILU (Norsk Institutt for Luftforskning). Tilgjengelig fra: <http://www.nilu.no/Forskning/Milj%C3%B8kjemi/Milj%C3%B8gifter/Kvikks%C3%B8lv/tabid/116/language/nb-NO/Default.aspx> (lest 2012-10-05).
- Nuttall, K. L. (2006). Interpreting hair mercury levels in individual patients. *Ann Clin Lab Sci*, 36 (3): 248-61.
- Schoeman, K., Tanaka, T., Bend, J. R. & Koren, G. (2010). Hair Mercury Levels of Women of Reproductive Age in Ontario, Canada: Implications to Fetal Safety and Fish Consumption. *Journal of Pediatrics*, 157 (1): 127-131.
- vanloon, G. W. & SDuffy, S. J. (2005). *environmental chemistry, a global perspective*. 2 utg. Oxford: Oxford University Press. 493 s.
- Watras, C. J. & Huckabee, J. W. (1994). *Mercury Pollution: Integration and Synthesis*: CRC Press Inc.
- Wibetoe, G. *Hg Kvikksølv*. periodesystemet.no: Universitetet i Oslo, Kjemisk institutt. Tilgjengelig fra: <http://www.mn.uio.no/kjemi/tjenester/kunnskap/periodesystemet/vis.php?e=Hg&vis=alt> (lest 2012-09-20).
- Wikipedia. (2012). *Cysteine*. Tilgjengelig fra: <http://en.wikipedia.org/wiki/Cysteine> (lest 2012-11-28).
- Yasutake, A. & Hachiya, N. (2006). Accumulation of inorganic mercury in hair of rats exposed to methylmercury or mercuric chloride. *Tohoku Journal of Experimental Medicine*, 210 (4): 301-306.

## Vedlegg 1 Analyseresultater

Analyser for bestemmelse av presisjon og bestemmelsesgrenser for opprinnelig metode er gjengitt i Tabell 15 og Tabell 16.

**Tabell 15 Resultater for bestemmelse av presisjon for den opprinnelige analysemetoden. 10 paralleller av hårprøve nr 32 ble brukt i forsøket. Resultater for hårprøve er fratrukket resultat for blindprøve.**

Prøve id	Prøve og parallell	Resultat analyseløsning µg Hg / l	Innvekt av prøve (g)	Fortynningsvolum (ml)	Resultat (mg MeHg / kg)
118	Hårprøve 32-1	1,152	0,0944	10,0	0,477
119	Hårprøve 32-2	1,264	0,1037	10,0	0,503
120	Hårprøve 32-3	1,305	0,1095	10,0	0,501
121	Hårprøve 32-4	1,203	0,0953	10,0	0,506
122	Hårprøve 32-5	1,212	0,0972	10,0	0,503
123	Hårprøve 32-6	1,190	0,0915	10,0	0,518
124	Hårprøve 32-7	1,187	0,0923	10,0	0,512
125	Hårprøve 32-8	1,194	0,0934	10,0	0,511
126	Hårprøve 32-9	1,212	0,0937	10,0	0,521
127	Hårprøve 32-10	1,302	0,1076	10,0	0,508
	Gjennomsnitt				0,51
	Standardavvik				0,01
	% RSD				2,4

**Tabell 16 Blindprøver for bestemmelse av LOD og LOQ for den opprinnelige analysemetoden. Innvekt for blindprøver er satt til 0,1 g for å kunne beregne et resultat som tilsvarer innhold av MeHg i hår (0,1 g er den prøvemengden som veies inn av hårprøver)**

Prøve id	Prøve og parallell	Resultat analyseløsning µg Hg / l	Innvekt av prøve (g)	Fortynningsvolum (ml)	Resultat (mg MeHg / kg)
112	Blind 1	0,460	0,1	10,0	0,297
113	Blind 2	0,446	0,1	10,0	0,288
114	Blind 3	0,462	0,1	10,0	0,298
115	Blind 4	0,444	0,1	10,0	0,286
116	Blind 5	0,461	0,1	10,0	0,298
117	Blind 6	0,454	0,1	10,0	0,293
	Gjennomsnitt				0,293
	Standardavvik				0,005
	LOD				0,016
	LOQ				0,052

Resultater fra modifisering av metoden, analyse med og uten dobbel tilbakeekstraksjon, med og uten sentrifugering er gjengitt i Tabell 17, blindprøver i Tabell 18.

Tabell 17 Sammenlikning av prøver med og uten sentrifugering i ekstraksjon. Bestemmelse av effekt av enkel eller dobbel tilbakeekstraksjon. 5 paralleller av hårprøve nr. 33 ble brukt i forsøket. Resultat for hårprøve er fratrukket resultat for blindprøve.

Sett 1	Sett 1 Sentrifugert og dobbel tilbakeekstraksjon	Resultat analyteløsning µg Hg / l	Innvekt av prøve (g)	Fortynningsvolum (ml)	Resultat hårprøve (mg MeHg / kg)
135	33-1-1	0,8981	0,1066	10,0	0,265
136	33-1-2	0,8777	0,1007	10,0	0,268
137	33-1-3	0,8797	0,0998	10,0	0,272
138	33-1-4	0,8772	0,0950	10,0	0,284
139	33-1-5	0,9182	0,1099	10,0	0,269
	Gjennomsnitt	-	-	-	0,272
Sett 2	Standardavvik	-	-	-	0,007
140	33-2-1	1,3640	0,1098	10,0	0,266
141	33-2-2	1,2866	0,0986	10,0	0,271
142	33-2-3	1,3382	0,1018	10,0	0,278
143	33-2-4	1,3216	0,0992	10,0	0,280
144	33-2-5	1,2539	0,0998	10,0	0,257
	Gjennomsnitt	-	-	-	0,27
Sett 3	Standardavvik	-	-	-	0,010
145	33-3-1	0,9399	0,1078	10,0	0,288
146	33-3-2	0,8714	0,0969	10,0	0,274
147	33-3-3	0,8511	0,0936	10,0	0,270
148	33-3-4	0,8810	0,0996	10,0	0,273
149	33-3-5	0,9054	0,0976	10,0	0,295
	Gjennomsnitt	-	-	-	0,28
Sett 4	Standardavvik	-	-	-	0,011
150	33-3-1	1,2746	0,1067	10,0	0,246
151	33-3-2	1,1956	0,0950	10,0	0,250
152	33-3-3	1,3026	0,1023	10,0	0,266
153	33-3-4	1,3740	0,1071	10,0	0,275
154	33-3-5	1,2438	0,0947	10,0	0,267
	Gjennomsnitt	-	-	-	0,26
	Standardavvik	-	-	-	0,012

Volum av L-cystein ved dobbel tilbakeekstraksjon var 12 ml.

Volum av L-cystein ved enkel tilbakeekstraksjon var 6 ml.

Tabell 18 Blindprøver til sammenlikning av prøver med og uten sentrifugering i ekstraksjon

	Prøve id	Resultat $\mu\text{g Hg}$ /l	Gjennomsnitt $\mu\text{g}$ Hg /l	Standardavvik $\mu\text{g Hg}$ /l
Sett 1 Sentrifugert og dobbel tilbakeekstraksjon	158	0,456	0,453	0,003
	159	0,449	-	-
	160	0,454	-	-
Sett 2 Sentrifugert og enkel tilbakeekstraksjon	132	0,458	0,463	0,006
	133	0,467	-	-
	134	0,438	-	-
Sett3 Dobbel tilbakeekstraksjon	155	0,443	0,46	0,016
	156	0,474	-	-
	157	0,466	-	-
Sett4 Enkel tilbakeekstraksjon	129	0,496	0,47	0,024
	130	0,461	-	-
	131	0,450	-	-

Analyser av CRM, IAEA-086 for kontroll av hele analysen og DORM 3 for kontroll av standardkurve er vist i Tabell 19, Tabell 22 og Tabell 21.

Tabell 19 Bestemmelse av nøyaktighet for modifisert. Analyse av CRM IAEA-086

Prøve id	µg Hg / l i prøveløsning	Innvekt (g)	Fortynning (ml)	Resultat for hårprøve µg MeHg / l
168	1,210	0,0984	10	0,250
169	1,220	0,1011	10	0,247
170	1,170	0,0935	10	0,250
171	1,210	0,0990	10	0,249
172	1,180	0,0943	10	0,251
173	1,160	0,0927	10	0,248
Gjennomsnitt	-	-	-	0,249
Standardavvik	-	-	-	0,001

Tabell 20 Analyser av Hg i CRM Dorm 3, for kontroll av standardkurve ved hver enkelt analyse. Kun en av disse er for opprinnelig metode, resten er modifisert metode. Alle resultatene er innenfor sertifisert område.

Prøve id	Prøve og parallell	Resultat analyseløsning µg Hg / l	Innvekt av prøve (g)	Fortynningsvolum (ml)	Resultat (mg MeHg / kg)
128	Dorm 3	2,105	0,2492	50,0	0,42
161 (13/3)	Dorm 3	2,122	0,2548	50,0	0,42
187 (17/4)	Dorm 3	1,770	0,208	50,0	0,43
219 (3/9)	Dorm 3	1,756	0,2156	50,0	0,41
219 (10/9)	Dorm 3	1,756	0,2156	50,0	0,41
245 (24/9)	Dorm 3	1,756	0,0542	10,0	0,41
Uten nr (2/10)	Dorm 3	2,089	0,2577	50,0	0,41

Sertifisert område 0,322 – 0,442

Tabell 21 Analyser av MeHg i CRM IAEA-086, analysert sammen med prøver, alle resultatene var innenfor sertifisert område.

Prøvenummer	Prøve id	µg Hg / l i prøveløsning (korrigert for blindprøve)	Innvekt (g)	Fortynning (ml)	Resultat for hårprøve mg MeHg / kg
194 (3/9) Etter 3 dager	CRM IAEA-086	0,8010	0,1015	10,0	0,254
194 (10/9) Etter 10 dager	CRM IAEA-086	0,631*	0,1015	10,0	0,250
221 (24/9) Etter 10 dager	CRM IAEA-086	0,724	0,0923	10,0	0,253
270 (2/10) Etter 1 dag	CRM IAEA-086	0,8754	0,0949	10,0	0,266

Sertifisert område 0,236 – 0,379

\*2,0 ml L-cystein tatt ut

Analyse av blindprøver for bestemmelse av deteksjonsgrense og kvantifiseringsgrense er vist i Tabell 22 og Tabell 23.

Tabell 22 Blindprøver fortynnet til 10 ml for beregning av LOD / LOQ.

Blindprøve	Resultat i prøveløsning (µg Hg /l)	Innvekt av prøve	Fortynningsvolum	Resultat (mg MeHg / kg)
195	0,4072	0,1	10	0,131
196	0,4189	0,1	10	0,135
197	0,4095	0,1	10	0,132
198	0,4082	0,1	10	0,132
199	0,4079	0,1	10	0,132
200	0,4075	0,1	10	0,131
Gjennomsnitt				0,132
Standardavvik				0,001
LOD				0,004
LOQ				0,015

Tabell 23 Blindprøver fortynnet til 50 ml for beregning av LOD / LOQ.

Blindprøve	Resultat i prøveløsning (µg Hg /l)	Innvekt av prøve	Fortynningsvolum	Resultat (mg MeHg / kg)
201	0,0842	0,1	50	0,136
202	0,0794	0,1	50	0,128
203	0,0837	0,1	50	0,135
204	0,0802	0,1	50	0,129
205	0,0833	0,1	50	0,134
206	0,0822	0,1	50	0,133
Gjennomsnitt				0,132
Standardavvik				0,003
LOD				0,010
LOQ				0,032



Analyse av metylkvikksølvstandard, spikede og uspikede prøver for å bestemme gjenfinning av MeHg med modifisert metode ved høy konsentrasjon finnes i Tabell 24, Tabell 25 og Tabell 26

Tabell 24 bestemmelse av konsentrasjon i metylkvikksølvstandard benyttet til spiking av prøver.

Prøve nr	Prøve id	µg Hg / l i prøveløsning	Volum av spikestandard 400 µg MeHg/l (ml)	Fortynning (ml)	Konsentrasjon i spikestandard µg MeHg / l	Konsentrasjon i utgangsstandard mg MeHg / l
242	Spikestandard	8,26	0,25	40	8,88	888
243	Spikestandard	8,21	0,25	40	8,83	883
244	Spikestandard	8,10	0,25	40	8,71	871
	Gjennomsnitt	-	-	-	8,81	880
	Standardavvik	-	-	-	0,09	9

Tabell 25 Bestemmelse av metylkvikksølv i hårprøve 34.

Prøve nr	µg Hg / l i prøveløsning	Innvekt (g)	Fortynning (ml)	Resultat for hårprøve mg MeHg / kg
174	0,800	0,0981	10	0,116
175	0,880	0,0949	10	0,147
176	0,790	0,0967	10	0,115
177	0,830	0,1048	10	0,118
178	0,780	0,0928	10	0,116
179	0,800	0,1008	10	0,113
Gjennomsnitt	-	-	-	0,12
Standardavvik	-	-	-	0,01

Brukes til å beregne bidrag fra hårprøven i de spikede prøvene.

Tabell 26 Analyse av spiket hårprøve 34. Blindprøver fortynnet til 50 ml ble ødelagt under ekstraksjon, blindverdi for fortynning til 50 ml er funnet ved blindverdi for 10 ml fortynning delt på 5. Det er benyttet konsentrasjon for MeHg standard funnet ved analyse for beregning av gjenfinning.

Prøve id	Konsentrasjon i prøveløsning (µg Hg / l) (korrigert for blindprøve)	Fortynning (ml)	Innvekt Hårprøve (g)	Bidrag fra hårprøve (µg MeHg)	Gjenfinning Korrigert for bidrag fra hår (µg MeHg)	Mengde MeHg spiket, µg	Gjenfinning (%)
180	5,311	50	0,0987	0,012	0,844	0,88	96,0
181	5,331	50	0,0980	0,012	0,848	0,88	96,3
182	5,321	50	0,0927	0,011	0,847	0,88	96,2
183	5,321	50	0,1013	0,012	0,846	0,88	96,1
184	5,291	50	0,0993	0,012	0,841	0,88	95,6
185	5,351	50	0,1060	0,013	0,850	0,88	96,6
Gjennomsnitt	-	-	-	-	0,846	-	96,1
Standardavvik	-	-	-	-	0,003	-	0,3

Resultater av analyser for bestemmelse av stabilitet i L-cystein er vist i Tabell 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 og 35.

**Tabell 27** Analyse av prøver med spiket L-cystein, dekomponert og analysert samme dag som tilsetning av metylkvikksølvstandard.

Prøvenummer	Prøve id	µg MeHg / l i prøveløsning (korrigert for blindprøve)
232	L-cystein tilsatt standard	2,22
233	L-cystein tilsatt standard	2,17
234	L-cystein tilsatt standard	2,20
235	L-cystein tilsatt standard	2,16
236	L-cystein tilsatt standard	2,32
Gjennomsnitt	-	2,21
Standardavvik	-	0,06

**Tabell 28** Analyse av prøver med spiket L-cystein, dekomponert og analysert 14 dager etter tilsetning av MeHg standard

Prøvenummer	Prøve id	µg MeHg / l i prøveløsning (korrigert for blindprøve)
232	L-cystein tilsatt standard	2,27
233	L-cystein tilsatt standard	2,30
234	L-cystein tilsatt standard	2,29
235	L-cystein tilsatt standard	2,32
236	L-cystein tilsatt standard	2,49
Gjennomsnitt	-	2,33
Standardavvik	-	0,09

**Tabell 29** Analyse av prøver med spiket L-cystein, dekomponert og analysert 20 dager etter tilsetning av MeHg standard.

Prøvenummer	Prøve id	µg MeHg / l i prøveløsning (korrigert for blindprøve)
232	L-cystein tilsatt standard	2,28
233	L-cystein tilsatt standard	2,33
234	L-cystein tilsatt standard	2,27
Gjennomsnitt	-	2,29
Standardavvik	-	0,03

**Tabell 30** Analyse av ren L-cysteinløsning som ikke har vært gjennom ekstraksjoner. Denne fungerer som blindprøve for prøver med spiket L-cystein.

L-cysteinløsning	Resultat (µg Hg / l)	Gjennomsnitt µg Hg / l	Standardavvik µg Hg / l
227	0,403	0,400	0,002
228	0,398		
229	0,398		
230	0,401		

**Tabell 31** Analyse av ren L-cysteinløsning (blindprøve), analysert etter 14 dager.

L-cysteinløsning	Resultat (µg Hg / l)	Gjennomsnitt µg Hg / l	Standardavvik µg Hg / l
227	0,399	0,395	0,005
228	0,389		
229	0,396		

Tabell 32 Stabilitet av MeHg i L-cystein, Hårprøve E-3 dekomponert og analysert 1 dag etter ekstraksjon.

Prøvenummer	Prøve id	µg Hg / l i prøveløsning (korrigert for blindprøve)	Innvekt (g)	Fortynning (ml)	Resultat for hårprøve µg MeHg / l
267	E-3	1,730	0,0977	10,0	0,571
268	E-3	1,589	0,0923	10,0	0,532
269	E-3	1,531	0,0949	10,0	0,535
Gjennomsnitt	-	-	-	-	0,55
Standardavvik	-	-	-	-	0,02

Tabell 33 Stabilitet av MeHg i L-cystein, Hårprøve E-3 dekomponert og analysert 10 dager etter ekstraksjon.

Prøvenummer	Prøve id	µg Hg / l i prøveløsning (korrigert for blindprøve)	Innvekt (g)	Fortynning (ml)	Resultat for hårprøve µg MeHg / l
218	E-3	1,68	0,0926	10,0	0,588
219	E-3	1,91	0,1035	10,0	0,596
220	E-3	1,64	0,1020	10,0	0,517
Gjennomsnitt	-	-	-	-	0,56
Standardavvik	-	-	-	-	0,04

Tabell 34 Stabilitet av MeHg i L-cystein, Hårprøve E-3 dekomponert og analysert 17 dager etter ekstraksjon

Prøvenummer	Prøve id	µg Hg / l i prøveløsning (korrigert for blindprøve)	Innvekt (g)	Fortynning (ml)	Resultat for hårprøve µg MeHg / l
218	E-3	1,784	0,0926	10,0	0,611
219	E-3	2,009	0,1035	10,0	0,626
220	E-3	1,622	0,1020	10,0	0,513
Gjennomsnitt	-	-	-	-	0,58
Standardavvik	-	-	-	-	0,06

Tabell 35 Bindprøver tilhørende analyse av hårprøve E-3

Blindprøve	Resultat (µg Hg / l)	Gjennomsnitt µg Hg / l	Standardavvik µg Hg / l
222	0,382	0,391	0,005
223	0,392		
224	0,392		
225	0,396		
226	0,393		

Resultater for analyse av metylkvikksølv i hår er gjengitt i Tabell 36.

Tabell 36 Bestemmelse av MeHg i hårprøver.

Prøve- nummer	Prøve id	µg Hg / l i prøveløsning (korrigert for blindprøve)	Innvekt (g)	Fortynning (ml)	Resultat for hårprøve mg MeHg / kg
207	Hårprøve 1	2,7388	0,1023	10	0,86
208	Hårprøve 2	1,6119	0,0982	10	0,53
209	Hårprøve 3	1,3856	0,0997	10	0,45
210	Hårprøve 4	3,1583	0,0947	10	1,08
211	Hårprøve 5	10,5273	0,1007	10	3,37
212	Hårprøve 6	1,0273	0,1088	10	0,30
213	Hårprøve 7	3,4501	0,0954	10	1,17
214	Hårprøve 8	5,7015	0,0943	10	1,95
215	Hårprøve 9	1,6496	0,1024	10	0,52
216	Hårprøve 10	0,6992	0,1010	10	0,22
217	Hårprøve 11	0,3485	0,1030	10	0,11
218	Hårprøve 12	1,1398	0,0980	10	0,38
246	Hårprøve 13	0,7243	0,0899	10	0,26
247	Hårprøve 14	1,0604	0,0936	10	0,37
248	Hårprøve 15	0,6007	0,0906	10	0,21
249	Hårprøve 16	0,5730	0,0938	10	0,20
250	Hårprøve 17	0,2584	0,0977	10	0,09
251	Hårprøve 18	8,8121	0,0460	10	6,18
252	Hårprøve 19	3,8167	0,0830	10	1,48
253	Hårprøve 20	0,8516	0,0470	10	0,58
254	Hårprøve 21	0,2481	0,0280	10	0,29
255	Hårprøve 22	0,2587	0,0160	10	0,52
256	Hårprøve 23	1,3740	0,0829	10	0,53
257	Hårprøve 24	0,2760	0,0653	10	0,14
258	Hårprøve 25	0,1949	0,0300	10	0,21
259	Hårprøve 26	0,4356	0,0370	10	0,38
260	Hårprøve 27	0,5446	0,0940	10	0,19
261	Hårprøve 28	1,1529	0,0760	10	0,49
262	Hårprøve 29	1,5907	0,0728	10	0,71
263	Hårprøve 30	0,9522	0,0910	10	0,34
264	Hårprøve 31a	0,6596	0,1013	10	0,21
265	Hårprøve 31b	1,0073	0,0980	10	0,33
	Hårprøve 32			10	0,51
	Hårprøve 33			10	0,26
	Hårprøve 34			10	0,12
266	Hårprøve 35	0,8261	0,9310	10	0,29
308	36	0,051	0,0952	10	0,02
309	37	-0,001	0,1050	10	< LOD
310	38	0,033	0,0991	10	< LOQ
311	IAEA-086	0,732	0,0996	10	0,24

Resultat for hårprøve 32, 33 og 34 er et gjennomsnitt av flere paralleller, derfor er ikke µg Hg / l eller innvekt oppgitt.

Resultater for analyse av total kvikksølv i hår er gjengitt i Tabell 37, tilhørende blindprøver finnes i Tabell 38.

Tabell 37 Bestemmelse av THg i hårprøver.

Prøve ID	Hårprøve	Resultat prøveløsning $\mu\text{g Hg / l}$	Fortynning (ml)	Innvekt (g)	THg mg / kg
274	1	1,790	50	0,0842	1,063
275	2	1,147	50	0,0946	0,606
276	3	0,919	50	0,0887	0,518
277	4	2,663	50	0,0945	1,409
278	5	7,358	50	0,0901	4,083
279	6	0,720	50	0,0881	0,409
280	7	2,422	50	0,0863	1,403
281	8	4,577	50	0,0918	2,493
282	9	3,119	50	0,0988	1,578
283	10	0,589	50	0,1015	0,290
284	11	0,321	50	0,1065	0,151
285	12	0,918	50	0,0903	0,509
286	13	0,516	50	0,0883	0,292
287	14	0,764	50	0,0848	0,451
288	15	0,529	50	0,1030	0,257
289	16	0,388	50	0,0814	0,239
290	17	0,213	50	0,0975	0,109
291	30	0,650	50	0,0833	0,390
292	31a	-	50	-	0,243
304	31b	-	50	-	0,384
305	32	0,905	50	0,0900	0,503
293	33	0,305	50	0,0482	0,316
306	34	0,297	50	0,1021	0,145
307	35	0,640	50	0,1017	0,315
-	36	0,315	-	-	0,047
-	37	0,305	-	-	0,042
-	38	0,252	-	-	0,045
CRM	IAEA-086	4,051	-	-	0,557
CRM	IAEA-086	1,316	50	0,1081	0,609

Sertifisert område for IAEA-086: 0,534 – 0,612

Resultat for prøve 31 a og b er gjennomsnitt av tre paralleller, derfor er ikke resultat for prøveløsning eller innvekt oppgitt.

For prøve 36-38 er beregning utført av analyseinstrumentet

Tabell 38 Blindprøver tilhørende bestemmelse av THg

Blindprøve total Hg	Resultat ( $\mu\text{g Hg / l}$ )	Gjennomsnitt $\mu\text{g Hg / l}$	0,0001
299	-0,0021	Standardavvik $\mu\text{g Hg / l}$	0,0033
300	0,0039	LOD	0,010
301	-0,0014	LOQ	0,033

## Vedlegg 2 Beregninger

Beregning av konsentrasjon metylkvikksølv i hårprøver

$$\text{Resultat (Hår)} = (\text{Analyseresultat} - \text{Blank}) * \frac{\text{Tilsatt toluen}}{\text{Uttatt toluen}} * \frac{\text{Tilsatt L cystein}}{\text{Utatt L cystein}} * \frac{\text{Molekylmasse MeHg}}{\text{Atommasse Hg}} * \frac{\text{Fortynningsvolum}}{\text{Innvekt}}$$

Eksempel for enkel tilbakeekstraksjon, CRM parallell 1.

$$\text{MeHg} \left( \frac{\mu\text{g}}{\text{g}} \right) = \left( 1,210 \left( \frac{\mu\text{g}}{\text{l}} \right) - 0,45 \left( \frac{\mu\text{g}}{\text{l}} \right) \right) * \frac{25(\text{ml})}{20(\text{ml})} * \frac{6,0(\text{ml})}{2,5(\text{ml})} * \frac{215,6(\text{g})}{200,6(\text{g})} * \frac{10(\text{ml})}{0,0984(\text{g})} * \frac{1}{1000 \left( \frac{\text{ml}}{\text{l}} \right)} = 250 \left( \frac{\mu\text{g}}{\text{g}} \right)$$

Beregning av gjenfinning av MeHg i spikede prøver.

$$\text{Gjenfinning} = \left( \frac{\text{Resultat justert for blank} (\mu\text{g MeHg}) - \text{Bidrag fra hår} (\mu\text{g MeHg})}{\text{Beregnet spiket mengde MeHg} (\mu\text{g})} \right) * 100\%$$

Resultat justert for blindprøve

$$= (\text{Analyseresultat} - \text{blindprøve}) * \frac{\text{Tilsatt toluen}}{\text{Uttatt toluen}} * \frac{\text{Tilsatt L cystein}}{\text{Utatt L cystein}} * \frac{\text{Molekylmasse MeHg}}{\text{Atommasse Hg}} * \text{Fortynningsvolum}$$

Eksempel, parallell nr 1

$$\text{Gjenfinning}(\%) = \left( \frac{(0,856 - 0,012)(\mu\text{g MeHg})}{0,88(\mu\text{g MeHg})} \right) * 100 \% = 96 \%$$

$$\text{Resultat justert for blindprøve} = ((5,400 - 0,089)\mu\text{g Hg/l}) * \frac{25(\text{ml})}{20(\text{ml})} * \frac{6,0(\text{ml})}{2,5(\text{ml})} * \frac{215,6 \text{ g}}{200,6 \text{ g}} * \frac{50(\text{ml})}{1000 \left( \frac{\text{ml}}{\text{l}} \right)} = 0,856(\mu\text{g MeHg})$$

### Vedlegg 3 Oversikt over nasjonalitet, bosted, kjønn og fødselsår til forsøkspersoner.

Prøve nummer	Nasjonalitet	Bosted	Fødselsår	Kjønn
1	Norway	Oppegård, Akershus	1949	Mann
2	Norway	Ås, Akershus	1960	Kvinne
3	Norway	Oppegård, Akershus	1971	Mann
4	Sweden	Charlottenberg	1961	Kvinne
5	Norway	Drammen, Buskerud	1946	Mann
6	Norway	Ski, Akershus	1970	Kvinne
7	Norway	Drammen, Buskerud	1956	Kvinne
8	Norway	Degernes, Østfold	1974	Mann
9	Norway	Oslo	1958	Mann
10	Canada	Sudbury, Ontario	1954	Mann
11	Canada	Sudbury, Ontario	1980	Kvinne
12	Canada	Sudbury, Ontario	1988	Kvinne
13	Canada	Sudbury, Ontario	1983	Kvinne
14	Canada	Sudbury, Ontario	1952	Mann
15	Canada	Sudbury, Ontario	1972	Mann
16	Canada	Lively, Ontario	1977	Kvinne
17	Canada	Sudbury, Ontario	1942	Mann
18	Canada	Yellowknife, NWR	1966	Mann
19	Canada	Yellowknife, Northwest Territories	2006	Mann
20	Canada	Yellowknife, Northwest Territories	1979	Kvinne
21	Canada	Yellowknife, Northwest Territories	1968	Mann
22	Canada	Yellowknife, NWR	1972	Mann
23	Canada	Yellowknife, NWR	1977	Kvinne
24	Canada	Yellowknife, NWR	1958	Kvinne
25	Canada	Yellowknife, Northwest Territories	1974	Mann
26	Canada	Yellowknife, NWR	1970	Kvinne
27	Canada	Yellowknife, Northwest Territories	1992	Kvinne
28	Canada	Yellowknife, Northwest Territories	1980	Kvinne
29	Canada	Yellowknife, Northwest Territories	1979	Kvinne
30	Norway	Stryn, Sogn og Fjordane	1958	Mann
31	Norway	Ski, Akershus	1970	Kvinne
32	Norway	Oppegård, Akershus	1965	Mann
33	Norway	Oppegård, Akershus	1972	Kvinne
34	Norway	Oppegård, Akershus	2008	Mann
35	Norway	Ås, Akershus	1960	Kvinne
36	Norway	Oppegård, Akershus	1968	Kvinne
37	Norway	Oppegård, Akershus	2000	Kvinne
38	Norway	Oppegård, Akershus	2004	Mann

## Vedlegg 4 Tillagning av løsninger

### Load til UltraClave oppslutning

20-30 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> og 2-3 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ble tilsatt til 320 ml vann.

### L-cysteinløsning

L-cysteinløsningen ble laget ved å løse 2,5 g L-cysteinhydroklorid- monohydrat, 31,25 g natriumsulfat og 1,93 g natriumacetat i vann og fortynne til 250 ml i en målekolbe.

### 8,5 % (V/V) saltsyre

Det ble laget 10 % saltsyre-løsning ved å måle opp 85 ml konsentrert saltsyre (destillert ultrapure) i et målebeger og fortynne til 1000 ml i en målekolbe.

### 10 % (w/V) tinnklorid

Det ble laget 10 % tinnklorid-løsning ved å veie inn 100 g tinnklorid i en målekolbe, tilsette 85 ml konsentrert HCl og fortynne til 1000 ml.

### Analysestandarder

Det ble laget 4 Hg standarder, på henholdsvis 0,5 µg/l, 1,0 µg/l, 5,0 µg/l og 10,0 µg/l ved å fortynne først sertifisert 1000 mg/l Hg til en stamløsning på 10,0 mg Hg / ml.

Stamløsningen ble så fortynnet til 200 µg Hg / ml.

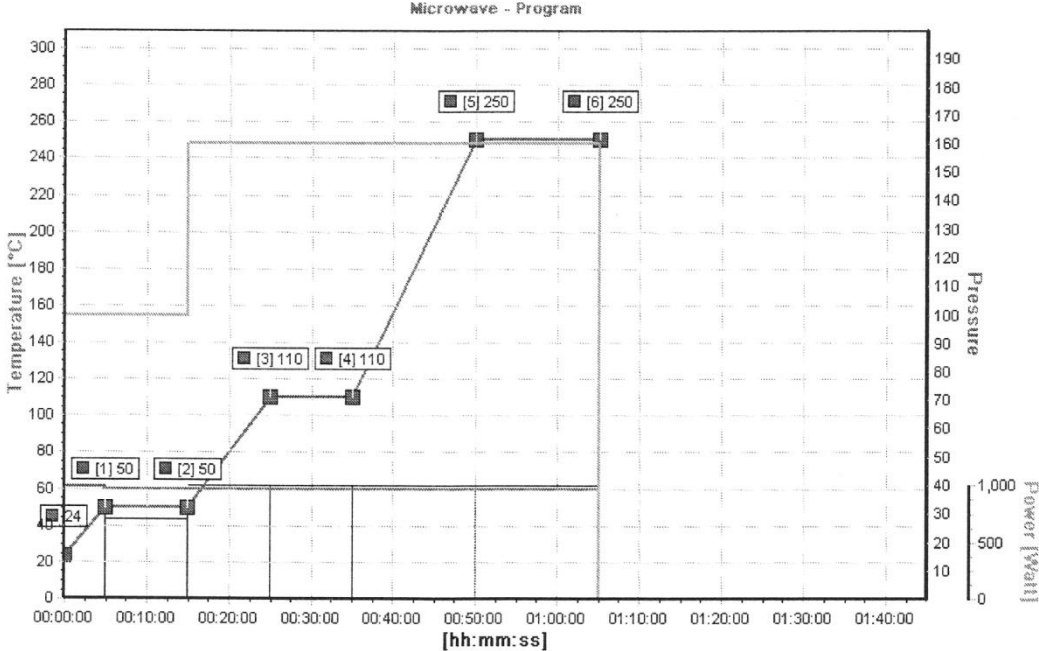
Standardene ble laget ved å fortynne følgende volumer (se **Error! Reference source not found.**1) av 200 µg / ml løsningen til 50,0 ml i målekolber. Det ble også laget en analytisk blank (standard 0)

#### Oversikt over kvikksølvstandarder brukt til kalibreringskurve

Standard nummer	Konsentrasjon (µg Hg /ml)	Tilsatt volum 200 µg Hg / ml
0	0,00	0,00
1	0,50	0,125
2	1,00	0,250
3	5,00	1,25
4	10,0	2,50



# Vedlegg 5 Temperaturprofil for UltraClave



## Vedlegg 6 Variansanalyse modifisering av metode

Variansanalyse for modifisering av metoden

$\alpha$  settes til 0,05

Nullhypotese: Alle settene er like

Alternativ hypotese: Det er forskjell på settene

sett1	sett 2	sett 3	sett 4
0,265	0,266	0,288	0,246
0,268	0,271	0,274	0,250
0,272	0,278	0,270	0,266
0,284	0,280	0,273	0,275
0,269	0,257	0,295	0,267

Variansanalyse: en-faktor fra excel

### SAMMENDRAG

Grupper	Antall	Sum	Gjennomsnitt	Varians
sett1	5	1,358	0,2716	5,43E-05
sett 2	5	1,352	0,2704	8,73E-05
sett 3	5	1,4	0,28	0,0001185
sett 4	5	1,304	0,2608	0,0001507

### Variansanalyse

Variasjonskilde	SK	fg	GK	F	P-verdi	F-krit
Mellom grupper	0,000927	3	0,000309	3,00876339	0,06107237	3,23887152
Innenfor grupper	0,0016432	16	0,0001027			
Totalt	0,0025702	19				

$F < F\text{-krit}$ , dermed kan ikke nullhypotesen forkastes og det kan ikke påstås noen forskjell på settene